



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-CCB  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA –  
PPGBqF

FLÁVIA THUANE DUARTE DO MONTE

**CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO EXTRAÍDO A PARTIR DE ESCAMAS DE  
PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*)**

RECIFE

2016

FLÁVIA THUANE DUARTE DO MONTE

**CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO EXTRAÍDO A PARTIR DE ESCAMAS DE  
PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*)**

Dissertação apresentada para o cumprimento  
parcial das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela  
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadora: Dr.a Helane Maria Silva da Costa

RECIFE

2016

FLÁVIA THUANE DUARTE DO MONTE

**CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO EXTRAÍDO A PARTIR DE ESCAMAS DE  
PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*)**

Dissertação apresentada para o cumprimento  
parcial das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela  
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadora: Dr.a Helane Maria Silva da Costa

**Aprovado por:**

---

**Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

---

**Dr. Vagne de Melo Oliveira**

---

**Dra. Marina Marcuschi**

**Data: 22/02/2016**

*A Deus, luz que me guia em todos os meus  
dias de vida.*

*Aos meus pais pelo amor, incentivo e  
dedicação de sempre.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo sempre, me dando proteção, saúde, coragem e muita força para continuar em busca dos meus objetivos, me permitindo concluir mais esta etapa em minha vida profissional.

Ao professor Dr. Ranilson Bezerra e Dr.<sup>a</sup> Helane Maria, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de crescer e amadurecer no LABENZ e pela orientação e co-orientação na realização deste trabalho.

Aos integrantes da mesa examinadora (Ranilson Bezerra, Patrícia Paiva, Vagne Oliveira e Marina Marcuschi), além dos suplentes (Thiago Napoleão e Augusto Vasconcelos), pela disponibilidade em aceitar o convite para contribuir com o enriquecimento do meu trabalho.

Aos meus pais em especial, pois sem o apoio deles eu não seria metade do que eu sou hoje. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. À minha família em geral, por torcer e me incentivar na busca por minhas vitórias.

Ao meu noivo Cleyton, que está ao meu lado desde a graduação, por ser muito compreensivo, amigo e companheiro, me apoiando em tudo o que eu faço e por ser um dos motivos da minha felicidade.

A todos os integrantes da família LABENZ, que me auxiliaram como puderam no que eu precisei, com tanto carinho e humildade, além do ótimo convívio no laboratório.

Aos meus amigos da turma de mestrado (2014.1), pelos momentos inesquecíveis de dificuldade e companheirismo cursando as disciplinas. Graças às circunstâncias criamos um grande laço de carinho, amizade e cumplicidade.

A todos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, que de alguma forma auxiliaram na execução desta pesquisa.

Aos amigos externos a este trabalho, que estão em minha vida compartilhando bons momentos, e os que entenderam a minha ausência em certos momentos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo auxílio financeiro concedido.

Grata a todos.

*“O conhecimento por si só de nada vale. É a sua aplicação para fins úteis que lhe dá a sua valia”.*

**(Livro de Eclesiastes)**

## RESUMO

O colágeno é a proteína fibrosa de origem animal mais abundante, que representa 30% de proteína total e 6% em peso no corpo humano. A pele e os ossos de bovinos e suínos geralmente são as principais fontes de colágeno e gelatina. No entanto, devido ao risco de transferência de zoonoses, existe uma necessidade de obtenção desta proteína por meio de outras fontes. A pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) é um importante representante da pesca nacional e possui grande valor comercial. O objetivo deste estudo foi utilizar resíduos do processamento de pescada amarela para obter colágeno e sugerir sua utilização como fonte alternativa para o colágeno mamífero. Colágeno pepsino solúvel (PSC) foi isolado a partir de escamas de pescada amarela e caracterizado com sucesso. O rendimento da extração de PSC foi de 8,3% (baseado no peso seco). A SDS-PAGE (7,5%) mostrou que o padrão de bandas do PSC consistiu de uma cadeia  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  na proporção de 2:1, bem como cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo caracterizado como colágeno do tipo I. O espectro de absorção ultravioleta (UV) mostrou uma máxima absorção em 222 nm. PSC foi solúvel na faixa de pH de 1 à 4, com a máxima solubilidade em pH 1. O colágeno também demonstrou maior solubilidade na faixa de concentração de 0 à 2% (w/v) de NaCl. A temperatura máxima de transição ( $T_{max}$ ) para PSC foi de 30,4°C, tal como determinado por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os resultados obtidos neste estudo indicam a possibilidade do uso de escamas de pescada amarela como uma fonte de colágeno do tipo I, com grande potencial para aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chaves:** Colágeno de peixe. Molécula bioativa. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*). Resíduos do processamento do pescado.

## ABSTRACT

Collagen is the most abundant fibrous protein of animal origin, representing 30% of the total protein and 6% in weight of the human body. The skin and bones of bovines and pigs usually are the main sources of collagen. However, due to the risk of transfer of diseases, there is a need for obtaining this protein from other sources. The acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*) is an important representative of the national fishing and has great commercial value. The aim of this study was to use acoupa weakfish waste processing for obtain collagen and suggest its use as an alternative source mammal collagen. Pepsin soluble collagen (PSC) from scales of acoupa weakfish was isolated and characterized. The yield of PSC was 8.3% (based on dry weight). SDS-PAGE (7.5%) pattern showed that both PSC consisted of one  $\alpha 1$  and one  $\alpha 2$  chains in proportion 2:1, as well as  $\beta$  and  $\gamma$  chains, and were characterized to be type I collagen. The PSC ultraviolet (UV) absorption spectrum showed a maximum absorption at 222 nm. The PSC was soluble at pH between 1 and 4, with maximum solubility at pH 1. He have also shown solubility majority at NaCl concentration from 0 to 2% (w/v). The maximum transition temperature ( $T_{\max}$ ) for PSC was 30.4°C, as determined by differential scanning calorimetry (DSC). The results obtained in this study indicate the possibility of using acoupa weakfish scales as a source of type I collagen with great potential for biotechnological application.

**Keywords:** Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*). Bioactive molecules. Fish collagen. Fishery processing waste.

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                     |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: | Produção aquícola mundial                                           | 14 |
| Figura 2: | Produção de pescado (t) nacional no período de 2009–2010 por região | 15 |
| Figura 3: | <i>Cynoscion acoupa</i> – figura esquemática                        | 16 |
| Figura 4: | <i>Cynoscion acoupa</i>                                             | 17 |
| Figura 5: | Distribuição geográfica de <i>Cynoscion acoupa</i>                  | 18 |
| Figura 6: | Fibra de colágeno                                                   | 21 |
| Figura 7: | Principais tipos de colágeno                                        | 22 |
| Figura 8: | Estrutura do colágeno                                               | 23 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                      |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: | Sistemática Filogenética da pescada amarela, <i>Cynoscion acoupa</i> | 17 |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |                                                                  |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|
| MPA                    | Ministério da Pesca e Aquicultura                                |
| FAO                    | Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação |
| OMS                    | Organização Mundial de Saúde                                     |
| BSE                    | Encefalopatia espongiforme bovina                                |
| TSE                    | Encefalopatia espongiforme transmissível                         |
| FMD                    | Febre aftosa                                                     |
| PSC                    | Colágeno pepsino solúvel                                         |
| NaCl                   | Cloreto de sódio                                                 |
| NaOH                   | Hidróxido de sódio                                               |
| Tris                   | Tris(hidroximetil)aminometano                                    |
| HCl                    | Ácido clorídrico                                                 |
| EDTA-2Na               | Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico                     |
| nm                     | nanômetro                                                        |
| kDa                    | Quilodalton                                                      |
| pH                     | potencial Hidrogeniônico                                         |
| pI                     | ponto Isoelétrico                                                |
| <i>T<sub>max</sub></i> | Temperatura máxima de transição                                  |
| UV                     | Radiação Ultravioleta                                            |
| SDS                    | Sulfato sódico de dodecila                                       |
| DSC                    | Calorimetria exploratória diferencial                            |

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                        | 13 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                            | 14 |
| 2.1. Pesca e aquicultura .....                                            | 14 |
| 2.2. Pescada amarela ( <i>Cynoscion acoupa</i> ) .....                    | 16 |
| 2.3. Resíduos do processamento do pescado como fonte de biomoléculas..... | 19 |
| 2.4. Colágeno.....                                                        | 20 |
| 2.5. Fontes de colágeno .....                                             | 24 |
| 2.6. Colágeno e suas aplicações biotecnológicas .....                     | 25 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                         | 27 |
| 3.1. Objetivo Geral .....                                                 | 27 |
| 3.2. Objetivos Específicos .....                                          | 27 |
| 4. CONCLUSÕES .....                                                       | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....                                          | 29 |
| APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO .....                                      | 36 |

## 1. INTRODUÇÃO

O processamento de peixes gera grande quantidade de resíduos, que são pouco utilizadas pela indústria pesqueira. Menos de 50% do peso correspondem ao filé, produto de maior interesse comercial. O impacto gerado pelo descarte desse material no ambiente é uma preocupação da comunidade científica, cujos esforços visam atenuar o ônus ambiental e incrementar a economia do setor pesqueiro.

Os insumos da indústria pesqueira (ossos, pele, escamas e vísceras) podem ser utilizados para a extração de várias biomoléculas. Com o previsível e acentuado desenvolvimento da aquicultura brasileira no início do século XXI e, conseqüentemente, o aumento na disponibilidade de subprodutos, torna-se viável a utilização de biomoléculas extraídas de peixes para aplicações biotecnológicas, contribuindo também para que o agronegócio da pesca se torne uma atividade sustentável.

Este conhecimento, atrelado à necessidade da obtenção de fontes alternativas e mais seguras à utilização do colágeno mamífero já comercializado e utilizado nos vários segmentos biotecnológicos (indústria de cosmético, alimentos, farmacêutica, médica, entre outros), justifica o aproveitamento dos resíduos da pesca para obtenção de colágeno. Esta proteína possui extrema importância estrutural para os vertebrados e têm características e propriedades bastante interessantes para a indústria, sendo um dos biomateriais mais utilizados no mercado. Colágenos oriundos de organismos aquáticos não possuem nenhum risco de transmissão de doenças, de toxicidade ou barreiras religiosas.

A pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) é a maior espécie do gênero *Cynoscion* no Brasil e uma das espécies demersais mais promissoras. É um peixe oriundo da pesca extrativa e também apreciado na pesca esportiva. Presente em todo o território costeiro nacional, é um dos peixes mais produzidos e de grande comercialização no país. Pele e escamas desta espécie são estruturas ricas em colágeno e podem ser utilizadas para a extração desta biomolécula.

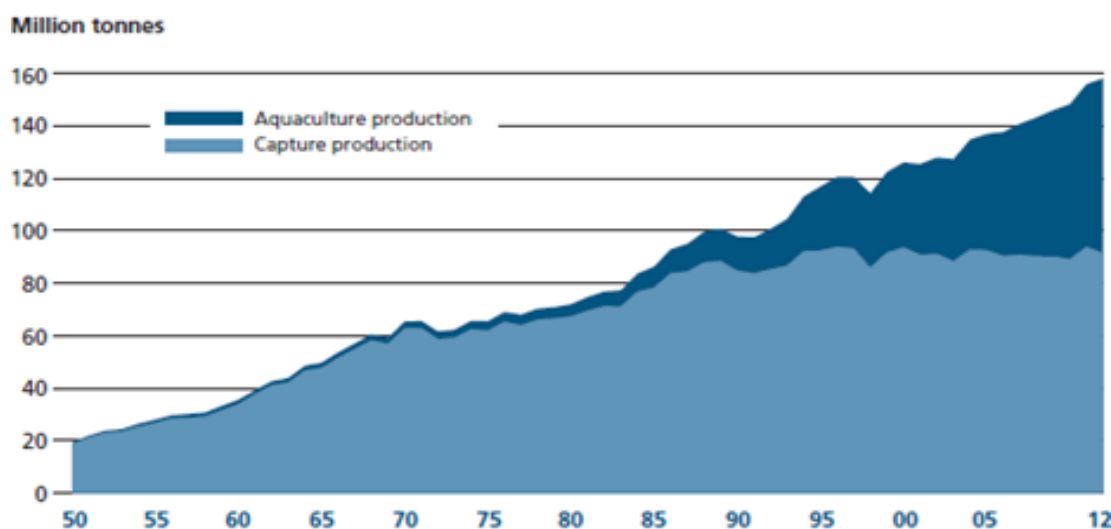
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Pesca e aquicultura

A produção aquícola representa um importante segmento na economia mundial e vem crescendo em ritmo constante ao longo das últimas cinco décadas (Figura 1), com a oferta alimentar aumentando a uma taxa média anual de 3,2%, ultrapassando o crescimento da população mundial em 1,6%. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), o consumo mundial de peixe per capita aparente aumentou de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012.

Este impressionante desenvolvimento tem sido impulsionado por uma combinação de fatores, como o crescimento populacional, aumento da renda e urbanização, além de ser facilitado pela forte expansão da produção de peixes e canais de distribuição mais eficientes (FAO, 2014).

Figura 1 – Produção aquícola mundial.



Fonte: FAO, 2014.

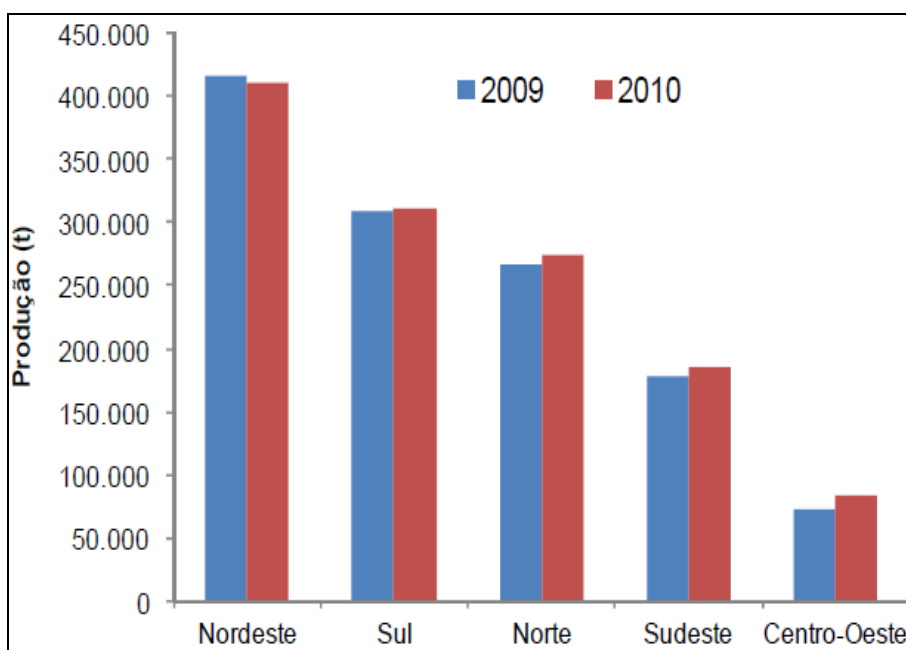
O Brasil é banhado por uma costa marítima de 8,5 mil quilômetros, possui 12% de toda a água doce do planeta e ainda 8,2 bilhões de metros cúbicos de água distribuídos em rios, lagos, açudes e represas. Com condições ambientais e climáticas favoráveis e tanta riqueza natural tem potencial para se tornar um dos maiores produtores de pescado do mundo (MPA, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o pescado é a proteína animal mais saudável e consumida do mundo, sendo responsável pela oferta de 50% do que é consumido pela população mundial. Os brasileiros ultrapassam o consumo mínimo de pescado recomendado pela OMS que é de 12 quilos por habitante ao ano. No Brasil, o consumo chega a 14,50 quilos por habitante/ano de acordo com o levantamento feito em 2013 (MPA, 2013).

Com este cenário, o país vem crescendo ao longo dos anos em produção de pescado. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), em 2010, a produção nacional de pescado apresentou um crescimento de 2% comparado a 2009 e produziu aproximadamente 1,26 milhões de toneladas. A região Nordeste foi a maior produtora de pescado em 2010 (410.532 t; 32,5%), seguida pela região Sul (311.700 t; 24,6%), região Norte (274.015 t; 21,7%), região Sudeste (185.636 t; 14,7%) e região Centro-Oeste (82.881t; 6,6%) (Figura 2).

Além de apresentar condições favoráveis e grande diversidade de espécies aquáticas, o Brasil também dispõe de grande potencial de crescimento no mercado, tanto por meio das atividades da pesca como também da aquicultura, gerando negócios, inclusão social, emprego e renda.

Figura 2 – Produção de pescado (t) nacional no período de 2009 – 2010 por região.

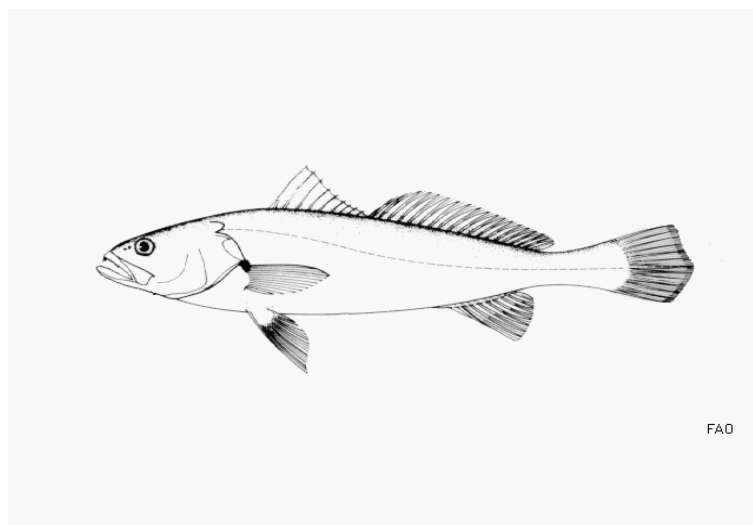


Fonte: MPA, 2012.

## 2.2. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

Pescada é uma designação comum a diversos tipos de peixes teleósteos e, no Brasil, a maioria pertence à ordem perciformes, especialmente os do gênero *Cynoscion*, estes com vinte e quatro espécies pertencentes ao gênero no total. A pescada amarela, *Cynoscion acoupa* (LACEPÉDE, 1801), uma espécie pertencente à família Sciaenidae (Tabela 1), é um importante recurso pesqueiro mundial, que ocorre em águas rasas tropicais e subtropicais da costa atlântica da América do Sul (MOURÃO et al., 2009). No Brasil ocorre em todo o litoral (SZPLIMAN, 2000), sendo a maior espécie do gênero no país (Figura 5). Com ampla faixa de distribuição, também é conhecida pelos nomes de calafetão, cambucu, cupa, guatupura, pescada-cascuda, pescada-de-escama, pescada-dourada, pescada-ticupá, pescada-verdadeira, tacupapirema, ticoá, ticupá e tucupapirema (Figura 3 e 4).

Figura 3. *Cynoscion acoupa* – figura esquemática.



Fonte:

<http://fishbase.sinica.edu.tw/summary/SpeciesSummary.php?genusname=Cynoscion&speciesname=acoupa>

a.

Figura 4. *Cynoscion acoupa*.

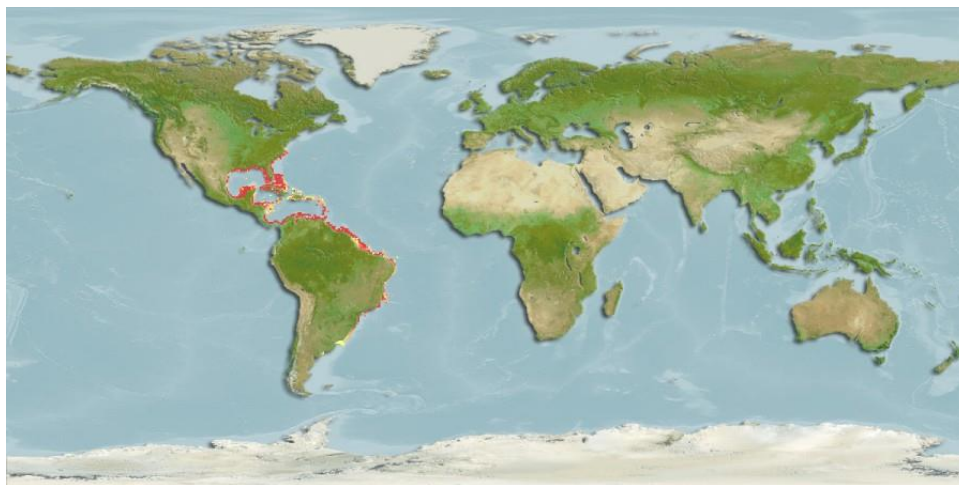


Fonte: <http://www.fishbase.org/summary/speciesSummary.php?ID=1169&AT=Pescada+Amarela>.

Tabela 1 – Sistemática filogenética da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) (LACEPÉDE, 1801).

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| Reino   | Animalia                |
| Filo    | Chordata                |
| Classe  | Actinopterygii          |
| Ordem   | Perciformes             |
| Família | Sciaenidae              |
| Gênero  | <i>Cynoscion</i>        |
| Espécie | <i>Cynoscion acoupa</i> |

Figura 5. Distribuição geográfica de *Cynoscion acoupa* (em vermelho).



Fonte: <http://www.aquamaps.org/receive.php>.

Esta espécie é nectônica (movimenta-se ativamente nas águas dos oceanos), demersal (vive a maior parte do tempo em associação com o substrato) e costeira de águas rasas, comum nas águas salobras dos estuários, lagoas estuarinas, desembocadura dos rios e podem penetrar na água doce. Os espécimes juvenis são restritos às águas salobras e doces. São encontrados em pequenos e grandes cardumes, alimentando-se principalmente de peixes e crustáceos. Reproduz-se na primavera e no verão e as larvas se desenvolvem em águas rasas e de baixa salinidade (MATOS & LUCENA, 2006). Possui em sua maturidade um tamanho médio de 45 a 53 cm, podendo chegar a um comprimento máximo de 130 cm, e peso máximo publicado de 17 kg (FishBase, 2015).

Dos tipos de embarcações utilizadas para a atividade pesqueira, a *Cynoscion acoupa* está presente como uma espécie capturada por meio de canoas motorizadas, barcos de pequeno e médio porte e barcos industriais (SOUZA-JÚNIOR et al. 2012). Embora a importância desse recurso seja facilmente comprovada pelo volume desembarcado e relevância socioeconômica, não existe atualmente legislação específica para a pesca amarela (LOPES et al., 2012).

A pesca amarela é um representante importante da pesca nacional e de grande valor comercial, sendo apreciada também na pesca esportiva. Frequente nos mercados em geral, é

comercializada fresca, congelada ou salgada. Seu valor comercial se deve tanto pela qualidade da carne, como também pela bexiga natatória, denominada de “grude”, com alto valor agregado no mercado europeu e asiático, sendo utilizada para a elaboração de emulsificantes e clarificantes (CERVIGÓN, 1993; WOLFF et al., 2000). Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013), a produção pesqueira extrativa nacional de pescada amarela no ano de 2011 foi de 21.074 t, sendo esta a quarta espécie de peixe mais capturada do país naquele ano.

### **2.3. Resíduos do processamento do pescado como fonte de biomoléculas**

O aumento da produção pesqueira e, conseqüentemente, do volume do pescado processado mundialmente, tem gerado uma grande quantidade de resíduos e subprodutos tanto líquidos (águas residuais) como sólidos (pele, ossos, vísceras, nadadeiras e cabeças) (DOODE, 1996; GILDBERG, 1992). Estes subprodutos são responsáveis por 50-70g/100g de peso total dos peixes (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2005) e, por se tratar de produtos altamente perecíveis, possuem uma necessidade significativa de processamento.

Os resíduos da indústria pesqueira apresentam uma composição rica em compostos orgânicos e inorgânicos (SEIBEL & SOARES, 2003). Atualmente são utilizados como alimentos de baixo valor e como fertilizantes (LI et al., 2013) ou são simplesmente descartados no ambiente sem tratamento prévio, causando poluição ambiental e ocasionando numerosos efeitos negativos sobre ecossistemas marinhos. Quando não descartado *in natura* no meio ambiente, tais resíduos possuem um processamento sanitário bastante oneroso para a indústria pesqueira. Assim, preocupados com problemas ambientais, pesquisadores em todo o mundo () vem desenvolvendo diversos esforços para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos passíveis de utilização.

A agregação de valor e comercialização dos insumos gerados pela indústria durante o processamento de peixes é uma importante estratégia que visa reduzir o ônus econômico e ambiental desta atividade. Além disso, a utilização destes subprodutos permite à indústria uma produção sustentável que pode gerar receitas adicionais ao faturamento da empresa, bem como minimizar os custos do descarte destes materiais (ARVANITOYANNIS e KASSAVETI, 2008) e ainda gerar novos empregos e oportunidades para a população (LIU et al., 2015).

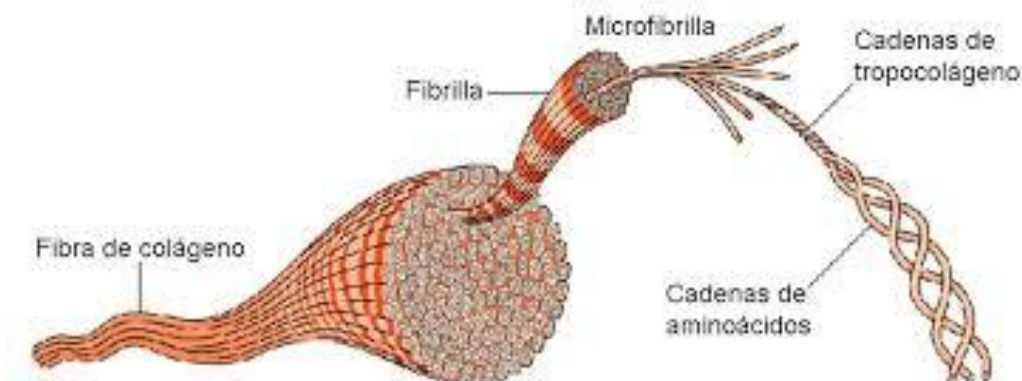
Há uma necessidade crescente por parte do setor industrial, da descoberta de fontes alternativas para a obtenção de biomoléculas como colágeno, enzimas, polissacarídeos; etc. Diversos estudos indicam que os subprodutos do processamento de pescados podem ser utilizados para este fim, uma vez que essas biomoléculas possuem uma ampla aplicabilidade tecnológica e podem agregar valor ao processamento industrial do pescado além de propiciar a criação de novos setores industriais, contribuindo também com a sustentabilidade econômica e ambiental da indústria pesqueira.

Além da utilização na produção de hidrolisado proteico, de farinha e óleo de peixe (AIDOS et al., 2001; ARVANITOYANNIS e KASSAVETI, 2008; KHAN et al., 2003), os resíduos da indústria pesqueira (peixes e camarões) são passíveis de aplicação em diversos segmentos do setor industrial, entre eles: na alimentação animal (ARVANITOUANNIS, 1999; KUMAR, 2000; ESTEBAN et al., 2006); produtos dietéticos (quitosana) (ARVANITOYANNIS et al., 1998; GILDBERG e STENBERG, 2001); pigmentos naturais (SACHINDRA et al., 2006); imobilização de cromo (OZAWA et al., 2003); fertilizante de solo (MORIMURA et al., 2002); embalagens de alimentos (quitosana, gelatina e colágeno) (ARVANITOYANNIS et al., 1998; CARVALHO et al., 2008; GÓMEZ-ESTACA et al., 2009); obtenção de enzimas, principalmente proteases (BEZERRA et al., 2001; 2005; ESPÓSITO et al., 2009a; 2009b; 2010; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012; MARCHUSCHI et al., 2010; SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2007) e na indústria farmacêutica e de cosméticos (colágeno) (BENJAKUL et al., 2010; HEU et al., 2010; HWANG et al., 2007; LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2006).

## **2.4. Colágeno**

O colágeno se destaca com o maior conteúdo proteico entre os componentes do tecido conjuntivo e, assim como as  $\alpha$ -queratinas, evoluiu para garantir resistência (NELSON & COX, 2014). A molécula básica de colágeno é uma fibra constituída de três cadeias alfa entrelaçadas, ligados para a formação da unidade básica chamada tropocolágeno (Figura 6).

Figura 6. Fibra de colágeno.



Fonte: HIDROBEM, 2013.

O termo colágeno é derivado de palavras gregas que significam “produzir cola”. É uma das mais antigas substâncias de origem animal usadas pelo homem, inicialmente, para a produção de cola, sendo sua primeira aplicação industrial reportada na literatura (COELHO et al., 2001). O colágeno é a principal proteína estrutural dos vertebrados, representando cerca de 30% da proteína total nestes organismos (SINTHUSAMRAN et al., 2013). É o principal elemento estrutural de ossos, cartilagens, peles, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos, dentes, córneas e demais órgãos dos vertebrados (SENARATNE et al., 2006).

Atualmente foram identificados pelo menos 29 diferentes tipos de colágeno a partir de uma variedade de tecidos animais, conhecidos de I-XXIX, sendo o tipo I a forma mais comumente encontrada (Figura 7) (LIU et al., 2012). Cada tipo de colágeno difere consideravelmente na sua sequência de aminoácidos (normalmente em torno de 35% de Gly, 21% de Pro e 4-Hyp e 11% de Ala), estrutura molecular e função, em que desempenham um papel na manutenção da estabilidade e integridade estrutural dos tecidos correspondentes e órgãos (LIU et al., 2015).

Figura 7. Principais tipos de colágeno.

| Tipo de Colágeno | Distribuição                              | Célula produtora                                                 | Função principal                                           | Organização molecular          |
|------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Tipo I           | Derme, tendões, ossos, fibrocartilagens   | Fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos, condroblastos         | Resistência a trações                                      | Forma fibrilas                 |
| Tipo II          | Cartilagem hialina, disco intervertebral  | Condroblastos                                                    | Resistência a pressão                                      | Forma fibrilas                 |
| Tipo III         | Músculo liso, tecido conjuntivo reticular | Células musculares lisas, células reticulares, células e Schwann | Manutenção da estrutura de tecidos delicados e expansíveis | Forma fibrilas                 |
| Tipo IV          | Lâminas basais                            | Células endoteliais, epiteliais e de Schwann                     | Suporte de estruturas delicadas, filtração                 | Forma rede tridimensional      |
| Tipo V           | Derme, tendão, osso, fibrocartilagem      | Fibroblastos                                                     | Participam das funções do colágeno do tipo I               | Forma fibrilas                 |
| Tipo VII         | Derme                                     |                                                                  | Une as células ao tecido conjuntivo                        | Colágeno de ancoragem          |
| Tipo IX          | Cartilagem hialina                        | Condroblastos                                                    | Associação lateral das fibrilas                            | Colágeno associado as fibrilas |
| Tipo XI          | Cartilagem hialina, disco intervertebral  | Condroblastos                                                    | Participa das funções do colágeno do tipo II               | Forma fibrilas                 |
| Tipo XII         | Tendão, ligamentos                        | Fibroblastos                                                     | Associação lateral das fibrilas                            | Colágeno associado as fibrilas |

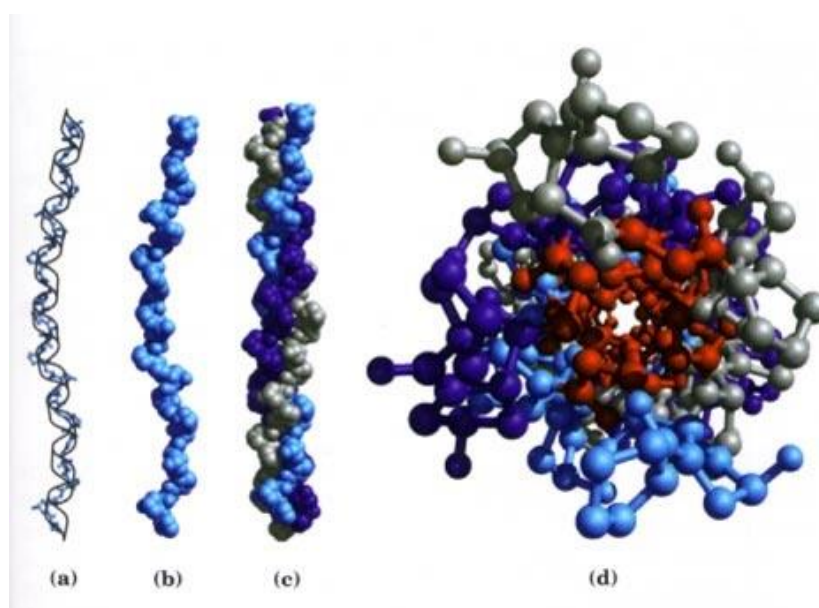
Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/1267564/>.

Colágenos em geral se apresentam na forma helicoidal e entrelaçam-se de modo a formar uma tripla hélice, sendo ancoradas umas nas outras por ligações do tipo pontes de hidrogênio (MONTANHA et al., 2011). A manutenção da estrutura em tripla hélice é garantida devido a estas ligações entre as fibras (grupos  $-NH$  de glicina e grupos carbonila  $C=O$  de resíduos localizados em outra cadeia polipeptídica) ou com moléculas de água.

O colágeno é uma proteína termoinstável que pode ser desnaturada em temperatura ambiente. Esta sensibilidade à temperatura está associada à sua estrutura química (GUDMUNDSSON & HAFSTEINSSON, 1997). A cadeia  $\alpha$  do colágeno tem uma estrutura secundária repetitiva que é única desta proteína. A estrutura tripeptídica que se repete Gly-X-Pro ou Gly-X-4-Hyp adota uma estrutura helicoidal com orientação de sentido dextrogiro (gira para a esquerda), com três resíduos por volta. A sequência repetida para gerar este modelo é a Gly-Pro-4-Hyp. O resíduo de glicina é pré-requisito estrutural para a formação da tripla hélice, enquanto que os resíduos de

prolina e hidroxiprolina permitem a torção acentuada da hélice do colágeno (NELSON & COX, 2014). Esse trio de aminoácidos, ligados e entrelaçados uns nos outros, formam uma estrutura semelhante a uma trança, dando origem a uma cadeia extremamente resistente e estável (Figuras 8a e 8b) (SIONKOWSKA, 2006). Além disso, a influência na estabilização da molécula de colágeno é também devido a pequenas interações, tais como: Van der Waals, hidrofóbicas e eletrostática.

Figura 8. Estrutura do colágeno.



Fonte: NELSON & COX, 2014 – PDB ID 1CGD.

O colágeno também é uma espiral enrolada, mas com estruturas terciárias e quaternárias distintas: três polipeptídeos separados, chamados de cadeias  $\alpha$ , são supertorcidos uns sobre os outros (Figura 8c). A glicina, por seu tamanho pequeno, é necessária para uma junção firme na região onde as três cadeias estão em contato (Figura 8d – glicina ilustrada em vermelho), mantendo o centro da esfera firmemente compacto. A torção super-helicoidal no colágeno tem sentido horário, oposto ao da hélice anti-horária das cadeias  $\alpha$  (NELSON & COX, 2014).

## 2.5. Fontes de colágeno

As mais abundantes fontes de colágeno são mamíferos, especialmente bovinos e suínos, sendo a pele e os ossos os subprodutos mais disponíveis para extração destas proteínas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). A pele de animais contém 30% a 35% de proteínas e destas 90% a 95% são representadas pela fração de colágeno (COELHO et al., 1998). Enquanto isso, os ossos são uma grande fonte de colágeno, porém sua composição varia consideravelmente de acordo com a espécie e o tipo de osso. Por suas características e propriedades, o colágeno contido nos subprodutos de animais como aves, bovinos e suínos tem sido amplamente utilizados em processos industriais. Entretanto, devido ao risco de transferência de doenças, tais como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), encefalopatia espongiforme transmissível (TSE) e a febre aftosa (FMD), existe a necessidade da obtenção desta proteína através de fontes alternativas e mais seguras (ZHANG et al., 2007). Além disso, devido às barreiras religiosas e questões relacionadas ao próprio consumidor, a utilização de produtos de origem bovina ou suína pode ser proibida em algumas regiões ou por grupos religiosos, como é o caso dos muçulmanos, hindus e judeus, assim como os vegetarianos (AHMAD & BENJAKUL, 2010).

Organismos aquáticos, como os peixes, merecem destaque principalmente devido a sua grande disponibilidade, ausência de risco de transmissão de doenças, toxicidade ou de barreiras religiosas, além do bom rendimento no processo de extração (SENARATNE et al., 2006). Peles, ossos, nadadeiras e escamas são tecidos formados principalmente por colágeno e não há associação destas proteínas a tais doenças. Sendo assim, vários pesquisadores de todo o mundo têm realizado continuamente estudos envolvendo extração de colágeno provenientes de espécies aquáticas. Estudos já realizados apresentam rendimentos de extração de colágeno que variam entre 0,9% (NAGAI et al., 2008) e 92,2% (WANG et al., 2007). Porém, o rendimento desta extração e as propriedades do colágeno variam de acordo com diversos fatores, como o habitat do animal, da espécie utilizada, da sua idade, da parte do peixe e dos parâmetros de extração (temperatura, tempo, pH, etc.), sendo de grande importância a caracterização da proteína presente a partir das diferentes fontes (FALGUNI et al., 2010).

Extrações bem sucedidas a partir de pele, ossos e escamas de peixes e outros organismos aquáticos marinhos tem sido reportadas pela literatura ao longo dos últimos anos: medusas

gigantes (*Stomolophus nomural*) (KIMURA et al., 1983); estrelas-do-mar (*Asterias amurensis*) (KIMURA et al., 1993); Pargo japonês (*Pagrus major*) (IKOMA et al., 2003); Perca do nilo (*Lates niloticus*) (MUYONGA et al., 2004); Arraia (*Raja kenoei*) (HWANG et al., 2007); Albacora (*Thunnus albacares*) (WOO et al., 2008); Peixe gato (*Mystus macropterus*) (ZHANG et al., 2009); Lula (*Sepia pharaonis*) (AEWSIRI et al., 2009); Peixe porco (*Aluterus monóceros*) (Ahmad et al., 2010); *Priacanthus tayenus* e *Priacanthus macracanthus* (BENJAKUL et al., 2010); Tubarão (*Pangasianodon hypophthalmus*) (SINGH et al., 2011); Peixe vermelho do alto mar (*Sebastes mentella*) (WANG et al., 2011); Carpa cabeçuda (*Hypophthalmichthys nobilis*) (LIU et al., 2012); Salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) (MORENO et al., 2012); Escamudo do Alasca (*Theragra chalcogramma*) (YAN et al., 2012); Carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) (SAFANDOWSKA et al., 2013); Enguia (*Evenchelys macrura*) (VEERURAJ et al., 2013); Moluscos (*Doryteuthis singhalensis*) (VEERURAJ et al., 2014); Perca gigante (*Lates calcarifer*) (Chuaychan et al., 2015); Carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (Liu et al., 2015); Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Chen et al., 2016).

## 2.6. Colágeno e suas aplicações biotecnológicas

Por se tratar de um importante biomaterial, o colágeno tem uma utilização industrial variada, que se deve às suas propriedades incluindo biodegradabilidade, baixa antigenicidade e propriedade direta de adesão celular, além de suas propriedades gelificantes, emulsificantes, espumantes e microencapsulantes. Por suas características, o colágeno é utilizado em alimentos, materiais biomédicos, produtos farmacêuticos e na indústria de cosméticos (SINTHUSAMRAN et al., 2013), além da indústria de couro e médica (HWANG et al., 2007). A qualidade e aplicação específica do colágeno extraído está diretamente relacionada com suas propriedades funcionais e grau de pureza (RUSTAD, 2003).

Na indústria de alimentos, o colágeno é amplamente utilizado como ingrediente funcional de vários produtos como doces, bebidas, em produtos com baixo teor de gordura, laticínios em geral, produtos de panificação e derivados de carne (KARIM & BHAT, 2009). O consumo de 3g de gelatina e 7h de colágeno hidrolisado, totalizando 10g por dia, tem ação preventiva contra doenças como a osteoartrose, osteoporose e osteoartrite (SOUZA et al., 2004).

A gelatina, derivado do colágeno e produto obtido a partir de sua hidrólise parcial, é um produto amplamente utilizado em diversos produtos comerciais, como por exemplo, gelatina comercial e fotográfica (SENARATNE et al., 2006), além da fabricação de biofilmes, cápsulas e revestimento de comprimidos (OLIVEIRA et al., 2006). No Brasil, a produção de proteína de origem animal, como a gelatina, é feita em larga escala e a preços relativamente baixos, o que possibilita seu emprego na indústria e também viabiliza sua aplicação em diversas áreas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

Santos et al. (2004), partindo da combinação de colágeno de origem bovina e de glicerol, produziram filmes flexíveis para o recobrimento de frutos e vegetais, aumentando o tempo de prateleira desses alimentos, além de suas condições de transporte, armazenamento e comercialização.

O colágeno também é utilizado na área médica, como por exemplo em cirurgias do trato urinário, como substituto parcial ou total de tecidos e órgãos lesados. Isto se dá pela baixa resposta imunológica, baixa antigenicidade e citotoxicidade do material (CHAPE & HAREY, 1997).

A proteína endostatina, derivada do colágeno do tipo IV (proteína da matriz extracelular), possui uma função importante que é a de induzir células endoteliais a apoptose (morte programada das células). Por isso, tal substância vem sendo utilizada em pacientes com câncer, em uma tentativa promissora de impedir ou retardar a disseminação de células neoplásicas (BELIZÁRIO, 2002).

Colágenos extraídos de bexiga natatória de peixes tropicais vem sendo utilizados por várias centenas de anos como clarificadores de bebidas alcoólicas. A proteína é utilizada na indústria como um pó fino, pasta ou um líquido altamente viscoso, sendo adicionado à bebida para agregar leveduras e outras partículas insolúveis, ocorrendo a sua sedimentação no fundo do recipiente ou removidos por filtração (HICKMAN et al, 2000). Na China, a bexiga natatória é utilizada diretamente como alimento, enquanto que na Alemanha e Estados Unidos é matéria-prima para a produção de cola com alto desempenho (COUTINHO, 2002).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Extrair e caracterizar colágeno pepsino solúvel (PSC) a partir de escamas do peixe pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Extrair colágeno a partir das escamas de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*);
- Determinar o rendimento da extração do colágeno;
- Identificar o tipo de colágeno isolado, caracterizando-o por seu perfil bioquímico, através de SDS-PAGE;
- Encontrar a melhor solubilidade relativa do colágeno obtido, frente a variações de pH e concentrações de NaCl, propondo uma nova metodologia para o teste de solubilidade ao pH;
- Determinar a temperatura máxima de transição através de DSC;
- Caracterizar fisicamente o colágeno isolado, através de espectroscopia na região do infravermelho.

#### 4. CONCLUSÕES

Colágeno pepsino solúvel (PSC) foi extraído com sucesso a partir de escamas de pescada amarela. A extração com pepsina se mostrou essencial, devido ao rendimento obtido e ao grau de preservação da estrutura, provando que causou pequenas mudanças no colágeno. Baseado nos padrões de SDS-PAGE e no espectro de absorção em UV, pode ser sugerido que o material extraído neste trabalho é colágeno do tipo I, mais importante comercialmente. O PSC mostrou uma maior solubilidade na faixa ácida de pH e diminuição da sua solubilidade na presença de NaCl em concentrações superiores a 2%. O colágeno apresentou temperatura máxima de transição próxima à encontrado para mamíferos, sendo interessante para várias aplicações, como a produção de gelatina. Portanto, os resultados mostram que escamas de pescada amarela (*C. acoupa*) podem ser uma promissora fonte alternativa ao colágeno comercial para diversas aplicações biotecnológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AEWSIRI, T., BENJAKUL, S., & VISESSANGUAN, W. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, 115 (1), 243-249, 2009.

AHMAD, M. & BENJAKUL, S. Extraction and characterization of pepsin solubilized collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 817-824, 2010.

AIDOS, et al. Upgrading of maatjes herring byproducts: production of crude fish oil. **Food Chem**, v. 49, p. 3697–3704, 2001.

ARVANITOYANNIS, et al. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 371–382, 1998.

ARVANITOYANNIS, I.S. Totally and partially biodegradable polymer blends based on natural and synthetic macromolecules: preparation, physical properties, and potential ad food packaging materials. **JMS Rev Macromol Chem Phys**, v. 39(2), p. 205-271, 1999.

ARVANITOYANNIS, I.S.; KASSAVETI, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 726-745, 2008.

BENJAKUL, et al. Extraction and characterization of pepsin solubilized collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90, 132-138, 2010.

BEZERRA, et al. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25(3), p. 199-210, 2001.

BEZERRA, et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1829-1834, 2005.

CARVALHO, et al. Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1117-1123, 2008.

CERVIGÓN, F. Los peces marinhos de Venezuela. Vol. II, 2ª ed. Venezuela: Editora ExLibris, p. 497, 1993.

CHEN, J.; LI, L.; YI, R.; XU, N.; GAO, R.; HONG, B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Science and Technology**, v. 66, p. 453-459, 2016.

CHUAYCHAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Science and Technology**, v. 63, p. 71-76, 2015.

COELHO, H. S.; MORANDINI, L. M. B.; ROSA, C. S.; SANTANA, A. M.; TERRA, N. N.; KUBOTA, E. H. Obtenção do couro suíno cozido para adição em embutidos cárneos. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais v. 2, 1998.

COELHO, H. S.; MORANDINI, L. M. B.; SANTANA, A. M.; TERRA, N. N. Características físico-químicas do salame tipo italiano contendo couro suíno cozido. **Revista Nacional da Carne**. v. 278. Ano XXIV, 2001.

DOODE, M.S. Los Claro-oscuros de la Pesquería de la Sardina em Sonora: Contradicciones y Alternativas para un Desarrollo Equilibrado. Tese de Doutorado. El Colegio de Michoacán. Zamora, Michoacán, p. 120-136, 1996.

ESPÓSITO, et al. Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*Cyprinus carpio* L.) processing waste. **Journal of Food Biochemistry**, v.33, p. 821–834, 2009a.

ESPÓSITO, et al. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry**, v. 112, p.125–130, 2009b.

ESPÓSITO, et al. Trypsin from the processing waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and its compatibility with oxidants, surfactants and commercial detergents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6433-6439, 2010.

ESTEBAN, et al. Evaluation of fruit–vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. **Waste Management**, v. 27, p. 193–200, 2006.

FALGUNI, P.; BASUDAM, A.; SANTANU, D. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3737-3742, 2010.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome, p. 223, 2014.

FIGUEIRÓ, S.D. Filmes de galactomanana-colágeno: caracterização física química e uso na detecção de lectinas. Fortaleza: UFC. Tese (Doutorado). 2002.

FISH BASE. Cynoscion acoupa (Lacepède, 1801) – Acoupa weakfish. Disponível em: <http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=1169&AT=pescada+amarela>. Acesso em: 10 de set. 2015.

FREITAS-JÚNIOR, et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1596-1602, 2012.

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

- GILDBERG, A. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 271-276, 1992.
- GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 809-812, 2001.
- GÓMEZ-ESTACA, et al. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 18, p. 46-52, 2009.
- GOMEZ-GUILLEN, et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 25-34, 2002.
- GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON, H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37-39, 1997.
- HEU, et al. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 19, p. 27-33, 2010.
- HICKMAN, et al. Isinglass/Collagen: Denaturation and functionality. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 245-257, 2000.
- HIDROBEM. Disponível em: <<http://www.hidrobem.com.br/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2016.
- HWANG, et al. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoi*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 921–925, 2007.
- IKOMA, et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, p. 199-204, 2003.
- KARIM, A.A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatines. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 563-576, 2009.
- KATO, et al. Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 37, p. 863 – 870, 2004.
- KHAN, M.A., et al. Effect of enzymatic fish protein hydrolysate from fish scrap on the state of water and denaturation of lizard fish (*Saurida wanieso*) myofibrils during dehydration. **Food Science and Technology Research**, v. 9(3), p. 257-263, 2003.
- KIMURA, S.; MIURA, S.; PARK, Y.H. Collagen as the major edible component of jellyfish (*Stomolophus nomural*). **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1758-1760, 1983.
- KIMURA, et al. Molecular characterization of fibrillar collagen from the body wall of starfish *Asterias amurensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 104B, p. 663-668, 1993.

KITTIPHATTANABAWON, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bones of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89(3), p. 363-372, 2005.

LANARI, D.; FRANCI, C. Biogas production from solid wastes removed from fish farm effluents. **Aquatic Living Resources**, v. 11, p. 289–295, 1998.

LI, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bones of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonicus*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 103-113, 2013.

LIU, et al. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, 133, 1441-1448, 2012.

LIU, et al. Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Bioscience**, v. 9, p. 68-74, 2015.

LOPES, et al. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71(4), p. 677–684, 2012.

MANTOS, I.P. e LUCENA, F. Descrição da pesca da pescada amarela *Cynoscion acoupa* da costa do Pará. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 39, pag. 66-73, 2006.

MARCUSCHI, et al. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 667-673, 2010.

MCCORMICK, R. J. Collagen. In *Applied muscle biology and meat science* (p. 127-146). Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**: Brasil 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura, p. 27, 2011.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Balanço da Pesca e Aquicultura**: Brasil 2013. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. Em: <http://www.mpa.gov.br/pesca>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2016.

MONTANHA, et al. Caracterização de Microesferas de Colágeno e Fibroína como suporte para as células tronco. XVIII Congreso Argentino de Bioingeniería SABI 2011 - VII Jornadas de Ingeniería Clínica Mar del Plata, 28 al 30 de septiembre de 2011.

MORENO, et al. Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture. **Food Chemistry**, v. 134, p. 678-685, 2012.

MORIMURA, et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1403–1412, 2002.

MOURÃO, et al. Sistema de produção pesqueira pescada amarela – Cynoscion acoupa Lacèpede (1802): um estudo de caso no litoral nordeste do Pará – Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35(3), p. 497–511, 2009.

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**, 85 (1), 81-89, 2004.

NAGAI, T.; SUZUKI, N.; NAGASHIMA, T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. **Food Chemistry**, v. 111, p. 296-301, 2008.

NELSON & COX, 2014. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre, Ed. Artmed, 6ª edição, 2014.

OLIVEIRA, et al. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3(1), p. 29-35, 2006.

OZAWA, et al. Removal of aqueous chromium by fish bone waste originated hydroxyapatite. **Journal of Materials Science Letters**, v. 22, p. 513–514, 2003.

RUSTAD, T. Utilization of marine by-products. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 2 (4), 2003.

SACHINDRA, et al. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**, v. 26, p. 1092-1098, 2006.

SAFANDOWSKA, M.; PIETRUCHA, K. Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 32-37, 2013.

SANTOS, et al. Estudos do efeito do glicerol nas propriedades físico-químicas de filmes de colágeno-galactomanana. Fortaleza: UFC. (Monografia de Graduação do Curso de Bacharel em Química Industrial). 2004.

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

SENARATNE, L. S.; PARK, P. & KIM, S. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, 97, 191-197, 2006.

SILVA, et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food Chemistry**, v. 129, p. 777-782, 2011.

- SINGH, et al. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v. 124 (1), p. 97-105, 2011.
- SINTHUSAMRAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Chemistry**, v. 138, p. 2435-2441, 2013.
- SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly (ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 2, p. 305-312, 2006.
- SOUZA, et al. Desenvolvimento e análise sensorial de uma sobremesa à base de colágeno hidrolisado e soja. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais, Recife – PE, 2004.
- SOUZA, et al. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1429-1434, 2007.
- SOUZA-JÚNIOR, et al. A cadeia produtiva do pescado na microrregião do Salgado-PA e sua participação no índice de desenvolvimento humano local. In: Simpósio de excelência em gestão e tecnologia – IX SEGeT, 2012, Resende, RJ. Disponível em: <http://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos12/3761671.pdf>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2016.
- SZPILMAN, M. Peixes marinhos do Brasil: Guia prático de identificação. Rio de Janeiro. **Mauad**, p. 288, 2000.
- TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, p. 943-948, 2002.
- VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M. & BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization thermostable collagen from eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48(10), p. 1592-1602, 2013.
- VEERURAJ, et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, 2014.
- WANG, et al. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). **Journal of Food Science**, v. 72, p. E450-E455, 2007.
- WANG, et al. Chromatographic separation and physicochemical properties of collagen species in the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1134-1138, 2011.
- WOLFF, et al. A Trophic flow model of the Caeté mangrove estuary (north Brazil) with considerations for the sustainable use of its resources. **Estuarine, costal and shelf science**. London, v. 50, p. 789-803, 2000.
- WOO, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 879-887, 2008.

WU, R.S.S. The environmental impact of marine fish culture: towards a sustainable future. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 159-166, 1995.

YAN, et al. Effect of concentration, pH and ionic strength on the kinetic self-assembly of acid-soluble collagen from walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) skin. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 199-204, 2012.

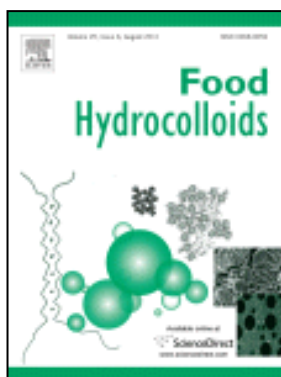
ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, p. 23-28, 2006.

ZHANG, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, 103, 906-912, 2007.

ZHANG, M.; LIU, W.; LI, G. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). **Food Chemistry**, v. 115, p. 826-831, 2009.

## APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

**Characterization of collagen extracted from scales of acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*).**



**A ser submetido no periódico FOOD HYDROCOLLOIDS  
(ISSN: 0268-005X)**

**Characterization of collagen extracted from scales of acoupa weakfish**  
**(*Cynoscion acoupa*)**

Flávia Thuane Duarte do Monte<sup>a</sup>; Helane Maria Silva da Costa<sup>a</sup>, Robson Coelho de Araújo Neri<sup>a</sup>;  
Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior<sup>b</sup>; Klauss Engelmann<sup>c</sup>; Iolanda Mídea Cuccovia<sup>d</sup>;  
Katia Regina Perez<sup>c</sup>; Luiz Bezerra de Carvalho Júnior and Ranilson de Souza Bezerra<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup> Campos Universitário Prof<sup>a</sup> Cinobelina Elvas, Universidade Federal do Piauí, Brazil.

<sup>c</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, Brazil.

<sup>d</sup> Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, Brazil.

Author for correspondence:

Ranilson Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-910, Recife, PE, Brazil.

Telephone: +55 81 21268540

E-mail: ransoub@uol.com.br

## Abstract

Collagen is the major structural protein of vertebrates, the main structural element of bone, cartilage, skin, tendons, ligaments, blood vessels, teeth, corneal and other organ of vertebrates. The skin and bones of bovines and pigs usually are the main sources of collagen. However, due to the risk of transfer of diseases, there is a need for obtaining this protein from other sources. The acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*) is an important representative of the fishing and has great commercial value. The aim of this study was use acoupa weakfish waste processing for obtain collagen and suggest its use as an alternative source mammal collagen. Pepsin soluble collagen (PSC) from scales of acoupa weakfish was isolated and characterized. The yield of PSC was 8.3% (based on dry weight). SDS-PAGE (7.5%) pattern showed that both PSC consisted of one  $\alpha 1$  and one  $\alpha 2$  chains in proportion 2:1, as well as  $\beta$  and  $\gamma$  chains, and were characterized to be type I collagen. The PSC ultraviolet (UV) absorption spectrum showed a maximum absorption at 222 nm. The PSC was soluble at pH between 1 and 4, with maximum solubility at pH 1. He have also shown solubility majority at NaCl concentration from 0 to 2% (w/v). The maximum transition temperature ( $T_{max}$ ) for PSC was 30.4°C, as determined by differential scanning calorimetry (DSC). The results obtained in this study indicate the possibility of using acoupa weakfish scales as a source of type I collagen with great potential for biotechnological application.

**Keywords:** Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*). Bioactive molecules. Fish collagen. Fishery processing waste.

## 1. Introduction

Collagen is the major structural protein in the connective tissue of vertebrates and constitutes about 30% of the total animal protein (Chuaychan et al., 2015). It is present in bone, cartilage, skin, tendons, ligaments, blood vessels, teeth, cornea and other organs of vertebrates (Senaratne et al., 2006). There are at least 29 types of collagen variants, known as I-XXIX and different types possess varying molecular properties (Liu et al., 2010; Shoulders & Raines, 2009). Type I collagen is a fibrous collagen and has been found as the most common in fish and mammal. It is found in skin, bone, scale and fins of various fish species, and it is also the main component of the extracellular matrix, has the function to confer mechanical strength to the tissues and organs and to assist in regulation cell medium (Ikoma et al., 2003; Muyonga et al., 2004).

This fibrous protein is an important biomaterial and its industrial use is due to its properties, including biodegradability and low antigenicity. For its peculiar characteristics, it is used in food, biomedical materials, pharmaceuticals, and cosmetics industries (Sinthusamran et al., 2013). Bovine and pig skin and bones are usually the main commercial sources of collagen. However, due to the risk of diseases such as Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) and Foot Mouth Disease (FMD), there is a need for obtaining this protein from other sources. Therefore, there is great demand in the search for new and safer alternative sources for obtaining this compound (Zhang et al., 2007).

Among several alternative sources, fish has been referred to as a very promising source of collagen and gelatin mainly because of its wide availability, low risk of disease transmission, no religious barriers, high yield in the extraction process and lack of toxicity (Senaratne et al., 2006). Fish are consumed daily in large quantities and during its processing, a large amount of by-products are produced, including scales, skin, and bones. Its byproducts can be used as an alternative source for collagen traditionally harvested from land mammals (Chen et al., 2016).

The acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*) is an important representative of fishing. According to the Brazilian fishery and aquaculture ministry (MPA, 2013), the national production of acoupa weakfish in 2011 was 21,074.2 t, which is the fourth most species of fish caught that year. Therefore, the extraction of collagen from the scales from acoupa weakfish

would not only improve the added value of these fish products, but also reduce environmental pollution (Chen et al., 2016).

The aim of this study was to use acoupa weakfish waste processing for obtain collagen and suggest its use as an alternative source for mammal collagen.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Collecting and obtaining the scales**

The adult acoupa weakfish scales were obtained from the local industry processing fishery products Noronha Pescados LTDA (Recife/PE, Brazil) and transported to Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Universidade Federal de Pernambuco (Recife/PE, Brazil) which was performed its grind. The obtained scales were washed in cold distilled water and stored at -20°C until use.

### **2.2. Preparation of pepsin soluble collagen from scales**

The collagen was prepared according Nagai and Suzuki (2008), with few modifications. For removal of soluble protein, NaOH 0.1M at a proportion of 1:10 (w/v) was added to the mashed scales with constant homogenization for 6h at 4°C, to remove non-collagenous proteins, washed fully with cold distilled water. The fish scales were decalcified with EDTA-2Na 0.5M pH 7.5 at a proportion of 1:10 (w/v) for 24h at 4°C, then washed with cold distilled water. Then, the residue was homogenized in a solution containing swine commercial pepsin 1% (w/w) (EC 3.4.23.1, Sigma-Aldric, MO) in 0.5M acetic acid for 24h at 4°C. Precipitation of the collagen was performed by differential saline separation, by successive addition of NaCl 0.9M and 2.6M in Tris-HCl 1.5M pH 8.8, followed by centrifugation at 20.000g for 1h. The solution obtained was dialyzed against 0.1M acetic acid and, subsequently, was dialyzed against distilled water until a neutral pH was obtained. The dialyzed sample was freeze-dried and referred to as pepsin soluble collagen (PSC). The yield of PSC was calculated as:  $\text{Yield (\%)} = (M/M_0) \times 100$ , where M is the weight of lyophilized collagen (g), and  $M_0$  is the weight of drought scale used (g).

### 2.3. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)

SDS–PAGE was carried out according to the Laemmli (1970), using a 4% (w/v) stacking gel and a 7.5% (w/v) separating gel. The sample of PSC (25 µg of protein) was mixed with 5% (w/v) SDS and heated in a bath (IKA® Works Inc., China) at 85°C for 1 h and were loaded on to the polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis at a constant current of 15 mA/gel, using a vertical electrophoresis system (Vertical Electrophoresis System Bio-Rad 143 Laboratories, Inc.). After electrophoresis, the gel was stained with 0.05% (w/v) Coomassie Blue R- 250 in 15% (v/v) methanol and 5% (v/v) acetic acid for 10 min and destained with the mixture of 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid for 12 h. Type I collagen from calf skin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was also prepared following similar procedure and 10 µl were loaded as standard collagen. High-molecular-weight protein markers (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) were used to estimate the molecular weight of proteins.

### 2.4. UV absorption spectrum

UV absorption spectra of PSC from acoupa weakfish scales was carried out according to Zeng et al. (2012), using a GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE, USA). The collagen sample (1mg/mL) was dissolved in 0.5M acetic acid solution and then placed into a quartz cell with a path length of 1 mm. UV spectra were measured at wavelength from 200 to 280 nm.

### 2.5. Effect of pH on solubility

The collagen samples (3mg/mL, final concentration) were dissolved in distilled water with pH adjusted from 1.0 to 12.0 with HCl or NaOH 6M and stirred at 4°C for 24h. The protein concentration was measured by Smith method (1985). Relative solubility was calculated in comparison with that obtained at the pH rendering highest solubility.

### 2.6. Effect of NaCl on solubility

The effect of NaCl on solubility of the collagen sample was determined by the method of Montero, Jiménez-Colmenero and Borderias (1991), with a slight modification. The sample was dissolved in 0.5M acetic acid to obtain a final concentration of 6 mg/ml and stirred at 4°C. The solubility of collagen samples at different NaCl concentrations was performed using 500µL of collagen solution and 500µL of NaCl in 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% and 6% (w/v) concentrations

in distilled water (3 mg/mL final concentration). The mixture was stirred for 30 min at 4 °C. The protein concentration was measured by Smith method (1985) and relative solubility was calculated in comparison with that obtained at the NaCl rendering highest solubility.

## 2.7. Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermal stability of collagen from acoupa weakfish scales was determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC). Thermal transitions were monitored by heating using a Microcal VP-DSC micro-calorimeter (Northampton, MA, USA). Thermal transitions were by heating the sample from 5 to 100° C. A scan rate of 10 °C/h was used. The resulting thermograms were analyzed by the ORIGIN DSC software that was provided by Microcal Inc. (Northampton, USA).

## 2.8. Infra-red spectroscopy

FTIR spectroscopy of samples was analyzed according to the protocol of Singh et al. (2011) with a few modifications. Collagen sample was subjected to FTIR analysis using a horizontal ATR Trough plate crystal cell (PIKE technology Inc., Madison, WI, U.S.) equipped with a Bruker Model VERTEX 70 FTIR spectrometer (Bruker Co., Ettlingen, Germany). Analysis of spectral data was carried out using the OPUS 6.5 data collection software program (Bruker Co., Ettlingen, Germany). It was used a bovine type I collagen (SIGMA) as standard and the symbology for vibrations and rotations used are:  $\nu$  (stretch),  $\delta$  (angular deformation),  $\gamma$  (asymmetric) and some relevant points are reported.

## 2.9. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and all values are presented as mean  $\pm$  standard deviations. These data were statistically analyzed by ANOVA, followed by a post-hoc (Tukey–Kramer) test, when indicated. Differences between groups were accepted as significant at the 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Yield of PSC from the scales of *acoupa* weakfish

PSC was isolated from the scales of *acoupa* weakfish with yield of 8.3% (dry weight) (Table 1). The yield obtained indicates that *C. acoupa* scales are a promising source of collagen, compared to the yields reported in the literature (Table 1).

The scales were not completely solubilized by 0.5M acetic acid, therefore, pepsin-solubilized collagen was readily solubilized. This result was in agreement with Jongjareonrak et al. (2005a) who reported the incomplete solubilization of bigeye snapper skin in 0.5 M acetic acid. That fact can be due to possibility of the collagen molecules are linked through crossed covalent bonds, causing a decrease in solubility of the protein in acetic acid (Zhang et al., 2007). When submitting the scales to the pepsin action, the material obtained is a result of cleavage of the telopeptide regions and crossed covalent bonds (Foegeding et al., 1996).

These variations in yields are related both to different biological conditions which each species is subject, as well as the specie utilized and methods of extraction (Regenstein & Zhou, 2007; McCormick, 2009). It is also worth pointing out that these structural differences in collagen as directly related to the performance of the extraction, because if the molecules in telopeptide region are highly cross-linked the collagen solubility in acid tends to decrease (Foegeding et al., 1996). The difference in efficacy of pepsin in extracting collagen might be influenced by fish species, age, collagen composition and configuration or amount of pepsin used (Matmaroh et al., 2011).

#### 3.2. SDS-PAGE of collagen

The pepsin soluble collagen obtained from scales of *C. acoupa* was analyzed by SDS-PAGE, using a 7.5% gel (Figure 1). The subunit pattern of collagen from *acoupa* weakfish shows a similar distribution of the bands observed in commercial collagen. The PSC of *C. acoupa* is composed of two different  $\alpha$  chains ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ) in ratio of 2:1, collagen type I characteristics, and their dimers ( $\beta$  chains) and trimmers ( $\gamma$  chains). The results were in agreement with the previous report for Kimura et al. (1991).

Similar electrophoretic patterns of type I collagen were found for *Archosargus probatocephalus* (Ogawa et al., 2004), *Mystus macropterus* (Zang et al., 2009), *Aluterus*

*monoceros* (Ahmad & Benjakul, 2010), *Chiloscyllium punctatum* (Kittiphattanabawon et al., 2010), *Platydoras armatulus* (Singh et al., 2011), *Diodon holocanthus* (Huang et al., 2011), *Nemipterus hexodon* (Nalinanon et al., 2011), *Parupeneus heptacanthus* (Matmaroh et al., 2011), *Rachycentron canadum* (Zeng et al., 2012), *Evenchelys macrura* (Veeruraj et al., 2013), *Lates calcarifer* (Sinthusamran et al., 2013), *Acipenser schrenckii* (Wang et al., 2014), *Mylopharyngodon piceus* (Wu et al., 2014), *Thunnus albacares* (Kaewdang et al., 2014), *Sciaenops ocellatus* (Chen et al., 2016).

### 3.3. UV spectra

PSC isolated from *C. acoupa* scales showed a maximum absorption 222 nm (Figure 2). Most proteins have a maximum ultraviolet absorption at 280 nm. However, there are no studies in the literature report collagen with near maximum absorption at this wavelength. Furthermore, due to the characteristics of collagen, in this experiment can verify the presence of contaminants protein (Liu and Liu, 2006). Based on this information it may be suggested that collagenous material extracted in this work is type I collagen and has no large amount of contaminating proteins in collagen solubilized.

Similar results were found for *Teragra chalcogramma* (Yan et al., 2008), *Oreochromis niloticus* (Zeng et al., 2009), *Rachycentron canadum* (Zeng et al., 2012), *Evenchelys macruca* (Veeruraj et al., 2013), *Mylopharyngodon piceus* (Wu et al., 2014) and *Doryteuthis singhalensis* (Veeruraj et al., 2014).

### 3.4. Effect of pH on solubility

The effect of pH on the PSC solubility from *C. acoupa* scales is shown in Figure 3. It was observed that sample showed higher solubility in acid pH range. The solubility of PSC reached maximum at pH 1.0 and the sample has lost more than 70% solubility at pH 5.0. The marked decreases in solubility were observed in the neutral and alkaline pH ranges, with a minimum solubility at pH 7.0, quite common for collagens in general.

It is know that when the pH of the collagen solution reaches a value equal or close to the isoelectric point (pI), the net charge residues of protein molecules are greater and the solubility is increased by the repulsion forces between chains. Foegeding et al. (1996) reported that the pI of type I collagen ranges between pH 6.0 and 9.0. At this point, the total net charges of protein

molecules are zero and hydrophobic-hydrophobic interaction increases, thereby leading to the precipitation and aggregation of protein (Singh et al., 2011). Thus the lowest solubility of PSC from *C. acoupa* scales observed at pH around 7 was in agreement with the literature.

Similar profiles to collagens extracted from other fish have been found in the literature, as were reported for PSC of *Aluterus monoceros* (Ahmad & Benjakul, 2010), *Lutjanus vitta* (Jongjareonrak et al., 2005b), *Oreochromis niloticus* (Zeng et al., 2009), *Diodon holocanthus* (Huang et al., 2011), *Rachycentron canadum* (Zeng et al., 2012) and marine fishes from Japan and Vietnam (Thuy et al., 2014).

### 3.5. Effect of NaCl on solubility

The effect of NaCl on the PSC solubility is shown in Figure 4. The PSC remained more than 90% solubility on the NaCl concentration 0 to 2%, losing almost 70% of its solubility in the salt concentration 3% in the solution. The decrease in solubility of collagens can be due to a “salting out” effect, which occurred at relatively high NaCl concentrations (Jongjareonrak et al., 2005a). According to the report of Damodaran (1996), an increase in ionic strength causes a reduction in protein solubility by an enhanced hydrophobic–hydrophobic interaction between protein chains and the competition for water of ionic salts, leading to the induced protein precipitation. This solubility behavior of collagens with changes in pH and NaCl concentrations may play a crucial role in their extraction and the choice of your application (Montero et al., 1991).

The solubility of PSC from the skin of *Aluterus monoceros* had drastic decrease at NaCl concentration higher than 2% (Ahmad & Benjakul, 2010). Expressive decrease in ASC and PSC solubility was observed with 3% NaCl or above for collagen extracted from the skin of *Evenchelys macrura* (Veeruraj et al., 2013) and the skin of *Rachycentron canadum* (Zeng et al., 2012).

### 3.6. Thermal denaturation of collagen

The maximum transition temperature ( $T_{max}$ ) of PSC from *C. acoupa* scales is shown in Figure 5. Denaturation temperature is an important index for evaluating the thermal stability of collagen. When the raw material was subjected to the limited digestion by pepsin, the triple helical structure was still predominant in the PSC (Jongjareonrak et al., 2005b). The  $T_{max}$  value of

PSC from *C. acoupa* scales (30.4°C) were lower than that of *Parupeneus heptacanthus* (41.58°C–41.01°C) (Matmaroh et al., 2011), *Nemipterus hexodon* (33.35°C) (Nalinanon et al., 2011), of the five tissues of *Hypophthalmichthys nobilis* (35.2°C–37.3°C) (Liu et al., 2012), *Lates calcarifer* (33.33°C) (Sinthusamran et al., 2013), but higher than those of collagens from *Siganus luridus* (28.7°C) (Bae et al., 2008), *Pleurogrammus azonus* (15.4°C) (Nalinanon et al., 2010), *Aluterus monoceros* (29.33°C–29.36°C) (Ahmard & Benjakul, 2010), of marine fishes from Japan and Vietnam (26.1°C–29.2°C) (Thuy et al., 2014) and *Mylopharyngodon piceus* (25.6°C) (Wu et al., 2014).

Many fish collagens had  $T_{max}$  values lower than 30°C and hence had lower thermal stability than mammalian collagens (Bae et al., 2008). However,  $T_{max}$  values above 30°C have also been reported for collagens of various fish species, indicating their high heat resistance and great structural stability, which might be beneficial when using in several biotechnological applications. The  $T_{max}$  values of collagen from different sources have been correlated with various parameters, such as the contents of imino acids (hydroxyproline and proline), temperature of normal habitat, seasons and age (Matmaroh et al., 2011; Regenstein & Zhou, 2007; Singh et al., 2011). Collagens from fish species with a high habitat temperature had higher amounts of imino acids and they also had higher thermal stability than those from fish with a low habitat temperature (Matmaroh et al., 2011; Regenstein & Zhou, 2007).

Furthermore, in general, collagen is denatured to gelatin when it is used as foodstuff in food industry. The denaturation temperature collagen observed in the present study makes it possible to utilization of *C. acoupa* scales as a raw material to extract the gelatin, it is an economic advantage.

### 3.7. Infrared spectrometry of collagen

The collagen sample was subjected to spectroscopy test in the infrared region, in order to verify the integrity and purity (Figure 6). The observed band for amide I in PSC has characteristic frequencies of 1600 and 1700  $\text{cm}^{-1}$  and is associated with stretching vibration of the carbonyl group (C=O) along the polypeptide backbone (Payne & Veis, 1988). For PSC sample obtained, the amide I band was observed at 1630  $\text{cm}^{-1}$ . Bands indicating amides II and III were found at 1548 and 1240  $\text{cm}^{-1}$  (respectively). The indicating amides II and III bands correspond to vibration and bending N-H and C-H bonds, respectively. Hydrolysis of telopeptide region by pepsin might

increase free amino groups, as indicated by the higher wavenumber of PSC (Chuaychan et al., 2015). The results demonstrate that the examined protein has helical arrangement, as is known to collagen.

In the PSC triple helical integrity coefficient evaluation the value obtained was close to 1. According to Benjakul et al. (2010), values close to 1 indicate that the triple helical is well preserved or integrate. The results demonstrate that was possible to obtain type I collagen from scales of acoupa weakfish with preserved structure and high purity with respect to other protein contaminants. Similar data were found in the literature for collagen extracted from processing waste from other fishes and marine mammals (Benjakul et al, 2010; Nagai et al., 2008).

#### 4. Conclusions

Pepsin soluble collagen was successfully extracted from scales of acoupa weakfish. The extraction with pepsin showed useful due to the yield achieved and also to degree of preservation of structures, proving it caused little changes in collagen. Based on SDS–PAGE patterns and absorption spectrum UV of collagen it may be suggested that material extracted in this work is type I, most commercially important. It was observed that PSC showed higher solubility in acidic range of pH and the solubility decreased in the presence of NaCl at concentrations above 2%. Therefore, the results show that the scales of acoupa weakfish (*C. acoupa*) could be an alternative source of collagen for several applications.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) and the Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for their financial support. F.T.D. Monte presented part of this contribution as her MSc. dissertation to fulfill a postgraduate degree at the Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

## References

1. Ahmad, M., & Benjakul, S. Extraction and characterization of pepsin solubilized collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 817–824, 2010.
2. Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., & Hara, K. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of under utilised fishes. **Food Chemistry**, v. 108, p. 49–54, 2008.
3. Chen, et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Science and Technology**, v. 66, p. 453-459, 2016.
4. Chuaychan et al. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Science and Technology**, v. 63, p. 71-76, 2015.
5. Damodaran, S. Amino acids, peptides, and proteins. In O. R. Fennema (Ed.), **Food Chemistry**, 3<sup>a</sup> ed., 321-429, 1996.
6. Foegeding, E. A., Lanier, T. C., Hultin, H.O. Characteristics of edible muscle tissues. In: Fennema, O.R. (Ed.), **Food Chemistry**. Marcel Dekker, New York, pp. 879–942, 1996.
7. Huang, et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids**, v. 25(6), p. 1507-1513, 2011.
8. Hwang, et al. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoi*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 921-925, 2007.
9. Ikoma, et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, p. 199-204, 2003.
10. Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Tanaka, M. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1203–1210, 2005a.
11. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chemistry**, v. 93, p. 475–484, 2005b.

12. Kaewdang, et al. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **Food Chemistry**, v. 155, p. 264-270, 2015.
13. Karim, A.A.; Bhat, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatines. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 563-576, 2009.
14. Kimura, et al. Scale and bone type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99B(2), p. 473-476, 1991.
15. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. 454. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper 455 (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89, p. 363–372, 2005.
16. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
17. Li, et al. Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1467-1473, 2008.
18. Liu, Y.K., & Liu, D.C. Comparison of physical-chemical properties of type I 474 collagen from different species. **Food Chemistry**, v. 99, p. 244–251, 2006.
19. Liu et al. Purification and characterization of pepsin-solubilised collagen from skin and connective tissue of giant red seacucumber (*Parastichopus californicus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(2), p. 1270-1274, 2010.
20. Liu, et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v. 133, p. 1441-1448, 2012.
21. Matmaroh, et al. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parapeneus heptacanthus*). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1179-1186, 2011.
22. McCormick, R. J. Collagen: In Applied muscle biology and meat science (pp. 492 127 - 146). Boca Raton, Florida: **CRC Press**, 2009.
23. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da pesca e Aquicultura: Brasil 2011. **Ministério da Pesca e Aquicultura**, p. 128, 2011.
24. Montero, P., Jimenez-Colmenero, F., & Borderias, J. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus*

- 401 Gibb) muscle and skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, p. 137–  
402 146, 1991.
- 403 25. Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B.; Duodu, K.G. Characterisation of acid soluble collagen from  
404 skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 81-89,  
405 2004.
- 406 26. Na, G. C. UV spectroscopic characterization of type I collagen. **Collagen and Related**  
407 **Research**, v. 8, p. 315–330, 1988.
- 408 27. Nagai, T., Izumi, M., Ishii, M. Fish scale collagen: Preparation and partial  
409 characterization. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 39, p. 239-  
410 244, 2004.
- 411 28. Nagai, T., Suzuki, N., Nagashima, T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera*  
412 *acutorostrata*) unesu. **Food Chemistry**, v. 111, p. 296-301, 2008.
- 413 29. Nalinanon, et al. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*)  
414 solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunus alalunga*)  
415 stomach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1492-1500, 2010.
- 416 30. Nalinanon, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus*  
417 *hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 125, p.  
418 500–507, 2011.
- 419 31. Ogawa, et al. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the  
420 subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus*  
421 *probatoccephalus*). **Food Chemistry**, v. 88, p. 495-501, 2004.
- 422 32. Regenstein, J. M., & Zhou, P. Collagen and gelatin from marine by-product. In F. Shahidi  
423 (Ed.), *Maximising the value of marine by-products* (p. 279–303). Boca Raton, Florida:  
424 CRC Press, 2007.
- 425 33. Senaratne, L.S.; Park, P-J.; Kim, S-K. Isolation and characterization of collagen from  
426 brownbacked toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, v. 97, p.  
427 191-197, 2006.
- 428 34. Shoulders, M.D., & Raines, R.T. Collagen structure and stability. **Annual Review of**  
429 **Biochemistry**, v. 78(1), p. 929-958, 2009.

35. Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v. 124(1), p. 97–105, 2011.
36. Sinthusamran, et al. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swin bladder of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Chemistry**, v. 138, p. 2435-2441, 2013.
37. Smith, et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-86, 1985.
38. Tonhi, E.; Plepis, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n.6, p. 943-948, 2002.
39. Veeruraj, A., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48(10), p. 1592–1602, 2013.
40. Veeruraj, A., Arumugam M., Ajithkumar T., Balasubramanian, T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708-716, 2014.
41. Wang, et al. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 104-109, 2014.
42. Wu, et al. Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the skin of black carp (*Mylopharyngodon piceus*). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 5, p. 642-650, 2014.
43. Yan, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 107(4), p. 1581-1586, 2008.
44. Zeng, et al. Isolation and characterization of acid-solubilized collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 116, p.879-883, 2009.
45. Zeng, et al. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cioba (*Rachycentron canadum*). **Food Chemistry**, v. 135, p.1975-1984, 2012.
46. Zhang, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, v. 103, p. 906-912, 2007.

47. Zhang, et al. Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). Food Chemistry, v. 115, p. 826-831, 2009.
48. Zhang, et al. Isolation and characterization of collagens from scale of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 34(6), p. 1343-1354, 2010.

### Figure Captions

Fig. 1. SDS-PAGE (7,5%) of pepsin soluble collagen (PSC) from the *Cynoscion acoupa* scales. M: high-molecular weight markers; 1: type I collagen from commercial bovine skin; 2: PSC of *C. acoupa* scales.

Fig. 2. UV absorption spectra of PSC from *Cynoscion acoupa* scales.

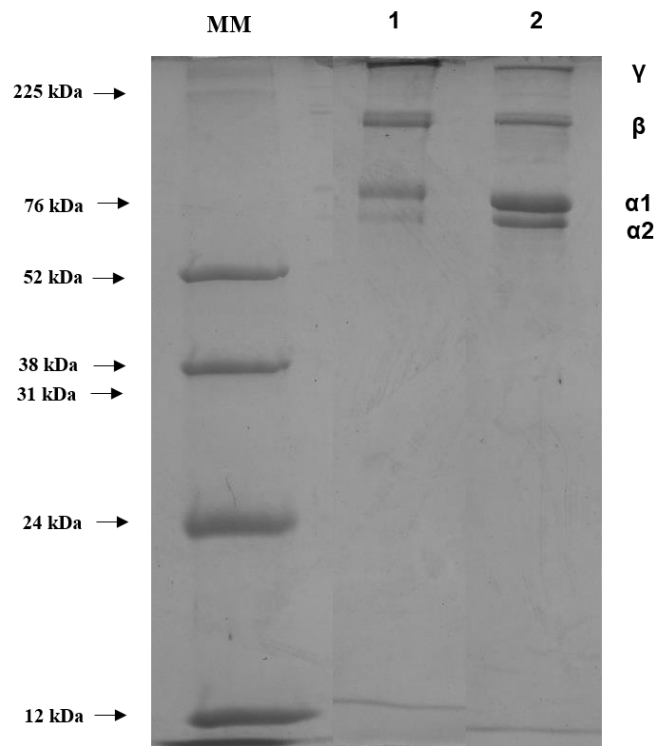
Fig. 3. Relative solubility (%) of PSC from *Cynoscion acoupa* scales in distilled water at different pHs.

Fig. 4. Relative solubility (%) of PSC from *Cynoscion acoupa* scales in 0.5M acetic acid with different NaCl concentrations.

Fig. 5. DSC thermogram of pepsin soluble collagen (PSC) from the scales of *Cynoscion acoupa*.

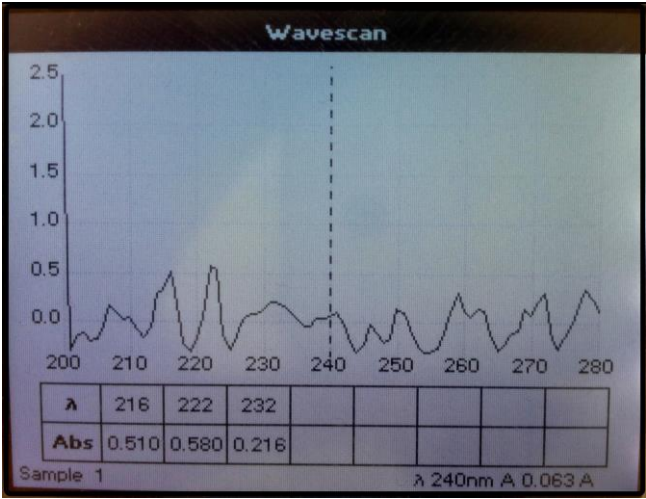
Fig. 6. Infrared spectrometry of pepsin soluble collagen (PSC) from the scales of *Cynoscion acoupa*.

491 MONTE, FTD *et al.*



492  
493 **Figure 1**

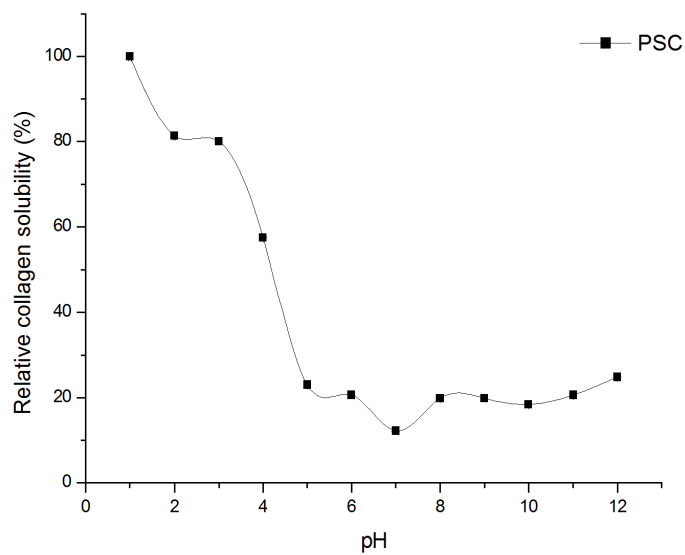
496 MONTE, FTD *et al.*



497  
498 **Figure 2**

499

500 MONTE, FTD *et al.*



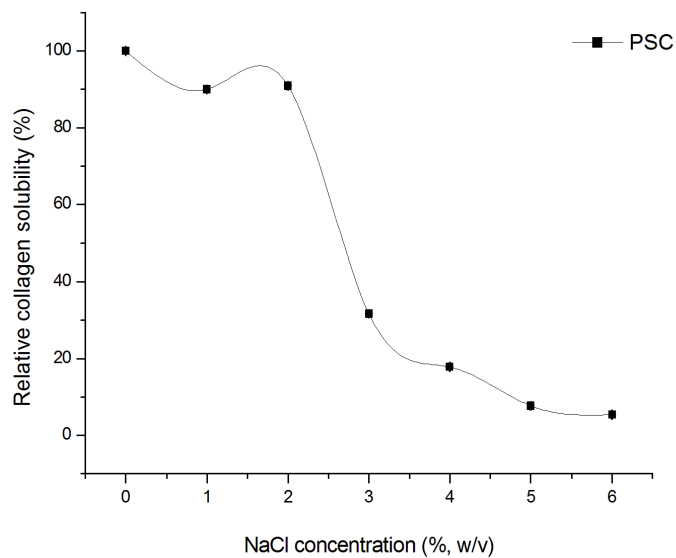
501

502 **Figure 3**

503

504

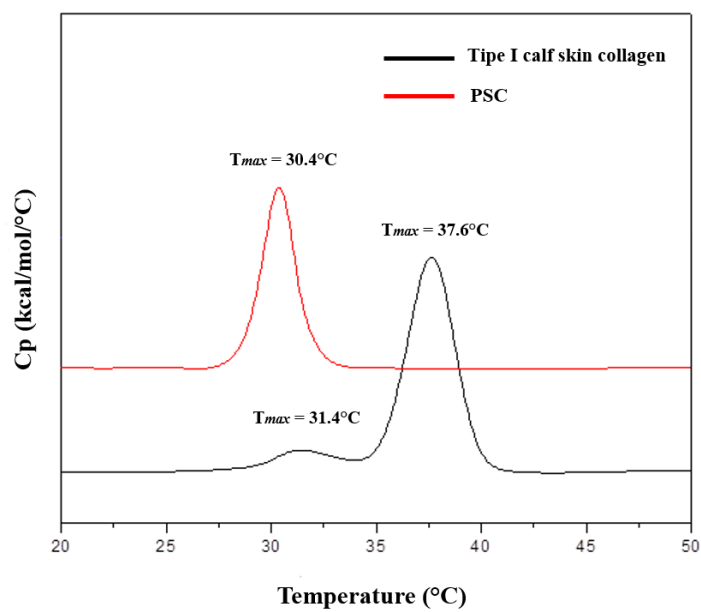
505 MONTE, FTD *et al.*



506

507 **Figure 4**

508 MONTE, FTD *et al.*

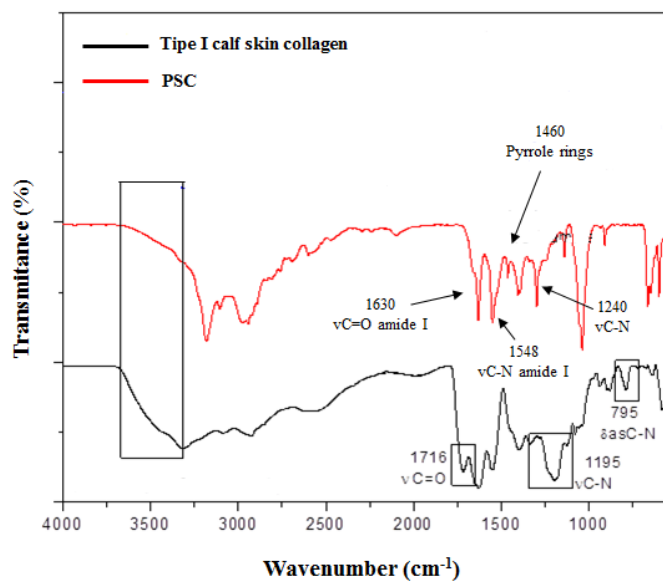


509  
510 **Figure 5**

511

512

513 MONTE, FTD *et al.*



514  
515 **Figure 6**

516 **Table 1 – The extraction yields of pepsin soluble collagen (PSC) from fish scales.**

| Species                            | Extract yield PSC (%)<br>(dry weight) | References             |
|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| <i>Cynoscion acoupa</i>            | 8.3                                   | present study          |
| <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | 2.32                                  | Zhang et al., 2010     |
| <i>Parapeneus heptacanthus</i>     | 1.2                                   | Matmaroh et al., 2011  |
| <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>  | 2.7                                   | Liu et al., 2012       |
| <i>Lates calcarifer</i>            | 1.06                                  | Chuaychan et al., 2015 |
| <i>Sciaenops ocellatus</i>         | 4.32                                  | Chen et al., 2016      |

517

518