

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FLÁVIA TRIVELATO DA COSTA

**EXTRAÇÃO DE COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO
COM PROTOCOLO ÁCIDO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2019

FLÁVIA TRIVELATO DA COSTA

**EXTRAÇÃO DE COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO
COM PROTOCOLO ÁCIDO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado ao Curso Superior de Engenharia de Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flávia Aparecida Reitz Cardoso.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Aparecida Droval.

CAMPO MOURÃO

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRAÇÃO DE CONCENTRADO PROTEÍCO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO COM PROTOCÓLO
ÁCIDO.

POR

FLÁVIA TRIVELATO DA COSTA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 26 de Novembro de 2019 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Flávia Aparecida Reitz Cardoso

Orientador

Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Droval

Coorientador

Prof^a. Dr^a. Angela Maria Gozzo

Membro da banca

Prof^a. Dr. Rafael Porto Ineu

Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Ligia Trivelato Batista, por estar sempre presente, me apoiar, me dar forças para seguir em todos os momentos, por nunca medir esforço algum para que eu pudesse realizar meus objetivos e por ser essa mulher incrível que eu admiro e me inspiro todos os dias.

A minha tia, Rosa Maria Trivelato Batista e minha avó, Aracy Trivelato Batista, pelo apoio, palavras de conforto e incentivo, e por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida até o presente momento.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente a Francine dos Santos Cruz e Larissa Assunção Faustino que mesmo de longe me transmitiram todo amor, carinho e companheirismo durante esse percurso. Agradeço principalmente meus amigos, Gabriela Possebon, Larissa Caroline Perinoto, Patricia Casarin de Lima, Sidnei Macedo, por todo carinho, amor, por vivenciar comigo os momentos bons e os ruins da graduação, por cada ajuda e ensinamento que me auxiliaram a chegar até aqui.

Minha gratidão aos professores que pelos seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje estar concluído essa trajetória. Em especial à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Flávia Aparecida Reitz Cardoso por toda paciência, tempo dedicado e ensinamento desde a iniciação científica até o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Adriana Aparecida Droval por todo auxílio e conhecimento passado durante o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

COSTA, F. T. **Extração de colágeno da pele de Tilápia do Nilo com protocolo ácido**. 2019. 36f. Trabalho de Conclusão de Curso - Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2019.

A tilápia, por possuir uma grande tolerância de temperatura, habilidade de reprodução em cativeiros, um rápido crescimento e um excelente custo benefício vem representando um grande interesse na aquicultura, além de ser o pescado mais produzido atualmente no Brasil. Entretanto, com o aumento da produção de tilápia, também houve aumento na quantidade de resíduos orgânicos provenientes, principalmente, da filetagem, no qual se descarta 70% de resíduos. Como alternativa para diminuição desses resíduos e agregar maior valor comercial a eles, diversos estudos vêm sendo realizados para extrair colágenos da pele de tilápia. O colágeno é uma proteína estrutural com princípios funcionais que tem a finalidade de auxiliar na estrutura dos tecidos conjuntivos do corpo. Neste trabalho foi testada a extração de colágeno por meio de um protocolo ácido, no qual as peles de tilápia passaram por um pré-tratamento em meio ácido e com precipitação salina, com variações de tempo e concentração. Depois de sua extração, foi avaliado por análises de cinzas, umidade, proteínas, solubilidade e pH. O colágeno obtido apresentou baixos teores de cinzas e a umidade se encontra dentro das apresentadas pela literatura. Em relação à quantidade de proteínas, o colágeno mostrou teores de 68,73 a 80,58% e uma solubilidade baixa entre 4,03 a 6,93%. Portanto, foi possível concluir que a extração por meio ácido é um possível meio de extração de colágeno e a pele de tilápia é uma boa alternativa para ajudar no reaproveitamento de resíduos gerados na indústria de pescados.

Palavras-chave: tilápia, colágeno, extração, meio ácido.

ABSTRACT

COSTA, F. T. **Nilo tilapia skin collagen extraction with acid protocol**. 2019. 36p. Course Conclusion Work - Academic Department of Food, Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2019.

Tilapia, due to its high temperature tolerance, captive breeding ability, fast growth and excellent cost benefit, has been of great interest in aquaculture, being the most produced fish in Brazil today. However with the increase of tilapia production started to generate larger amounts of organic waste mainly from filleting, which discards 70% of waste. As an alternative to reduce these residues and add greater commercial value to them, several studies have been performed to extract collagen from Tilapia skin. Collagen is a structural protein with functional principles that is intended to assist in the structure of connective tissues in the body. In this study collagen extraction was tested using an acid protocol, in which tilapia skins were pretreated in acid medium and with saline precipitation, with variations in time and concentration. After collagen extraction it was evaluated by analysis of ash, moisture, protein, solubility and pH. The collagen obtained presented low ash contents and the humidity is within the ones shown in the literature. Regarding the amount of protein, collagen showed contents of 68.73 to 80.58% and a low solubility between 4.03 to 6.93%. Therefore, it could be concluded that acid extraction is a possible collagen extraction medium and Tilapia skin is a good alternative to help reuse waste generated in the fish industry.

Keywords: tilapia, extraction, acid and collagen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tilápia do Nilo	5
Figura 2 - Representação da estrutura química dos três aminoácidos que quando entrelaçados no arranjo helicoidal, formam uma molécula tripla, denominada tropocolágeno.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 3 - Fórmula estrutural dos aminoácidos presentes no colágeno: (a) Glicina; (b) Prolina; (c) 4-hidroxi prolina.	Erro! Indicador não definido.
Figura 4 - Fluxograma de extração do colágeno da pele de tilápia em protocolo ácido	22
Figura 5 - Valores experimentais x valores preditos para as cinzas.....	22
Figura 6 - Gráfico de contorno para a variável cinzas.	23
Figura 7 - Valores experimentais x valores preditos para a umidade.	24
Figura 8 - Gráfico de contorno para a variável umidade.....	25
Figura 9 - Valores experimentais x valores preditos para o pH.	27
Figura 10 - Gráfico de contorno para a variável pH.....	28
Figura 11 - Valores experimentais x valores preditos para as proteínas.	29
Figura 12 - Gráfico de contorno para a variável proteínas.	30
Figura 13 - Valores experimentais x valores preditos para a solubilidade.....	32
Figura 14 - Gráfico de contorno para a variável solubilidade.	32
Figura 15 - Gráfico de influência da concentração de ácido acético (M) e do tempo (horas) na obtenção de proteínas e solubilidade.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de ácido acético e tempo para cada ensaio.	12
Tabela 2 - Valores reais das variáveis do planejamento experimental e seus respectivos níveis codificados.	14
Tabela 3 - Valores das variáveis físico-químicas para todas as formulações.	19
Tabela 4 - Anova para o modelo de resposta de cinzas.	22
Tabela 5 - Coeficientes do modelo de regressão para as cinzas da extração.	22
Tabela 6 - Anova para o modelo de resposta de umidade.	24
Tabela 7 - Coeficientes do modelo de regressão para a umidade da extração.	24
Tabela 8 - Anova para o modelo de resposta do pH.	26
Tabela 9 - Coeficientes do modelo de regressão para o pH da extração.	26
Tabela 10 - Anova para o modelo de resposta de proteínas.	28
Tabela 11 - Coeficientes do modelo de regressão para as proteínas da extração. ..	29
Tabela 12 - Anova para o modelo de resposta de solubilidade.	31
Tabela 13 - Coeficientes do modelo de regressão para a solubilidade da extração.	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivos Gerais	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Aquicultura e piscicultura no Brasil e no mundo	4
3.2	Tilápia do Nilo	5
3.3	Aproveitamento de resíduos	6
3.4	Extração do colágeno	10
3.5	Colágeno	Erro! Indicador não definido.
4	MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1	Extração	Erro! Indicador não definido.
4.2	Planejamento experimental e tratamento estatístico das amostras	13
4.3	Análises	15
4.3.1	Umidade	15
4.3.2	Cinzas	16
4.3.3	Proteínas	16
4.3.4	Solubilidade	17
4.3.5	pH	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1	Análise de cinzas	21
5.2	Análise de umidade	23
5.3	Análise de pH	25
5.4	Análise de proteínas	28
5.5	Análise de solubilidade	30
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Em função de fatores como clima, adaptação da espécie a diferentes formas de produção, elevada demanda e resultados muito satisfatórios em cultivos intensivos, a produção de tilápia, no Brasil, obteve um crescimento de 223% no período compreendido entre 2005 e 2015 (MAPA, 2017). Com essa demanda, surgiram problemas que envolvem a geração de resíduos, pois a tilápia possui um rendimento de apenas 30% para filés, para uma formação de 70% de resíduos. Os resíduos, anteriormente dados como inaproveitáveis, hoje são utilizados na fabricação de subprodutos, principalmente porque a pele e os ossos possuem alto valor nutricional (BUENO et al., 2011). O reaproveitamento contribui com o meio ambiente na redução do impacto ambiental e agrega valor ao processo produtivo, fatores altamente aceitos pela maioria dos consumidores que prezam por uma produção mais consciente e mais sustentável, além de ser uma nova alternativa para ajudar na economia das empresas (ALMEIDA; SANTANA, 2010).

Diversos produtos podem ser obtidos a partir dos descartes oriundos da filetagem do pescado, como por exemplo, extração de gelatina e suplementos alimentares à base de proteína e colágeno, objetivo de estudo desta pesquisa (SILVA; PENNA, 2012).

O colágeno é uma proteína estrutural com princípios funcionais e com cadeias peptídicas de aminoácidos, dentre os quais a glicina, prolina e hidroxiprolina, encontrados em aves, peixes e animais de corte. Estes, por sua vez, têm a finalidade de auxiliar na estruturação dos tecidos conjuntivos do corpo, como a pele, cartilagens, tendões, ossos, sistemas vasculares e músculos (SILVA; PENNA, 2012).

O processo de extração de colágeno influencia diretamente nas suas características e qualidade, que são dependentes das propriedades físico-químicas, e que sofrem enorme influência das atividades exercidas para a conversão do produto bruto em colágeno (ALFARO et al., 2008). Daí a importância de um alto rendimento da extração do colágeno para viabilizar seu uso como fonte de produção. Dependendo da maneira como a extração é realizada, o colágeno pode sair em fibras e o seu subproduto em pó, ambos possuindo a mesma composição, e apresentando propriedades interessantes para a produção de biofilmes, na qual visa uma disposição física alongada e uma granulometria maior (BASSO et al., 2013).

Quando se obtém o colágeno purificado, o mesmo apresenta inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e de cosmético, como em substituição de pele, vaso sanguíneo artificial, enxerto ósseo, substituição de cartilagens, entre outras. (FIGUEIREDO, 2015).

Atualmente têm sido feitos muitos estudos para verificar a aplicação do colágeno e seus derivados na área de alimentos. E esses estudos vêm despertando um grande interesse na indústria devido às propriedades funcionais do colágeno em alimentos, além de suas propriedades usuais como agentes espumantes, características emulsificantes, formação de películas biodegradáveis, estabilizantes coloidais, agentes microencapsulantes, e a possibilidade de substituição de material sintético por natural (GÓMEZ, 2011).

Como os resultados encontrados na literatura são escassos à respeito da extração de colágeno via protocolo ácido, objetivou-se nesse trabalho a tentativa de extração nessas condições.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é obter colágeno a partir da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando um protocolo ácido.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliação do colágeno obtido por protocolo ácido por meio de análises de proteínas, solubilidade, cinzas, umidade e pH.
- Analisar a influência da concentração de ácido acético e tempo, visando encontrar as melhores condições para a extração.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aquicultura e piscicultura no Brasil e no mundo

Segundo a EMBRAPA (2018), a aquicultura refere-se à criação e reprodução de peixes, moluscos, crustáceos e outros organismos aquáticos em ambiente semicontrolado ou controlado. Dentro da aquicultura insere-se a piscicultura, que é o cultivo exclusivo de peixes. Conforme tratamentos de dados realizados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e a Organização da Alimentação e Agricultura da ONU (FAO), em 2017 foi atingida a marca global de produção de 172 milhões de toneladas de pescado, no qual 80 milhões de toneladas são de cultivo e 92 milhões de toneladas de captura. De acordo com as previsões das instituições até 2020, a produção mundial de peixes cultivados será maior que a de captura. Os dados também mostram que a produção de peixes em cultivos teve uma crescente de 60% nos períodos de 2007 a 2017, enquanto que a de captura permaneceu na mesma faixa de produção (PEIXEBR, 2018).

Esse crescimento da aquicultura nas últimas décadas se dá pela inserção de novas tecnologias e técnicas de produção, principalmente por ser possível a obtenção de ambientes aquáticos mais controlados e de tamanho reduzido, refletindo em maiores ganhos de produtividade e uma maior qualidade no cultivo, além de ser ambientalmente favorável (SIQUEIRA, 2018).

Como o Brasil é um país banhado por 8,5 mil quilômetros de costa marítima, usufrui de 12% de toda água doce disponível no planeta e possui 8,2 bilhões de metros cúbicos de água divididos em lagos, rios e represas. Com fatores climáticos e recursos naturais favoráveis, tem total condição de vir a se tornar líder na produção de pescado (MPA, 2015). Em 2017, a piscicultura brasileira obteve um crescimento de 8% e uma produção anual de 691.700 toneladas de peixes, destaque para o estado do Paraná com uma produção de 112.00 toneladas de peixe e um crescimento anual de 19,7% (PEIXEBR, 2018).

O carro-chefe da piscicultura brasileira é a tilápia que, de acordo com a Associação Brasileira de Piscicultura, corresponde a 51,7% de toda a piscicultura nacional, produzindo 357.639 toneladas no ano de 2017. O Paraná aparece em primeiro lugar, sendo responsável por 94% da produção do Brasil, com 105.392

toneladas, corroborando sua viabilidade em questões produtivas e de negócios, principalmente na região Sul do país (PEIXEBR, 2018).

3.2 Tilápia do Nilo

Com nome científico *Oreochromis niloticus*, classificada taxonomicamente na ordem *Perciformes* e pertencente à família *Cichlidae*, a Tilápia do Nilo pode atingir até 45 centímetros e 2,5 quilos. É uma espécie de água doce que tem como característica listras verticais em sua cauda e exibe uma coloração cinza-azulada com escamas (MAIA, 2015). Suporta variações de temperaturas de 21°C até 35°C, e apesar de ser uma espécie de água doce, consegue se manter em águas com até 18% de sal. Sua alimentação consiste em algas verdes, detritos, macrófitas e bactérias, por isso é considerada onívora (SOUZA, 2016).

Figura 1 - Tilápia do Nilo



Fonte: Natify et al., 2015.

Essa espécie tem origem na bacia do rio Nilo, situado no Leste da África, presente em grande quantidade nas regiões tropicais e subtropicais, e no continente americano. A tilápia foi inserida no Brasil no começo da década de 70 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) na região Nordeste, e na década de 90, com o grande avanço das tecnologias de exploração, maior conhecimento técnico e condições climáticas favoráveis se expandiram para todo o

território nacional, principalmente no estado do Paraná que atualmente é o maior produtor de tilápia do Brasil (EMBRAPA, 2016; FIGUEIREDO, 2015; SOUZA, 2016).

Todo esse interesse se dá devido às características expressadas pela espécie, já que a mesma possui uma grande tolerância de temperatura, habilidade de reprodução em cativeiro, crescimento rápido, aceita dietas artificiais e tem bom custo benefício. Além de seus atributos organolépticos e ausência de espinhos em forma de Y na sua musculatura, que acaba agregando maior valor e aceitabilidade ao seu filé (SOUZA, 2016; VICENTE et al., 2014).

3.3 Aproveitamento de resíduos

O aumento do crescimento populacional e de consumo de produtos industrializados resulta diretamente no agravamento de problemas com resíduos industriais, especialmente quando esses produtos têm algum tipo de beneficiamento. A alta quantidade de resíduos gerados pelas indústrias de diferentes tipos de produção causa impactos ambientais desastrosos, assim como na piscicultura (FIGUEIREDO, 2015).

Como consequência do crescimento da produção de tilápia são geradas maiores quantidades de resíduos orgânicos provenientes das etapas da cadeia produtiva, principalmente da filetagem do pescado, já que o filé tem um rendimento médio de 30% e os outros 70% são considerados resíduos, conforme já mencionado (BUENO et al., 2011). Esses resíduos provenientes da cadeia produtiva da tilápia compõem diversas matérias-primas com atributos propensos a serem convertidos em diferentes subprodutos. Quando acoplados com a tecnologia adequada, atinge-se produtos com ótimos valores nutricionais, ricos em proteínas, minerais e ácidos graxos (ω -3), aumentando de maneira considerável o custo benefício do reaproveitamento, já que a utilização total dos pescados aumentaria os lucros das empresas e diminuiria o impacto ambiental (BORDIGNON, 2012; BUENO et al., 2011).

A piscicultura tem capacidade para se tornar um importante aliado da sustentabilidade, transformando os resíduos orgânicos em matérias-primas, atuando de forma direta na preservação do meio ambiente e recursos naturais e diminuindo de maneira significativa os resíduos gerados e o consumo de água (MAIA, 2015).

Os subprodutos dos pescados podem ser usufruídos em diversos ramos, como no setor de alimentação animal, obtenção de fertilizantes, na fabricação de bolsas, carteiras, roupas entre outros artefatos e também na produção de alimentos, como fabricação de polpa usada para fazer empanados, extração do colágeno presente nas escamas e na pele, na produção de carne mecanicamente processada e na indústria farmacêutica (MAIA, 2015).

Tendo em vista que os resíduos gerados possuem grandes quantidades de colágenos, sua extração se mostra como um importante caminho para agregar valor a esses (FIGUEIREDO, 2015).

3.4 Colágeno

O termo colágeno tem origem nas palavras gregas KOLLA e GENO, que expressam cola e produção, respectivamente. Usualmente tem significado de produção de cola animal, provenientes de diversas matérias-primas (SOUZA, 2016). O colágeno é encontrado em abundância devido sua grande gama de fontes de extração, que vai desde répteis como jacarés até vidas marinhas como esponjas (MOLINARI, 2014).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas na extração do colágeno de peixe, pois além de possuir diversos subprodutos não aproveitados na indústria, tem ausência de toxicidade, não tem risco de transmitir doenças, não possui barreira religiosa e se obtém um alto rendimento no processo de extração (FONTOURA, 2019).

O colágeno é responsável por compor um terço das proteínas presentes nos vertebrados. Nos mamíferos, por exemplo, compõe de 20 a 30% das proteínas totais. É encontrado em diversos tecidos como ossos, dentes, cartilagens, ligamentos, tendões, músculos, peles, córneas e sistema vascular (LIMA, 2016; SOUZA, 2016; SILVA; PENNA, 2012). Caracterizado por sua produção de fibras insolúveis e elásticas, que articulam forças externas e internas exercidas no organismo, sua função não é apenas estrutural, pois também orienta os tecidos que estão se desenvolvendo (NERI, 2013).

O colágeno é a proteína principal do tecido conectivo e sua molécula é caracterizada pela composição de três cadeias alfa com polipeptídeos, que é a sequência de mais de 1000 aminoácidos ligados por ligação peptídica, rotacionando

no sentido horário e enovelando entre si formando uma tripla hélice, que é o elemento básico da proteína e chamado tropocolágeno, conforme Figura 2. Na cadeia de polipeptídeos existe grandes quantidades dos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina e um baixo teor de aminoácidos aromáticos (NERI, 2013; SOUZA, 2016; FRAZEN et al., 2013). Praticamente todas as moléculas de colágeno têm em sua composição um terço de glicina e a repetição da sequência glicina-prolina-hidroxiprolina. No colágeno também é possível observar a presença dos aminoácidos 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina, que são difíceis de serem encontrados em outras proteínas (SILVA, 2016).

Figura 2 - Representação da estrutura química dos três aminoácidos que quando entrelaçados no arranjo helicoidal, formam uma molécula tripla, denominada tropocolágeno.

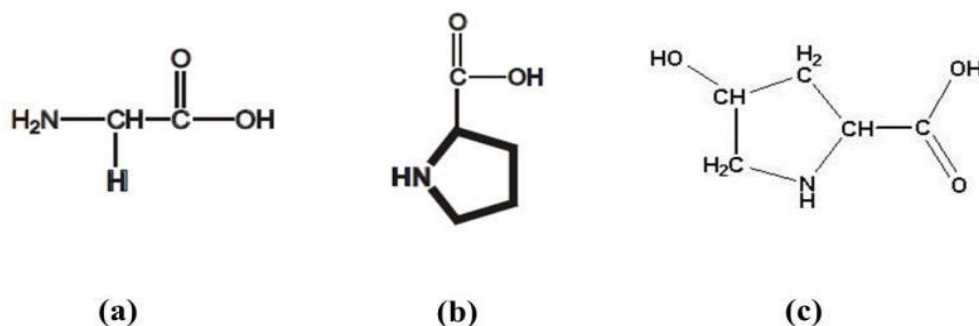


Fonte: Frazen et al. (2013).

A molécula do colágeno é formada aproximadamente de 30% de glicina, 12% de prolina e 11% de hidroxiprolina, tendo essa última como aminoácido importantíssimo na determinação de colágeno presente em um tecido, já que o colágeno possui uma quantidade alta de hidroxiprolina quando comparado com as demais proteínas. Por ter sua composição majoritariamente formada de glicina, aminoácido de baixo peso molecular, o colágeno é uma proteína de peso menor que as demais proteínas com o mesmo número de aminoácidos, tendo peso molecular em torno de 100 kDa (ALFARO, 2008; LIMA, 2016). A Figura 3 apresenta a estrutura dos aminoácidos glicina, prolina e 4-hidroxiprolina.

Figura 3 - Fórmula estrutural dos aminoácidos presentes no colágeno:

(a) Glicina; (b) Prolina; (c) 4-hidroxiprolina.



Fonte: Figueiredo (2015).

É conhecido pelo menos dezenove tipos de colágeno, chamados de tipos I a XIX, dos quais onze já foram identificados e caracterizados. Conforme sua estrutura macromolecular o colágeno pode ser dividido em três grupos:

- Grupo a: colágeno fibroso estriado, que são os tipos I, II e III.
- Grupo b: colágeno não fibroso, do tipo IV, colágeno da membrana basal.
- Grupo c: colágeno miofibrilar, que estão os tipos VI e VII proveniente da matriz miofibrilar, V, IX e X pericelular e VIII e XI que ainda não possuem uma classificação (MOLINARI, 2014; SILVA, 2016).

O colágeno do tipo I tem se destacado por ser o colágeno mais abundante, além de ser responsável pela manutenção da resistência mecânica nos ossos. Na molécula do colágeno do tipo I, existem duas cadeias iguais denominadas $\alpha 1$, e uma que possui a mesma função, mas é quimicamente diferente denominada $\alpha 2$ (FRAZEN, 2013; SOUZA, 2016).

Embora o colágeno tenha várias aplicações, tem sido pouco aproveitado tecnologicamente, principalmente na indústria de alimentos onde poderia ser utilizado como umidificante, emulsionante e potencializador de textura, contribuindo para a obtenção de produtos com melhores desempenhos e melhor custo benefício. Além disso, o colágeno é considerado pela legislação como alimento e não como aditivo, agregando um maior valor nutricional ao produto (ALFARO, 2008; FIGUEREDO, 2015).

3.5 Extração do colágeno

A técnica de extração é fundamentada no processo de separação de um ou mais componentes pelo contato da amostra com um líquido imiscível denominado solvente. A separação por extração é baseada em como os componentes da solução original se distribuem de forma diferente entre as duas fases, ocorrendo assim a separação (COUPER et al., 2010). Na extração sólido-líquido, os componentes presentes na fase sólida são separados pela dissolução seletiva da fração solúvel da amostra sólida em meio a um solvente apropriado. Geralmente, o componente desejado é solúvel, sendo necessária uma nova etapa para a recuperação do soluto do extrato (FOUST et al., 1982).

Esse método tem aplicabilidade na obtenção de colágeno a partir da sua separação de uma matriz de origem animal, tendo como variantes comumente empregadas as extrações em meio ácido e meio ácido com enzima. O método químico costuma ser mais utilizado nas indústrias, mas os métodos biológicos com o uso de adição de enzimas são mais eficientes quando se trata de produtos de maior valor nutritivo e funcional (FOUNTOURA, 2019). É necessário fazer um pré-tratamento antes da extração do colágeno para retirada das impurezas e proteínas não colagenosas.

Nos estudos mais recentes estão realizando a extração de colágeno com o emprego da solubilização em meio ácido, na qual comumente se emprega ácido acético combinado com a precipitação salina. A solubilidade do colágeno em meio ácido exerce uma função fundamental na eficiência da extração, já que ocorre o aumento dos íons H^+ , facilitando o acesso da água nas fibras presentes no colágeno (LIMA, 2016).

Como os resultados encontrados na literatura são escassos á respeito da extração de colágeno via protocolo ácido, objetivou-se nesse trabalho a tentativa de extração nessas condições.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os materiais utilizados foram: as peles doadas pelo pescueiro situado na cidade de Peabiru – PR, balança analítica, tesoura, solução de 0,1M de hidróxido de sódio, incubadora shaker, solução de EDTA 0,5M, solução de 10% de butanol, ácido acético, solução de NaCl, ácido clorídrico, ácido bórico, membrana diálise, liofilizador, capela de fluxo laminar, destilador, digestor, centrífuga, mufla, estufa, dessecador, *erlenmeyer*, *béquer* e cadinhos de porcelana.

4.2 Métodos

As peles utilizadas nos experimentos foram doadas por um pescueiro que fica situado na cidade de Peabiru- PR.

A metodologia de extração empregada foi baseada em YAN et al. (2015) com algumas alterações. Após a obtenção, as peles isentas de carnes foram lavadas em água corrente e congeladas até o início do tratamento.

Para iniciar os procedimentos de extração, as peles foram pesadas em uma balança analítica e cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura. Depois foram lavadas em solução de 0,1M de hidróxido de sódio (NaOH) seguindo a proporção 1:20 w/v (a cada 1g de tilápia usa-se 20 ml de NaOH) por 24 horas na incubadora *shaker*. Esta etapa foi necessária para retirada de pigmentos e proteínas que não continham colágeno. Retiradas da incubadora as peles foram submersas em uma solução de EDTA 0,5M, onde corrigiu-se o pH com NaOH para 7,5, seguindo a proporção 1:10 w/v (1g de amostra para 10 ml de EDTA). Durante 5 dias a solução era renovada a cada 24 horas para a descalcificação da amostra. Passado este período as amostras foram lavadas com água destilada a 5°C.

Na etapa seguinte ocorreu o desengorduramento das peles. Essas foram emergidas em uma solução de 10% de butanol com razão de 1:20 w/v (1g de amostra para 20 ml de butanol) durante 24 horas. A solução foi trocada a cada 8 horas, passada as 24 horas e as peles lavadas com água destilada a 5°C.

Posteriormente, as amostras foram submersas em uma solução de ácido acético com concentrações e tempos variados na incubadora *shaker*, conforme apresentados na Tabela 1. Os ensaios estabelecidos na Tabela 1 provêm da avaliação de possíveis fatores que seriam capazes de interferir no rendimento do colágeno.

Para tanto, elaborou-se um planejamento fatorial completo 3^2 com três níveis e dois fatores e com duas repetições no ponto central, seguindo modelo quadrático de regressão com as variáveis concentração de ácido acético e tempo, conforme a Equação (1).

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2, \quad (1)$$

onde:

y = variável resposta;

b_0 = intercepto;

b_1 = coeficiente de regressão para os efeitos linear da concentração;

b_2 = coeficiente de regressão para os efeitos linear do tempo;

b_{11} = coeficiente de regressão para os efeitos quadráticos da concentração;

b_{12} = coeficiente de regressão para os efeitos de interação de concentração e tempo;

b_{22} = coeficiente de regressão para os efeitos quadráticos do tempo;

x_1 = concentração;

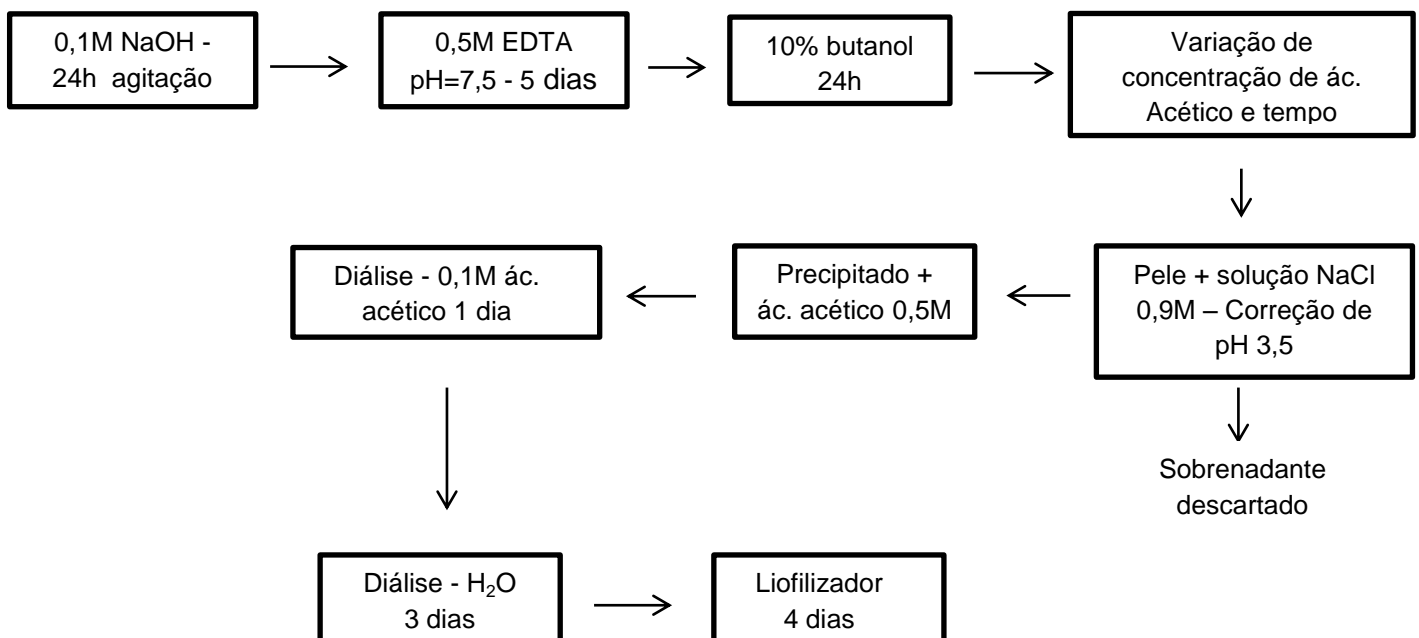
x_2 = tempo,

Tabela 1 - Concentração de ácido acético e tempo para cada ensaio.

Ensaio	Concentração de ácido acético (M)	Tempo (horas)
1	0,25	12
2	0,25	24
3	0,25	36
4	0,50	12
5	0,50	24
6	0,50	36
7	0,75	12
8	0,75	24
9	0,75	36
10	0,50	24
11	0,50	24

Na sequência, foi adicionada nas peles a solução de 0,9M de NaCl, corrigido o pH com HCl para 3,5 e deixado em 24 horas na geladeira para a retirada do precipitado. Esse foi então dissolvido em ácido acético 0,5M e dialisado contra ácido acético 0,1M por 24 horas, sendo trocada a solução a cada 8 horas. Após, a solução de ácido acético 0,1M foi trocada por água destilada durante 3 dias, renovando a água a cada 8 horas.

As amostras retiradas da diálise foram liofilizadas por 4 dias e então as análises foram realizadas para avaliação do colágeno obtido. O Fluxograma 1 apresenta resumidamente a metodologia empregada para a extração do colágeno.



Fluxograma 1 - Fluxograma de extração do colágeno da pele de tilápia em protocolo ácido.

4.1 Planejamento experimental e tratamento estatístico das amostras

Para o estudo do processo de extração da pele de tilápia e avaliação das variáveis que influenciam diretamente no rendimento, foi empregado o planejamento fatorial completo 3², conforme mencionado na seção anterior. A Tabela 2 apresenta

as variáveis independentes, com os valores reais e codificados, para a extração em meio ácido.

Tabela 2 - Valores reais das variáveis do planejamento experimental e seus respectivos níveis codificados.

Variáveis	-1	0	1
Extração em meio ácido			
Concentração de ácido acético (M)	0,25	0,50	0,75
Tempo (horas)	12	24	36

Os dados experimentais foram analisados com a ajuda do *software* Statistica 12, utilizando a metodologia de superfície de resposta com ajuste de modelo quadrático. Também empregou-se a análise de variância com teste de Tukey ao nível de significância de 5% (valor $p < 0,05$) para verificar se existiam diferenças entre as médias e a metodologia da função desejabilidade.

A função desejabilidade teve o intuito de verificar quais as condições de tempo e concentração de ácido acético seriam ideais para se obter a extração do concentrado proteico considerando a solubilidade e a proteína obtidas na pele da tilápia do Nilo. Tal método consiste em aplicar para cada variável resposta um valor adimensional que representa a sua desabilidade individual (d_i). Segundo Novaes et al. (2017), a desejabilidade pode variar de 0 (para uma resposta não desejada) até 1 (para uma resposta desejada) e pela média global das desejabilidades individuais, pode-se obter a desejabilidade global (D), expressa pela Equação (2):

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 d_3 \dots d_m}, \quad (2)$$

onde:

D é a desejabilidade global;

d_1, d_2, d_3 e d_m são as desejabilidades individuais;

m é o número de variáveis resposta.

Desta forma, o processo de otimização simultânea é reduzida à simples tarefa de se calcular os níveis das variáveis que maximizem a desejabilidade global. Há diferentes tipos de transformações possíveis para a obtenção das desejabilidades individuais. Se o valor alvo, U_i para a resposta y_i , por exemplo, for um máximo, a desejabilidade individual (d_i) é descrita pela seguinte função:

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 1 & \text{se } y_i(x) < L_i \\ \left[\frac{U_i - y_i(x)}{U_i - L_i} \right]^t & \\ 0 & \text{se } y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (3)$$

onde:

y_i é a resposta obtida para a variável estudada;

$d_i(y_i)$ é a desejabilidade individual da resposta y_i ;

U_i é o maior valor aceitável adotado para a resposta;

L_i é o menor valor aceitável adotado para a resposta;

t é fator que determina o quão é desejável y_i ser próximo do mínimo, variando de 0 a 1.

Funções para o cálculo das desejabilidades individuais também podem ser estabelecidas para outras situações como o valor alvo ser um mínimo ou estiver localizado entre um valor mínimo e um valor máximo. A aplicação de função de desejabilidade na otimização de métodos analíticos traz inúmeras vantagens como eficiência, economia e objetividade na otimização de procedimentos com múltiplas respostas (CANDIOTI, 2014).

4.3 Análises

4.3.1 Umidade

A determinação de umidade do colágeno liofilizado foi realizada seguindo o Método Físico-Químico para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Consistiu na secagem em estufa a 105°C pelo período de 6 horas e depois pesado os cadinhos para obter os pesos. A Equação (4) foi aplicada em cada cadinho para se ter a porcentagem de umidade da amostra.

$$Umidade (\%) = \frac{100 \times N}{P}, \quad (4)$$

onde:

N = perda em gramas da massa (massa da amostra e cadinho antes da secagem - massa do cadinho após a secagem);

P = quantidade em gramas de amostras.

4.3.2 Cinzas

Para análise de cinzas também seguiu-se a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), que se baseou na carbonização da amostra e depois foi aquecida na mufla a 550°C por um período de 4 a 6 horas (até obtenção de uma cinza em coloração clara). Para analisar as cinzas pesou-se 3 a 5 gramas de amostra e obteve-se a porcentagem de cinzas com o uso da Equação (5).

$$Cinzas (\%) = \frac{100 \times N}{P}, \quad (5)$$

onde:

N = massa em gramas de cinzas (massa do cadinho depois de incinerado - massa do cadinho vazio);

P = massa da amostra úmida.

4.3.3 Proteínas

Com base no método de micro Kjeldahl, realizou-se uma digestão ácida, na qual o nitrogênio contido na amostra se transformou em amônia, então separado por meio de uma destilação. Após a destilação, a amostra foi titulada para determinar a quantidade de amônia presente na solução.

Primeiramente foi feita uma mistura catalítica com a proporção de 100:10:1 de sulfato de sódio, sulfato de cobre e selênio, com 2g em cada amostra. Para a digestão pesou-se 0,2g da amostra e 2g da mistura catalítica. Depois foi colocado em um papel manteiga para, posteriormente, ser inserido no tubo de digestão. Após isto, adicionou-se 5 ml de ácido sulfúrico e então colocou-se a mistura no bloco digestor.

Para a realização da destilação, soluções de bório 4%, NaOH 40% e HCl 10% foram preparadas. Com as amostras em temperatura ambiente adicionou-se 10 ml de água destilada no tubo digestor. No *erlenmeyer* de 125 ml foi colocado 15 ml da solução de ácido bórico e 6 gotas do indicador. Adicionou-se 25 ml de NaOH no funil dosador e, após a fervura da água, o tubo digestor foi encaixado no bloco de destilação e o *erlenmeyer* encaixado na outra extremidade do destilador para então abrir a válvula. Esta, por sua vez, foi fechada após a amostra estar neutralizada e preencher o *erlenmeyer*, até 75 ml. Depois a amostra foi titulada com solução HCl e o resultado obtido foi substituído na Equação (6).

$$N_T = \frac{V \times f \times 0,0014 \times fc \times 100}{p}, \quad (6)$$

onde:

V = volume de HCl gasto na titulação;

f = fator de correção (HCl);

fc = fator de correção da proteína;

p = peso (amostra).

4.3.4 Solubilidade

A solubilidade do colágeno foi definida pelo método de Li et al. (2013). As amostras foram dissolvidas em ácido acético 0,5M na proporção de 3 mg de amostra para cada ml de ácido. Por 24 horas a solução (amostra + meio ácido) foi agitada a 4°C. Depois da agitação, a solução foi centrifugada por 15 minutos também a 4°C. Após a centrifugação retirou-se o sobrenadante e realizou-se a secagem para determinação da solubilidade, dada pela Equação (7).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{100 \times N}{P}, \quad (7)$$

onde:

N = perda em gramas da massa (massa da amostra e cadinho antes da secagem - massa do cadinho após a secagem);

P = quantidade em gramas de amostras.

4.3.5 pH

Para determinação do pH foi utilizada a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). As amostras foram dissolvidas em água destilada na proporção de 1:10 (1 grama de amostra para 10 ml de água) e com o auxílio do pHmetro mediu-se o pH.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises físico-químicas foi realizado o teste da Análise de Variância com nível de significância de 5%. Os testes de cinzas, umidade, pH, proteínas e solubilidade foram realizados para as onze formulações constantes da Tabela 1 e determinadas segundo o delineamento fatorial completo do tipo 3² com três níveis e dois fatores e com duas repetições no ponto central. Os testes de cinzas, umidade, pH e proteínas foram realizados em triplicata e a solubilidade em duplicata. Os resultados das médias e os desvios encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores das variáveis físico-químicas para todas as formulações.

Amostras	Cinzas (%)	Umidade (%)	pH	Proteínas (%)	Solubilidade (%)
A1	1,77 ^a ±0,06	15,98 ^a ±0,50	6,40 ^{abc} ±0,02	71,52 ^{ab} ±2,60	5,72 ^{ab} ±0,40
A2	1,40 ^a ±0,24	15,44 ^a ±2,29	6,48 ^{ab} ±0,09	68,73 ^b ±3,95	6,74 ^a ±0,32
A3	1,46 ^a ±0,23	13,63 ^a ±2,76	6,19 ^{abc} ±0,32	72,18 ^{ab} ±1,13	6,93 ^a ±0,02
A4	1,65 ^a ±0,23	12,05 ^a ±0,79	5,52 ^c ±0,29	71,26 ^{ab} ±1,05	4,03 ^b ±0,19
A5	1,69 ^a ±0,12	13,62 ^a ±3,25	5,73 ^{bc} ±0,12	79,96 ^a ±0,72	4,07 ^b ±0,41
A6	1,17 ^a ±0,08	18,49 ^a ±0,35	5,71 ^{bc} ±0,05	74,73 ^{ab} ±2,22	4,33 ^b ±0,66
A7	1,45 ^a ±0,27	10,93 ^a ±0,48	6,34 ^{abc} ±0,15	71,26 ^{ab} ±3,21	4,70 ^b ±0,30
A8	1,51 ^a ±0,18	15,50 ^a ±1,56	6,18 ^{abc} ±0,10	73,50 ^{ab} ±2,17	4,14 ^b ±0,20
A9	1,16 ^a ±0,16	13,34 ^a ±2,31	6,85 ^a ±0,28	77,80 ^{ab} ±0,23	5,42 ^{ab} ±0,47
A10	1,79 ^a ±0,01	12,81 ^a ±0,30	5,81 ^{bc} ±0,16	80,58 ^a ±0,35	4,15 ^b ±0,27
A11	1,82 ^a ±0,19	12,91 ^a ±1,06	5,82 ^{bc} ±0,06	80,24 ^a ±1,11	4,04 ^b ±0,21

Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Pelos resultados é possível verificar que não houveram diferenças significativas para as onze amostras com relação às análises de cinzas e umidade. O resíduo proveniente da incineração ou as cinzas propriamente dita, é o resíduo obtido a partir do aquecimento de uma amostra em temperatura em torno de 550°C (ADOLFO LUTZ, 2008). As cinzas representam uma importante medida de identificação, pois são bastante usadas como critério de identificação de alimentos. Além disso, a sua composição presente em alimentos evidencia previamente o seu valor nutricional, já que as mesmas demonstram a quantidade de minerais da amostra (CHAVES et al., 2004).

Os resultados de cinzas obtidos variaram entre 1,16 a 1,82%, conforme evidenciado na Tabela 3, e não apresentaram diferenças significativas entre as 11 amostras analisadas. Os valores se encontram a abaixo de 2,0%, que é o resultado recomendado por Ockerman e Hansen (1994). O resultado apresentado pelas

amostras A3 e A7 se assemelham com os valores encontrados por Bordignon (2012), que foi de 1,44%.

A umidade mostra a quantidade de perda em peso pela a qual a amostra sofreu quando aquecida, condições essas em que a água é removida do alimento, sendo o teor de umidade um fator importantíssimo para a conservação dos alimentos (ADOLFO LUTZ, 2008).

Os percentuais de umidade das amostras estão apresentados na Tabela 3. Nos resultados, a umidade variou entre 10,93 e 18,49% e, conforme o teste de Análise de Variância, as amostras de A1 a A11 não se diferem entre si.

Segundo dados encontrados pelas autoras Alves e Prudencio-Ferreira (2002), que foi de 15,06% de umidade para colágenos não liofilizados, percebe-se que as amostras A1, A2 e A4 ficaram próximas a esse valor. Quando se trata da umidade do colágeno liofilizado, as demais amostras, com exceção da amostra A7, se encontram acima do valor estabelecido pelas autoras que foi de 11,29%.

Para o pH, as amostras se diferenciaram significativamente e as amostras A9 e A4 foram as que tiveram o maior e o menor valor do pH, respectivamente, variando de 5,52 a 6,85%. Dessa forma, os valores de pH das amostras A4, A5, A6, A10 e A11 se encontram abaixo da faixa de valores de pH obtidos por Prestes et al. (2013) para colágenos bovinos. Já as amostras A1, A2, A3, A7, A8 e A9 ficaram dentro da faixa destacada pelos autores, que foi de 6,11 a 8,41%.

Para a determinação de proteínas, as amostras A5, A10 e A11 não se diferenciaram entre si, assim como as amostras A1, A3, A4, A6, A7, A8 e A9 não tem diferença significativa com nenhuma das amostras apresentadas na Tabela 3. A amostra A2 só se diferencia das amostras A5, A10 e A11, sendo a A10 amostra com maior quantidade de proteína extraída e a A2 a com menor.

Os teores de proteínas encontrados ficam abaixo dos valores da literatura, na qual Basso et al. (2013) cita ser 91,24%. O resultado também se mantém abaixo do encontrado por Alves e Prudencio-Ferreira (2002), que foi de 85,59%, mas as amostras A5, A9, A10 e A11 se enquadram na faixa de valores mostrados por Olivo & Shimokomaki (2001), que é de 76,27 a 81,41%.

Para a solubilidade, as amostras A2 e A3 não se diferiram significativamente, bem como as amostras A4, A5, A6, A7, A8, A10 e A11. Já as amostras A1 e A9 não se diferenciam de nenhuma das demais amostras, assemelhando-se assim dos dois

grupos. O menor valor da solubilidade ficou com as amostras A4 e A11, sendo a A11 com maior valor de proteína determinada.

Os valores apresentados pelas amostras A2 e A3 se mostram pouco acima do valor obtido por Alves e Prudencio-Ferreira (2002), no qual encontrou 6,45% para colágeno liofilizado com concentração 1:40. Porém, as amostras A4, A5, A6, A7, A8, A10 e A11 se aproximaram bastante do valor obtido pelas autoras quando a concentração no meio ácido foi de 1:150, cujo valor foi de 4,0% de solubilidade para colágenos extraídos de pé de frango.

Devido aos resultados obtidos de alto teor de proteína e um baixo teor de solubilidade podem sinalizar possíveis proteínas colagenosas. Já que de acordo com a literatura o colágeno, por ser uma proteína retirada do tecido conjuntivo, se mostra pouco solúvel, assim como mostrado no presente experimento (NELI, 2013).

A análise de variância das respostas de interesse em relação às variáveis independentes do processo de extração do colágeno também objetivou a análise da significância dos efeitos destas nas variáveis respostas e o ajuste dos dados experimentais a um modelo de regressão que expressasse matematicamente a extração. A seguir são comentadas as respostas estudadas neste trabalho.

5.1 Análise de cinzas

Para a resposta cinzas, na Tabela 4 estão os dados referentes à análise de variância para os dados experimentais obtidos. Na Tabela 5 estão os coeficientes de ajuste ao modelo quadrático para esta resposta (os efeitos que foram significantes na Anova estão destacados em vermelho). Os termos de concentração de ácido acético, bem como as interações entre este e o tempo, foram eliminados nesta análise por não atender ao nível de significância e objetivando um melhor valor para R^2_{adj} . Com isso, verificou-se um excelente ajuste para o modelo, que foi de 98,275%. Na Figura 5 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

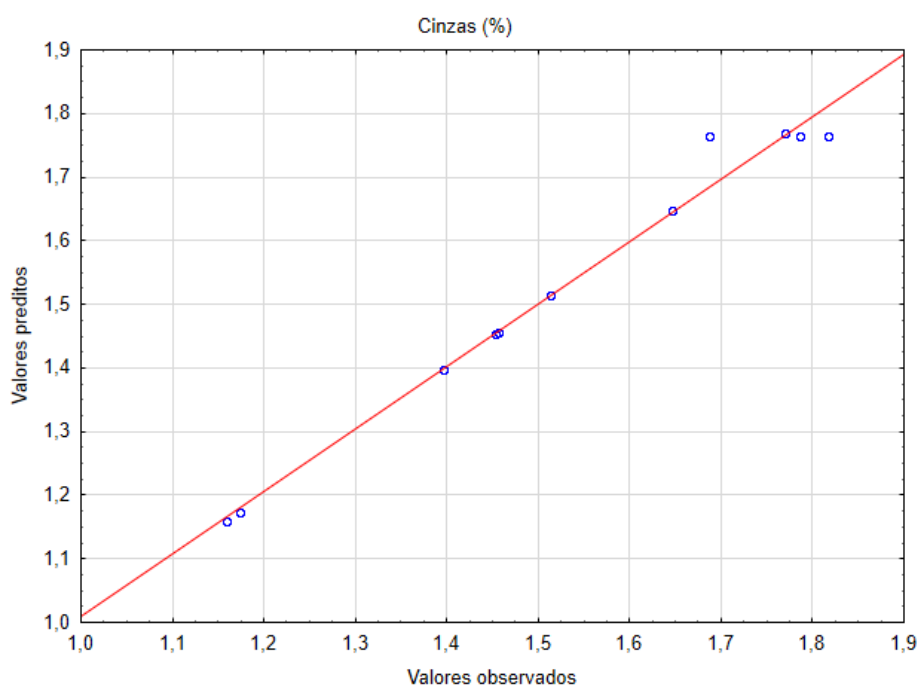
Tabela 4 - Anova para o modelo de resposta de cinzas.

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F _{calculado}	p-valor
(1) Concentração de ácido acético (M) L+Q	0,052435	2	0,026218	5,65850	0,150184
(2) Tempo (horas) L+Q	0,225151	2	0,112575	24,29684	0,039531
1*2	0,150567	4	0,037642	8,12411	0,112593
Erro	0,009267	2	0,004633		
Total SS	0,537152	10			

Tabela 5 - Coeficientes do modelo de regressão para as cinzas da extração.

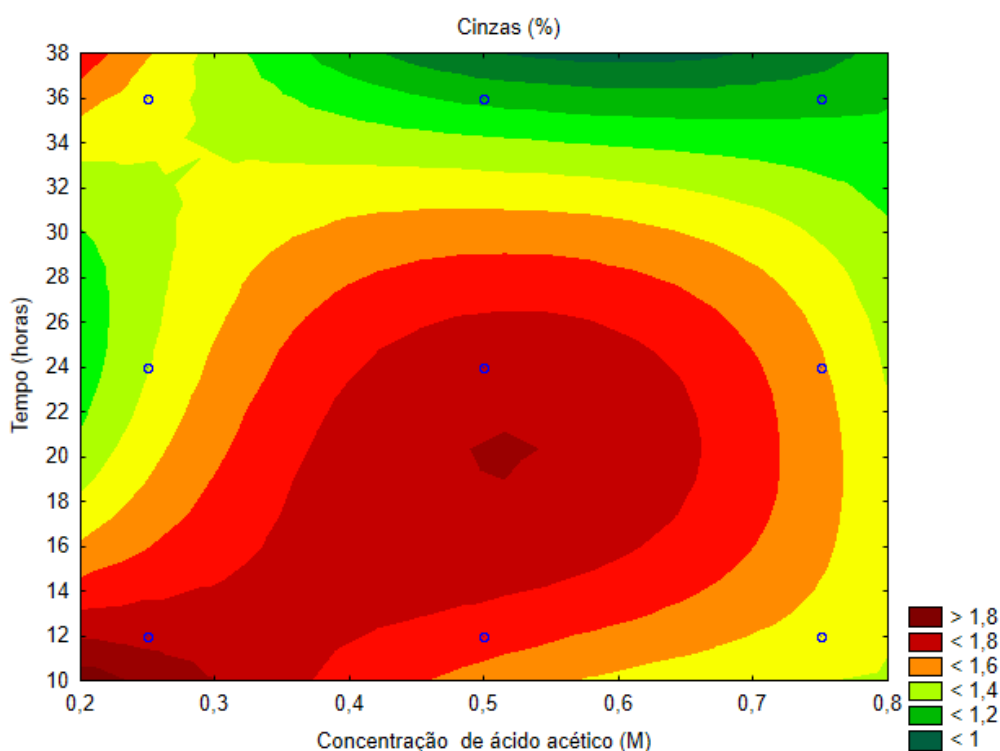
Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	6,162346	0,000006
(1) Concentração de ácido acético (M)(L)	0,050000	0,124851
Concentração de ácido acético (M)(Q)	-0,366481	0,001813
(2) Tempo (horas)(L)	0,082222	0,052139
Tempo (horas)(Q)	-0,009815	0,594057
1L by 2L	0,178333	0,017549
1L by 2Q	-0,152500	0,017987
1Q by 2L	0,010833	0,653426
1Q by 2Q	0,071528	0,041596
R ²	98,275	
R ² _{ajus}	91,374	

Figura 5 - Valores experimentais x valores preditos para as cinzas.



Para a resposta cinzas, o tempo apresentou efeito significativo negativo, ou seja, a diminuição do tempo contribuiu para o aumento das cinzas, conforme se verifica na Figura 6.

Figura 6 - Gráfico de contorno para a variável cinzas.



Na Figura 6 é possível ver ilustrativamente este comportamento, quanto menor a concentração e menor o tempo, maiores valores para as cinzas. Esta tendência se inicia entre os níveis 0,0 e -1,0 para ambas as variáveis

5.2 Análise de umidade

Para a resposta umidade, a Tabela 6 apresenta a análise de variância para os dados experimentais obtidos. Na Tabela 7 estão os coeficientes de ajuste ao modelo quadrático para esta resposta (os efeitos que foram significantes na Anova estão destacados em vermelho). Tanto o tempo quanto a concentração foram significativas para que o ajuste no modelo fosse bastante satisfatório: 99,125%. Na Figura 7 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

Tabela 6 - Anova para o modelo de resposta de umidade.

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F _{calculado}	p-valor
(1) Concentração de ácido acético (M) L+Q	5,07126	2	2,535632	12,88916	0,071999
(2) Tempo (horas) L+Q	7,94602	2	3,973008	20,19565	0,047179
1*2	32,76165	4	8,190412	41,63362	0,023593
Erro	0,39345	2	0,196726		
Total SS	44,95416	10			

Tabela 7 - Coeficientes do modelo de regressão para a umidade da extração.

Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	14,27383	0,000099
(1) Concentração de ácido acético (M)(L)	-0,88167	0,039686
Concentração de ácido acético (M)(Q)	0,20824	0,286828
(2) Tempo (horas)(L)	1,08500	0,026740
Tempo (horas)(Q)	0,30657	0,168326
1L by 2L	1,18833	0,033108
1L by 2Q	0,68250	0,070872
1Q by 2L	1,60250	0,014061
1Q by 2Q	-1,04014	0,017523
R ²		99,125
R ² _{ajus}		95,624

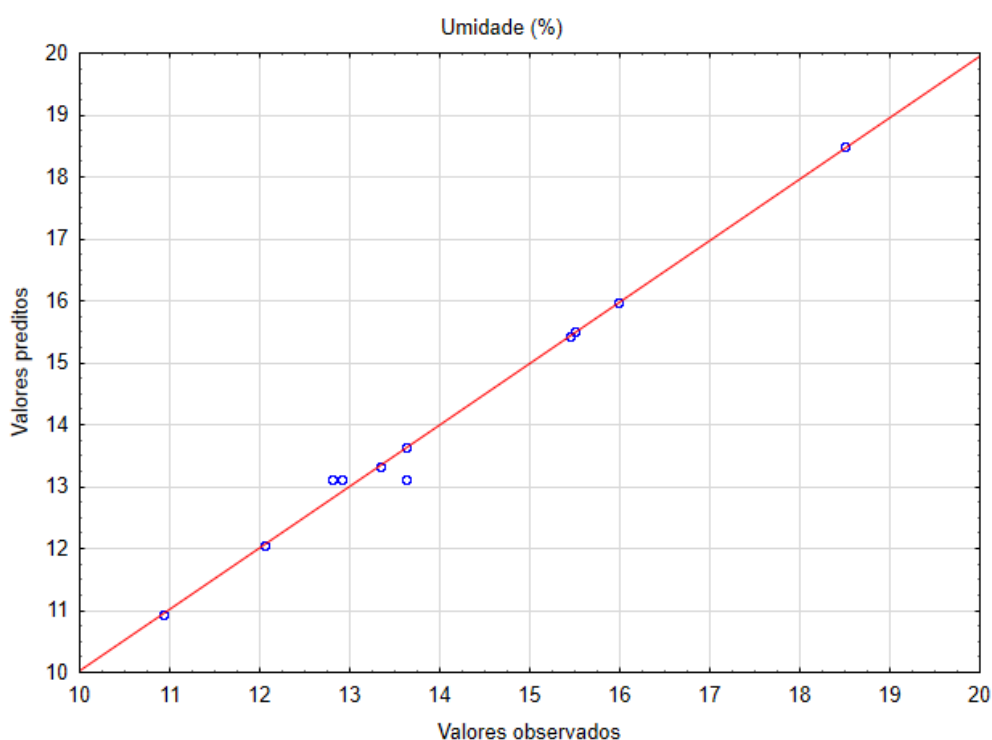
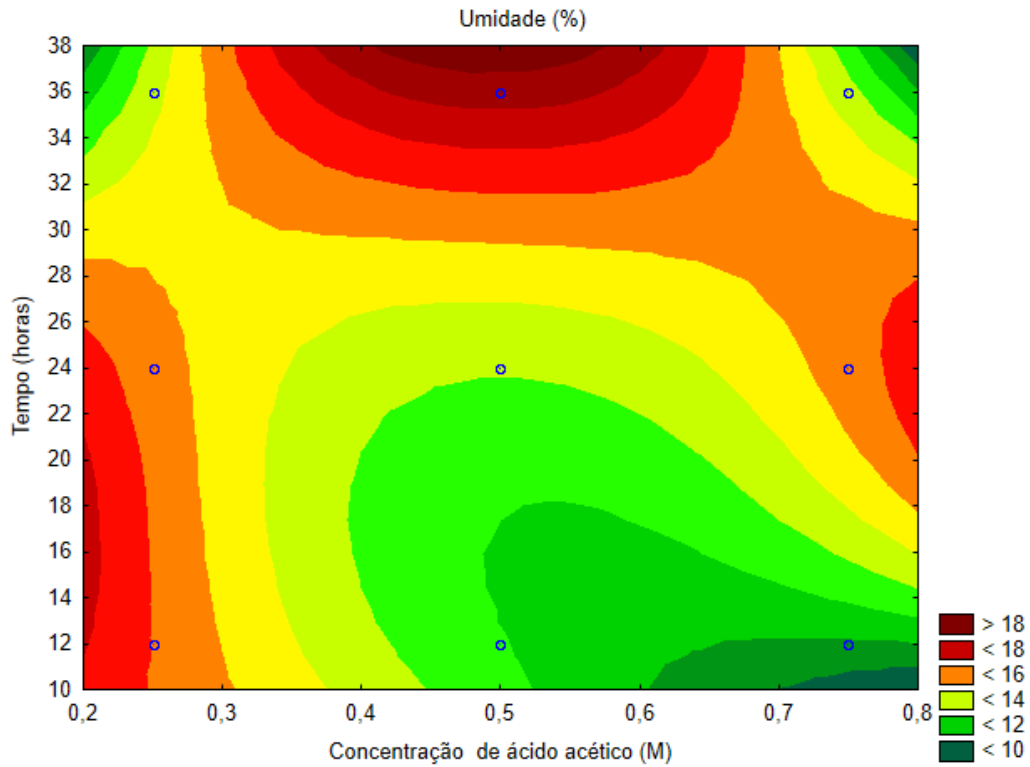
Figura 7 - Valores experimentais x valores preditos para a umidade.

Figura 8 - Gráfico de contorno para a variável umidade.



Maiores valores de umidade se destacaram em níveis intermediários para a concentração (0,0) e níveis mais altos para o tempo (+1,0), conforme se apresenta na Figura 8.

5.3 Análise de pH

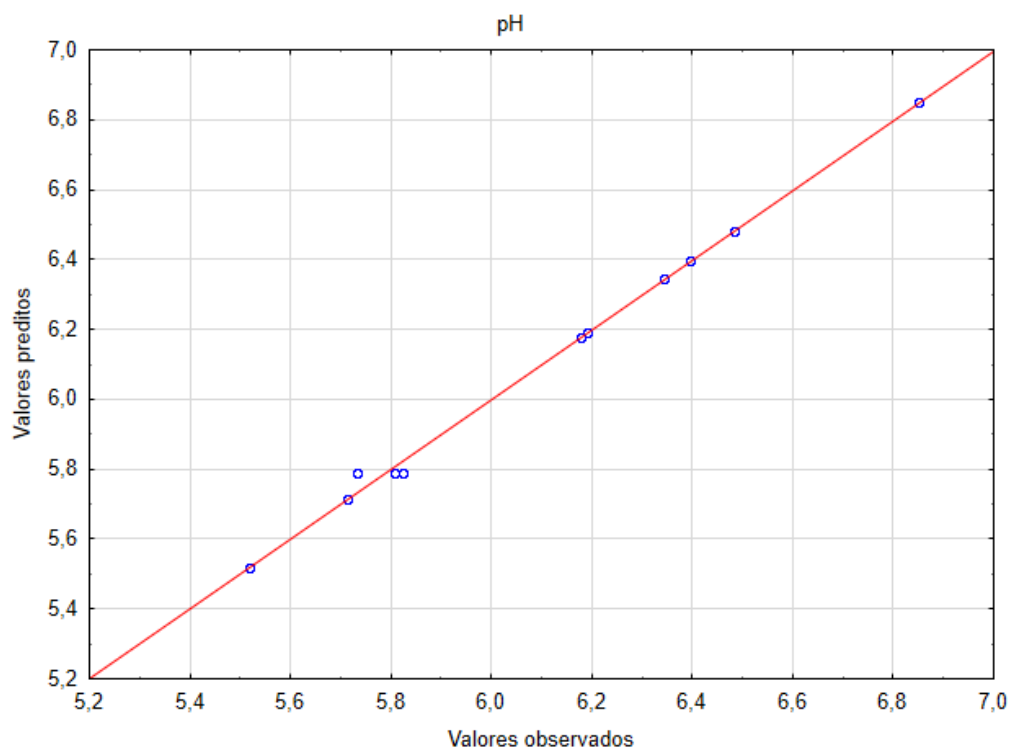
Para a resposta pH, tem-se na Tabela 8 a análise de variância para os dados experimentais. Na Tabela 9 estão os coeficientes de ajuste ao modelo quadrático para esta resposta de acordo com o nível de significância de 5%. A concentração e a interação concentração e tempo foram significativas para que o ajuste no modelo foi bastante satisfatório: 99,723%. Na Figura 9 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

Tabela 8 - Anova para o modelo de resposta do pH.

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F_{calculado}	p-valor
(1) Concentração de ácido acético (M) L+Q	1,276334	2	0,638167	278,3603	0,003580
(2) Tempo (horas) L+Q	0,041468	2	0,020734	9,0438	0,099564
1*2	0,303571	4	0,075893	33,1035	0,029537
Erro	0,004585	2	0,002293		
Total SS	1,653224	10			

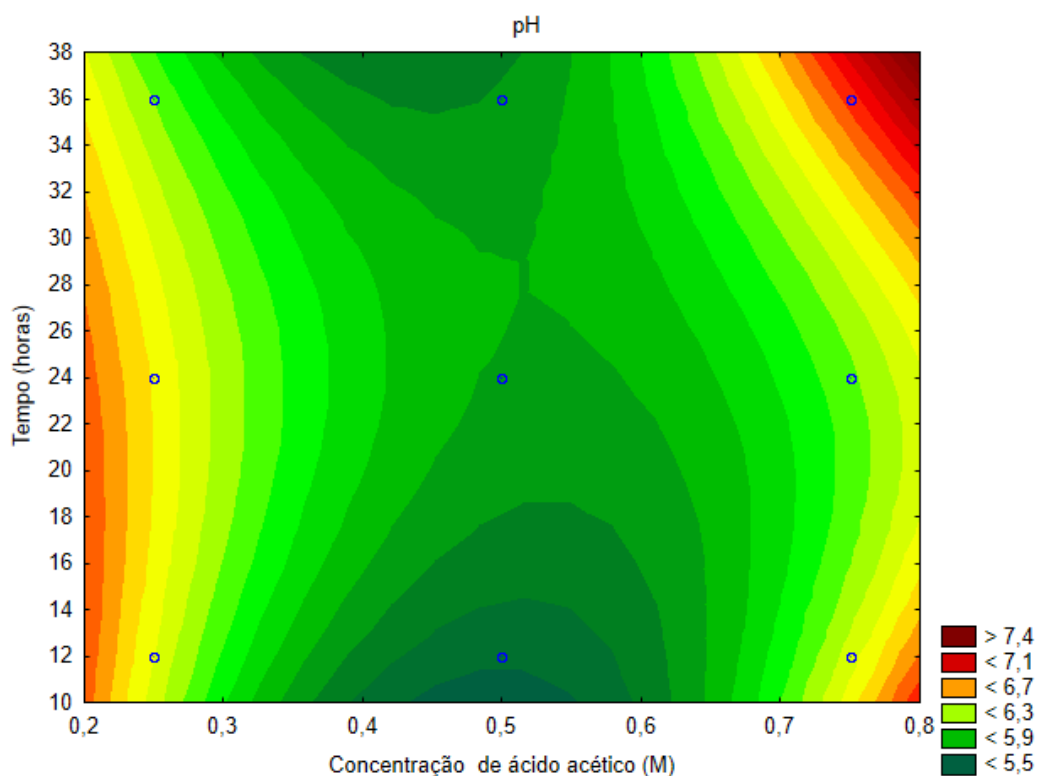
Tabela 9 - Coeficientes do modelo de regressão para o pH da extração.

Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	6,162346	0,000006
(1) Concentração de ácido acético (M)(L)	0,050000	0,124851
Concentração de ácido acético (M)(Q)	-0,366481	0,001813
(2) Tempo (horas)(L)	0,082222	0,052139
Tempo (horas)(Q)	-0,009815	0,594057
1L by 2L	0,178333	0,017549
1L by 2Q	-0,152500	0,017987
1Q by 2L	0,010833	0,653426
1Q by 2Q	0,071528	0,041596
R²	99,723	
R²_{ajus}	98,613	

Figura 9 - Valores experimentais x valores preditos para o pH.

Na Figura 10 é possível ver ilustrativamente este comportamento, quanto maior a concentração e maior o tempo, maiores valores para o pH. Esta tendência se inicia entre os níveis 0,0 e +1,0 para ambas as variáveis.

Figura 10 - Gráfico de contorno para a variável pH.



5.4 Análise de proteínas

Para a resposta proteínas, a Tabela 10 traz um resumo da análise de variância para os dados experimentais e a Tabela 11 os coeficientes de ajuste ao modelo quadrático para esta resposta de acordo com o nível de significância de 5%. A concentração, o tempo e a interação concentração e tempo foram muito significativas para que o ajuste no modelo fosse excelente: 99,893%. Na Figura 11 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

Tabela 10 - Anova para o modelo de resposta de proteínas.

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F _{calculado}	p-valor
(1) Concentração de ácido acético (M) L+Q	37,1210	2	18,56050	192,5363	0,005167
(2) Tempo (horas) L+Q	21,5024	2	10,75119	111,5268	0,008887
1*2	65,1635	4	16,29088	168,9925	0,005891
Erro	0,1928	2	0,09640		
Total SS	179,7435	10			

Tabela 11 - Coeficientes do modelo de regressão para as proteínas da extração.

Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	73,47111	0,000002
(1) Concentração de ácido acético (M)(L)	1,68944	0,005582
Concentração de ácido acético (M)(Q)	1,45917	0,004786
(2) Tempo (horas)(L)	1,77778	0,005045
Tempo (horas)(Q)	0,52000	0,035928
1L by 2L	1,46917	0,010982
1L by 2Q	0,52292	0,060195
1Q by 2L	-0,02958	0,846256
1Q by 2Q	2,33437	0,001746
R^2		99,893
R^2_{ajus}		99,464

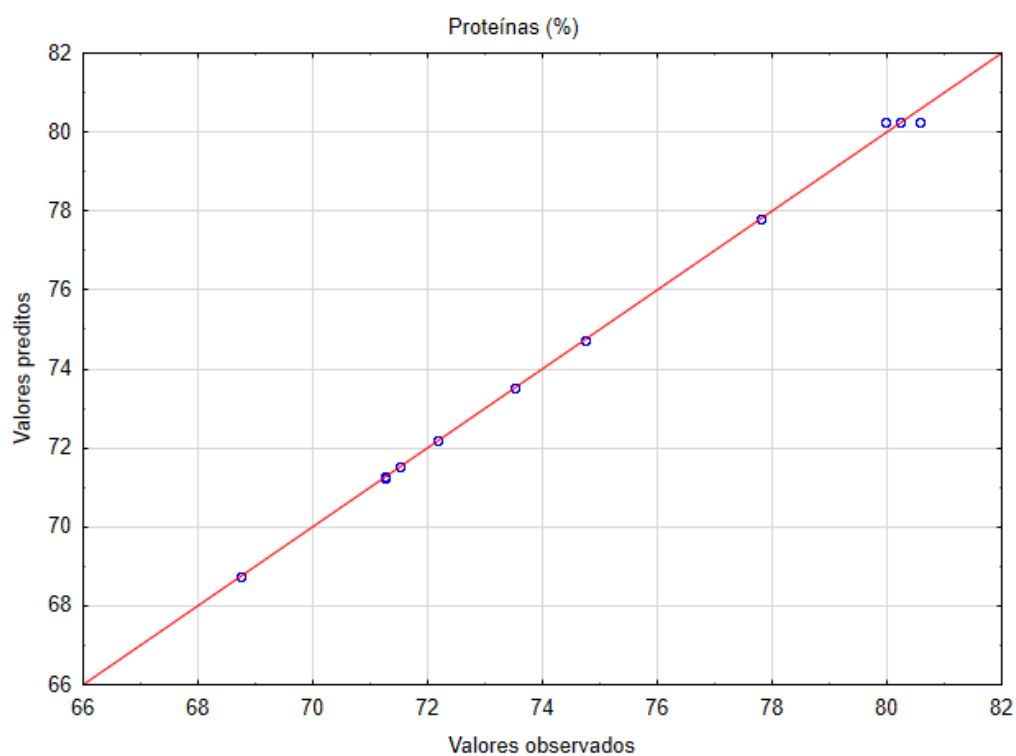
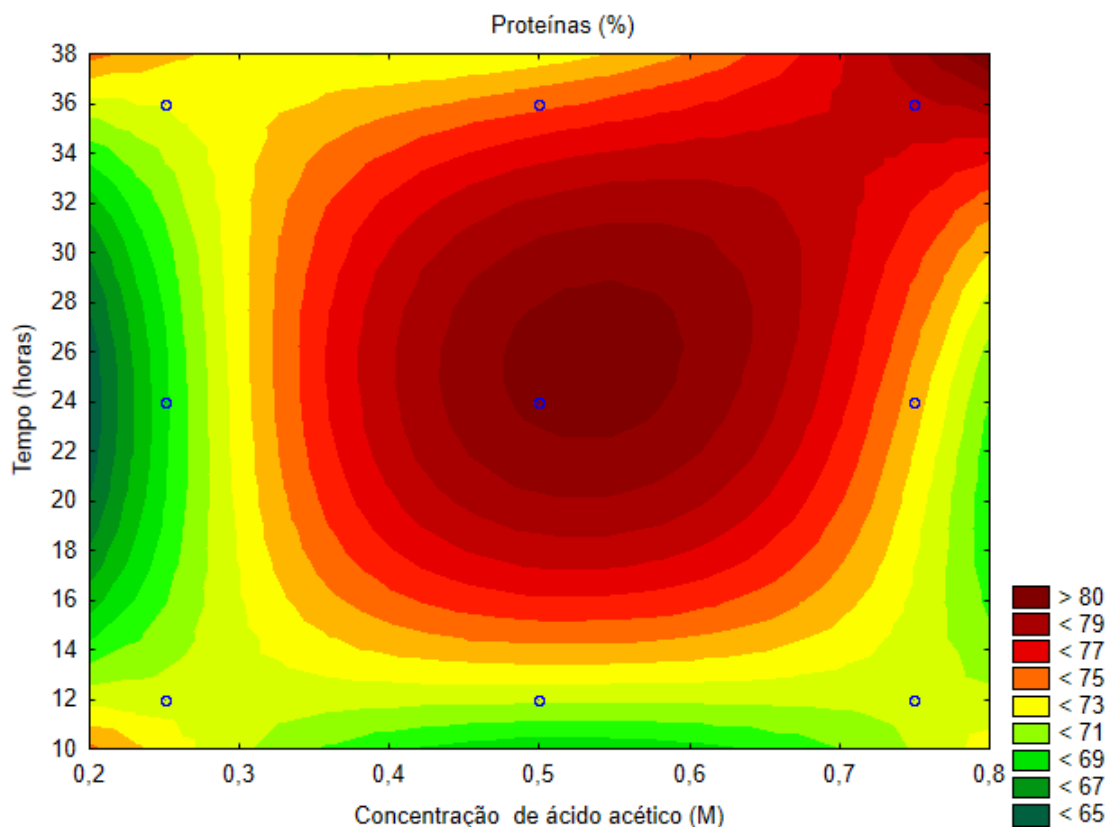
Figura 11 - Valores experimentais x valores preditos para as proteínas.

Figura 12 - Gráfico de contorno para a variável proteínas.



Na Figura 12 é bem perceptível a influência da concentração e do tempo, bem como sua interação para o aumento de proteínas obtidas na extração. Partindo do ponto central (0,5; 24,0), é nítido o aumento desta variável resposta.

5.5 Análise de solubilidade

Para a resposta solubilidade, tem-se nas Tabelas 12 e 13 um resumo da análise de variância para os dados experimentais e os coeficientes de ajuste ao modelo quadrático para esta resposta de acordo com o nível de significância de 5%, respectivamente. Tanto a concentração, como o tempo e a interação concentração e tempo foram significativas para que o ajuste no modelo fosse excelente: 99,943%. Na Figura 13 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

Tabela 12 - Anova para o modelo de resposta de solubilidade.

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F _{calculado}	p-valor
(1) Concentração de ácido acético (M) L+Q	9,39573	2	4,697864	1358,124	0,000736
(2) Tempo (horas) L+Q	0,91599	2	0,457996	132,404	0,007496
1*2	0,81605	4	0,204012	58,978	0,016742
Erro	0,00692	2	0,003459		
Total SS	12,12734	10			

Tabela 13 - Coeficientes do modelo de regressão para a solubilidade da extração.

Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	5,118093	0,000014
(1) Concentração de ácido acético (M)(L)	-0,855000	0,000788
Concentração de ácido acético (M)(Q)	-0,730361	0,000690
(2) Tempo (horas)(L)	0,370000	0,004185
Tempo (horas)(Q)	-0,100361	0,034677
1L by 2L	-0,122500	0,053081
1L by 2Q	-0,333750	0,005772
1Q by 2L	-0,165000	0,023004
1Q by 2Q	0,040708	0,158778
R ²		99,943
R ² _{ajus}		99,715

Figura 13 - Valores experimentais x valores preditos para a solubilidade.

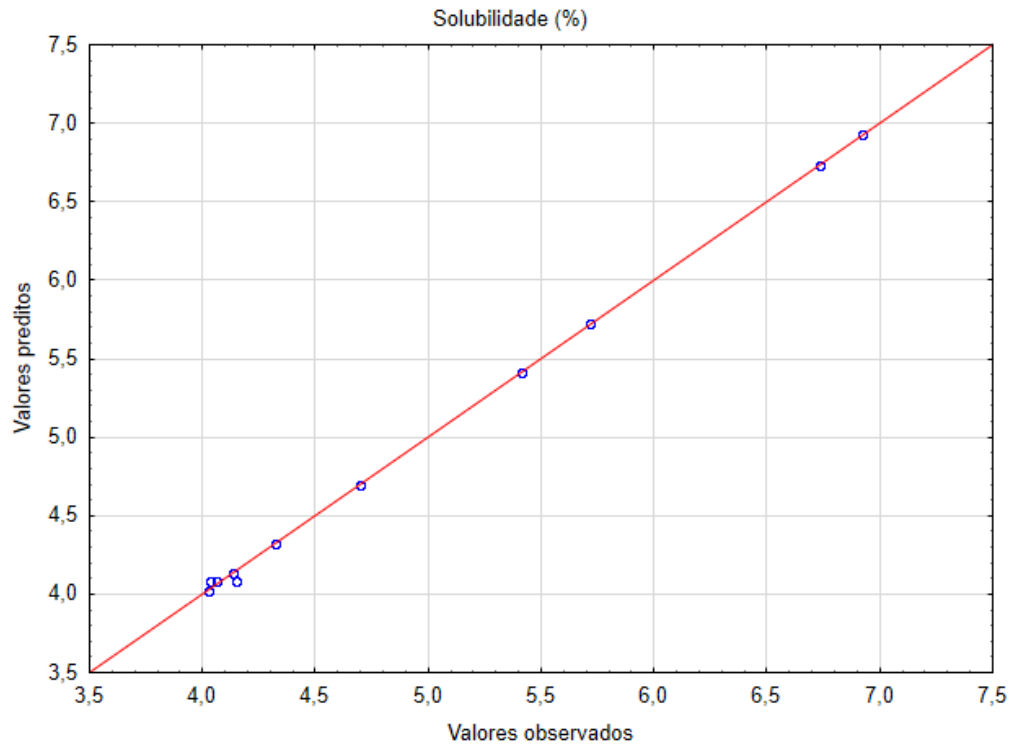
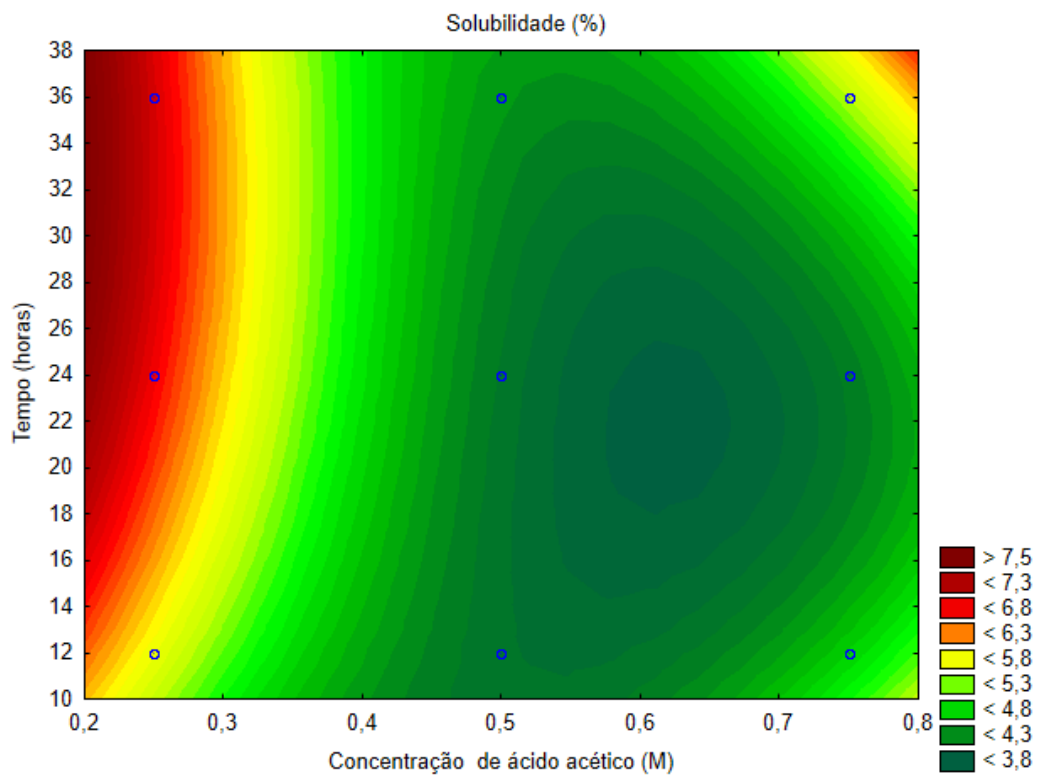


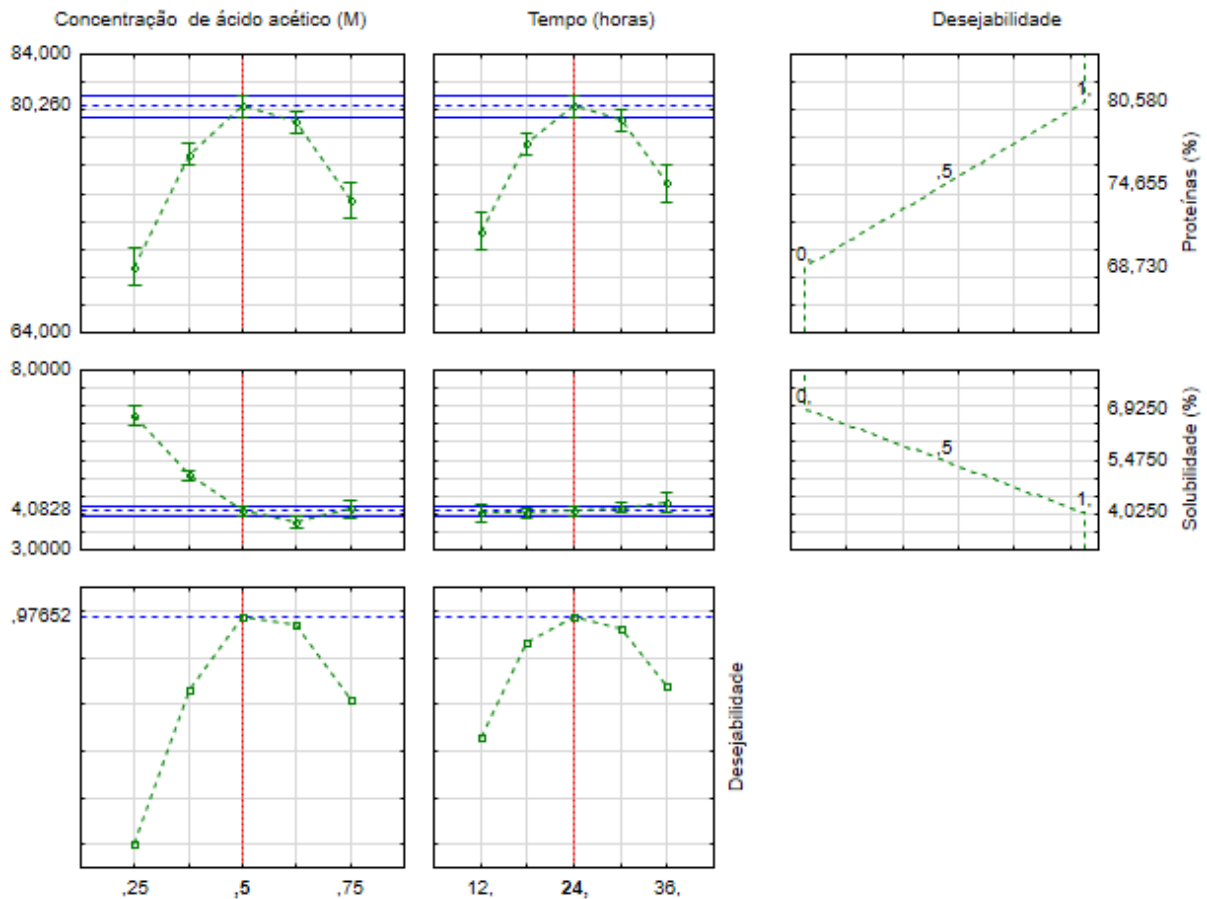
Figura 14 - Gráfico de contorno para a variável solubilidade.



Para a solubilidade, é possível verificar na Figura14 que concentrações intermediárias (0,0) de ácido acético e tempo intermediário (0,0) contribuem para a diminuição na variável resposta solubilidade.

Com base nas respostas obtidas, almejou-se determinar qual a concentração ideal do ácido acético, bem como o tempo ideal, ainda mais considerando que, para o processo de extração do colágeno, o ideal é que se tenha altos valores de proteínas associados a baixos valores de solubilidade.

Figura 15 - Gráfico de influência da concentração de ácido acético (M) e do tempo (horas) na obtenção de proteínas e solubilidade.



Pela Figura 15 é possível verificar que valores ótimos para solubilidade e proteínas são obtidos quando se opta pelos valores centrais do delineamento proposto anteriormente, ou seja, uma concentração de 0,5 M de ácido acético e um tempo de 24 horas. Desta forma, a amostra A5, bem como as amostras A10 e A11, repetições no ponto central, foram as que se mostraram com valores ótimos (97,652%) para a determinação do colágeno extraído da pele de tilápia.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados de determinação de proteínas, os mesmos se apresentaram coerentes com a literatura e demonstraram sofrer uma influência direta das variáveis concentração e tempo, além de uma interação entre estas promovendo um aumento de proteínas obtidas na extração. Os baixos valores de solubilidade encontrados no experimento juntamente com os altos teores de proteínas, possibilitaram dizer que há grandes chances de a proteína extraída ser colágeno, já que o mesmo é uma proteína insolúvel.

Os resultados de cinzas se enquadram nos discutidos na literatura e apresenta variação em sua quantidade conforme o aumento da concentração e a diminuição do tempo. Já os resultados de umidade se apresentaram acima dos valores teóricos, obtendo maiores valores em níveis intermediários de concentração combinado com um maior tempo. O pH demonstrou uma influência direta das variáveis concentração e tempo, uma vez que quanto mais se elevaram a concentração e o tempo maiores valores de pH foram encontrados.

Pode-se concluir que os resultados obtidos na extração de colágeno da pele de tilápia por um protocolo ácido foram satisfatórios, haja vista que os valores encontrados não são discrepantes em relação aos apresentados pela literatura, ainda que em alguns casos comparados com colágeno bovinos e de aves. Além disso, a condição que mais favoreceu a extração do colágeno foi a de concentração 0,5M e tempo de 24 horas com uma desejabilidade de 97,652%.

REFERÊNCIAS

- ALFARO, A. T. **Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, 2008.
- ALMEIDA, P. F.; SANTANA, J. C. C. **Avaliação da Qualidade de uma gelatina obtida a partir de tarsos de frango**. XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção, São Carlos, 2010.
- ALVES, S. T. G.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de material de pés de frango. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, n. 3, p. 289-293, 2002.
- BASSO, T. R.; URNAU, R. M.; BRANDALIZE, C.; SIMOES, M. R. **Extração e caracterização de colágeno obtido de peles do processamento de tilápia**. III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência. Toledo-Paraná, 2013.
- BORDIGNON, A. C. **Caracterização da pele e da gelatina extraída de peles congeladas e salgadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2012.
- BUENO, C. M.; ALVIM, I. D.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; PORTELLA, M. C.; GROSSO, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 65-73, 2011.
- CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M.; CAMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization using the desirability function in analytical methods development. Nova Iorque, Elsevier. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014.
- COUPER, J. R.; PENNEY, R.W.; FAIR, J. R.; WALAS, S. M. **Chemical Process Equipment**. 2 ed. Elsevier, New York, 2010, 481-520 p.
- Disponível em:
<http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2010_tn_stp_114_750_15403.pdf>. Acesso em 15 out. 2018.
- EMBRAPA. **Pesca e aquicultura**. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/pesca-e-aquicultura/-/asset_publisher/pzk4tXFfiHGh/content/o-que-e-aquicultura-/1355746?inheritRedirect=false>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.
- EMBRAPA. **Pesquisa recomenda uso de armadilhas para controle da tilápia-do-nilo em bacia no Amapá**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17551031/pesquisa-recomenda-uso-de-armadilhas-para-controle-da-tilapia-do-nilo-em-bacia-no-amapa>>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.
- EMBRAPA. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Disponível em:
< www.embrapa.br/pantanal/busca-de-publicacoes/-/publicacao/812198/adequacao-da-metodologia-kjeldahl-para-determinacao-de-nitrogenio-total-e-proteina-bruta >. Acesso em: 25 out. 2018.

FIGUEIREDO G. I. **Elaboração de nanohidroxiapatita e colágeno proveniente de resíduos do beneficiamento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).**

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015. Disponível em:

<http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/17256/1/2015_dis_gifigueiredo.pdf>.

Acesso em: 10 out.2018.

FONTOURA. A. M. **Colágeno de tilápia: uma alternativa para agregar valor aos subprodutos da indústria de pescado.** Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

FOUST. A. S.; WENZEL. L. A.; CLUMP. C. W.; MAUS. L.; ANDERSEN, L. B. **Princípios das Operações Unitárias.** 2 ed. McGraw- Hill, New York, 1982. 13p.

FRANZEN, J. M.; SANTOS, J. M. S. R.; ZANCANARO, V. Colágeno: uma abordagem estética. **RIES**, v. 2, n. 2, p. 49-61, 2013.

GÓMEZ, G. M. C.; GIMÉNEZ B.; LÓPEZ. C. M. E.; MONTERO. M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-27, 2011.

LI, Z.; WANG, B.; CHI, C. *et al.* Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 103-113, 2013.

LIMA, D. A. S. **Colágeno de pé de frango como substituto de gordura em salsicha de frango tipo Frankfurt: efeito do tempo de armazenamento nas propriedades físico-químicas.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, 2016.

MAIA, M. O. **Gelatina de pescado: extração, caracterização e aplicação.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2015.

MAPA. **Sobre o ministério da pesca e aquicultura.** Disponível em: <<http://www.abc.gov.br/training/informacoes/InstituicaoMPA.aspx>>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Produção de tilápia cresceu 223% em dez anos.** Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/noticias/producao-de-tilapia-cresceu-80-em-dez-anos>>. Acesso em: 05 out. 2018

MOLINARI, M. C. **Extração e caracterização de gelatina a partir de subprodutos de Tilápia.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

NATIFY, W.; DROUSSI, M.; BERDAY.; ARABA. A.; BENABID. M. Effect of the seaweed ulva lactuca as a feed additive on growth performance, feed utilization and body composition of Nile tilapia. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, v. 7, n. 3, p. 85-92, 2015.

NERI, R. C. A. **Extração e caracterização de colágeno obtido a partir das escamas obtidas no processamento do peixe Cioba (*Lutjanus analis*).** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal do Pernambuco, 2013.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de

- superfícies de resposta. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017.
- OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E.I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 271-283, 2001.
- PEIXE BR. **Anuário da Peixe BR da piscicultura 2016**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/Anuario2017/AnuarioPeixeBR2017.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.
- PEIXE BR. **Anuário da Peixe BR da piscicultura 2017**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/Anuario2018/AnuarioPeixeBR2018.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.
- PEIXE BR. **Anuário da Peixe BR da piscicultura 2018**. Disponível em:<<https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.
- PRESTES, R. C.; GOLUNSKI, S. M.; TONIAZZO. G.; KEMPKA, A. P.; LUCCIO. M. D. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 375-382, 2013.
- ROCHA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SOUSA, V. R.; CORRÊA, D. A. Método de obtenção e análise da composição centesimal do polvilho da fruta-de-lobo (*solanum lycocarpum* st. hil)1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 248-254, 2012.
- SILVA, E. V. C. **Otimização das condições de extração da gelatina de pele de peixes amazônicos por diferentes métodos**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará, 2016.
- SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.
- SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. **Revista do BNDS**, v. 25, n. 49, p. 119-170, 2018.
- SOUZA, M. C. C. **Elaboração de filme biodegradável a partir da gelatina extraída da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.
- VICENTE, I.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil Prospects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392-398, 2014.
- YAN, M.; QUIN, S.; LI, J. Study on the self-assembly property of type I collagen prepared from tilapia (*oreochromis niloticus*) skin by different extraction methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2088-2096, 2015.