



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MARISA CORREA DE MORAES

**Produção de Hidrolisados de Colágeno Visando Diferentes
Aplicações Tecnológicas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Rosiane Lopes da Cunha

ORIENTADORA

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de
mestrado defendida por Marisa Correa de Moraes,
aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e
orientada pela Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M791p Moraes, Marisa Correa de.
Produção de hidrolisados de colágeno visando
diferentes aplicações tecnológicas / Marisa Correa de
Moraes. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Colágeno. 2. Hidrólise. 3. Gelificação. 4.
Emulsificação. 5. Hidrolisados. I. Cunha, Rosiane
Lopes da. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production of hydrolysates collagen targeting different
technological applications

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Collagen

Hydrolysis

Gelation

Emulsification

Hydrolysates

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Rosiane Lopes da Cunha

Fabiana de Assis Perrechil

Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

Data da defesa: 17/08/2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos
Unicamp – Universidade Estadual de Campinas
(Orientadora)

Prof. Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri
Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos
UFG – Universidade Estadual de Goiás
(Membro Titular)

Dra. Fabiana de Assis Perrechil
Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos
Unicamp – Universidade Estadual de Campinas
(Membro Titular)

Profa. Dra. Vâni Regina Nicoletti Telis
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
USP – Universidade de São Paulo
(Membro Suplente)

Para ter sucesso neste mundo é preciso ser louco ou ser sábio.

(Barão de Montesquieu)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram direta ou indiretamente ligados a este trabalho, que me apoiaram intelectualmente, financeiramente e emocionalmente.

Aos meus pais, pelo amor, pela torcida e incentivo de sempre. Ao Diogo por estar ao meu lado, pelo amor dedicado e pela paciência. À minha irmã que, mesmo de longe, sempre se interessou e apoiou esta etapa de minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha, pelos conselhos, dicas e amizade. Além de ter me orientado no desenvolvimento desta tese, por muitas vezes se tornou uma ótima conselheira pessoal.

À Novaprom Food Ingredients Ltda., pelo tempo disponibilizado no início deste trabalho, pelo apoio financeiro e pelo fornecimento das matérias-primas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro à pesquisa.

Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões e correções que contribuíram para aperfeiçoar este trabalho.

À Helena e Ana Paula, pela ajuda no laboratório e apoio nas etapas preliminares do trabalho.

Aos meus ex-colegas de trabalho na Novaprom, pela amizade, momentos de distração e ótimas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Processos, pelas ajudas nas análises, conversas na salinha e cafezinhos na padaria.

Às amigas Aninha, Fezinha, Fabi e Lizi, pelo apoio e ajuda dentro e fora do laboratório, pelos ótimos papos e jantares.

Aos grandes amigos, de longa data, João e Luciana, pelo interesse e amizade.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1. Introdução	3
1.2. Objetivos	5
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Colágeno.....	9
2.2. Uso Industrial do Colágeno.....	13
2.3. Produtos à Base de Colágeno.....	13
2.4. Efeito das Variáveis de Processo sobre a Estrutura do Colágeno.....	16
2.4.1. Cinética de Hidrólise Térmica.....	19
2.5. Propriedade Gelificante do Colágeno.....	19
2.6. Propriedade Emulsificante do Colágeno.....	21
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material.....	25
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Preparo dos Ingredientes à Base de Colágeno.....	25
3.2.2. Preparo dos Géis.....	28
3.2.3. Preparo das Emulsões.....	28
3.2.3.1. Preparo das Dispersões de Colágeno.....	28
3.2.3.2. Processo de Homogeneização	28
3.2.4. Métodos de Análise.....	29
3.2.4.1. Caracterização da Matéria-prima.....	29
3.2.4.2. Caracterização dos Hidrolisados de Colágeno.....	29
3.2.4.2.1. Teor de Proteína Solúvel.....	29
3.2.4.2.2. Calorimetria Diferencial Exploratória.....	30
3.2.4.2.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	31

3.2.4.2.4. Carga Elétrica Superficial.....	31
3.2.4.3. Propriedades dos Géis.....	32
3.2.4.3.1. Propriedades Mecânicas dos Géis.....	32
3.2.4.3.2. Capacidade de Retenção de Água dos Géis.....	34
3.2.4.4. Caracterização das Emulsões.....	34
3.2.4.4.1. Distribuição de Tamanho de Gotas.....	34
3.2.4.4.2. Estabilidade à Cremeação.....	35
3.2.4.4.3. Microscopia Óptica.....	36
3.2.4.4.4. Comportamento Reológico.....	36
3.2.4.5. Análises Estatísticas.....	37
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1. Caracterização da Matéria-prima.....	41
4.1.1. Composição Centesimal.....	41
4.1.2. Carga Elétrica Superficial.....	42
4.1.3. Temperatura de Desnaturação.....	43
4.2. Caracterização dos Hidrolisados.....	44
4.2.1. Solubilidade Protéica.....	45
4.2.2. Carga Elétrica Superficial.....	50
4.2.3. Temperatura de Desnaturação.....	53
4.2.4. Distribuição de Massa Molecular.....	57
4.3. Propriedade Gelificante.....	60
4.3.1. Propriedades Mecânicas.....	63
4.3.2. Capacidade de Retenção de Água.....	72
4.4. Propriedades Emulsificantes.....	75
4.4.1. Estabilidade à Cremeação.....	76
4.4.2. Distribuição de Tamanho de Gotas.....	83
4.4.3. Comportamento Reológico.....	87
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS.....	91
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição de aminoácidos (g/100 g de proteína) do colágeno tipo I, hidrofobicidade e correspondentes valores de pI (Fonte: ASGHAR & HENRICKSON, 1982; LIU et al., 2004).....	12
Tabela 2. Condições dos processos de hidrólise.....	27
Tabela 3. Composição da matéria-prima.....	41
Tabela 4. Taxa de hidrólise (k) e teor de proteína solúvel no equilíbrio ($[T_{ps}]_{eq}$) obtido a partir do modelo de cinética de 1ª ordem e respectivo coeficiente de determinação (R^2).....	49
Tabela 5. Valores do pI dos hidrolisados obtidos a 50, 60 e 80°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10), após 6 horas de processo.....	52
Tabela 6. Valores de T_{onset} e T_d para os hidrolisados obtidos a 50°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10), após uma hora de hidrólise.....	57
Tabela 7. Valor de pH das emulsões O/A (10% (m/m)) de óleo e 0,5% (m/m) de colágeno.....	75
Tabela 8. Diâmetro médio de gotas (μm) e polidispersão (Span) das emulsões estabilizadas por hidrolisados de colágeno produzidos a 60°C, nos valores de pH igual a 3, 5, 7 e 10.....	84
Tabela 9. Parâmetros reológicos das emulsões preparadas com os hidrolisados de colágeno obtidos a 60°C, nos diferentes valores de pH 3, 5, 7 e 10).....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura esquemática do colágeno tipo I (Fonte: FRIESS, 1998).....	10
Figura 2. Representação esquemática da estrutura cristalina (C), das moléculas distribuídas aleatoriamente (RC) ou em conformação helicoidal (H) (Fonte: BIANCHI et al., 1967).....	16
Figura 3. Diagrama de produção dos hidrolisados de colágeno.....	26
Figura 4. Potencial zeta da matéria-prima nos valores de pH entre 3 e 11.....	42
Figura 5. Termograma da matéria-prima em triplicata.....	44
Figura 6. Teor de proteína solúvel (g de proteína solúvel/100 g de proteína) nos valores de pH: A) 3, B) 5, C) 7 e D) 10 nas temperaturas de 50 (♦), 60 (■) e 80°C (▲), ao longo de 6 horas e curvas de ajustes obtidas a partir do modelo de cinética de 1ª ordem.....	46
Figura 7. Variação do potencial zeta em função do pH dos hidrolisados obtidos em diferentes valores de pH: 3 (♦), 5 (■), 7 (▲) e 10 (×) e temperaturas de A) 50°C, B) 60 °C e C) 80 °C, após 6 horas de processo.....	51
Figura 8. Termogramas dos hidrolisados de colágeno obtidos a 50°C e nos valores de pH igual a 3, 5, 10 e 7, após 1 hora de processo.....	54
Figura 9. Termogramas dos hidrolisados de colágeno obtidos a 60°C e nos valores de pH igual a 3, 5, 10 e 7, após 1 hora de processo.....	55
Figura 10: Termogramas dos hidrolisados de colágeno obtidos a 80°C e nos valores de pH igual a 3, 5, 10 e 7, após 1 hora de processo.....	55
Figura 11. Distribuição de massa molecular dos hidrolisados de colágeno obtidos a 50, 60 e 80°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10) em todos os tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas).....	58
Figura 12: Géis de hidrolisados de colágeno obtidos nos diferentes tratamentos, nos valores de pH de 3, 5, 7 e 10 e temperaturas de 50, 60 e 80°C, ao longo do tempo de 6 horas.....	62

Figura 13: Tensão na ruptura dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno obtidos a A) 50°C, B) 60°C e C) 80°C, nos diferentes valores de pH (3 ■, 5 ■, 7 ■ e 10 ■) ao longo de 6 horas de processo.....	64
Figura 14: Deformação na ruptura dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno obtidos a A) 50°C, B) 60°C e C) 80°C, nos diferentes valores de pH (3 ■, 5 ■, 7 ■ e 10 ■) ao longo de 6 horas de processo.....	68
Figura 15: Módulos de elasticidade dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno obtidos a A) 50°C, B) 60°C e C) 80°C, nos diferentes valores de pH (3 ■, 5 ■, 7 ■ e 10 ■) ao longo de 6 horas de processo.....	71
Figura 16: Capacidade de Retenção de Água dos tratamentos nos valores de pH igual A) 3, B) 5, C) 7 e D) 10, nas temperaturas de 50 (■), 60 (■) e 80°C (■), ao longo de 6 horas.....	73
Figura 17: Efeito do pH e do tempo de hidrólise no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por 0,5% de hidrolisado de colágeno. Tempos de processo de (◆) 1 hora, (■) 3 horas e (▲) 6 horas.....	77
Figura 18: Emulsões estabilizadas com colágeno hidrolisado a 60°C e em valores de pH 3, 5, 7 e 10. Armazenamento em 1 e 15 dias.....	78
Figura 19: Micrografias das emulsões O/A estabilizadas com 0,5% de hidrolisado de colágeno obtidos em tratamentos a 60°C e pH 3 e 5. Aumento de 100x e barra de escala de 10µm. O tempo acima das figuras representa o ocorrido no processo de hidrólise.....	81
Figura 20. Micrografias das emulsões O/A estabilizadas com 0,5% de hidrolisado de colágeno obtidos em tratamentos a 60°C e pH 7 e 10. Aumento de 100x e barra de escala de 10µm. O tempo acima das figuras representa o ocorrido no processo de hidrólise.....	82
Figura 21: Distribuição de tamanho de gotas das emulsões estabilizadas por hidrolisados produzidos a 60°C, nos valores de pH iguais a A) 3, B) 5, C) 7 e D) 10, nos tempos de 1 (◆), 3 (■) e 6 (▲) horas de hidrólise.....	86

Figura 22: Curvas de escoamento da emulsão estabilizada pelo hidrolisado de colágeno tratado a 60 °C e pH A) 3, e das fases superiores obtidas nos tratamentos em valores de pH iguais a B) 5, C) 7 e D) 10, nos tempos de 1 (◆), 3 (■) e 6 (▲) horas de processo.....89

RESUMO

O colágeno é um subproduto de matadouro sendo amplamente utilizado como ingrediente na indústria, depois de extraído e purificado. As propriedades tecnológicas do colágeno estão intimamente relacionadas com a distribuição da massa molecular de suas fibras, que varia de acordo com as características da matéria-prima e condições do processo de obtenção do material. Com o intuito de avaliar o efeito das variáveis de processo (tempo, temperatura e pH), o colágeno foi extraído da camada interna da pele bovina e submetido a hidrólise em diferentes condições de temperatura (50, 60 e 80°C) e pH (3, 5, 7 e 10) durante 6 horas. Os produtos obtidos foram avaliados quanto ao teor de proteína solúvel, carga superficial, distribuição de massa molecular, desnaturação protéica, capacidade gelificante e emulsificante. Os produtos mostraram teor de proteína solúvel entre 5 e 82% (m/m), sendo os maiores valores obtidos em tratamentos realizados em temperatura mais elevada e/ou condições mais ácidas. Produtos obtidos em condições extremas de pH (3 e 10) ou temperaturas acima ou similar à temperatura de desnaturação do colágeno (80 e 60°C, respectivamente) tiveram sua estrutura mais desnaturada. Em geral, os hidrolisados obtidos em pH ácido formaram géis mais firmes, exceto o produzido a 80°C. Já os hidrolisados obtidos nos outros valores de pH (5, 7 e 10) formaram géis com baixos valores de tensão de ruptura porém, quando tratados em temperatura acima da temperatura de desnaturação e maior tempo de processo, apresentaram uma melhora nas propriedades gelificantes. A capacidade de retenção de água (CRA) foi próxima de 100%, exceto para hidrolisados obtidos em pH igual a 7 e 10 e temperatura de 50°C. A capacidade emulsificante destes hidrolisados também foi avaliada em emulsões óleo/água (O/A). A estabilidade das emulsões aumentou com a redução do pH e com o aumento do tempo de

hidrólise, porém somente a emulsão em pH 3 e 6 horas de hidrólise não apresentou separação de fases. As emulsões mais estáveis (pH 3) apresentaram gotas com baixa polidispersão e diâmetro médio entre 1,5 e 5 μm . Em valores de pH próximo ao pI do colágeno houve a formação de agregados que desestabilizaram as emulsões, o que acarretou elevados valores de diâmetro médio (entre 8 e 17 μm). As emulsões estáveis mostraram comportamento pseudoplástico, porém nas emulsões em que ocorreu a separação de fases, a fase inferior (aquosa) sempre apresentou comportamento Newtoniano, enquanto que a fase creme foi pseudoplástica. De maneira geral, o uso de temperaturas mais amenas e pH ácido, possibilita a produção de hidrolisados com boas propriedades mecânicas, no entanto, em temperatura mais elevada obtém-se um produto com alta solubilidade. Se o objetivo é a obtenção de um gel com alta capacidade de retenção de água o mais indica-se utilizar pH abaixo ou próximo do pI ou elevadas temperaturas. Para melhorar a capacidade emulsificante o uso em pH abaixo do pI é o mais indicado.

Palavras-chave: colágeno, hidrólise, gelificação, emulsificação, hidrolisados

ABSTRACT

Collagen is a byproduct of the slaughterhouse that is widely used as an ingredient in industry, after being extracted and purified. The technological properties of collagen are closely related to the molecular weight distribution of the fibers, which varies with the characteristics of raw materials and process conditions used to obtain the material. In order to evaluate the effect of process variables (time, temperature and pH), collagen was extracted from the inner layer of bovine hide and subjected to hydrolysis under different conditions of temperature (50, 60 and 80°C) and pH (3, 5, 7 and 10) for 6 hours. The products were evaluated for soluble protein content, surface charge, molecular weight distribution, protein denaturation, gelling and emulsifying capacity. The products showed soluble protein content between 5 and 82% (w / w), in which the highest values were obtained in the treatments carried out at higher temperature and/or under more acidic conditions. Products obtained under extreme conditions of pH (3 and 10) or temperatures above or similar to the collagen denaturation temperature (80 and 60°C, respectively) were more denatured. In general, the hydrolysates obtained at acidic pH formed firmer gels, except that produced at 80°C. The hydrolysates obtained in the other pH values (5, 7 and 10), in turn, formed gels with low values of strain at fractures but, when treated at temperatures above the denaturation during long time, they showed an improvement in those properties. The water holding capacity (WHC) was approximately 100%, except for hydrolysates obtained at pH 7 and 10 and temperature of 50°C. The emulsifying capacity of such hydrolysates, was also evaluated in oil/water (O/W) emulsions. The stability of the emulsion increases with decreasing pH and increasing hydrolysis time, but only at pH 3

and 6 hours of process the emulsion showed no phase separation. These emulsions showed low polydispersity and droplet size between 1.5 and 5 μm . At pH values near the pI of collagen the formation of aggregates that destabilized the emulsions occurred, which resulted in higher droplet size (between 8 and 17 μm). The stable emulsions showed shear-thinning behavior, but in case of emulsions in which phase separation occurred, the lower phase (aqueous) always presented Newtonian behavior, while the cream phase was a shear-thinning fluid. In general, lower temperatures and acid pH, allows the production of hydrolysates with good mechanical properties, however, at higher temperature gives a product with high solubility. If the goal is to obtain a gel with high water retention capacity, it is indicated using pH below or close to the pI or elevated temperatures. To improve the emulsifying capacity the use of pH below the pI is the most suitable.

Key-words: collagen, hydrolysis, gelation, emulsification, hydrolysates

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento demográfico mundial, há maiores demandas de alimentos e bens de consumo, como calçados e outros produtos feitos de couro. Com isso, também crescem os rebanhos animais para suprir esta necessidade de mercado (GUTTERRES, 2006). No primeiro trimestre de 2011 foram abatidas 7,097 milhões de cabeças de bovinos, representando queda de 1,4% em relação ao trimestre anterior, porém um aumento de 0,2% em relação ao mesmo período de 2010 (IBGE, 2011). Além da carne e do couro, é possível aproveitar quase todas as outras partes do boi como crina e pelos (fabricação de pincéis), miúdos (indústria alimentícia e farmacêutica), sebo (sabão, tintas, velas e biodiesel) e pele (produção de derivados de colágeno, cápsulas farmacêuticas, filmes fotográficos e cosméticos) (ABCZ, 2009).

O colágeno é um subproduto de matadouros e frigoríficos, encontrados em peles, tendões, músculos, cartilagens, ossos, córneas, aponevroses e órgãos. Depois de extraído e purificado, a utilização na indústria é ampla, com aplicação em produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentícios. Em cosméticos é utilizado principalmente em cremes hidratantes devido à presença de prolina e hidroxiprolina (REBELLO, 2005). Na indústria alimentícia é utilizado para enriquecimento proteico de algumas formulações, mas sua maior importância está na sua utilização como tripa reconstituída para embutidos e como agente estabilizante em emulsões cárneas. Na indústria farmacêutica, é utilizado para curativos de ferimentos e queimaduras, agente hemostático, veículo para medicamentos, suturas, lentes de contato e biopróteses (PEDREIRA, 2012).

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. Existem diversos tipos de colágeno que são geneticamente diferentes, mas sua principal função é estrutural (VARGAS et al., 1997). Além de ser um material de origem natural, propriedades como retenção de água e capacidade de formação de géis podem, juntamente com o efeito emulsificante, tornar o colágeno atrativo como um ingrediente alimentício. As propriedades de capacidade de retenção de água e de gelificação do colágeno permitem a sua utilização como substituto de gordura em produtos cárneos. Quando o seu teor não supera 15% com relação à massa de proteína total, o colágeno possui uma preponderante função estabilizante e texturizante em embutidos de carne (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002). Além disso, devido à sua propriedade emulsificante, o colágeno pode atuar como ligação entre a gordura e a carne magra, sendo bastante útil como um aditivo em produtos cárneos (LIU & OCKERMAN, 2001).

As propriedades tecnológicas do colágeno estão intimamente relacionadas com a distribuição da massa molecular de suas fibras, que varia de acordo com as características da matéria-prima e condições do processo de obtenção do material (OLIJVE et al., 2001). A distribuição de massa molecular e, conseqüentemente, a densidade de carga alteram as propriedades funcionais do colágeno através de modificações da organização das fibras em estruturas helicoidais ou desordenadas. Esta organização das fibras depende de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que são reguladas por fatores como temperatura, pH e força iônica. Vários autores mostraram a influência do pH, temperatura e força iônica na alteração da estrutura molecular e na densidade de cargas da proteína de colágeno (ACHILLI & MANTOVANI, 2010).

Quando as soluções de colágeno são aquecidas a temperaturas acima da temperatura de desnaturação, as pontes que estabilizam a tripla hélice são quebradas, as moléculas adotam uma organização desordenada e perdem a estrutura fibrilar. Por outro lado, as alterações de pH levam à modificação do número de grupos carregados positivamente ou negativamente. Desta forma, as interações eletrostáticas que estabilizam a rede são alteradas, podendo aumentar ou diminuir o diâmetro da fibrila de colágeno e, conseqüentemente a estrutura da proteína (ACHILLI & MANTOVANI, 2010). Tais mudanças afetam as propriedades emulsificantes, gelificantes e de retenção de água dos produtos obtidos a partir do colágeno.

Apesar do crescente uso desta proteína em materiais biomédicos e cosméticos, ainda existe uma escassez de estudos sobre a influência das variáveis de processo (temperatura e pH) nas propriedades tecnológicas de ingredientes a base de colágeno.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos da temperatura e pH na variação das propriedades tecnológicas do colágeno extraído de pele bovina ao longo do tempo de hidrólise. Com este intuito, os objetivos específicos foram:

- Analisar os efeitos de valores de temperaturas abaixo, igual e acima da desnaturação do colágeno (50, 60 e 80°C, respectivamente), e de pH neutro, abaixo, igual e acima do ponto isoelétrico (7, 3, 5 e 10, respectivamente) nas propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água dos géis de colágeno expostos a diferentes tempos de hidrólise (até 6 horas) .

- Avaliar a densidade de carga, distribuição de massa molecular e modificações estruturais dos produtos formados a partir dos processos de hidrólise realizados sob diferentes condições de temperatura (50, 60 e 80°C) e pH (3, 5, 7 e 10) .
- Avaliar a capacidade emulsificante dos produtos obtidos nos diferentes valores de pH e na temperatura de 60°C, a partir da distribuição de tamanhos de gotas e estabilidade das emulsões preparadas com estes ingredientes.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo animal, chegando a representar cerca de 30% de toda a proteína do corpo dos vertebrados (HORN et al., 2009). Além de sua enorme abundância, essa proteína se destaca por sua ampla aplicação comercial (BRODSKY & PERSIKOV, 2005), sendo principalmente empregada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Atualmente, pelo menos 29 diferentes tipos de colágenos são conhecidos (HORN et al., 2009), os quais apresentam diferenças em relação à composição de aminoácidos, massa molecular e sua localização no animal (OAKENFULL et al., 1997). Apesar dos diversos tipos de colágeno, somente alguns se organizam na forma de fibras. Dentre estes se destaca o colágeno do tipo I, que é o mais abundante na maioria dos animais, sendo principalmente encontrado na pele (80% da matéria seca da pele adulta), tendões (90% da matéria seca), ligamentos e ossos (90% da matéria seca).

A estrutura do colágeno do tipo I é basicamente composta por uma seqüência específica de aminoácidos formada por subunidades de repetição Glicina-X-Y, onde X e Y são freqüentemente prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Figura 1a) (OAKENFULL et al., 1997). As estruturas secundária e terciária do colágeno tipo I são formadas por três cadeias polipeptídicas, sendo duas levógiras (α_1) que se enrolam em uma dextrógira (α_2), formando a estrutura de α -hélice chamada de tropocolágeno (Figura 1b). Esta estrutura particular, chamada de tripla hélice, é estabilizada principalmente por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (ASGHAR & HENRICKOSN, 1982). No entanto, as extremidades das cadeias polipeptídicas são globulares, onde se localizam ligações cruzadas intermoleculares que atuam na estabilização da estrutura das fibrilas colagenosas. O

monômero de tropocolágeno possui massa molecular média de 300 kDa e 300 nm de comprimento com 1,5 nm de diâmetro, dimensões que propiciam elevada viscosidade às soluções. As moléculas de tropocolágeno se rearranjam longitudinal e bilateralmente formando uma estrutura quaternária (Figura 1c), que se agregam originando as miofibrilas e posteriormente as fibras (FRIESS, 1998). Este processo em que as moléculas de colágeno se organizam *in vitro* de forma ordenada é chamado fibrilogênese e é dependente da temperatura, pH e força iônica do meio (HORN, 2009).

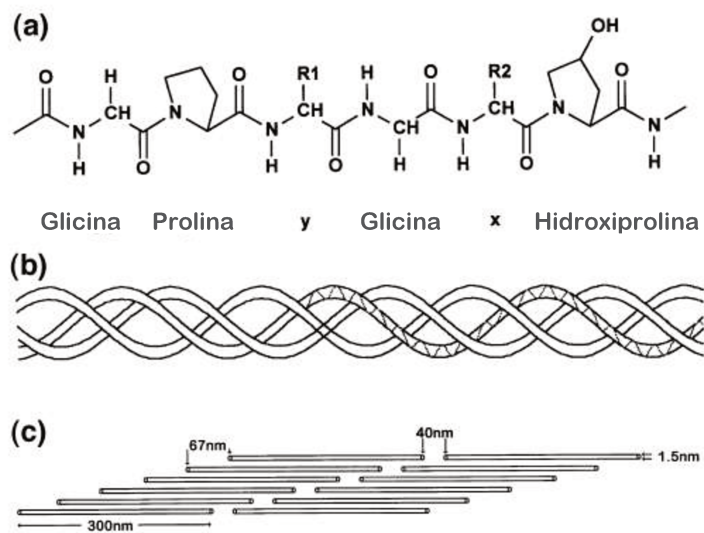


Figura 1. Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Seqüência primária de aminoácidos, (b) estrutura secundária e terciária e (c) estrutura quaternária (Fonte: FRIESS, 1998).

A molécula de colágeno (Tabela 1) é constituída por aproximadamente 60% de resíduos hidrofóbicos e 40% de hidrofílicos que conferem à proteína um caráter anfifílico (BAILEY & LIGHT, 1989). Os aminoácidos essenciais metionina, treonina e histidina estão presentes em pequena quantidade, enquanto que cisteína e triptofano estão comumente ausentes. O baixo teor de aminoácidos essenciais compromete o valor

nutricional do colágeno. Entretanto, combinações de colágeno com alguns aminoácidos podem ser viáveis para suplementar a alimentação humana ou animal. A substituição da carne gorda ou magra em embutidos suínos ou bovinos até o nível de 20% de colágeno não prejudica as propriedades funcionais do produto final e os requerimentos nutricionais da dieta (RAO & HENRICKSON, 1983).

Os aminoácidos não-essenciais (glicina, prolina, hidroxiprolina, arginina e alanina) constituem 2/3 dos resíduos, sendo que a elevada quantidade de hidroxiprolina (~11%) é utilizada para indicar o teor de colágeno de um material, uma vez que este aminoácido não está comumente presente em proteínas não colagenosas (ASGHAR & HENRICKSON, 1982). O conteúdo de prolina e hidroxiprolina é particularmente relevante para a capacidade gelificante do colágeno (LEWARD, 1986). Embora a prolina seja importante, acredita-se que a hidroxiprolina desempenhe uma função singular na estabilização da tripla hélice do colágeno devido à sua capacidade de ligação com as moléculas de hidrogênio, através de seus grupos hidroxila (BURJANDZE, 1979).

Tabela 1: Composição de aminoácidos (g/100g de proteína) do colágeno tipo I, hidrofobicidade e correspondentes valores de pI (Fonte: ASGHAR & HENRICKSON, 1982; LIU et al., 2004)

Aminoácidos Essenciais	%	HIDROFOBICIDADE	pI
Cisteína	Ausente	Hidrofilico	5,15
Fenilalanina	1,2	Hidrofóbico	5,76
Histidina	0,6	Hidrofilico	7,64
Isoleucina	1,1	Hidrofóbico	6,04
Leucina	2,5	Hidrofóbico	6,04
Lisina	2,5	Hidrofilico	9,47
Metionina	0,5	Hidrofóbico	5,71
Treonina	1,8	Hidrofilico	5,60
Triptofano	Ausente	Hidrofóbico	5,88
Valina	2,4	Hidrofóbico	6,02
Aminoácidos Não-essenciais	%	HIDROFOBICIDADE	pI
Asparagina	4,6	Hidrofilico	5,43
Glutamina	7,5	Hidrofilico	5,65
Alanina	11,1	Hidrofóbico	6,11
Arginina	4,8	Hidrofilico	10,76
Glicina	33,0	Hidrofóbico	6,06
Hidroxilisina	1,0	Hidrofilico	9,15
Hidroxiprolina	10,9	Hidrofilico	5,74
Prolina	11,7	Hidrofóbico	6,30
Serina	3,0	Hidrofilico	5,70
Tirosina	0,2	Hidrofilico	5,63

2.2 USO INDUSTRIAL DO COLÁGENO

Um grande número de ingredientes pode ser obtido a partir do processamento do colágeno, tais como a gelatina, a fibra, o pó e os hidrolisados de colágeno.

Atualmente, o colágeno tem sido utilizado como biomaterial nas áreas médica e farmacêutica devido à sua baixa antigenicidade, biocompatibilidade, além de ser facilmente absorvido pelo corpo humano (FRIESS, 1998). Já na indústria de cosméticos, o colágeno tem sido usado como umectante na produção de cremes, tendo grande apelo comercial já que o colágeno presente nas camadas inferiores da pele é responsável pela sua firmeza e elasticidade (BAILEY & LIGHT, 1989). Na indústria de alimentos, o colágeno é tradicionalmente utilizado na forma de gelatina, que é um polipeptídeo solúvel e completamente desnaturado, obtido a partir do aquecimento controlado do colágeno em meio alcalino ou ácido. No entanto, o colágeno com baixo teor de hidrólise tem sido pouco aplicado como um ingrediente funcional na indústria de alimentos, provavelmente devido à sua baixa solubilidade (MONTERO & BORDERIAS, 1991), apesar de sua elevada capacidade de retenção de água e de formação de géis (NEKLYUDOV, 2003).

2.3 PRODUTOS À BASE DE COLÁGENO

A gelatina é uma proteína solúvel obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno. Inicialmente é realizado um pré-tratamento químico que quebra as ligações não-covalentes e desorganiza a estrutura macromolecular. Posteriormente, um aquecimento rompe as pontes de hidrogênio e as ligações covalentes, desestabilizando a tripla hélice. A principal propriedade da gelatina é a capacidade de produzir géis estáveis em temperaturas abaixo de

40°C, sendo que este gel é termorreversível. Por estar completamente desnaturada, a gelatina pode ser usada na indústria alimentícia como agente gelificante e emulsificante (GOMÉZ-GUILLÉN et al., 2011). Existem dois tipos de gelatina, que são classificadas de acordo com o tipo de matéria-prima que as originou: gelatina tipo A, que é produzida a partir de pele e ossos de suínos, e gelatina tipo B, produzida de peles e ossos bovinos (SCHRIEBER & GAREIS, 2007). As gelatinas apresentam diferenças em relação à distribuição de massa molecular, sendo que a tipo A possui distribuição mais homogênea, contendo maior quantidade de polipeptídeos de baixa massa molecular, enquanto a tipo B apresenta uma maior proporção de frações de alta massa molecular. Essas diferenças de distribuição de massa molecular afetam diretamente a funcionalidade da gelatina. Em termos gerais, uma maior proporção de frações de baixa massa molecular aumenta o tempo necessário para a formação de gel. Além disso, a força de gel, também conhecida como “Bloom” da gelatina, está relacionada à soma das cadeias α e β juntamente com os peptídeos de maior cadeia. Já a viscosidade pode ser correlacionada diretamente com a massa molecular média (WARD & COURTS, 1977).

A fibra e o pó de colágeno são obtidos a partir da camada subcutânea da derme bovina, que é um subproduto dos curtumes. Este material é previamente submetido a um processo químico para delipidação (retirada da gordura), para depois passar por um processo de secagem a temperaturas moderadas e moagem (NICOLETI & TELIS, 2009). Durante o processo de moagem, duas frações de diferentes tamanhos e formatos de partículas são geradas, sendo que as partículas maiores são denominadas como fibras de colágeno e apresentam diâmetro equivalente próximo a 36 μm e o pó de colágeno é constituído da porção mais fina, com cerca de 1 μm (MAXIMO & CUNHA, 2010).

Máximo & Cunha (2010) observaram, através de análise eletroforética, que a fibra de colágeno apresenta 3 bandas com alta intensidade, que provavelmente corresponde às 3 cadeias da tripla hélice, sendo que uma delas possui massa molecular em torno de 180 kDa (β) e as outras duas entre 82 e 115 kDa (α_1 e α_2). Já o pó de colágeno apresenta somente uma banda com maior intensidade (β) e as outras duas com menor intensidade. A presença de cadeias menores e a maior exposição dos grupos hidrofílicos proporcionou aos géis de colágeno em pó melhores propriedades mecânicas, quando comparados aos formados por fibra de colágeno.

Já os denominados hidrolisados protéicos são definidos como proteínas que estruturalmente foram quebradas, química ou enzimaticamente, e convertidas em peptídeos menores de massa molecular variável (SKANDERBY, 1994). São produtos da hidrólise limitada do colágeno de pele suína ou bovina, sendo constituídos por peptídeos de massas moleculares entre 2,5 e 10 kDa (OESSER et al., 1999). Peptídeos menores apresentam mais resíduos polares que, devido à facilidade de formarem ligações de hidrogênio com a água, aumentam sua solubilidade (GBOGOURI et al., 2004). Devido às suas características físicas, propriedades tecnológicas e funcionais, os hidrolisados protéicos apresentam grande potencial de aplicação em cosméticos para pele e cabelo, formulações farmacêuticas, e em diversos produtos alimentícios.

2.4 EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO SOBRE A ESTRUTURA DO COLÁGENO

Ao se tratar de macromoléculas, como é o caso do colágeno, três situações podem ser encontradas na presença de um solvente: moléculas distribuídas aleatoriamente e desordenadamente, moléculas com conformação helicoidal ou um precipitado cristalino. A ocorrência de uma dessas situações depende do pH, da temperatura e da força iônica do meio. Muitos estudos tentaram mostrar o papel destas variáveis nas transformações das estruturas dessas macromoléculas, as quais estão esquematizadas na Figura 2.

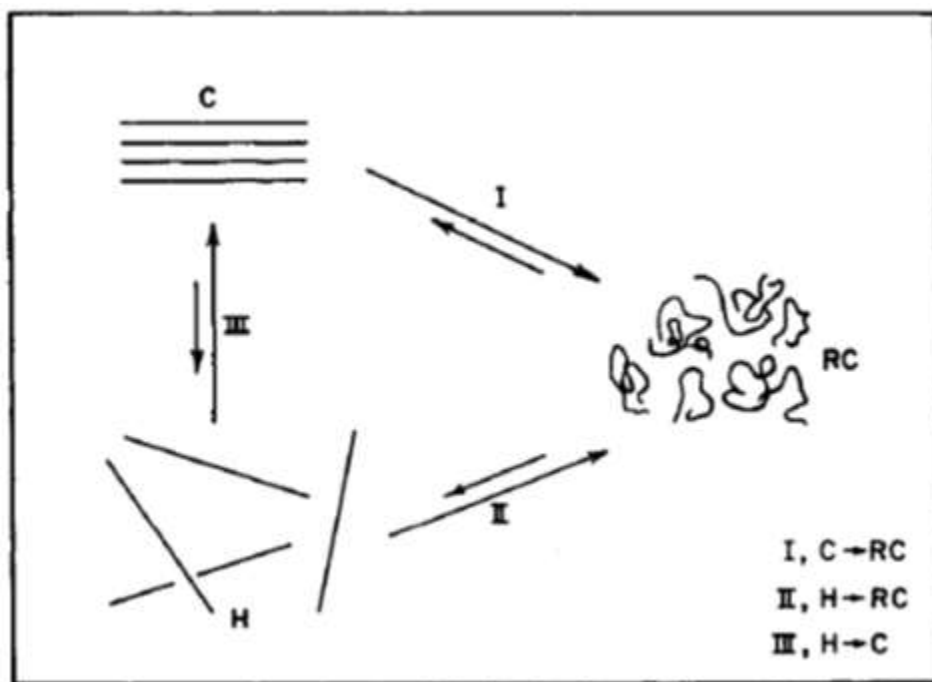


Figura 2. Representação esquemática da estrutura cristalina (C), das moléculas distribuídas aleatoriamente (RC) ou em conformação helicoidal (H), bem como das transformações que podem ocorrer entre estas estruturas. I – Transformação da forma cristalina para uma estrutura aleatória, II – Transformação de moléculas aleatórias para conformação helicoidal, III – Passagem da estrutura cristalina para a conformação helicoidal (Fonte: BIANCHI et al., 1967).

O efeito da adição de sais na estrutura helicoidal do colágeno é um típico exemplo da Transformação II, entretanto, dependendo da concentração e tipo de sal, as moléculas do colágeno podem precipitar, passando diretamente da conformação helicoidal para precipitados cristalinos (Transformação III). Esta fase precipitada pode se tornar novamente solúvel, por exemplo, com o aumento da temperatura, passando a ser uma solução de moléculas distribuídas aleatoriamente. Este fato, juntamente com um encolhimento das fibras de colágeno causado por mudanças no pH ou na força iônica, é um exemplo da Transformação I. Estas transformações afetam a densidade de carga e a distribuição de massa molecular do colágeno, causando alterações em suas propriedades funcionais (BIANCHI et al., 1967).

Como a composição aminoacídica do colágeno apresenta alta concentração de aminoácidos apolares e uma significativa concentração de polares (ASGHAR & HENRICKSON, 1982), sugere-se que a desnaturação da proteína pode expor os grupos hidrofílicos e aumentar a solubilidade desta proteína. Os efeitos do aquecimento do colágeno podem ser reversíveis ou irreversíveis. O aquecimento moderado pode resultar em um desdobramento local da proteína. Este desdobramento pode ser devido à quebra de um número pequeno de ligações consecutivas de hidrogênio. No entanto, o aquecimento severo resulta em uma transformação da estrutura helicoidal a uma conformação desordenada, que é irreversível e dependente do tempo (BRANDTS, 1969; PRIVALOV, 1982). A temperatura de desnaturação do colágeno situa-se entre 53 e 63°C. Acima dessa temperatura, as fibras de colágeno tendem a encolher um quarto de seu comprimento conferindo maior elasticidade e, por consequência, levando à formação de uma rede de gel com alta capacidade de retenção de água (MAXIMO & CUNHA, 2010).

As interações eletrostáticas são reguladas por fatores como pH e força iônica. A formação de grupos carregados nas moléculas de colágeno pode resultar em interações eletrostáticas que podem afetar o tamanho das suas fibras (responsáveis por conferir força e resistência) e, conseqüentemente, a estrutura da rede (ROSENBLATT et al., 1994; WOOD & KEECH., 1960). Isto significa que a capacidade reativa do colágeno está relacionada com seu ponto isoelétrico (pI ~ 5,5). Quando o colágeno está no ponto isoelétrico, ambos os grupos carboxílico e amino estão ionizados e há atração entre as cargas opostas nas cadeias de proteína, diminuindo a distância entre as cadeias e o inchamento ou solubilidade é mínimo.

Em pH alcalino há uma redução do diâmetro da fibrila e um aumento de seu comprimento, o que pode alterar as propriedades mecânicas (ACHILLI & MANTOVANI, 2010) e levar à uma redução da capacidade de gelificação (WOOD & KEECH., 1960). Já em valores de pH abaixo do pI (~ 5,5) há um aumento de íons de hidrogênio e as partículas da proteína ficam carregadas positivamente, causando uma repulsão entre as mesmas. Estas modificações provocam a abertura da tripla hélice, facilitando a interação com a água e aumentando sua solubilidade (MÁXIMO & CUNHA, 2010). Entretanto, em pH abaixo do pI observam-se densidade de carga mais altas do que em pH acima do pI, devido ao aumento de íons de hidrogênio ligados aos aminoácidos do colágeno. Este fato pode explicar porque a solubilidade é mais baixa em pH alcalino quando comparado ao pH ácido (SANTANA et al., 2011). Esta abertura da tripla hélice também modifica a hidrofobicidade superficial da proteína, podendo causar melhora na sua capacidade emulsificante (NEKLYUDOV, 2003).

2.4.1 CINÉTICA DA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

O estudo da cinética de hidrólise de proteínas é complicado, devido à existência de grande número de ligações peptídicas que são quebradas (MÁRQUEZ & VÁZQUEZ, 1999; MORENO & CUADRADO, 1993). Assim, há uma dificuldade em estabelecer modelos cinéticos para a hidrólise destas macromoléculas. Modelos muito simples têm aplicação limitada e podem representar inadequadamente o mecanismo real, enquanto que um modelo complicado pode não ser analisado estatisticamente. Para contornar esses problemas, pode-se utilizar uma equação que relacione o aumento do teor de proteína solúvel ao longo do tempo de hidrólise. Curvas que apresentam crescimento limitado, mostram que a medida que o tempo aumenta, o valor de $f(t)$ fica próximo de “a” sem ultrapassá-lo, como apresentado na Equação 1.

$$f(t) = a.(1 - e^{-kt}) \rightarrow T_{ps} = [T_{ps}]_{eq} . (1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

onde T_{ps} é o teor de proteína solúvel no tempo “t”, $[T_{ps}]_{eq}$ o teor de proteína solúvel no equilíbrio, t o tempo de processo e k a taxa de reação.

2.5 PROPRIEDADE GELIFICANTE DO COLÁGENO

O colágeno tem uma ampla utilização na indústria alimentícia como ingrediente para melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade de alimentos. A qualidade de ingredientes a base desta proteína depende largamente das suas propriedades reológicas,

além das características físico-químicas básicas, como composição, solubilidade, cor, odor e sabor. Os atributos que melhor definem seu valor comercial e qualidade são a força de gel e a termoestabilidade (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

A gelificação do colágeno ocorre devido à formação de estruturas ordenadas e estabilizadas por forças de baixa energia, como ligações de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Esse processo consiste na transição de uma solução contendo proteínas livres e desordenadas, para uma conformação helicoidal e, posteriormente, para uma rede estruturada (NEKLYUDOV, 2003). A composição aminoacídica e a distribuição de massa molecular são fatores que influenciam as propriedades físicas e estruturais dos géis. A elevada força do gel formado a partir de produtos à base de colágeno deve-se ao elevado teor de hidroxiprolina (NORLAND, 1990). A lisina e hidroxiprolina são particularmente importantes para a gelificação, pois a estabilidade da tripla hélice é proporcional ao conteúdo de pirrolidina, anel presente na estrutura destes dois aminoácidos (LEDWARD, 1986). Por outro lado, produtos com menores massas moleculares levam a géis mais frágeis e altamente deformáveis (MUYONGA et al., 2004). No entanto, a presença de cadeias protéicas menores e a maior exposição dos grupos hidrofílicos favorecem a interação com a água e, conseqüentemente, podem melhorar as propriedades gelificantes (AL-ASSAF et al., 2006). A relação entre a fração solúvel e insolúvel de proteína pode influenciar nas propriedades mecânicas, pois um aumento da fração solúvel leva à melhora da dureza, deformabilidade e elasticidade dos géis a base de colágeno (MÁXIMO & CUNHA, 2010).

2.6 PROPRIEDADE EMULSIFICANTE DO COLÁGENO

A capacidade emulsificante é uma importante propriedade tecnológica no processamento de alimentos, e vem sendo extensivamente estudada. Em emulsões estabilizadas por proteínas, alterações no pH modificam as interações eletrostáticas entre as gotas da emulsão. A superfície da gota está carregada se o pH estiver distante do pI desta proteína. Em pH abaixo do pI, as gotas de emulsão ficam carregadas positivamente e há uma repulsão eletrostática entre elas, prevenindo a formação de agregados e a coalescência (MCCLEMENTS, 2005). Além disso, a tripla hélice do colágeno se abre, o que modifica a hidrofobicidade da superfície e melhora a capacidade emulsificante (NEKLYUDOV, 2003). Foi observado que a capacidade emulsificante de material colagenoso extraído de peixes foi maior em níveis de pH entre 1 e 3 e decresceu à medida que o pH aumentou (MONTERO & BODERÍAS, 1991), aproximando-se do ponto isoelétrico (pI) desta proteína (NEKLYUDOV, 2003). O pI relativamente elevado do colágeno bovino pode viabilizar a estabilidade de emulsões em uma faixa de pH ácida, que é o caso da maior parte das emulsões alimentícias. Santana et al. (2011) observou a formação de emulsões verdadeiras em valores de pH igual a 3,5, quando estabilizadas com fibra de colágeno. Por outro lado, as emulsões preparadas em altos valores de pH, mostraram uma rede tridimensional formada devido a ausência de repulsão eletrostática entre as gotas.

Processos térmicos modificam a massa molecular da proteína agindo sobre as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, o que desestabiliza a tripla hélice transformando-as em estruturas desordenadas. Maior intensidade do tratamento térmico diminui a capacidade emulsificante do colágeno, pois o aumento da temperatura diminui ligeiramente a carga protéica, a qual é responsável pela estabilização eletrostática das

emulsões. Além disso, o tratamento térmico reduz a fração de proteína insolúvel, responsável pela imobilização estérica das gotas do óleo (SANTANA et al., 2012).

A capacidade emulsificante do colágeno é inferior à da proteína de soja, caseinato e plasma, provavelmente devido à sua insolubilidade. Entretanto, o colágeno possui uma preponderante função estabilizante e texturizante em embutidos de carne quando seu teor não supera 15% (m/m) da proteína total, sugerindo que o colágeno possui propriedades emulsificantes assim como as outras proteínas da carne (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

A camada interna do couro bovino moída em um moedor (S-220, Stelka, Brasil) em disco de 4 mm foi fornecida pela Novaprom Food Ingredients Ltda. (Lins, Brasil). O óleo de soja (Soya, Bunge Alimentos S.A., Brasil) foi obtido em supermercado local. Antes de cada processo, a matéria-prima foi caracterizada como descrito na seção 3.2.4.1 e a sua temperatura de desnaturação também foi avaliada (seção 3.2.4.2.2).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PREPARO DOS INGREDIENTES A BASE DE COLÁGENO

Os produtos foram preparados conforme fluxograma descrito na Figura 3. A etapa de hidrólise foi feita para determinar as diferentes condições de temperatura, tempo e pH de reação, para obtenção de produtos com diferentes características tecnológicas desejáveis.

A camada interna do couro bovino moído foi pesada e diluída com água destilada de modo a formar uma mistura com concentração de 8% (m/m) de proteína. Essa mistura foi colocada em um tanque encamisado de aço inoxidável, submetida à agitação mecânica, sendo que as condições de temperatura e pH foram ajustadas de acordo com o tratamento a ser realizado (Tabela 2). Os valores de temperatura e pH selecionados levaram em consideração a desnaturação térmica (entre 50-60°C) e o ponto isoelétrico (pH ~5,5), respectivamente. Durante a reação foram retiradas alíquotas a cada 60 minutos para avaliação do teor de proteína solúvel (seção 3.2.4.2.1), temperatura de desnaturação (seção 3.2.4.2.2), distribuição de massa molecular (seção 3.2.4.2.3) e carga superficial (seção

3.2.4.2.4). Além disso, alíquotas também foram removidas para o preparo de géis e emulsões.

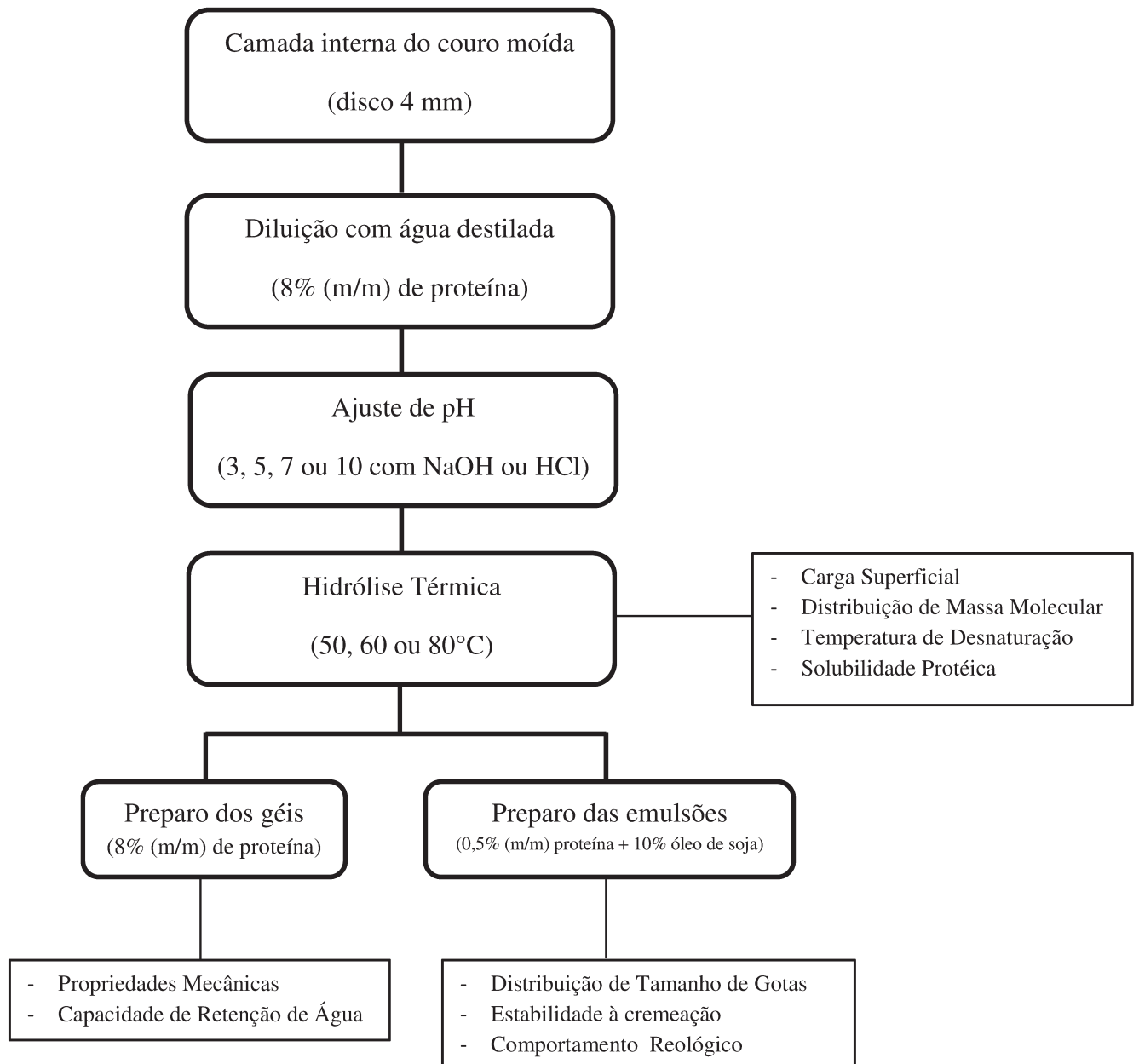


Figura 3: Diagrama de produção dos hidrolisados de colágeno

Tabela 2: Condições dos processos de hidrólise

Ensaio	Temperatura (°C)	pH
1	50	3
2	60	3
3	80	3
4	50	5
5	60	5
6	80	5
7	50	10
8	60	10
9	80	10
10	50	7
11	60	7
12	80	7

3.2.2 PREPARO DOS GÉIS

Alíquotas contendo 8% (m/m) de proteína, retiradas a cada hora de processo de hidrólise, tiveram o pH ajustado para 7 e a temperatura a 40 °C, para a preparação dos géis. Estas alíquotas foram acondicionadas em tubos plásticos de 2,1 mm de diâmetro e mantidas a 10 °C por 24 horas para completa formação do gel. Estes géis foram utilizados para os ensaios de propriedades mecânicas (seção 3.2.4.3.1) e capacidade de retenção de água (seção 3.2.4.3.2).

3.2.3 PREPARO DA EMULSÕES

3.2.3.1 Preparo das Dispersões de Colágeno

Os produtos obtidos a partir do processo de hidrólise a 60°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 ou 10), foram diluídos em água deionizada para que se tivesse 0,5% (m/m) de proteína na emulsão. Esta dispersão foi mantida sob constante agitação, com agitador magnético, por 1 hora em temperatura ambiente antes do preparo das emulsões. Azida sódica (0,02%, m/m) foi adicionada à água deionizada como agente antimicrobiano (SANTANA et al., 2011).

3.2.3.2 Processo de Homogeneização

Após o preparo das dispersões de colágeno, o óleo de soja (10 % m/m) foi adicionado e misturado com o auxílio de um agitador tipo rotor-estator (Ultra-Turrax, modelo DT18 basic, IKA, USA) a 14000 rpm por 5 minutos para a formação das macroemulsões. Com o intuito de produzir mini-emulsões (tamanho de gota reduzido), as macroemulsões foram homogeneizadas a alta pressão em um homogeneizador de dois

estágios (NS1001L2KPANDA2K, Niro Soave S.p.A., Itália). A pressão no primeiro estágio foi de 600 bar e no segundo estágio foi de 50 bar, com 1 passagem da emulsão pelo homogeneizador. Após a homogeneização, os valores de pH das emulsões foram medidos. Para facilitar a visualização da separação de fases das emulsões, corante Sudan III, de coloração avermelhada, foi adicionado ao óleo de soja (SANTANA et al., 2011).

3.2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE

3.2.4.1 Caracterização da matéria-prima

Foram realizadas análises de umidade (método gravimétrico AOAC – 925.10), cinzas (método gravimétrico AOAC – 900.02) e proteínas (método de Kjeldahl – fator de conversão: 5,55 – AOAC 937), além da medida do pH (pHmetro – modelo 827 lab, Metrohm, Suíça).

3.2.4.2 Caracterização dos Hidrolisados de Colágeno

3.2.4.2.1 Teor de Proteína Solúvel

Amostras dos hidrolisados de colágeno foram centrifugadas a 10000 g por 15 minutos a 40 °C, em uma centrífuga (Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA). Após a centrifugação, a fração sobrenadante foi retirada, pesada e acondicionada a 10 °C. A concentração de proteína (%) foi determinada pelo método de Kjeldhal, sendo o fator de conversão utilizado de 5,55 (ZIEGLER & SGARBIERI, 2009). O resultado foi expresso em porcentagem de proteína solúvel em relação à proteína total (g de proteína solúvel/100 g de proteína). A proteína total foi mensurada considerando a quantidade de proteína

presente na amostra inicial e também foi determinada pelo método de Kjeldhal utilizando o mesmo fator de conversão.

Os dados de teor de proteína solúvel foram ajustados segundo modelo matemático descrito no item 2.4.1 (Equação 1), onde foi possível obter o teor de proteína solúvel no equilíbrio e a taxa de reação de cada tratamento.

3.2.4.2.2 Calorimetria Diferencial Exploratória

A temperatura de desnaturação foi determinada através de calorimetria diferencial exploratória (DSC), de acordo com a metodologia descrita por LiChan & Ma (2002). Cápsulas herméticas de alumínio contendo aproximadamente 10 mg dos produtos obtidos através dos processos de hidrólise do colágeno foram colocadas no equipamento e aquecidas na razão de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em um intervalo entre 25 e 100°C , em um calorímetro diferencial exploratório - DSC (Model 2920, TA Instruments, EUA).

A partir da diferença de fluxo de calor entre a cápsula com amostra e a referência (sem amostra), obteve-se um termograma, no qual foi possível identificar a temperatura de desnaturação (T_d), representada pelo ponto de máximo de fluxo de calor. Também foi avaliada a temperatura inicial de desnaturação (T_{onset}), calculada a partir da interseção entre a linha base e a extrapolação do ponto máximo de fluxo de calor. A quantidade de energia (ΔH) necessária para a desnaturação da proteína foi calculada pela área compreendida entre a linha base e a curva do fluxo de calor. As análises foram realizadas em triplicata e analisadas através do software Universal Analysis Program, versão 3.0 G (TA Instruments, EUA).

3.2.4.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As análises de eletroforese foram realizadas segundo método de Laemmli (1970). Os ensaios foram realizados em gel de poliacrilamida com concentrações de 10% (m/m) para o gel de resolução e de 5% (m/m) para o gel de empacotamento. Os produtos obtidos dos processos de hidrólise foram diluídos em água deionizada a fim de se obter soluções com concentração de 35 µg/10 µL. Alíquotas de 20 µL destas soluções foram diluídas em tampão não-redutor (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,1%) na razão 1:1, aquecidas a 70°C por 5 minutos e aplicadas nos géis de poliacrilamida. As corridas foram realizadas a 110 V em uma unidade de eletroforese (Mini Protean Tetra Cell, Biorad Laboratories, EUA), sendo que o tampão de corrida (pH 8,3) continha 25 mM de Tris-HCl, 250 mM de glicina e 0,1% (m/v) de SDS. Após a corrida das amostras, todos os géis foram corados com uma solução a 0,25% de Comassie Brilliant Blue em etanol: ácido acético: água deionizada (10:5:85 v/v) descorados por meio de várias lavagens em solução de 10% (m/v) de etanol e 5% (m/v) de ácido acético. Foi utilizado como padrão um marcador comercial de massa molecular, variando de 180 a 6 kDa (Pre-stained Invitrogen™ Bench Marker protein leader, Byoagency International, EUA).

3.2.4.2.4 Carga Elétrica Superficial

A carga elétrica superficial das amostras foi medida em um equipamento de microeletroforese (ZEM-5300, Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments, Reino Unido). Este aparelho determina a carga elétrica através da medição da direção e velocidade das partículas em um campo elétrico (LITTOZ & MCCLEMENTS, 2008).

Os produtos obtidos dos processos de hidrólise foram diluídos com água deionizada, a fim de se obter soluções com 0,04% de proteína. Estas soluções foram analisadas através de uma varredura de pH variando de 3 a 11, em uma célula do tipo DTS 1060C – Clear Disposable Zeya Cell, sendo que a titulação foi feita com HCl 1M ou NaOH 1M. O potencial zeta foi calculado pela Equação de Henry (Equação 2), sendo que os dados foram ajustados pelo modelo matemático de Smoluchowski, por se tratar de um sistema aquoso. O ponto em que o potencial zeta era igual a zero, indicou o ponto isoelétrico.

$$U_E = \frac{2\varepsilon.z.f(ka)}{3\eta} \quad (2)$$

onde: z é o potencial zeta, U_E é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica, η é a viscosidade e $f(ka)$ é a função de Henry que, para o caso da aproximação de Smoluchowski, é igual a 1,5.

3.2.4.3 Propriedades dos Géis

3.2.4.3.1 Propriedades Mecânicas dos Géis

As propriedades mecânicas foram determinadas por ensaios de compressão uniaxial em um texturômetro (TA.XTplus Texture Analyser, Stable Microsystems Ltda., Inglaterra). As medidas foram feitas utilizando-se uma placa cilíndrica de acrílico com 60 mm de diâmetro, que foi lubrificada com silicone para evitar atrito com a amostra.

O material foi comprimido até 80% de deformação, sob velocidade de compressão de 1 mm/s à temperatura de 25°C. Os dados de força-altura foram convertidos em tensão e deformação de Hencky (Equações 3 e 4, respectivamente) e o ponto máximo da curva foi considerado como o ponto de ruptura. A tensão de ruptura (σ_{rup}) corresponde à tensão máxima que o gel suporta antes da fratura, e a deformação associada a este ponto é denominada deformação de ruptura (ε_{rup}).

$$\sigma_H = F(t) \cdot \left[\frac{H(t)}{H_0} / A_0 \right] \quad (3)$$

$$\varepsilon_H = -\ln \left[\frac{H(t)}{H_0} \right] \quad (4)$$

onde $F(t)$ é a força, A_0 e H_0 são a área e a altura inicial da amostra, respectivamente, e $H(t)$ é a altura no tempo t .

A partir dos diagramas de tensão-deformação também foi obtido o módulo de elasticidade (E), que está relacionado com a firmeza do gel e é obtido dentro da zona elástica. O módulo de elasticidade foi obtido a partir da regressão linear até $\approx 5\%$. Todas as medidas foram feitas em quintuplicata.

3.2.4.3.2 Capacidade de Retenção de Água dos Géis

Cerca de 5 g dos géis foram pesados, colocados em tubos de centrífuga (50 ml) e centrifugados a 10000 g por 15 minutos a 25 °C (centrífuga Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA). Após a centrifugação, o excesso de água foi retirado e o precipitado pesado (BRAGA et al., 2006). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

A capacidade de retenção de água foi determinada pela diferença de massa dos géis antes e após a centrifugação, conforme descrito na Equação 5.

$$CRA = \frac{(m_{amostra} - m_{\text{água liberada}})}{m_{amostra}} \cdot 100 \quad (5)$$

onde $m_{\text{água liberada}}$ é a massa de água liberada após a centrifugação e $m_{amostra}$ é a massa total de amostra antes da centrifugação.

3.2.4.4 Caracterização das Emulsões

3.2.4.4.1 Distribuição de Tamanho de Gotas

Imediatamente após a homogeneização, a distribuição de tamanho de gotas das mini-emulsões foi analisada através de difração a laser em um Laser Scattering Spectrometer Mastersizer (MAM 5005, Malvern Instruments LTD, Reino Unido). O diâmetro médio foi representado pelo diâmetro médio superficial (D_{32}), calculado pela Equação 6.

$$D_{32} = \frac{\sum n_i \cdot D_i^3}{\sum n_i \cdot D_i^2} \quad (6)$$

onde n_i é a quantidade de gotas com mesmo diâmetro médio e D_i o diâmetro médio de cada gota.

Além disso, a polidispersão do tamanho das gotas foi avaliada pelo *Span*, como definido na Equação 7.

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (7)$$

onde d_{10} , d_{50} e d_{90} são os diâmetros nos quais 10, 50 e 90% da amostra, respectivamente, são menores que este valor.

3.2.4.4.2 Estabilidade à Cremeação

Imediatamente após o processo de homogeneização, alíquotas de emulsão foram transferidas para provetas de 50 mL (25 mm de diâmetro interno e 95 mm de altura). As emulsões foram armazenadas por 15 dias à temperatura ambiente, sendo o volume da fase inferior quantificado diariamente. O índice de cremeação foi descrito pela Equação 8. Foram realizadas 3 repetições em 3 determinações independentes.

$$IC (\%) = 100 \cdot \frac{\text{volume da interface da fase inferior}}{\text{volume total de emulsão}} \quad (8)$$

3.2.4.4.3 Microscopia Óptica

As análises microscópicas das emulsões foram realizadas em microscópio óptico (Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Alemanha), em que uma alíquota de emulsão foi colocada em lâmina, coberta com lamínula e visualizada com um aumento de 100 x. Foram obtidas cerca de 5 micrografias ao longo de toda a lâmina para posterior análise visual de imagem.

3.2.4.4.4 Comportamento Reológico

As análises reológicas foram realizadas nas mini-emulsões, utilizando um reômetro de tensão controlada (Physica MCR301, Anton Paar, Áustria). Todas as medidas foram feitas em triplicata, em geometria de placas paralelas de aço inoxidável de 50 mm de diâmetro, com temperatura controlada em 25°C e distância entre as placas (“gap”) de 600 µm. As análises reológicas das mini-emulsões estabilizadas pelos hidrolisados de colágeno foram realizadas após 1 dia de estocagem. Para o caso de emulsões que apresentaram separação de fases, avaliou-se a fase superior e inferior separadamente.

As curvas de escoamento foram obtidas através de um programa de passos múltiplos usando intervalos de taxas de deformação entre 0-300 s⁻¹. Desta maneira pode-se avaliar a relação entre viscosidade (η) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$). Os modelos para fluidos Newtonianos (Equação 9) e Lei da Potência (Equação 10), foram utilizados para ajustar as curvas de escoamento aos dados:

$$\sigma = \eta.(\dot{\gamma}) \quad (9)$$

$$\sigma = k.(\dot{\gamma})^n \quad (10)$$

onde σ é a tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}), n é o índice de comportamento, η é a viscosidade (Pa.s) e k o índice de consistência (Pa.sⁿ).

3.2.4.5 Análises Estatísticas

A avaliação dos dados foi realizada com auxílio de análise estatística. Foi realizada a comparação de médias entre os dados por meio do teste de Tukey e através da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância (STATISTICA[®] 7.0, StatSoft, EUA).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.1.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição da matéria-prima utilizada está apresentada na Tabela 3. O colágeno apresentou cerca de 24% de proteína (b.u), baixa quantidade de cinzas (0,40%) e elevado teor de umidade, em torno de 76%. Além disso, apresentou pH próximo da neutralidade.

Tabela 3: Composição da matéria-prima

Componente	Conteúdo (g/100g de matéria-prima)
Proteína	23,79 ± 2,33
Cinzas	0,40 ± 0,03
Umidade	75,80 ± 2,36
pH	7,26 ± 0,18

A pele é composta de proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais e água, sendo que esta composição varia de acordo com a espécie, sexo e idade do animal. Geralmente, o teor de umidade das peles de animais varia entre 60 e 70% (HOINACKI, 1989).

4.1.2 CARGA ELÉTRICA SUPERFICIAL

Na Figura 4 pode-se observar o comportamento do potencial zeta em valores de pH entre 3 e 11. Em valores de pH entre 5,5 e 7, a diferença de potencial zeta foi próxima de zero e considerou-se que o ponto isoelétrico estaria próximo a 5,7. Valores semelhantes foram encontrados por Gutterres (2006), que mostrou que pó de pele bovina apresentava ponto isoelétrico entre 4,9 e 5,3, enquanto que Santana et al. (2011) observou ponto isoelétrico próximo de 4,8 para a fibra de colágeno.

Como pode-se observar, a carga elétrica superficial da matéria-prima mostrou valores positivos em pH abaixo do pI e carga levemente negativa em pH acima do pI. A elevada carga positiva em valores ácidos de pH é devido ao aumento dos íons H^+ em relação aos aminoácidos ionizáveis.

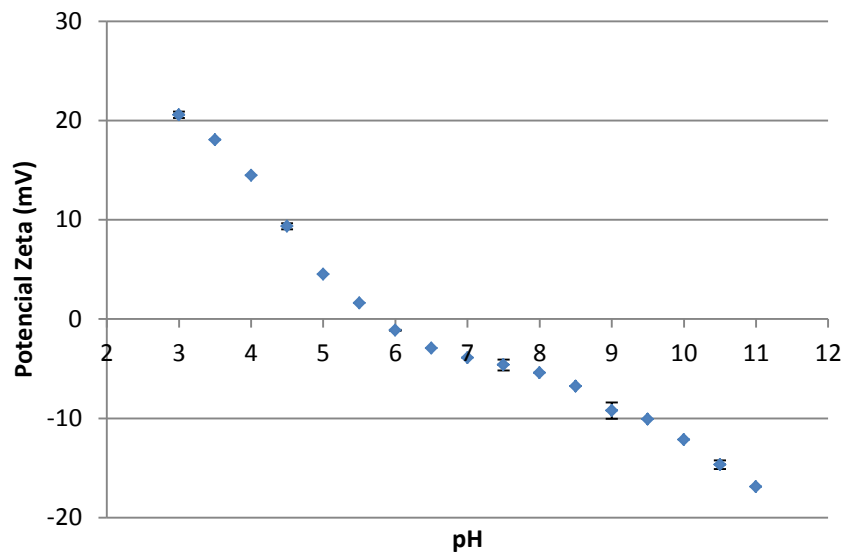


Figura 4: Potencial zeta da matéria-prima nos valores de pH entre 3 e 11

4.1.3 TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO

Através do termograma apresentado na Figura 5 foi possível determinar a temperatura inicial (T_{onset}) de desnaturação da matéria-prima, que foi de $58,59 \pm 1,28$ °C e a temperatura de desnaturação (pico), que apresentou valor médio de $63,37 \pm 2,20$ °C. Resultados semelhantes foram observados para a fibra de colágeno, sendo encontrados valores próximos de 63°C para a temperatura de desnaturação e T_{onset} igual a 58°C (WOLF et al., 2009; SANTANA et al., 2011). O colágeno bovino apresenta temperatura de desnaturação elevada quando comparada à de colágeno extraído de peixes, que está entre 15°C e 29°C. Esta diferença pode ser atribuída à diferente composição aminoacídica dos colágenos, principalmente pelo maior teor de hidroxiprolina, que é responsável por estabilizar a tripla hélice do colágeno bovino (ZHANG et al., 2009; RAMACHANDRAN et al., 1976).

Além disso, também foi avaliada a entalpia (ΔH) necessária para que a desnaturação ocorresse e o valor médio foi de $8,04 \pm 1,57$ J/g de proteína. Santana et al. (2011) encontrou um valor mais elevado para a desnaturação da fibra de colágeno não hidrolisada que estava próxima de 10 J/g de proteína.

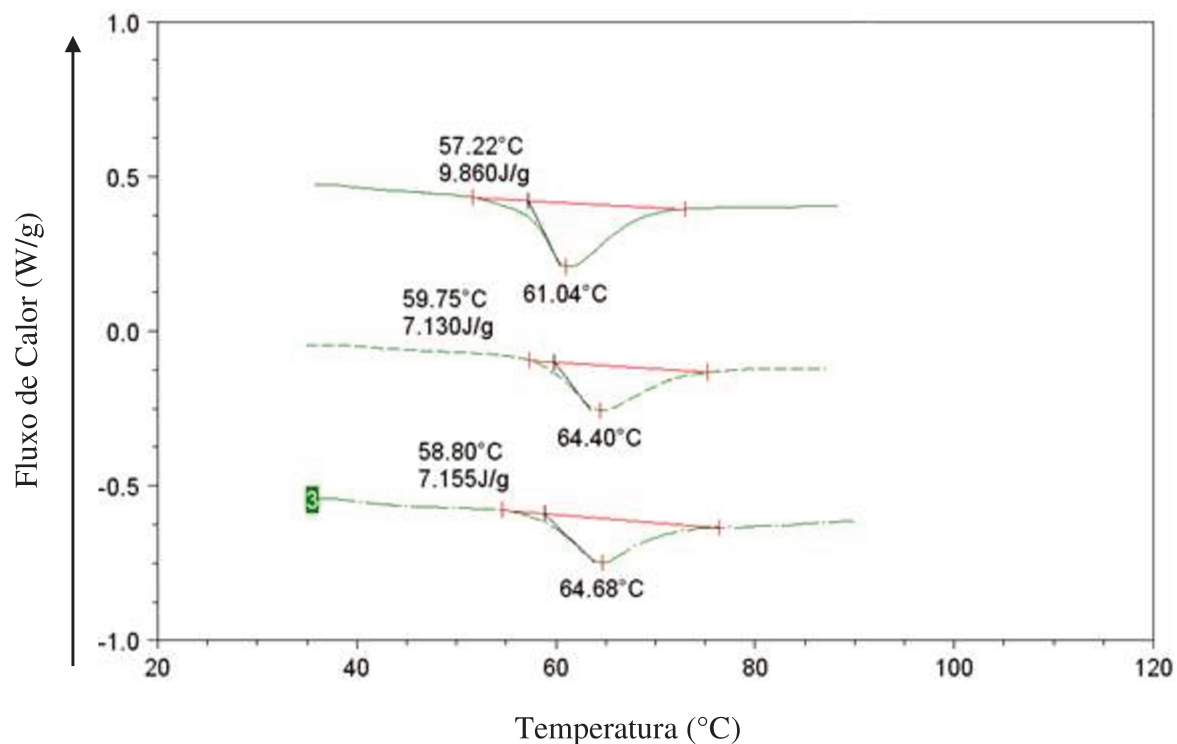


Figura 5: Termograma da matéria-prima em triplicata

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS

A caracterização dos hidrolisados obtidos permitiu determinar como as condições de processo influenciam nas suas propriedades gelificantes e emulsificantes. Com este intuito, primeiramente avaliou-se a solubilidade protéica, carga elétrica superficial, temperatura de desnaturação e distribuição de massa molecular dos hidrolisados.

4.2.1 SOLUBILIDADE PROTÉICA

A solubilidade é uma das propriedades funcionais mais importantes dos hidrolisados protéicos, pois exerce forte efeito sobre as propriedades físicas, como a capacidade emulsificante e gelificante (WILDING et al., 1984). Na Figura 6, pode-se observar o teor de proteína solúvel (T_{ps}) de todos os tratamentos ao longo do tempo de hidrólise, bem como as linhas de ajustes segundo a Equação 1.

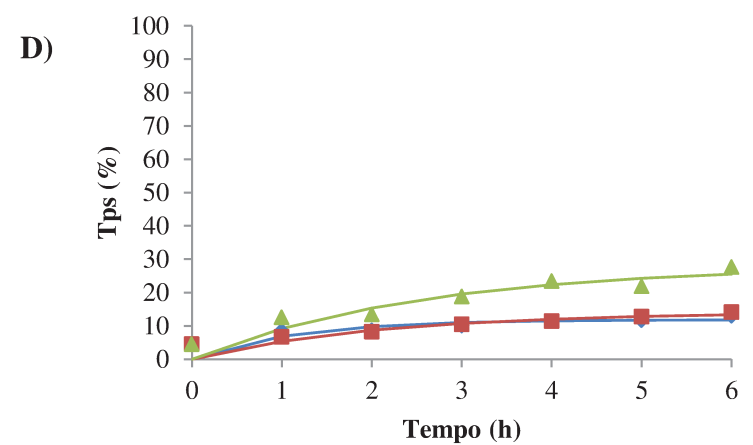
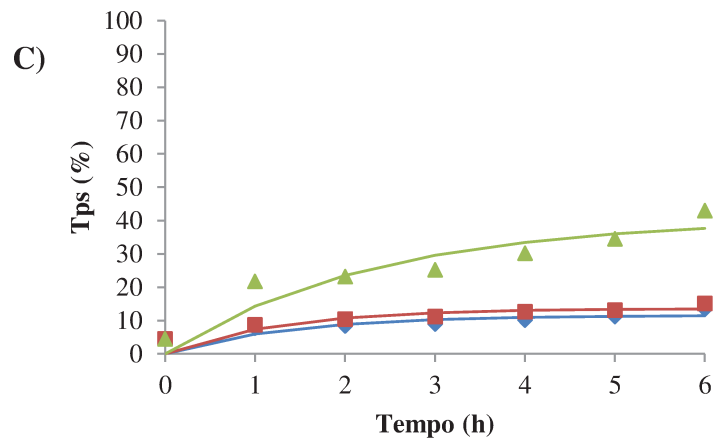
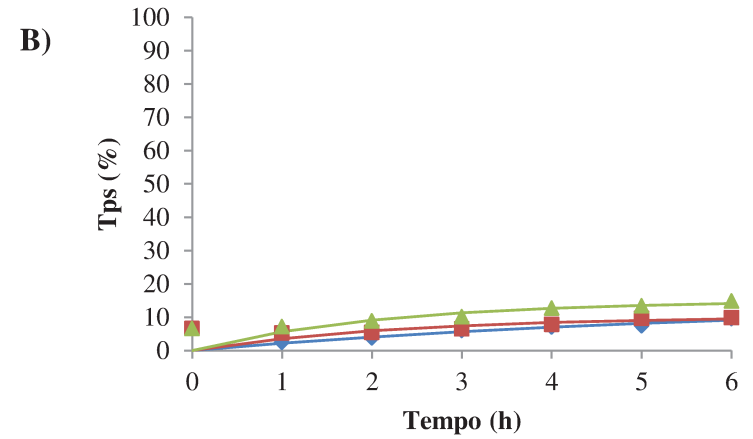
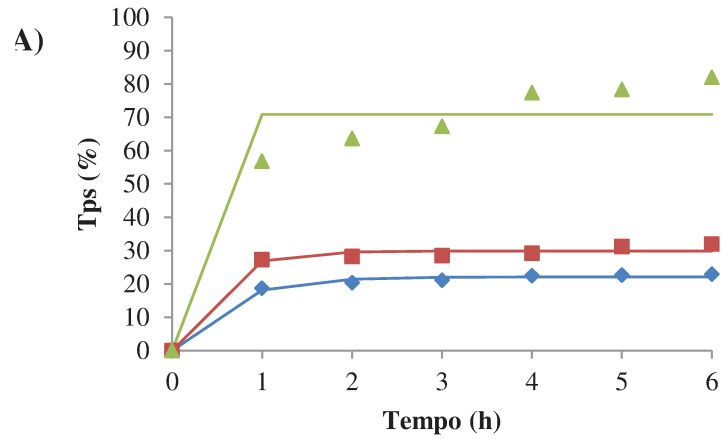


Figura 6: Teor de proteína solúvel (g de proteína solúvel/100 g de proteína) nos valores de pH: A) 3, B) 5, C) 7 e D) 10 nas temperaturas de 50 (◆), 60 (■) e 80°C (▲), ao longo de 6 horas e curvas de ajustes obtidas a partir do modelo de cinética de 1ª ordem

Um aumento no teor de proteína solúvel foi observado com o aumento da temperatura e do tempo de hidrólise para todos os tratamentos, indicando a influência do tratamento térmico na solubilização das proteínas do colágeno. A temperatura favorece a quebra das ligações de hidrogênio e demais interações que estabilizam a tripla-hélice do colágeno, propiciando a abertura da estrutura e a exposição de grupos hidroxila e, conseqüentemente, a hidratação da proteína (ALVES & FERREIRA, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Máximo e Cunha (2010), que observaram uma rede de gel mais forte quando o produto a base de colágeno foi tratado a 90°C se comparado ao tratado a 60 °C, sendo isso associado ao maior teor de proteína solúvel obtido no tratamento térmico mais drástico.

Além disso, no pH abaixo do pI, observaram-se os maiores teores de proteína solúvel. No processo a 80°C o teor de proteína solúvel foi de aproximadamente 57%, com apenas 1 hora de hidrólise, valor maior do que em todos os outros tratamentos com 6 horas de processo. A 80°C e pH 3, alcançou-se mais de 80% de proteína solúvel após 6 horas de processo. Em baixos valores de pH, os íons de hidrogênio interagem com a fibra de colágeno modificando a polaridade superficial (BOKI & KAWASAKI, 1994) e, provavelmente, viabilizando o acesso da água à estrutura da fibra, o que aumentou sua solubilidade. Em valores de pH igual a 5 observaram-se os menores teores de proteína solúvel, dada a proximidade do ponto isoelétrico (pI). Nos valores de pH igual a 7 e 10 notou-se um leve aumento na solubilidade com o tempo de processo e também com o aumento de temperatura do tratamento térmico.

A solubilidade da fibra de colágeno foi estudada por Wolf et al. (2009), que encontrou uma variação de 28,9 a 52,5 % (m/m) de proteína solúvel, em uma faixa de pH

entre 2 e 12, sendo que a menor solubilidade foi encontrada em pH 8. Valores semelhantes foram encontrados, principalmente nos tratamentos a 60 e 80°C, sendo que em pH ácido a 80 °C com somente 1 hora de processo já foi alcançado o valor máximo obtido por Wolf et al. (2009).

Santana et al. (2011) verificaram que, com o aumento da temperatura de hidrólise da fibra de colágeno de 50 para 80°C, a solubilidade protéica passou de 15 % para 33% (m/m) em relação à proteína total, quando dispersada em pH próximo de 9. Resultados semelhantes também foram obtidos neste trabalho, ou seja, com o aumento da temperatura ocorreu um aumento do teor de proteína solúvel, sendo que a maior alteração ocorreu em condições de hidrólise ácida. Neste caso, o teor de proteína solúvel passou de 23 para 82% com o aumento da temperatura de 50 para 80°C.

Para melhor avaliação da cinética de hidrólise em diferentes condições de temperatura e pH, as curvas de T_{ps} (teor de proteína solúvel) em função do tempo foram ajustadas a uma equação cinética de 1ª ordem (Equação 1), onde foi possível obter a taxa de reação (k) e o teor de proteína solúvel no equilíbrio do processo ($[T_{ps}]_{eq}$). Os valores destes parâmetros, bem como os seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) estão apresentados na Tabela 4. O ajuste pelo modelo de cinética de 1ª ordem mostrou-se adequado para representar a velocidade do processo de hidrólise, visto que os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram valores próximos ou acima de 0,9.

Tabela 4: Taxa de hidrólise (k) e teor de proteína solúvel no equilíbrio ($[T_{ps}]_{eq}$) obtido a partir do modelo de cinética de 1ª ordem e respectivo coeficiente de determinação (R^2)

	50 °C			60 °C			80 °C		
	$[T_{ps}]_{eq}$ (%)	k (s^{-1})	R^2	$[T_{ps}]_{eq}$ (%)	k (s^{-1})	R^2	$[T_{ps}]_{eq}$ (%)	k (s^{-1})	R^2
pH 3	22,141	1,728	0,985	29,916	2,309	0,912	70,897	50,769	0,949
pH 5	14,637	0,164	0,944	10,259	0,431	0,931	14,943	0,477	0,942
pH 7	11,601	0,724	0,987	13,627	0,783	0,918	40,616	0,434	0,953
pH 10	11,821	0,884	0,975	14,079	0,482	0,974	28,184	0,394	0,964

Nos valores de pH abaixo ou próximo do pI (3 e 5) as taxas de reação (k), aumentaram com o aumento da temperatura, indicando que o tratamento térmico potencializou a solubilidade protéica. Já em pH neutro (7) e alcalino (10) notou-se uma tendência contrária sendo que o valor de k foi maior em temperaturas mais baixas. No tratamento mais drástico (pH 3 e 80 °C) notou-se um elevado valor para k ($50,769 s^{-1}$), corroborado pelo teor de proteína solúvel obtido com 1 hora de processo (mais de 50% de proteína solúvel), indicando que a combinação de ácido e elevadas temperaturas levam a uma rápida desnaturação da estrutura do colágeno e conseqüente aumento da solubilidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Santana et al. (2011) que notou um aumento da solubilidade protéica da fibra de colágeno quando tratada a pH inferior a 4,5.

4.2.2 CARGA ELÉTRICA SUPERFICIAL

A Figura 7 mostra as curvas de titulação do potencial zeta, variando o pH de 3 a 11 para os hidrolisados produzidos a 50, 60 e 80°C, e valores de pH igual a 3, 5, 7 e 10, após 6 horas de processo. Em pH ácido, todos os hidrolisados mostraram elevada carga positiva, entre +15 e +35 mV. Já em pH alcalino, estes se apresentaram carregados negativamente, entretanto com menor magnitude, variando entre -5 e -15 mV.

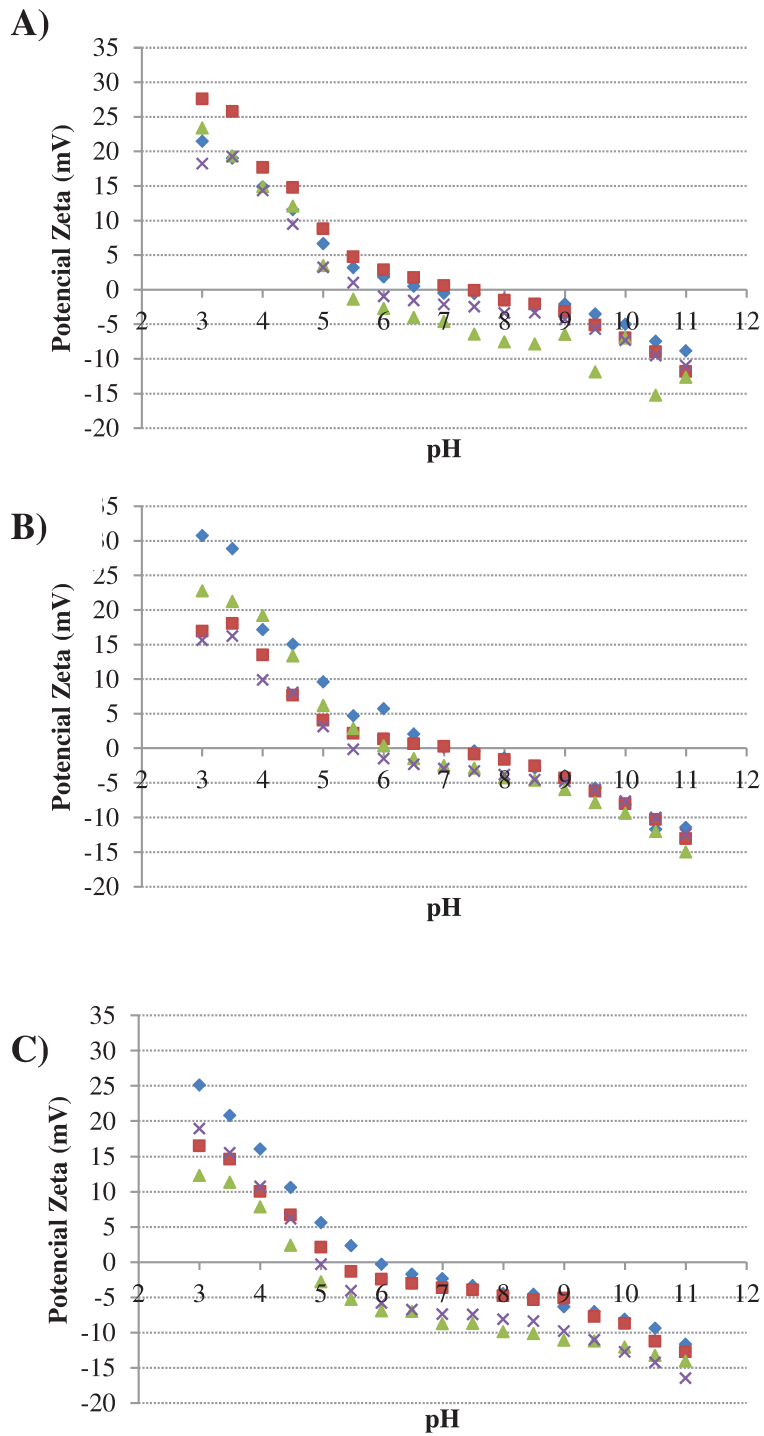


Figura 7: Variação do potencial zeta em função do pH dos hidrolisados obtidos em diferentes valores de pH: 3 (♦), 5 (■), 7 (▲) e 10 (×) e temperaturas de A) 50°C, B) 60 °C e C) 80 °C, após 6 horas de processo

Pelos valores mostrados na Tabela 5, foi possível verificar que o valor do pI decresceu a medida que os hidrolisados foram produzidos em condições de menor acidez e também com aumento da intensidade do tratamento térmico. O tratamento ácido mantém os resíduos de amida intactos, o que leva a um ponto isoelétrico (pI) mais básico. Já quando tratados com base ou elevada temperatura, estes resíduos são hidrolisados liberando alta densidade de grupos carboxílicos, que reduzem o pI deixando-o mais ácido (ZHANG et al., 2009). No tratamento alcalino, os grupos amida dos resíduos de glutamina e asparagina são convertidos em ácido glutâmico e ácido aspártico, que permite um conteúdo de 25% a mais de ácido carboxílico (WARDS & COURTS, 1977).

No processo a temperaturas mais elevadas, o colágeno provavelmente apresentou uma maior quantidade de moléculas desdobradas, ou seja, com regiões hidrofóbicas expostas (ALVES & FERREIRA, 2002). A maior exposição destes grupos ocasiona um aumento dos grupos carregados positivamente, o que leva a um deslocamento do pI para regiões mais ácidas.

Tabela 5: Valores do pI dos hidrolisados obtidos a 50, 60 e 80°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10), após 6 horas de processo.

	50°C	60°C	80°C
pH 3	7,18	7,30	5,88
pH 5	7,09	7,26	5,16
pH 7	5,87	5,24	4,62
pH 10	5,33	5,67	4,81

Notou-se também que há uma região onde o potencial zeta é muito próximo de zero, sendo que se estende do pH 5 até quase 10, o que pode justificar a baixa solubilidade dos hidrolisados obtidos nestas faixa de pH. Quando a proteína num sistema aquoso apresenta carga líquida nula, as interações proteína-proteína aumentam, pois as forças eletrostáticas moleculares são mínimas. Assim, menos água interage com as moléculas de proteína, sendo esta condição favorável para que as moléculas de proteína se aproximem, agreguem e precipitem. Ou seja, quanto mais próximo for o pH do ponto isoelétrico (pI) de uma solução protéica, mais baixa será a solubilidade da mesma.

4.2.3 TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO

Os termogramas dos hidrolisados, obtidos através de calorimetria diferencial exploratória de varredura, estão apresentados nas Figuras 8, 9 e 10 sendo os picos endotérmicos associados ao processo de desnaturação das proteínas de colágeno. As análises mostraram que, o colágeno dos hidrolisados obtidos a temperatura próxima ou acima da temperatura de desnaturação (60 e 80°C), já estava desnaturado após uma hora de processo, pois não foi identificado nenhum pico endotérmico nos termogramas.

Já nos hidrolisados produzidos a 50°C, ou seja, abaixo da temperatura de desnaturação do colágeno, foi observada a temperatura inicial (T_{onset}) e de pico de desnaturação (T_d), após uma hora de hidrólise, como pode ser observado na Tabela 6. Este fato indica que a estrutura do colágeno ainda não estava completamente desnaturada com este tempo de processo (1h). No entanto, os hidrolisados obtidos nesta mesma temperatura e em maiores tempos de reação não apresentaram pico endotérmico, indicando a influência do binômio tempo e temperatura no processo de desnaturação do colágeno. Acredita-se

que o desdobramento da molécula de colágeno ocorra em duas etapas. A primeira consiste na quebra das ligações de hidrogênio entre as 3 cadeias polipeptídicas, enquanto que a segunda etapa envolve o rompimento das ligações intramoleculares da cadeia α (ROCHID et al., 1999). Durante a desnaturação, o colágeno passa por transformações, ocorrendo um desalinhamento das fibras de colágeno, o colapso da tripla hélice em subunidades polipeptídicas, o rompimento de muitas ligações não covalentes, algumas ligações covalentes inter e intramoleculares (ligações cruzadas) e poucas ligações peptídicas, resultando na conversão da estrutura helicoidal do colágeno em uma forma mais amorfa (ALVES & FERREIRA, 2002). Neste caso, o trímero (α_1 , α_2 , β) é desintegrado em dímeros ou em cadeias individuais (LIU et al., 2004), e até em frações de menor massa molar, mais solúveis e com maior capacidade de retenção de água (ALVES & FERREIRA, 2002).

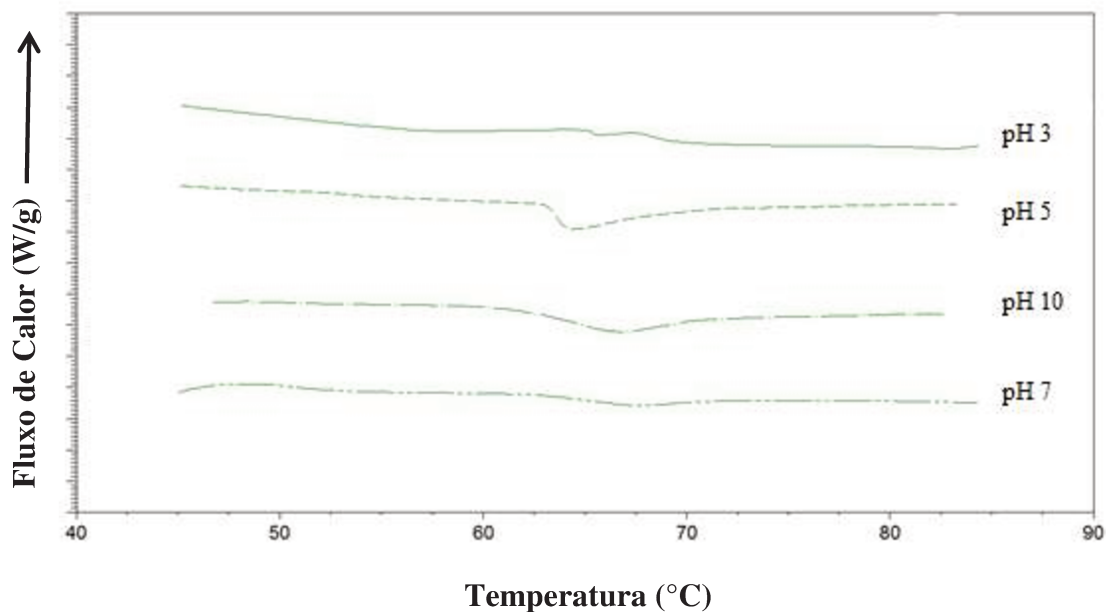


Figura 8: Termogramas dos hidrolisados de colágeno obtidos a 50°C e nos valores de pH igual a 3, 5, 10 e 7, após 1 hora de processo

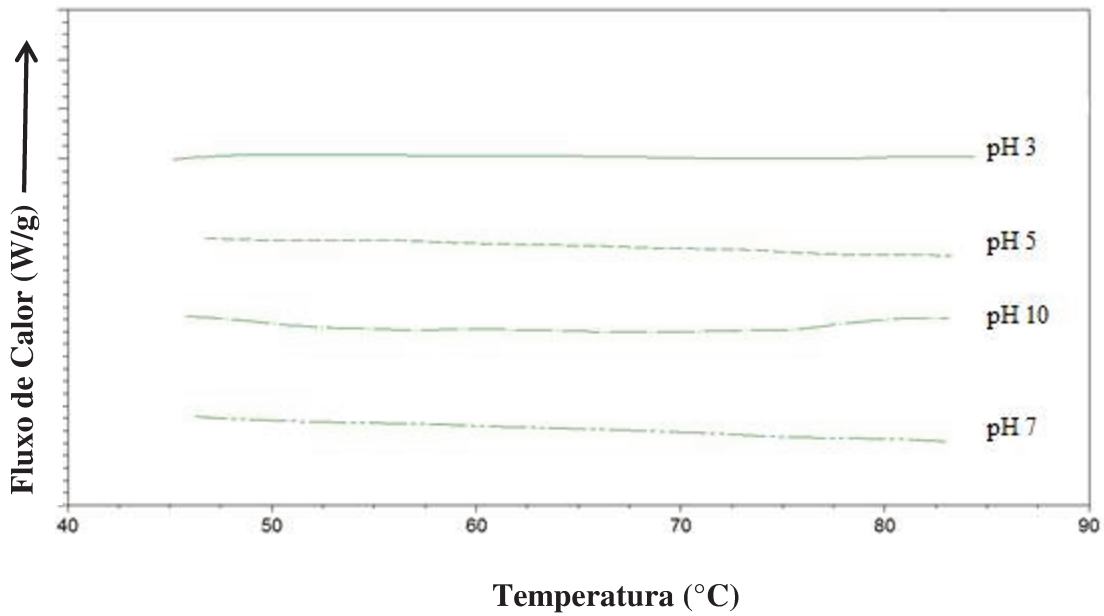


Figura 9: Termogramas dos hidrolisados de colágeno obtidos a 60°C e nos valores de pH igual a 3, 5, 10 e 7, após 1 hora de processo

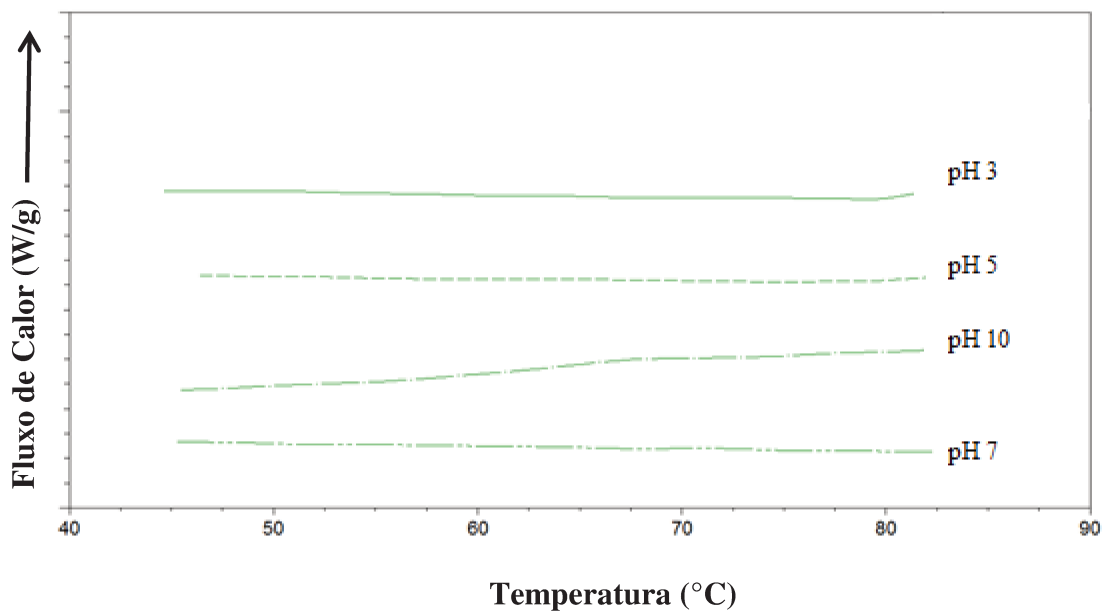


Figura 10: Termogramas dos hidrolisados de colágeno obtidos a 80°C e nos valores de pH igual a 3, 5, 10 e 7, após 1 hora de processo

No primeiro tempo de hidrólise, tanto em pH ácido quanto alcalino, notou-se valores de entalpia mais baixos, indicando que nestes tratamentos ocorreu uma maior desnaturação da estrutura do colágeno. Porém em pH igual a 3, houve uma redução maior que em pH 10, o que mostra que tratamentos em condições de acidez causam maior abertura da tripla hélice do colágeno e, conseqüentemente, a uma estrutura mais desordenada. Finch et al. (1972) sugeriu que as ligações de hidrogênio são importantes na estabilização da tripla hélice do colágeno. A quebra destas ligações (processo endotérmico) reduz a temperatura de desnaturação e a entalpia (ROCHID et al., 1999). O DSC mede a energia diferencial requerida para manter tanto a amostra quanto os materiais de referência à mesma temperatura. Assim, quando ocorre uma transição endotérmica, a energia absorvida pela amostra é compensada por um aumento de energia adquirida pela mesma, a fim de manter uma diferença de temperatura nula. Como essa entrada de energia tem um valor equivalente à energia absorvida na transição, a medida calorimétrica da energia de transição é obtida desta energia de equilíbrio (SILVA & SILVA, 2003). Assim, pela análise dos termogramas pode-se concluir que nos tratamentos a 50°C/1 hora ainda há ligações de hidrogênio a serem quebradas. Com o passar do tempo estas ligações são quebradas não sendo observado pico endotérmico, ou seja, a tripla hélice do colágeno já foi desnaturada. Situação semelhante ocorre quando a temperatura é aumentada para 60 ou 80°C, mesmo somente com 1 hora de processo.

Ao se comparar os valores de entalpia dos tratamentos a 50°C/1 hora com o da matéria-prima, notou-se uma redução neste valor, mesmo em valores de pH próximos ao natural na matéria-prima (5 e 7). O maior pico indica a presença da tripla hélice do

colágeno (ZHANG et al., 2009) e a redução deste mostra que a proteína se desnaturou parcialmente durante o processo a temperatura inferior a de desnaturação.

Tabela 6: Valores de T_{onset} e T_d para os hidrolisados obtidos a 50°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10), após uma hora de hidrólise

pH	T_{onset} (°C)	T_d (°C)	ΔH (J/g)
3	$65,16 \pm 0,81^a$	$65,71 \pm 1,63^a$	$0,028 \pm 0,023^a$
5	$63,19 \pm 1,57^a$	$64,40 \pm 0,96^a$	$0,575 \pm 0,28^a$
7	$62,02 \pm 1,04^a$	$66,47 \pm 1,61^a$	$0,576 \pm 0,28^a$
10	$63,59 \pm 1,58^a$	$67,62 \pm 1,04^a$	$0,172 \pm 0,31^a$

*Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$)

4.2.4 DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLECULAR

Os resultados de eletroferese em gel de poliacrilamida permitiram determinar a influência das condições do processo na distribuição de massa molecular dos hidrolisados de colágeno. Na Figura 11 é possível observar o perfil eletroforético de todos os hidrolisados obtidos, nas diferentes temperaturas (50, 60 e 80°C) e valores de pH de 3, 5, 7 e 10. Estão apresentados, da esquerda para a direita, o marcador e os tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de hidrólise, respectivamente.

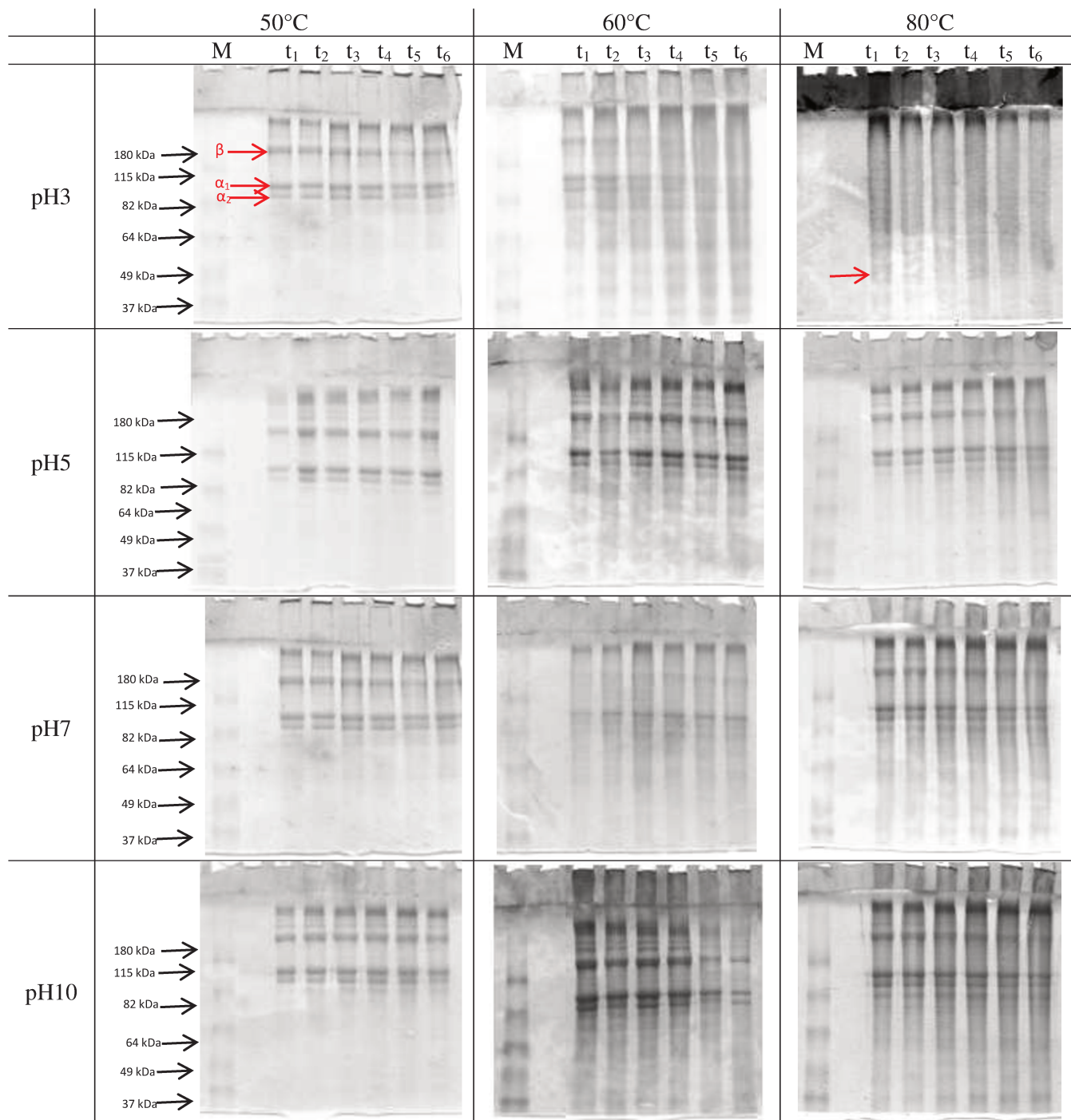


Figura 11: Distribuição de massa molecular dos hidrolisados de colágeno obtidos a 50, 60 e 80°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10) em todos os tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, respectivamente)

Todos os hidrolisados, com exceção do obtido em condição mais drástica (pH 3 e 80°C), apresentaram duas bandas α (α_1 e α_2), situadas entre 115 e 82 kDa. Além disso, observou-se a presença de uma banda em torno de 180 kDa, que pode ser identificada como a banda β , que caracteriza a presença das 3 cadeias que formam a tripla hélice. Em quase todos os hidrolisados foi possível observar a presença de moléculas de elevada massa molar (> 180 kDa), denominadas componentes γ (ZHANG et al., 2009). Existe também a evidência de bandas de baixa massa molecular em menor intensidade e de moléculas de agregados de elevada massa molecular no gel de empacotamento, que provavelmente foram formados por ligações covalentes entre os dímeros de colágeno (TOSH, 2003).

Em todos os tratamentos notou-se que, com o tempo de hidrólise, as bandas α_1 e α_2 ficaram menos evidentes e houve um maior arraste de moléculas de menor massa molecular, indicando a influência do tempo no processo de hidrólise. Os tratamentos a 50°C apresentaram grande evidência da presença das três bandas, indicando o baixo grau de desnaturação da molécula do colágeno. Além disso, também notou-se um menor arraste de moléculas de baixa massa molecular, o que pode ser justificado por serem tratamentos abaixo da temperatura de desnaturação do colágeno.

Ao se comparar os hidrolisados à temperatura de 60°C nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10), notou-se que o tratamento em pH abaixo do pI possibilitou a formação de moléculas com menores massas moleculares que os outros tratamentos, e que ao longo do tempo a presença das bandas β , α_1 e α_2 se tornaram imperceptíveis, indicando a quebra das cadeias que formavam a tripla hélice. No tratamento a pH 3 e 80°C também não foi possível notar a presença da banda β , sendo que no primeiro tempo notou-se a presença de

moléculas de baixa massa molecular (próximo de 49 kDa). Já nos outros tempos não foi possível identificar a presença de nenhuma banda, indicando que o produto hidrolisado alcançou massa molecular menor que 37 kDa. Resultados semelhantes são encontrados na distribuição de massa molecular de gelatinas do tipo A que passam por um pré-tratamento ácido, possuindo uma distribuição mais homogênea e maior quantidade de polipeptídios de baixa massa molecular (WARDS & COURTS, 1977). Já nos outros valores de pH (5, 7 e 10) e a 80 °C notou-se a presença das 3 bandas que caracterizam a estrutura do colágeno (β , α_1 e α_2) e o arraste de moléculas de menor massa molecular.

Nas análises de DSC notou-se a presença das 3 cadeias entrelaçadas (estrutura terciária) somente nos termogramas dos tratamentos a 50°C/1 hora, sendo que em todos os outros tratamentos esta estrutura não estava mais presente. Entretanto, ao se observar as análises eletroforéticas notou-se a presença dessas cadeias (β , α_1 e α_2) em quase todos os tratamentos, porém não mais ligadas entre si formando a tripla hélice, ou seja, ocorreu a desnaturação da estrutura terciária porém ainda não houve a quebra das cadeias.

4.3 PROPRIEDADE GELIFICANTE

Todos os produtos obtidos nos diferentes processos de hidrólise foram submetidos à avaliação de suas propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água, com o objetivo de avaliar a propriedade gelificante dos hidrolisados e qual a influência dos parâmetros de processo nesta característica.

Na Figura 12 estão apresentados os géis formados em todos os tempos de hidrólise de todos os tratamentos. A cor dos géis tornou-se mais amarelada para os hidrolisados

produzidos a temperaturas mais elevadas. O colágeno tipo I (presentes em peles e tendões) é uma glicoproteína com um conteúdo de carboidrato menor que 1% (PIEZ, 1985). Este açúcar pode, com o aumento da temperatura, induzir a reação de Maillard (escurecimento não-enzimático) que envolve grupos carbonila e compostos que possuem grupos amino livres como as proteínas, justificando assim a mudança das amostras tratadas a temperaturas mais altas. Todos os hidrolisados levaram à formação de géis auto-sustentáveis, sendo que quase todos eram bifásicos, apresentando um fase superior mais translúcida e uma inferior mais opaca, que correspondem à fração solúvel e insolúvel, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Máximo e Cunha (2010), pois os géis formados pela fração solúvel de fibra e pó de colágeno apresentaram aparência transparente.

Além disso, no tratamento mais drástico, pH ácido (3) e elevada temperatura (80°C), também notou-se que os géis se tornaram mais translúcidos, aspecto característico da fração solúvel da proteína. Máximo e Cunha (2010) observaram que os géis formados pela fração insolúvel de fibra de colágeno se mostraram opacos, enquanto que os formados pela fração solúvel foram mais transparentes.













	50°C	60°C	80°C
pH 3			
pH 5			
pH 7			
pH 10			

Figura 12: Géis de hidrolisados de colágeno obtidos nos diferentes tratamentos, nos valores de pH de 3, 5, 7 e 10 e temperaturas de 50, 60 e 80°C, ao longo do tempo de 6 horas

4.3.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Através da avaliação da tensão na ruptura, deformação na ruptura e módulo de elasticidade pode-se entender o efeito dos parâmetros de processo (pH, temperatura e tempo) nas propriedades dos géis, podendo relacionar estas características às alterações na estrutura da rede da proteína. A tensão na ruptura foi utilizada como indicador de dureza, a deformação na ruptura de fragilidade ou deformabilidade e o módulo de elasticidade como resistência ou firmeza (KOHYAMA & NISHINARI, 1993) dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno. Na Figura 13 estão apresentadas as tensões de ruptura dos géis de hidrolisados de colágeno dos tratamentos a 50, 60 e 80°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10) em todos os tempos do processo de hidrólise (1 a 6 horas).

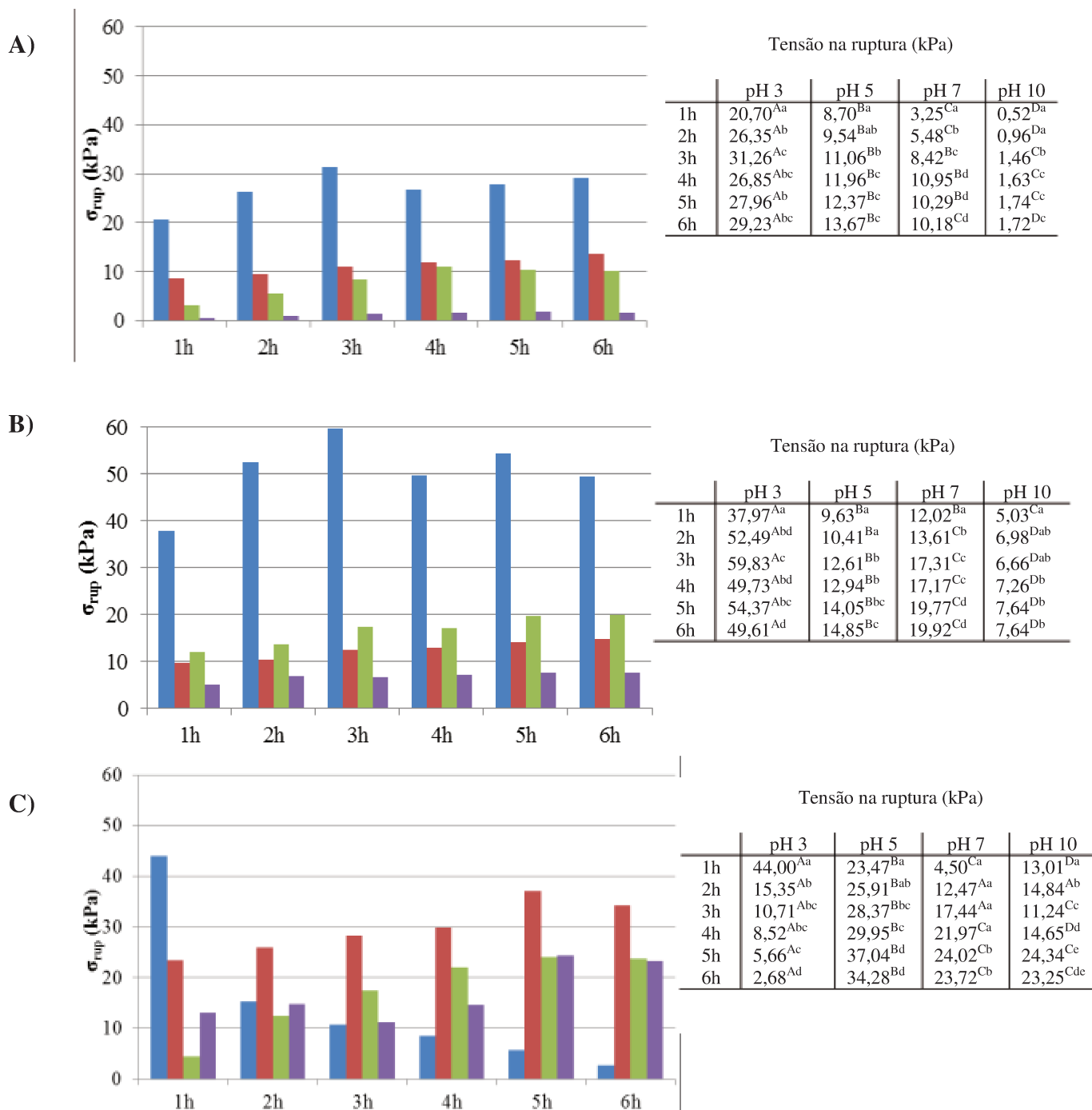


Figura 13: Tensão na ruptura dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno obtidos a A) 50°C, B) 60°C e C) 80°C, nos diferentes valores de pH (3 ■, 5 ■, 7 ■ e 10 ■) ao longo de 6 horas de processo

* Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam amostras nos diferentes tempos de um mesmo pH. Letras maiúsculas comparam amostra dos diferentes valores de pH num mesmo tempo.

Em pH abaixo do pI (pH 3) e temperatura próxima e abaixo da T_d (50 e 60°C), observou-se os maiores valores da tensão de ruptura, sendo que esta variou entre 20 e 60 kPa. Nestes tratamentos houve um aumento da dureza do gel nas 3 primeiras horas de hidrólise, alcançando o valor máximo (30 e 60 kPa para 50 e 60°C, respectivamente) e depois uma leve queda até o final do processo. Pode se observar que no tratamento a 60°C o valor de tensão foi maior do que a 50°C, indicando que temperaturas mais elevadas causam maior influência na hidrólise do colágeno. Já em temperatura acima da T_d (80°C), a tensão apresentou maior valor na primeira hora de hidrólise, aproximadamente 44 kPa, e teve uma queda brusca a partir de 2 horas de processo (15 kPa), chegando a um valor menor que 3 kPa no final do processo. Quando as moléculas de colágeno são extensivamente aquecidas a valores baixos de pH, as pontes que estabilizam a tripla hélice se quebram e as moléculas de colágeno adotam uma conformação desordenada (WARDS & COURTS, 1977). O teor de proteína solúvel alcançou cerca de 70% (m/m) da proteína total em 2 horas de processo e isto pode ter resultado na forte queda da tensão de ruptura, indicando que esta modificação estrutural do colágeno leva à formação de géis mais frágeis. Máximo e Cunha (2010) observaram que géis formados com a fração solúvel da fibra e pó de colágeno apresentaram baixa resistência à ruptura.

Já em pH próximo ao pI (5), os hidrolisados produzidos nas temperaturas mais baixas (50 e 60°C) apresentaram baixos valores de tensão de ruptura, entre 8 e 14 kPa, indicando que neste valor de pH a rede de gel era mais particulada e frágil que dos hidrolisados obtidos em pH 3. Foi possível notar que nesta faixa de pH o potencial zeta estava muito próximo de zero, condição que leva à agregação e precipitação das proteínas, impedindo a interação com a água e diminuindo a solubilidade das proteínas (abaixo de

10% (m/m)), o que desfavorece a formação da rede de gel. Entretanto, no tratamento a 80°C, notou-se um leve aumento com o passar do tempo, mostrando a influência da temperatura e tempo de processo na hidrólise do colágeno. De fato, nessa condição de processo o valor de potencial zeta aumentou, mostrando que a abertura da cadeia de colágeno favoreceu sua interação com a água.

Os hidrolisados tratados em pH 7 ou 10 apresentaram comportamento semelhante ao pH 5, porém em pH 10 os valores de tensão de ruptura obtidos foram mais baixos, sendo que a 50°C as amostras alcançaram valor máximo de 1,7 kPa e a 60°C de aproximadamente 7 kPa. Estes resultados indicam que em pH elevado a estrutura do colágeno foi pouco alterada, não possibilitando a formação de uma rede de gel forte. Porém a 80°C e pH 10 a tensão de ruptura apresentou um leve aumento com o tempo de hidrólise, indicando novamente a influência do binômio tempo e temperatura.

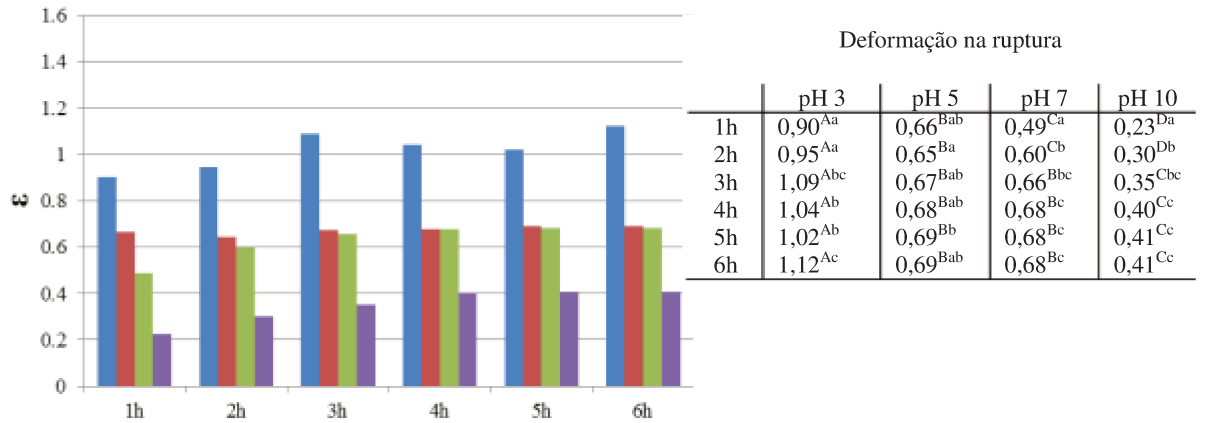
Notou-se que o teor de proteína solúvel teve influência nas propriedades mecânicas dos géis formados a partir dos hidrolisados. Até uma faixa de 10% (m/m) de proteína solúvel os géis apresentaram valores de tensão de ruptura próximos ou abaixo de 10 kPa, sendo que ao se alcançar maiores teores de proteína solúvel a força necessária para a ruptura dos géis também aumentou, alcançando valores próximos de 30 kPa quando a proteína solúvel chegou a teores acima de 30% (m/m). A exceção ocorreu em pH ácido e temperatura acima da temperatura de desnaturação (80°C) do colágeno, sendo possível observar máxima tensão de ruptura no primeiro tempo de hidrólise, com teor de proteína solúvel próximo a 56% (m/m). Com o aumento do teor de proteína solúvel houve uma queda nos valores de tensão de ruptura, chegando a menos de 3 kPa, quando se alcançou 82% (m/m). Além disso, através da análise de eletroforese pode-se notar que neste

tratamento o hidrolisado alcançou massa molecular menor que 37 kDa, o que também pode justificar a fragilidade do gel formado, já que a rigidez do gel é diretamente proporcional à massa molecular (BURGHAGEN, 1999).

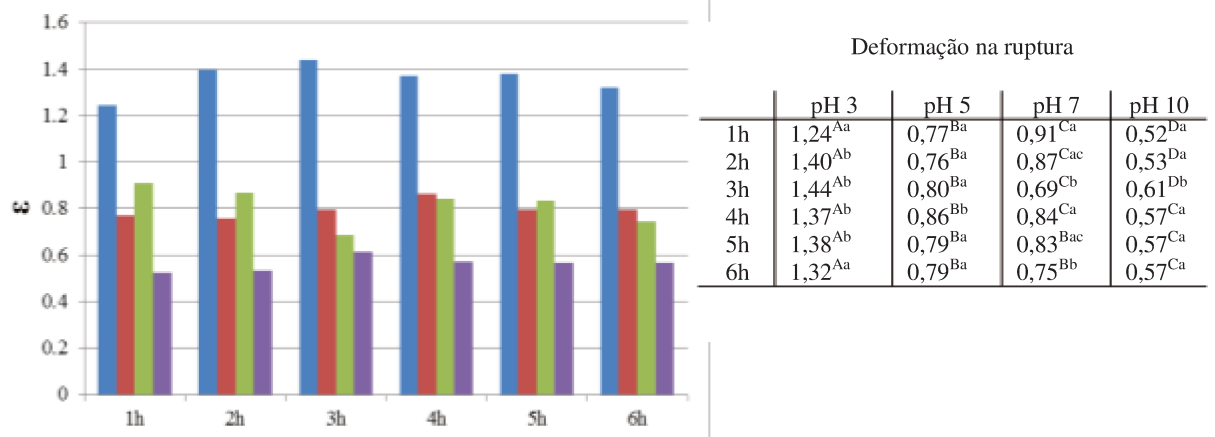
Logo, conclui-se que um aumento no teor de proteína solúvel e consequente aumento da solubilidade, devido à maior fração de moléculas com menor massa molecular, tende a formar géis mais resistentes à ruptura, porém se este valor ultrapassa um determinado ponto (cerca de 60% (m/m)) ocorre uma desestruturação da rede de gel e consequente queda no valor da tensão de ruptura. Em geral, o aumento da temperatura de processo favoreceu o aumento da fração solúvel e, conseqüentemente, melhorou as propriedades mecânicas, levando a formação de um gel mais rígido.

Os valores de deformação na ruptura dos géis de hidrolisados de colágeno tratados a 50, 60 e 80°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10) em todos os tempos do processo (1 a 6 horas) podem ser observados na Figura 14.

A)



B)



C)

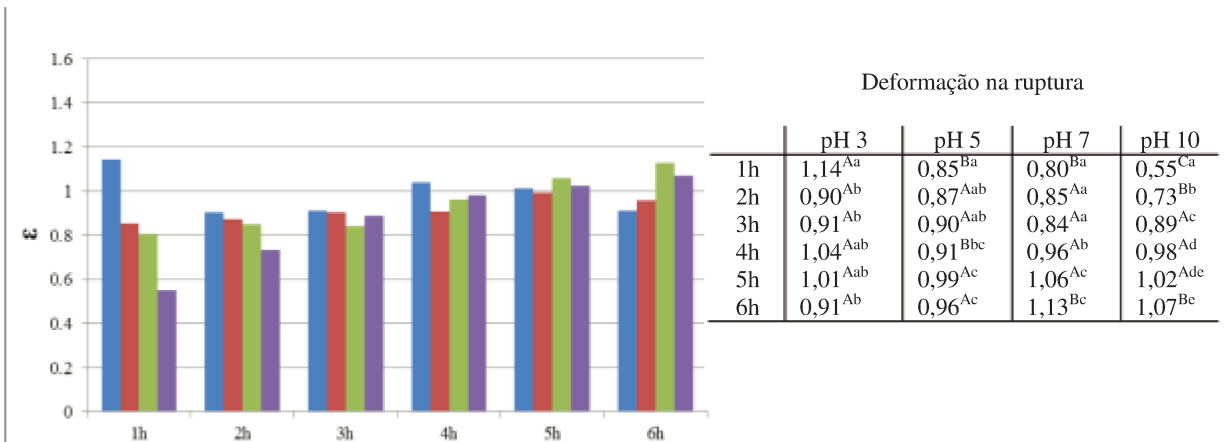


Figura 14: Deformação na ruptura dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno obtidos a A) 50°C, B) 60°C e C) 80°C, nos diferentes valores de pH (3 ■, 5 ■, 7 ■ e 10 ■) ao longo de 6 horas de processo

* Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam amostras nos diferentes tempos de um mesmo pH. Letras maiúsculas comparam amostra dos diferentes valores de pH num mesmo tempo.

Os valores de deformação na ruptura dos géis de hidrolisados obtidos em pH 5 e 7 foram similares, apresentando um leve aumento com o aumento da temperatura e tempo de hidrólise, alcançando valores entre 60 e 100%. Já os hidrolisados obtidos em pH 3 apresentaram os maiores valores de deformação na ruptura, sendo que o tratamento a 80°C apresentou um leve queda com o passar do tempo de hidrólise. Os tratamentos em pH ácido, quando comparados aos outros tratamentos na mesma temperatura, levaram a maior teor de proteína solúvel e deformabilidade, resultado que foi semelhante aos obtidos por Máximo e Cunha (2010).

A 80°C os hidrolisados obtidos em pH 5 e 7 tenderam a apresentar comportamento semelhante ao tratado em pH 3, com valores de deformação na ruptura próximos a 100%. No entanto, o hidrolisado nesta temperatura e pH 10 apresentou valor mais baixo (55%), na primeira hora de hidrólise e aumentou com o passar do tempo. Assim, no final do processo todos os tratamentos apresentaram valores de deformação na ruptura próximos a 100%. A baixa deformabilidade em tratamentos em pH alcalino, pode ser justificado pela presença de fibras encurtadas, que podem prejudicar as propriedades mecânicas.

Valores de pH abaixo do pI (3) propiciaram a formação dos géis mais deformáveis. Nos outros valores de pH foi necessária a aplicação de maior temperatura para a produção de géis com alta deformabilidade, sendo que em pH igual a 10 também foi preciso um maior tempo de hidrólise.

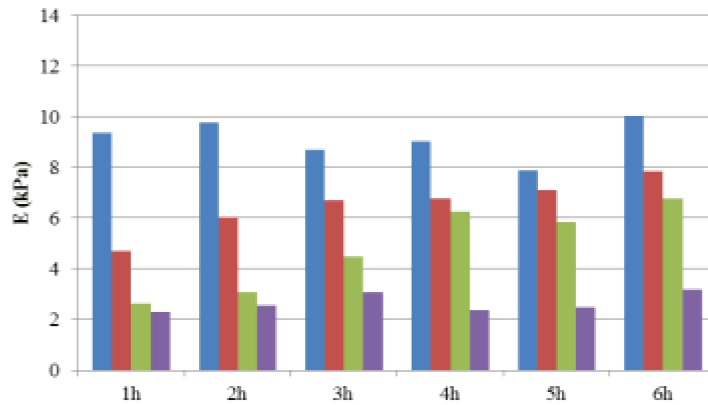
O comportamento dos módulos de elasticidade da maior parte dos géis de hidrolisados de colágeno (Figura 15) foi semelhante ao da tensão na ruptura na mesma condição de processo. Entre estes pode-se citar o tratamento a 80°C e pH 3 que, como a tensão de ruptura, apresentou valor elevado no primeiro tempo de hidrólise (11,95 kPa) e

teve uma queda brusca a partir de 2 horas de hidrólise, alcançando valores menores de 2 kPa ao final do processo. Além deste, os tratamentos com valor de pH igual a 5 e temperatura de 50 e 60°C, também apresentaram comportamento semelhante à tensão de ruptura, com um leve aumento com o passar do tempo, com valores variando entre 4 e 7 kPa.

Já os valores apresentados ao longo do tempo nos tratamentos em pH 3 a 50 e 60°C, não apresentaram diferença significativa, ficando em torno de 10 kPa. Os tratamentos em pH 10 também não apresentaram variação nos valores de módulos de elasticidade, sendo que os resultados chegaram no máximo a 8 kPa (a 80°C). O tratamento a 80°C e pH 5 ou 10, teve um leve aumento até 3 horas de hidrólise, sendo que após este tempo apresentou uma queda.

O tratamento a 60°C e pH igual a 7, mostra um aumento nos valores de módulo de elasticidade, assim como os resultados obtidos pela tensão de ruptura, o que não ocorreu nos outros tratamentos.

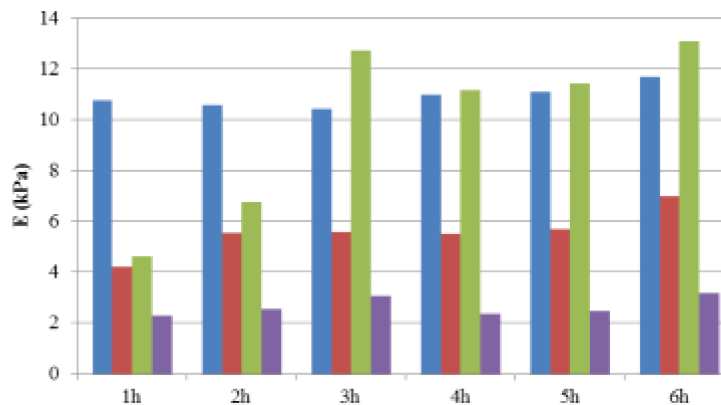
A)



Módulo de Elasticidade (kPa)

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 10
1h	9,36 ^{Aa}	4,69 ^{Ba}	2,62 ^{Ca}	2,30 ^{Ca}
2h	9,77 ^{Aa}	6,05 ^{Bab}	3,06 ^{Cab}	2,55 ^{Ca}
3h	8,70 ^{Aa}	6,70 ^{Bb}	4,48 ^{Bb}	3,06 ^{Ca}
4h	9,04 ^{Aa}	6,78 ^{Bb}	6,26 ^{Bc}	2,39 ^{Ca}
5h	7,87 ^{Aa}	7,11 ^{Ab}	5,85 ^{Abc}	2,48 ^{Ba}
6h	10,05 ^{Aa}	7,84 ^{Bb}	6,78 ^{Bc}	3,19 ^{Ca}

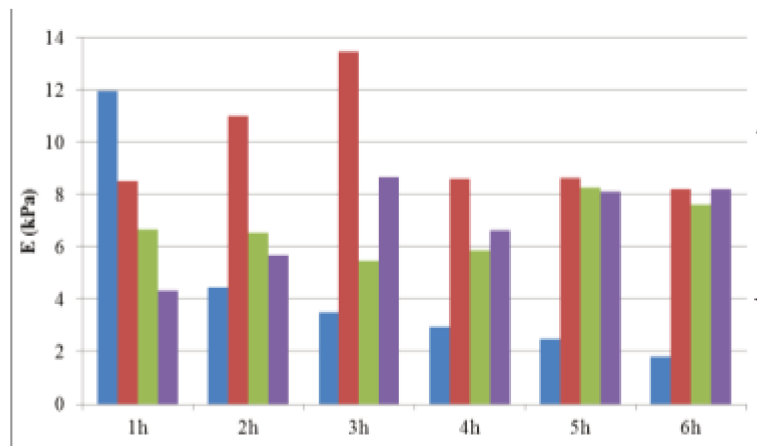
B)



Módulo de Elasticidade (kPa)

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 10
1h	10,76 ^{Aa}	4,22 ^{Ba}	4,64 ^{Ba}	2,30 ^{Ca}
2h	10,61 ^{Aa}	5,56 ^{Bab}	6,77 ^{Bab}	2,55 ^{Ca}
3h	10,44 ^{Aa}	5,58 ^{Bab}	12,74 ^{Ac}	3,06 ^{Ca}
4h	11,02 ^{Aa}	5,50 ^{Bab}	11,17 ^{Ac}	2,39 ^{Dab}
5h	11,11 ^{Aa}	5,72 ^{Bab}	11,45 ^{Ac}	2,48 ^{Ca}
6h	11,69 ^{Aa}	6,98 ^{Bb}	13,10 ^{Ac}	3,19 ^{Cb}

C)



Módulo de Elasticidade (kPa)

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 10
1h	11,97 ^{Aa}	8,51 ^{Ba}	6,66 ^{Ca}	4,34 ^{Ca}
2h	4,45 ^{Ab}	11,02 ^{Bab}	6,56 ^{Aa}	5,70 ^{Ab}
3h	3,51 ^{Ab}	13,48 ^{Bb}	5,47 ^{ABa}	8,66 ^{ABb}
4h	2,97 ^{Ab}	8,61 ^{Bab}	5,87 ^{Ca}	6,65 ^{Cb}
5h	2,50 ^{Ab}	8,63 ^{Bab}	8,27 ^{Bb}	8,11 ^{Bb}
6h	1,82 ^{Ab}	8,20 ^{Ba}	7,63 ^{Bb}	8,22 ^{Bb}

Figura 15: Módulos de elasticidade dos géis formados a partir dos hidrolisados de colágeno obtidos a A) 50°C, B) 60°C e C) 80°C, nos diferentes valores de pH (3 ■ , 5 ■ , 7 ■ e 10 ■) ao longo de 6 horas de processo

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam amostras nos diferentes tempos de um mesmo pH. Letras maiúsculas comparam amostra dos diferentes valores de pH num mesmo tempo.

4.3.2 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA

A capacidade de retenção de água (CRA) é uma propriedade relacionada à estrutura da rede dos géis, sendo uma característica que influencia na aceitação dos produtos pelos consumidores. Sendo assim, os resultados de capacidade de retenção de água dos géis produzidos a partir dos produtos obtidos da hidrólise do colágeno foram avaliados e estão apresentados na Figura 16.

Em comparação com outras proteínas funcionais usualmente utilizadas na indústria de alimentos, o colágeno possui maior capacidade de retenção de água que o plasma e o caseinato, sendo uma solução viável para a produção de alimentos com baixo teor de gordura, como derivados de carne bovina (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002). O colágeno possui a propriedade de absorver e reter grandes quantidades de água, devido à presença de grupos polares reativos na molécula, os quais possibilitam a interação com moléculas de água (HOINACKI, 1989).

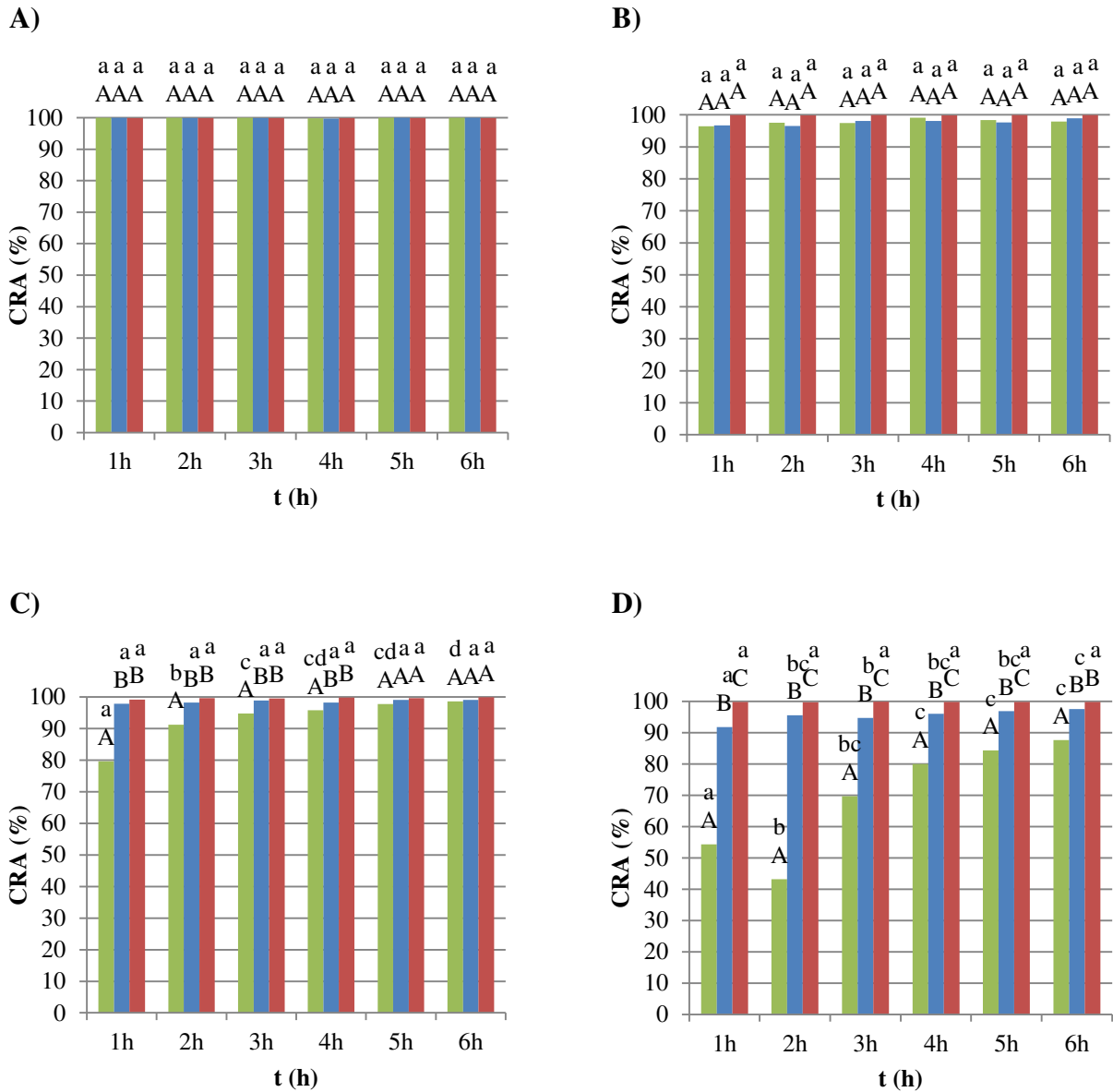


Figura 16: Capacidade de Retenção de Água dos tratamentos nos valores de pH igual A) 3, B) 5, C) 7 e D) 10, nas temperaturas de 50 (■), 60 (■) e 80°C (■), ao longo de 6 horas

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam amostras nos diferentes tempos de uma mesma temperatura. Letras maiúsculas comparam amostras das diferentes temperaturas num mesmo tempo

Em baixos valores de pH, verificou-se que nem a temperatura, nem o tempo tiveram efeito sobre os valores de CRA, sendo estes iguais a 100%. Notou-se que os hidrolisados tratados a pH 7 e 10 a 50°C apresentaram valores de CRA abaixo de 90%, o que pode ser justificado pela frágil rede formada nestes géis e confirmado pelos baixos valores de tensão de ruptura. Porém, ao se comparar os tratamentos a 60 e 80°C, notou-se que com o tempo de processo a CRA alcançou valores acima de 90%, não apresentando mais diferença significativa.

O tratamento em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico, leva à formação de agregados turvos e sujeitos a sinerese devido às forças atrativas intensas entre as moléculas protéicas. Como foi possível observar na análise da carga elétrica superficial dos hidrolisados, existe uma faixa de pH (entre 5 e 10) em que a carga é próxima de zero, o que pode justificar os valores mais baixo de CRA nestes valores de pH. Entretanto, com o aumento da temperatura ocorre uma desnaturação da proteína, expondo grupamentos reativos que durante o resfriamento formam, principalmente, pontes de hidrogênio intensificando a retenção de água pela matriz (BRANDENBERG et al., 1992). Os hidrolisados produzidos em pH alcalino e temperatura abaixo do que a de desnaturação apresentaram baixa deformabilidade o que pode ter prejudicado a capacidade de retenção de água.

4.4 PROPRIEDADES EMULSIFICANTES

A 50°C tonou-se poucas alterações na estrutura do colágeno, já a 80°C os hidrolisados apresentaram alta solubilidade e, conseqüentemente, grande afinidade pela água, o que provavelmente reduz a capacidade emulsificantes. Logo, os hidrolisados produzidos a 60°C foram escolhidos para o estudo das propriedades emulsificantes do colágeno.

As propriedades emulsificantes dos produtos obtidos nos diferentes processos de hidrólise a 60°C foi avaliado em emulsões O/A compostas de 10% (m/m) de óleo de soja e 0,5% (m/m) de colágeno. Primeiramente, o pH de cada emulsão foi medido e estes valores são apresentados na Tabela 7. Observou-se que os valores de pH das emulsões estavam próximos do pH do tratamento de hidrólise.

Tabela 7: Valor de pH das emulsões O/A (10% (m/m) de óleo e 0,5% (m/m) de colágeno)

pH da hidrólise	pH da emulsão
3	3,71
5	5,63
7	7,26
10	10,29

4.4.1 ESTABILIDADE À CREMEÇÃO

Na Figura 17 estão apresentados os valores do índice de cremeação das emulsões. Todas as emulsões, exceto as preparadas com os produtos obtidos após 6 horas de hidrólise em pH 3, apresentaram instabilidade cinética com a formação de uma fase inferior aquosa e uma superior oleosa. Nas emulsões preparadas em pH 5 foi possível observar a formação de duas fases logo após o processo de homogeneização. As emulsões contendo hidrolisados preparados em pH 7 e 10 também apresentaram separação de fases, sendo que nas primeiras 24 horas este processo foi mais acentuado, porém um pouco mais lento que em pH 5. As emulsões preparadas com hidrolisados em pH 3 e 6 horas de processo não mostraram a formação de 2 fases distintas, porém os outros tratamentos neste mesmo pH e com 1 e 3 horas de processo apresentaram separação de fases após 1 e 10 dias, respectivamente, como pode ser observado na Figura 18.

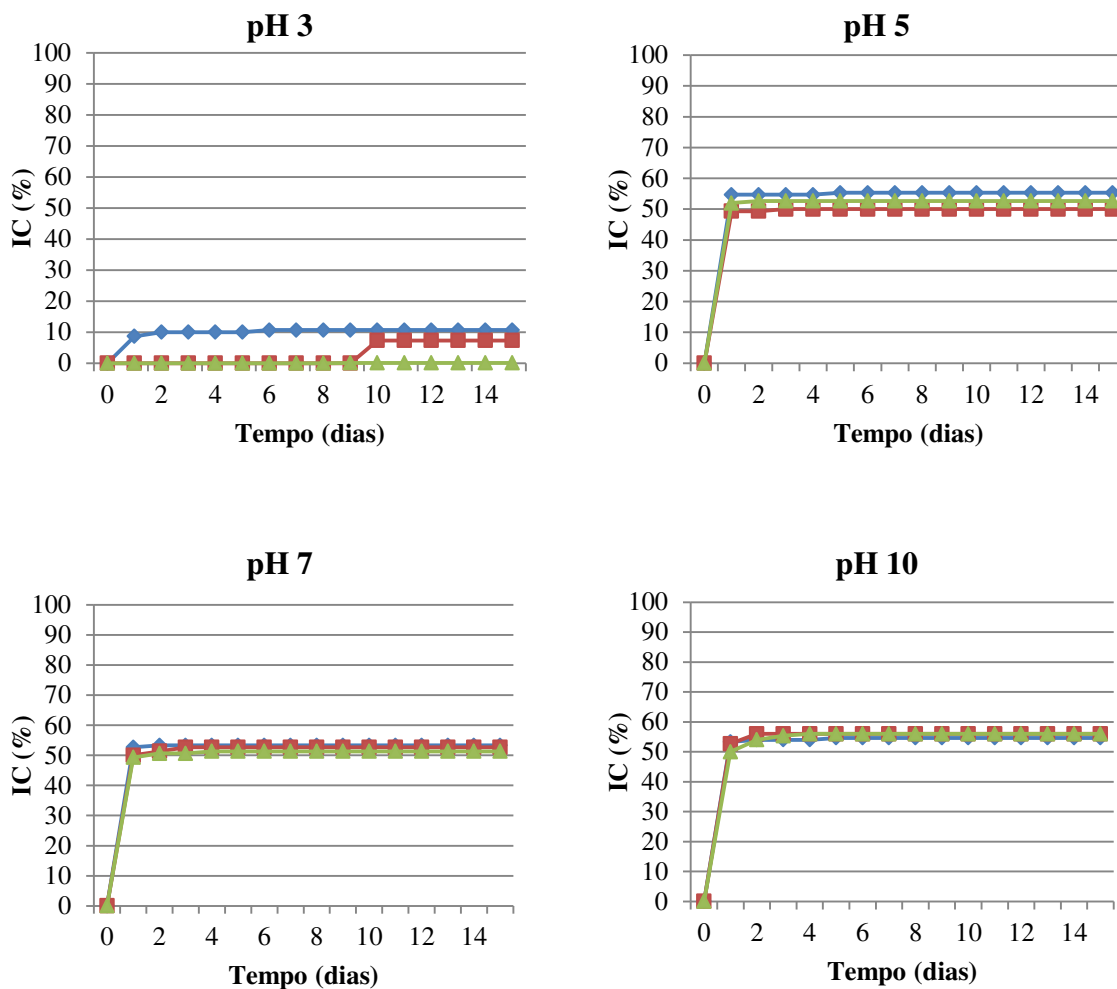


Figura 17: Efeito do pH e do tempo de hidrólise no índice de cremeação (IC) das emulsões estabilizadas por 0,5% de hidrolisado de colágeno. Tempos de processo de (♦) 1 hora, (■) 3 horas e (▲) 6 horas.

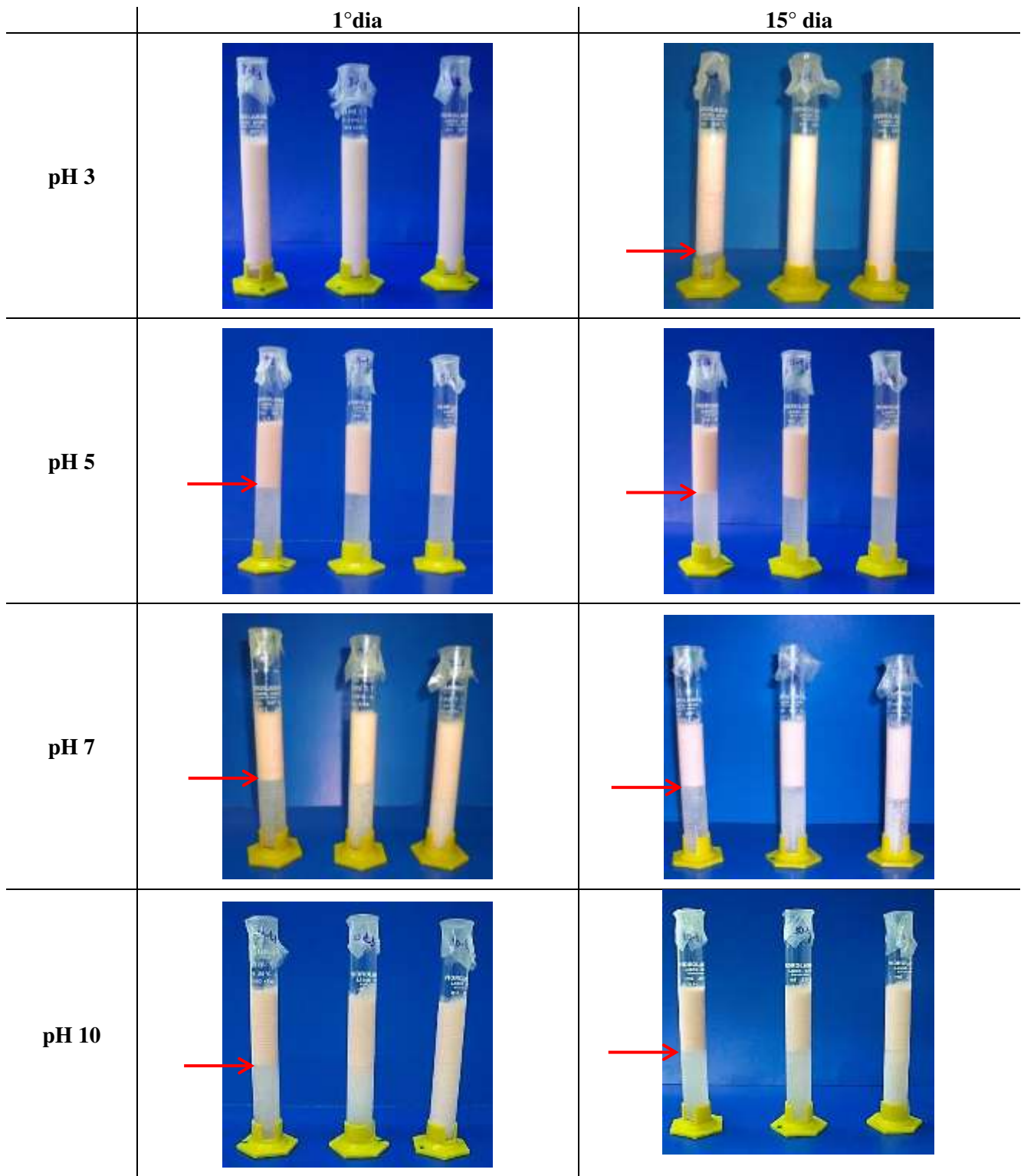


Figura 18: Emulsões estabilizadas com colágeno hidrolisado a 60°C e em valores de pH 3, 5, 7 e 10. Armazenamento em 1 e 15 dias.

A maior estabilidade em pH 3 deve-se ao fato de que com a hidrólise parcial do colágeno ocorre uma modificação na estrutura da proteína que propicia melhor interação proteína-lipídeo, promovendo uma estabilidade eletrostática pela força de repulsão das gotas. Essa repulsão é determinada pela carga existente na superfície da proteína e, abaixo do pI, estas proteínas apresentaram carga positiva. Quando esta carga é suficientemente alta, existe uma forte repulsão eletrostática entre as gotas, impedindo que estas se agreguem. Isto pode ser observado nos hidrolisados preparados que possuíam pI próximo de 7 e carga elétrica superficial próxima de +30 mV. Na Figura 18 nota-se que em pH 3, o aumento do tempo de hidrólise levou à maior estabilidade da emulsão. O hidrolisado preparado com 1 hora de processo apresentou IC próximo de 10% após 1 dia de armazenamento e o preparado com 6 horas de processo não apresentou separação de fases, indicando que a maior intensidade de tratamento térmico causou uma maior interação proteína-lipídeo. A capacidade emulsificante de material colagenoso extraído de peixes foi maior em níveis de pH entre 1 e 3 e decresceu à medida que o pH aumentou (MONTERO & BODERÍAS, 1991) e se aproximou do ponto isoelétrico (pI) desta proteína, entre 6,5 e 8,5 (NEKLYUDOV, 2003).

Já para os hidrolisados preparados em pH 5 e 7, nota-se que a carga superficial é praticamente nula, havendo assim atração entre as gotas (interações hidrofóbicas, eletrostáticas e forças de Van der Waals). Com essa interação atrativa, ocorre agregação das partículas, podendo haver a formação de uma rede tridimensional (CHEN et al., 1999), que diminui a mobilidade e leva à coalescência, que pode ser observada nas microscopias (Figura 19 e 20). Nota-se também que as emulsões encontram-se mais floculadas, o que leva à redução da estabilidade à cremação. Além disso, neste valor de pH os hidrolisados

apresentaram valores muito baixos de proteína solúvel, o que possibilita a desestabilização das emulsões.

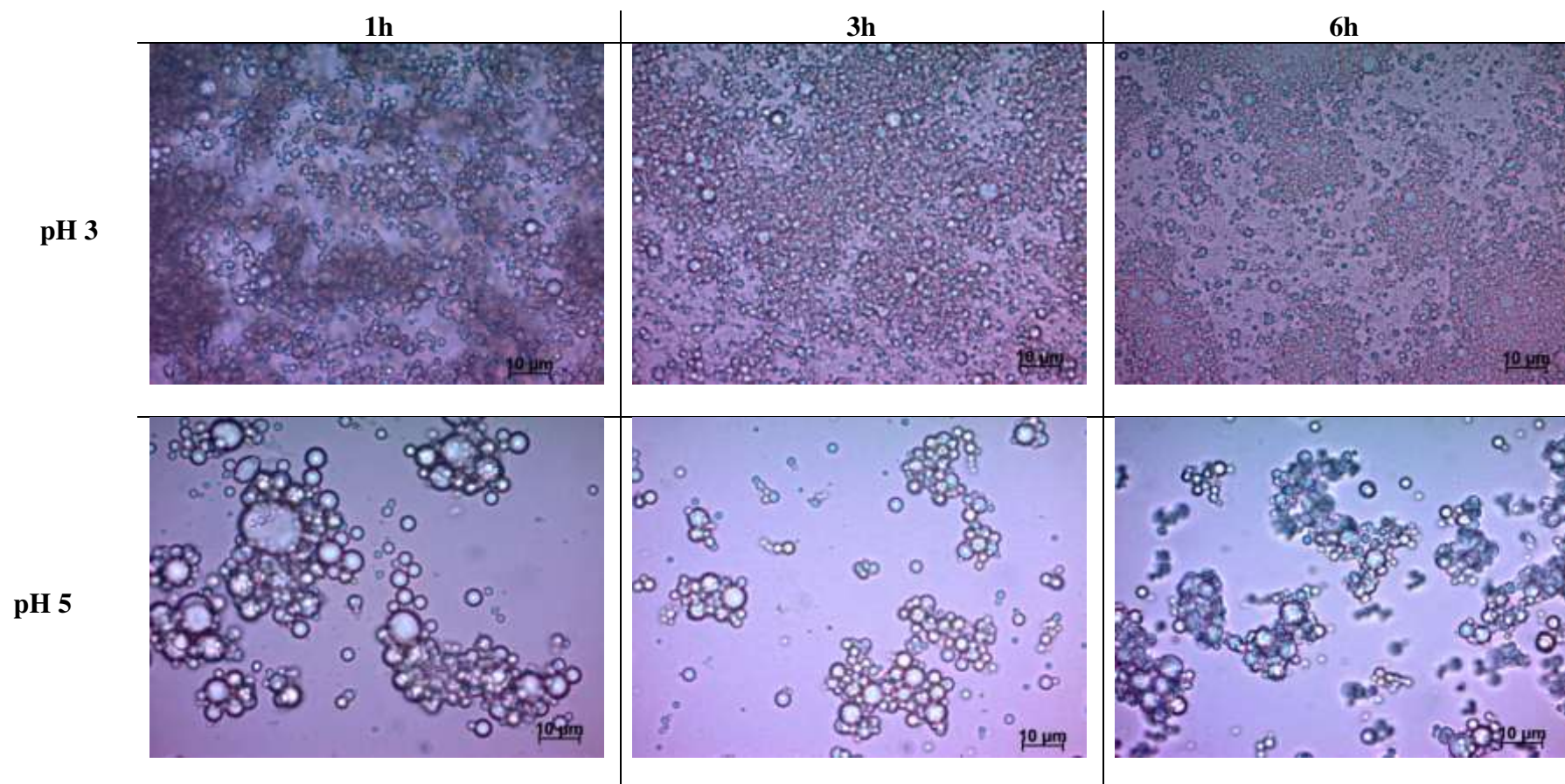


Figura 19: Micrografias das emulsões O/A estabilizadas com 0,5% de hidrolisado de colágeno obtidos em tratamentos a 60°C e pH 3 e 5. Aumento de 100x e barra de escala de 10µm. O tempo acima das figuras representa o ocorrido no processo de hidrólise

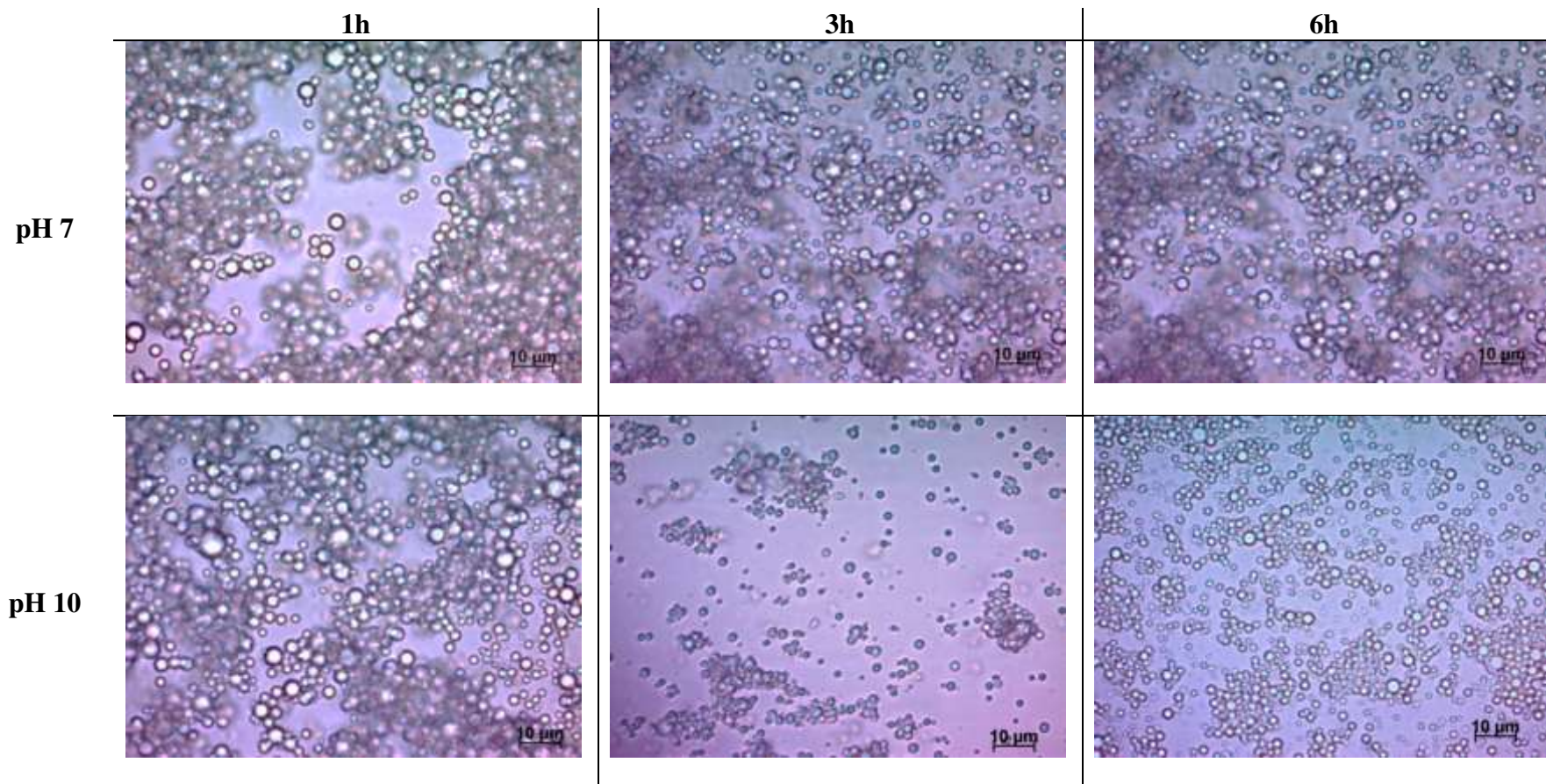


Figura 20: Micrografias das emulsões O/A estabilizadas com 0,5% de hidrolisado de colágeno obtidos em tratamentos a 60°C e pH 7 e 10. Aumento de 100x e barra de escala de 10µm. O tempo acima das figuras representa o ocorrido no processo de hidrólise

Os hidrolisados preparados em pH básico apresentaram pI próximo de 5 e carga de -5 mV em pH próximo a 10, o que poderia levar uma certa estabilidade eletrostática através da repulsão das gotas, como ocorreu em pH 3. Entretanto, como a carga não foi suficientemente alta, a repulsão eletrostática não foi forte o suficiente para superar as forças atrativas, levando a uma instabilidade das emulsões e formação de uma fase inferior.

Resultados semelhantes foram obtidos por Santana et al. (2011) em que foram formadas emulsões estáveis em pH 3,5 devido à elevada carga positiva. Em pH ácido a tripla hélice se abre e modifica a hidrofobicidade superficial da proteína, que pode ser parcialmente responsável pela melhoria nas propriedades emulsificantes (SANTANA, 2011).

O pI relativamente elevado do colágeno (entre 5 e 8) pode viabilizar a estabilidade de emulsões em uma faixa de pH ácida, que é o caso da maior parte das emulsões alimentícias. Além disso, o uso do colágeno em valores de pH abaixo do pI também poderia favorecer a proteção de lipídios poliinsaturados presentes em emulsões alimentícias. Em pH abaixo do pI, as proteínas formam uma membrana interfacial carregada positivamente ao redor das gotas de óleo, repelindo eletrostaticamente íons Fe^{2+} e Fe^{3+} catalisadores da oxidação de lipídeos presentes na fase aquosa (HU et al., 2003).

4.4.2 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE GOTAS

A distribuição de tamanho e o diâmetro médio de gotas são parâmetros muito importantes para diversas propriedades das emulsões como, por exemplo, vida de prateleira, aparência, textura e aroma. Consequentemente é fundamental que se possa controlar e medir com precisão o tamanho das gotas em emulsões (MCCLEMENTS,

2005). O comportamento da distribuição do tamanho de gotas das emulsões estabilizadas com colágeno processado em diferentes tempos de hidrólise (1, 3 e 6 horas) pode ser observado na Figura 21.

A partir das microscopias (Figuras 19 e 20), observa-se claramente uma diferenciação estrutural nos tamanhos e distribuição de gotas das emulsões estabilizadas com os hidrolisados produzidos em diferentes valores de pH. Em valores de pH igual a 3 existe a formação de uma emulsão verdadeira, ou seja, a dispersão de gotas de óleo em meio aquoso. Ao longo do tempo de hidrólise, notou-se que a distribuição de tamanho das gotas passou de bimodal, com dois picos, para monomodal. Também foi observada uma redução no diâmetro médio (D_{32}) e na polidispersão, indicando que o processo de hidrólise do colágeno teve importante papel na estabilização das emulsões (Tabela 8).

Tabela 8: Diâmetro médio de gotas (μm) e polidispersão (Span) das emulsões estabilizadas por hidrolisados de colágeno produzidos a 60°C , nos valores de pH igual a 3, 5, 7 e 10

pH	Tempo de hidrólise	Span	D_{32}
3	1h	2,65 ^{aA}	5,04 ^{aA}
	3h	2,19 ^{bA}	2,12 ^{bA}
	6h	1,64 ^{cA}	1,52 ^{cA}
5	1h	3,83 ^{aB}	16,89 ^{aB}
	3h	4,57 ^{aB}	10,63 ^{bB}
	6h	4,37 ^{aB}	8,33 ^{cB}
7	1h	4,51 ^{aB}	7,40 ^{aC}
	3h	5,54 ^{abC}	4,42 ^{bC}
	6h	6,17 ^{bC}	4,13 ^{bC}
10	1h	7,13 ^{aC}	5,95 ^{aA}
	3h	5,80 ^{bC}	3,62 ^{bD}
	6h	7,88 ^{aC}	2,58 ^{cD}

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam amostras nos diferentes tempos em um mesmo pH. Letras maiúsculas comparam amostras em diferentes valores de pH num mesmo tempo

Nas emulsões estabilizadas com hidrolisados produzidos em valores de pH próximo ao pI, observou-se tamanhos de gotas elevados, caracterizando a flocculação das gotas devido à desestabilização da emulsão.

Todas as emulsões estabilizadas por hidrolisados obtidos em valor de pH acima do pI (7 e 10), apresentaram distribuição multimodal sendo que o pico de maior tamanho reduziu ao longo do tempo de hidrólise com consequente aumento do pico a menores tamanhos de gotas. Apesar da redução do tamanho das gotas, estes resultados indicam a formação de gotas agregadas ou flocculadas, o que foi confirmado pelas micrografias e resultados de índice de cremeação. Além disso, quando as emulsões foram preparadas com os produtos obtidos nestes dois valores de pH, a polidispersão foi mais acentuada, levando à coalescência das gotas e desestabilização das emulsões. O aparecimento de picos com tamanhos menores pode estar associado a proteínas não adsorvidas que se agregaram, ocorrendo a flocculação por depleção (DICKINSON, 2006).

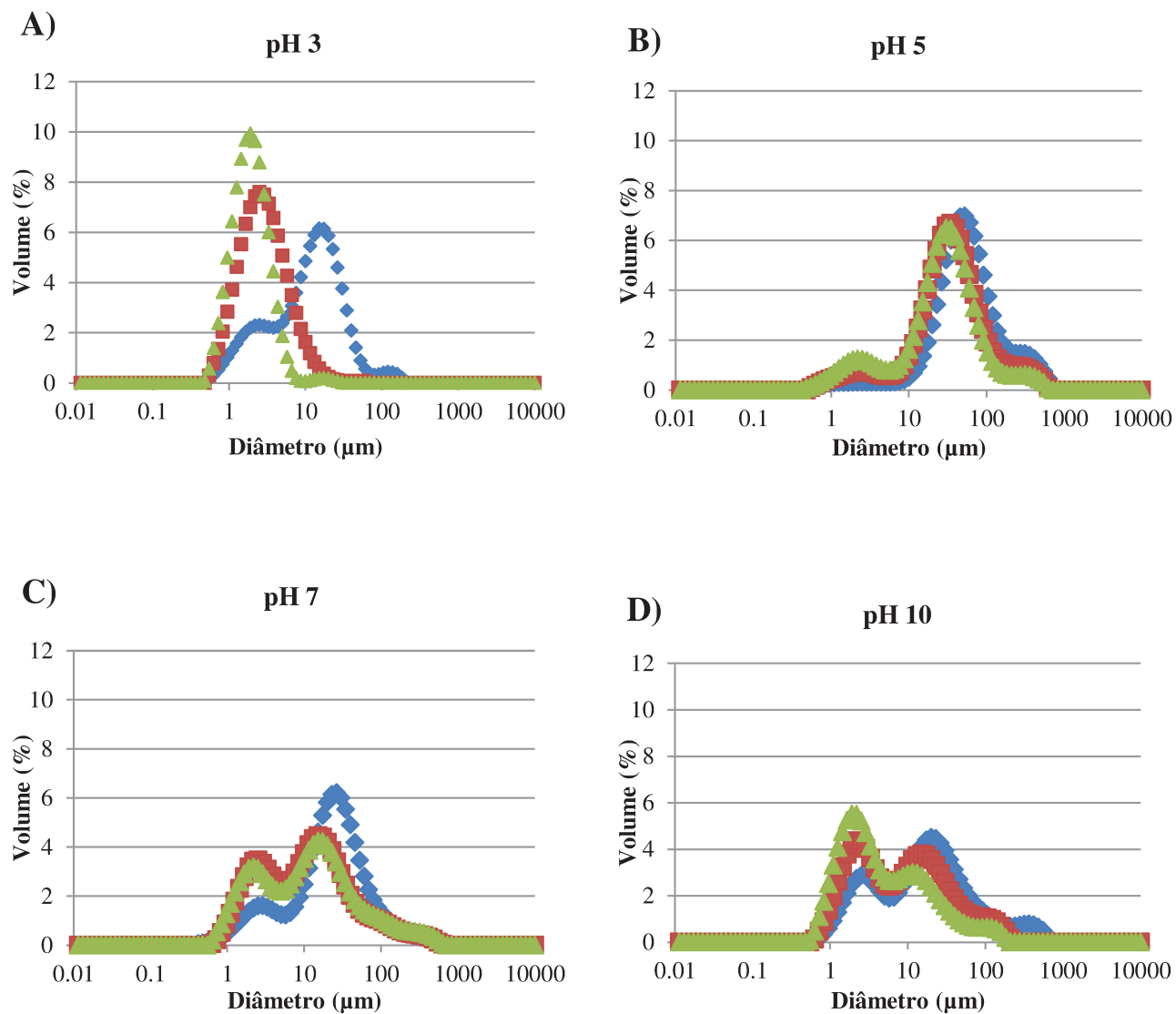


Figura 21: Distribuição de tamanho de gotas das emulsões estabilizadas por hidrolisados produzidos a 60°C, nos valores de pH iguais a A) 3, B) 5, C) 7 e D) 10, nos tempos de 1 (♦), 3 (■) e 6 (▲) horas de hidrólise

A comparação dos diferentes valores de pH no último tempo de hidrólise (6 horas), mostrou que em valores de pH abaixo do pI obteve-se o menor diâmetro médio, sendo que a maioria das gotas apresentaram D_{32} próximo a 1,5 μm e baixa polidispersão. Já os outros tratamentos apresentaram distribuição multimodal e elevada polidispersão. Além disso, no

valor de pH igual ao pI do colágeno (5,0), também notou-se o maior diâmetro de gotas, com valores de D_{32} em torno de 8 μm , o que reforça a hipótese da formação de agregados.

Santana et al. (2011) também observou que em valores baixos de pH (3,5) houve a formação de emulsões verdadeiras, com gotículas dispersas em uma fase aquosa. Além disso, as emulsões produzidas em altos valores de pH mostraram uma rede macroscópica devido à ausência de repulsão eletrostática entre as gotas.

4.4.3 COMPORTAMENTO REOLÓGICO

As curvas de escoamento em estado estacionário foram avaliadas sendo que, nas emulsões em que houve separação de fases, estas fases foram avaliadas separadamente. Na Figura 22 estão apresentadas as curvas de escoamento das emulsões estabilizadas por colágeno hidrolisado a 60°C, nos valores de pH igual a 3, 5, 7 e 10, nos tempos de 1, 3 e 6 horas de processo.

Em todos os casos, as fases inferiores apresentaram índice de comportamento (n) igual a 1, sendo assim caracterizados como fluidos newtonianos. O ajuste apresentou índice de determinação (R^2) acima de 0,98. Na Tabela 9 observa-se que os valores de viscosidade (η) apresentaram valores entre 0,9 e 1,1 mPa.s, indicando que a fase inferior era predominantemente composta por água.

Emulsões estabilizadas por hidrolisado produzido em pH 3 não mostraram separação de fases e apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), sem tensão residual. O modelo lei da potência foi ajustado aos resultados e valores de coeficiente de determinação próximos de 0,99 foram obtidos. No primeiro tempo de hidrólise (1 hora), a

emulsão apresentou alta pseudoplasticidade ($n = 0,50$) e viscosidade próxima de 11,39 mPa.s, sendo que com o passar do tempo de reação (6 horas de hidrólise) houve um aumento do índice de comportamento, indicando uma maior tendência ao comportamento de fluido Newtoniano, e uma redução na viscosidade, característico de emulsão menos polidispersa e com tamanhos de gotas menores.

Tabela 9: Parâmetros reológicos das emulsões preparadas com os hidrolisados de colágeno obtidos a 60°C, nos diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 10)

pH	Tempo de processo	Fase Inferior			Fase Superior			
		n	η (mPa.s)	R^2	n	k (mPa.s ⁿ)	η_{100} (mPa.s)	R^2
3	1h	-	-	-	0,50 ^{aA}	121,1 ^{aA}	11,39 ^{aA}	0,984
	3h	-	-	-	0,66 ^{bA}	30,21 ^{bA}	6,317 ^{bA}	0,998
	6h	-	-	-	0,92 ^{cA}	3,44 ^{bA}	2,320 ^{cA}	0,997
5	1h	1	0,95 ^{aA}	0,987	0,48 ^{aA}	362,2 ^{aB}	32,23 ^{aB}	0,995
	3h	1	1,01 ^{aA}	0,987	0,62 ^{bA}	81,41 ^{bAB}	14,07 ^{bAB}	0,997
	6h	1	1,11 ^{aA}	0,988	0,69 ^{cB}	42,89 ^{bAB}	9,86 ^{bB}	0,996
7	1h	1	0,93 ^{aA}	0,988	0,58 ^{aAB}	134,9 ^{aA}	16,850 ^{aA}	0,992
	3h	1	1,03 ^{aA}	0,987	0,64 ^{aA}	97,59 ^{aB}	17,90 ^{aB}	0,994
	6h	1	0,97 ^{aA}	0,986	0,64 ^{aB}	60,69 ^{aB}	10,56 ^{aB}	0,988
10	1h	1	0,96 ^{aA}	0,987	0,67 ^{aB}	73,67 ^{aA}	15,65 ^{aA}	0,988
	3h	1	0,95 ^{aA}	0,984	0,62 ^{bA}	112,5 ^{bB}	19,63 ^{bB}	0,999
	6h	1	1,04 ^{aA}	0,987	0,71 ^{cB}	37,27 ^{cAB}	9,79 ^{cB}	0,999

*Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam amostras nos diferentes tempos em um mesmo pH. Letras maiúsculas comparam amostras em diferentes pH em um mesmo tempo

Nos outros valores de pH (5, 7 e 10), a fase superior apresentou comportamento de fluido pseudoplástico, onde $n < 1$ em todos os tempos de hidrólise. Sendo assim, todos os tratamentos foram ajustados ao modelo lei da potência, com coeficientes de determinação próximos de 0,99.

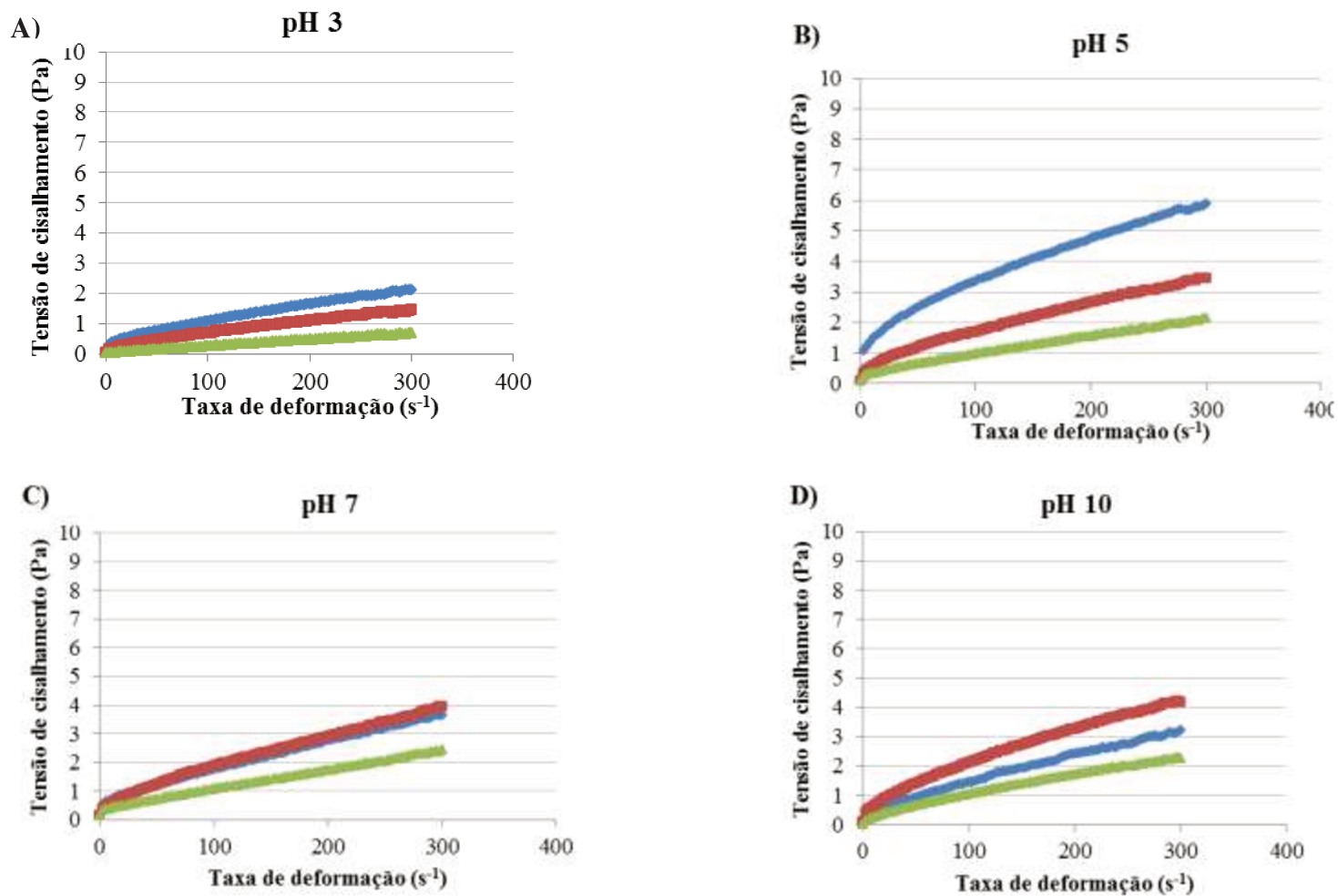


Figura 22: Curvas de escoamento da emulsão estabilizada pelo hidrolisado de colágeno tratado a 60 °C e pH A) 3, e das fases superiores obtidas nos tratamentos em valores de pH iguais a B) 5, C) 7 e D) 10, nos tempos de 1 (◆), 3 (■) e 6 (▲) horas de processo

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram avaliar os efeitos das condições de processo (tempo, temperatura e pH) nas características de hidrolisados de colágeno e, conseqüentemente, nas suas propriedades gelificantes (propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água) e capacidade emulsificante.

Dentre as condições avaliadas, os hidrolisados produzidos apresentaram diferentes propriedades, sendo que o tratamento a elevada temperatura e em condições ácidas levou à formação de hidrolisados com maior teor de proteína solúvel, menor massa molecular e elevada carga superficial positiva, gerando géis com excelentes propriedades mecânicas a curto tempo de processo, sendo recomendados para o uso em sobremesas gelificadas, geleias e balas de goma. Por outro lado, uma brusca queda nos valores de tensão de ruptura ocorreu em elevados tempos de processo. A alta solubilidade e a baixa capacidade de formação de gel possibilita a utilização destes hidrolisados em bebidas como isotônicos e sucos, com apelo estético ou como enriquecedor protéico. Nas outras temperaturas (50 e 60°C), os hidrolisados produzidos em pH abaixo do pI (3) formaram géis firmes, com aumento na tensão de ruptura ao longo do tempo de hidrólise. Estes hidrolisados apresentaram as bandas α e β , características da estrutura do colágeno e maior massa molecular média. Nos outros valores de pH, os hidrolisados apresentaram baixo teores de proteína solúvel, o que pode justificar as baixas propriedades mecânicas, sendo que os tratamentos a 80°C apresentaram valores de tensão de ruptura mais elevados. A utilização de pH ácido ou temperatura acima da temperatura de desnaturação propiciou a produção de géis de hidrolisados com alta deformabilidade, indicando que estes produtos podem ser utilizados em filmes e cápsulas à base de colágeno.

Os hidrolisados produzidos em condições de maior acidez apresentaram melhor capacidade emulsificante, sendo que o aumento do teor de proteína solúvel intensificou esta propriedade. Os hidrolisados obtidos a 60°C e pH igual a 3, produziram emulsões estáveis, podendo ser recomendado para a utilização em bebidas lácteas.

De maneira geral, foi possível a produção de hidrolisados de colágeno com diferentes propriedades tecnológicas a partir de variações nas condições de processo. Em valores de pH próximo ou acima do pI foi necessária a aplicação de elevadas temperaturas para que ocorressem transformações na estrutura do colágeno capazes de modificar sua funcionalidade. Já os tratamentos em pH ácido levaram a alteração mais relevante das características dos hidrolisados, mesmo em temperaturas próximas ou abaixo da temperatura de desnaturação. Neste caso, quando utilizadas altas temperaturas houve a formação de um produto com alta solubilidade e baixas propriedades mecânicas.

Sendo assim conclui-se que para a produção de hidrolisados com boa capacidade gelificante é mais interessante trabalhar com temperaturas mais amenas e pH abaixo do pI. No entanto, se o objetivo é obter um produto de alta solubilidade a aplicação de elevadas temperaturas é necessária. Já para a produção de emulsões estáveis o mais indicado é a utilização de valores ácidos de pH. Se o objetivo é a produção de hidrolisados com alta capacidade de retenção de água não é indicado o uso de pH acima do pI sendo que, neste caso, é necessário a utilização de temperatura acima da temperatura de desnaturação. Logo, para a produção de hidrolisados com diferentes características tecnológicas é necessária a utilização de diferentes condições de processo.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCZ – Associação Brasileira de Criadores de Zebu. Boi: mil e uma utilidades. Revista ABCZ, ed. 52 – setembro de 2009. Disponível em:
<<http://www.abcz.org.br/revista/materia.php?mostrar=%20Edi%E7%E3o%20N%BA%2052%20-%20setembro/2009&id=4189>>. Acesso em: Maio 2011.

ACHILLI, M.; MANTOVANI, D. Tailoring mechanical properties of collagen-based Scaffolds for vascular tissue engineering: The effects of pH, temperature and ionic strength on gelation. *Journal of Polymers*, v.2, p.664-680, 2010.

ASGHAR, A.; HENRICKSON, R. L. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics as collagen in food systems. *Advances in food research*, v.28, p.231-372, 1982.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington (DC), 1990.

ALVES, T. S.; FERREIRA P. S. H. Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.52, p.289-293, 2002.

AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids.*, v.20, p.369-377, 2006.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. Connective tissue in meat and meat products. *Barking:* Elsevier, p.355, 1989.

BIANCHI, E.; CONIO, G.; CIFERRI, A.; PUETT, D.; RAJAGH, L. The role of pH, temperature, salt type and salt concentration on the stability of the crystalline, helical and randomly coiled forms of collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, v.242, n.7, p.1361-1369, 1967.

BRANDENBERG, A.H.; MORR, C.V.; WELLER, C.L. Gelation of commercial whey protein concentrates: effect of removal of low-molecular-weight components. *Journal of Food Science*, v.57, n.2, p.427-432, 1992

BRANDTS, J.F. Conformational transitions of proteins in water and in aqueous mixtures. In: *Structure and Stability of Biological Macromolecule*. New York: Marcel Dekker, 1969.

BRODSKY, B.; PERSIKOV, A. V. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in Protein Chemistry*, v.70, p.301-339, 2005.

BOKI, K.; KAWASAKI, N. Moisture sorption characteristics of collagen fiber prepared in different acidic pH solutions. *Journal of Colloids and Interface Science*, v.164, p.364-369, 1994.

- BRAGA, A.L.; AZEVEDO, A.; MARQUES, M.J.; MENOSSI, M.; CUNHA, R.L.** Interactions between soy protein isolate and xantahn in heat-induced gels: The effect of salta addition. *Food Hydrocolloids*, v.20, p.1178-1189, 2006.
- BURGHAGEN, M.** Collagen. In *Food Chemistry*, 2nd edition, Springer: Berlim, 1999.
- BURJANDZE, T.V.** Hydroxy-proline content and location in relation to collagen thermal stability. *Biopolymers*, v.18, p.931-936, 1979.
- CHEN, J.; DICKINSON, E.; EDWARDS, M.** Rheology of acid-induced sodium caseinate stabilized emulsion gels. *Journal of Texture Studies*, v.30, p.377-396, 1999.
- DICKINSON, E.** Colloid science of mixed ingredients. *Soft Matter*, v.2, p.642-652, 2006.
- FRIESS, W.** Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.45, p.113-136, 1998.
- GBOGOURI, G.A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARTIMENTIER, M.** Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, v.69, n.8, p.c615-c622, 2004.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P.** Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, v.25, p.1813-1827, 2011.
- GUTTERES, M.** Tendencias emergentes en la industria del cuero. *Boletín Técnico de la AQEIC*, Barcelona, v.57, n.1, p.22-27, 2006.
- HOINACKI, E.** Peles e couros: Origens, defeitos e industrialização. 2^a. Edição. Porto Alegre: CFP Artes Gráficas d'Ávila Bertaso, 1989.
- HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.** Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*, v.77, p.239-243, 2009.
- HU, M.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.** Lipid oxidation in corn oil-in water emulsions stabilized by casein, whey protein, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.1696-1700, 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Sala de Imprensa :: Pesquisas trimestrais do abate de animais, do leite, do couro e da produção de ovos de galinha. Abate de bovinos tem queda de 2,5% entre 2º e 3º trimestres. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1789&id_pagina=1>. Acesso em: Abril 2011.

KOHYAMA, K.; NISHINARI, K. Rheological studies on the gelation process of soybean 7s and 11s proteins in the presence of glucono-&lactone. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.41, p.8-14, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.15, p.685-689, 1970.

LEDWARD, D.A. Gelation of gelatin. In J. R. Mitchell, & D.A. Ledward (Eds.), *Functional Properties of Food Macromolecules*. London: Elsevier Applied Science Publishers. p.171-201, 1986.

LI-CHAN, E.C.Y.; MA, C.Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, v.77, p.495-502, 2002.

LITTOZ, F.; MCCLEMENTS, D.J. Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. *Food Hydrocolloids*, v.22, p.1203-1211, 2008.

LIU, D.C.; OCKERMAN, H.W. Meat Co-Products. In: HUI, Y.H., NIP, W.-K., ROGERS, R.W., YOUNG, O.A. *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker, 2001.

LIU, H.X.; ZHANG, R.S.; YAO, X.J.; LIU, M.C.; HU, Z.D.; FAN, B.T. Prediction of the isoelectric point of an amino acid based on GA-PLS and SVMs. *Journal of Chemistry Information and Computer Science*, v.44, p.161-167, 2004.

MAXIMO, G. J.; CUNHA, R. L. Mechanical properties of collagen fiber and powder gels. *Journal of Texture Studies*, v.41, p.842-862, 2010.

MÁRQUEZ, M.C.; VÁZQUEZ, M.A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, Oxford, v.35, n.1, p.111-117, 1999.

MCCLEMENTS, D. J. *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. Washington: CRC Press, 2005.

MORENO, M.C.M.; CUADRADO, V.F. Enzymic hydrolysis of vegetables proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, Oxford, v.28, n.7, p.481-490, 1993.

MONTERO, P.; BORDERÌAS, J. Emulsifying capacity of collagenous material from the muscle and skin of hake *Merluccius merluccius* L. and trout *Salmo irideus* Gibb: Effect of pH and NaCl concentration. *Food Chemistry*, v.41, p.251-67, 1991.

MUYONGA, J.H.; COLE, C.G.B.; DUODU, K.G. Characterization of acid-soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, v.85, n.1, p.81-89, 2004.

NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.39, p.229-238, 2003.

NICOLETI, J.F.; TELIS, V.R.N. Viscoelastic and thermal properties of collagen-xanthan gum and collagen-maltodextrin suspensions during heat and cooling. *Food Biophysics*, v.4, p.135-146, 2009.

NORLAND, R.E. Fish gelatin. In M. N. Voight, & J.K. Botta (Eds.), *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability* Lancaster: Technomic Publishing Co, p. 325-333, 1990.

OAKENFULL, D.; PEARCE, J.; BURLEY, R. W. Protein gelation. In: Damodaran, S.; Paraf, A. (Eds.) *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker: New York, cap.4, p.111-142, 1997.

OESSER, S.; ADAM, M.; BABEL, W.; SEIFERT, J. Oral administration of C¹⁴ labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *The Journal of Nutrition*, v.129, p.1891-1895, 1999.

OLIJVE, J.; MORI, F.; TODA, J. Influence of the molecular-weight distribution of gelatin on emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.243, p.476-482, 2001.

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

PEDREIRA, C.M.S. Como as fibras de colágeno influenciam na maciez da carne. Disponível em: < <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/qualidade-da-carne/como-as-fibras-de-colageno-influenciam-na-maciez-da-carne-4983>>. Acesso em: Fevereiro 2012.

PIEZ, K.A. Collagen. In J.I. Kroschwitz (Ed.), *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Wiley, New York, p.699-727. 1985

PRIVALOV, P.L. Stability of proteins: proteins which do not presents single cooperative system. In. *Advances in Protein Chemistry*. New York Academic, p.1-104, 1982.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMARKRISHNAN, C. *Biochemistry of collagen*. Plenum Press: Nova Iorque, 1976

RAO, B. R.; HENRICKSON, R. L. Food grade hide collagen in bologna effect on functional properties, texture and color. *Journal of Food Quality*, v.6, p.1-10, 1983.

REBELLO, T. Guia de produtos cosméticos. São Paulo: Editora Senac, 6ª edição, p.35-36, 2005.

ROCHID, A.; FOUCAT, L.; RENO, J.P. Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. *Biopolymers*. v.5, p.690-696, 1999.

ROSENBLATT, J.; DEVEREUX, B.; WALLACE, D.G. Injectable collagen as a pH-sensitive hydrogel. *Biomaterials*, v.15, p.598-605, 1994.

SANTANA, R.C.; PERRECHIL, F.A.; SATO, A.C.K.; CUNHA, R.L. Emulsifying properties of collagen: Effect of pH, protein concentration and homogenization pressure. *Food Hydrocolloids*, v.25, p.604-612, 2011.

SANTANA, R.C.; SATO, A.C.K.; CUNHA, R.L. Emulsions stabilized by heat-treated collagen. *Food Hydrocolloids*, v.26, p.73-81, 2012.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. Gelatine handbook: Theory and industrial practice. Wiley – VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Germany, ISBN: 3527315484, p.334, 2007.

SILVA, A.L.B.B.; SILVA, E.O. Conhecendo Materiais Poliméricos. Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Departamento de Física, Grupo de Pesquisa em Novos Materiais, 2003

SKANDERBY, M. Protein hydrolysates: their functionality and applications. *Food Technology*, v.10, p.141, 1994.

TOSH, S.M.; MARANGONI, A.G.; HALLET, F.R.; BRIT, I.J. Aging dynamics in gelatin gel microstructure. *Food Hydrocolloids*, v.17, p.503-513. 2003

ZHANG, J.; DUAN, R.; TIAN, Y.; KONNO, K. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, v.116, p.318-322, 2009.

ZIEGLER, F.L.F.; SGARBIERI, V.C. Caracterização químico-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. *Revista de Nutrição*, v.22, n.1, p.61-70, 2009.

VARGAS, D.M.; AUDI, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: Novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.4, p.367-370, 1997

WARDS, A.G.; COURTS, A. The science and technology of gelatin. *Food Science and Technology*, New York: Academic Press, v. xvi, p.564, 1977.

WILDING, P.; LILLIFORD, P.J.; REGENSTAIN, J.M. Functional properties of proteins in food. *Journal of Chemical and Technology and Biotechnology*, v.34, p.182-189. 1984.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for selfcomposite film production. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.188-1894, 2009.

WOOD, G.C.; KEECH, M.K. The formation of fibrils from collagen solutions – The effect of experimental conditions: Kinetic and electron-microscope studies. *Biochemistry Journal*, v.75, p.588-598, 1960.