

UTILIZAÇÃO DA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA AVALIAÇÃO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DE DIFERENTES COLÁGENOS BOVINOS

A. P. KEMPKA¹, M. M. P. ANDRADE², F. B. MELLO³, W. S. WEIGELT³, G. WALTER³,
M. B. PINTON³, M. A. MAZUTTI⁴, I. M. DEMIATE² e R. C. PRESTES^{3*}

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos

² Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Engenharia de Alimentos

^{3*} Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Engenharia Química

*E-mail para contato: rosacrisprestes@hotmail.com

RESUMO - A partir do colágeno são obtidos o colágeno hidrolisado, a fibra de colágeno e a gelatina. O objetivo deste estudo foi avaliar a desnaturação térmica de 18 diferentes amostras de colágenos bovinos (amostras *in natura* e hidrolisadas enzimaticamente com e sem o emprego concomitante de ultrassom) utilizando a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Foi utilizada a faixa de aquecimento de -10 °C a 100 °C e cadinhos de alumínio previamente selados. Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na temperatura de pico (T_p) e entalpia (ΔH) para as amostras avaliadas. T_p variou de 18,90 °C a 58,13 °C e ΔH de 2,7/ J.g⁻¹ a 1153,00/ J.g⁻¹. Os maiores valores de T_p e ΔH foram encontrados para a fibra de colágeno e gelatina *in natura* em decorrência da estrutura mais íntegra. As amostras submetidas ao ultrassom apresentaram menores valores de T_p e ΔH . A avaliação da desnaturação térmica pode auxiliar na caracterização e seleção destes colágenos para as mais diversas aplicações industriais.

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína dominante no tecido conjuntivo sendo encontrado sob várias formas em tecidos de todas as espécies de organismos multicelulares, exercendo diversas funções dependendo de sua localização (Shimokomaki *et al.*, 2006; Damoradan *et al.*, 2010).

A partir do colágeno nativo podem ser obtidos: fibra de colágeno, colágeno

parcialmente hidrolisado (gelatina) e colágeno hidrolisado. Para fins de produção industrial, a gelatina é obtida do colágeno através da hidrólise ácida ou alcalina. Na extração ácida a gelatina obtida é classificada como Tipo A, apresenta ponto isoelétrico entre 7 e 9 e nesse processo ocorre a reorganização física da estrutura e mínimas alterações hidrolíticas resultando em ampla faixa de distribuição de massa molar. Na hidrólise alcalina o produto é denominado gelatina Tipo B, apresenta ponto isoelétrico entre 4,7 e 5,5, e este processo é mais drástico, hidrolisa até aminoácidos o que resulta em menor faixa de distribuição de massa molar (Scrieber & Gareis, 2007; Ockerman & Hansen, 1994; Deman, 1999; Damoradan *et al.*, 2010).

O colágeno hidrolisado é obtido por hidrólise química e enzimática sob condições controladas (Scrieber & Gareis, 2007). A diferença entre o colágeno hidrolisado e a gelatina é que o colágeno hidrolisado dissolve-se em água ou salmoura e a grande maioria não apresenta capacidade de geleificação (Damoradan *et al.*, 2010). A fibra de colágeno é obtida das camadas internas do couro bovino através de processo químico (tratamento alcalino com hidróxido de cálcio), segue para o desengorduramento e secagem a baixas temperaturas (processo menos drástico) (Santana *et al.*, 2012; Máximo & Cunha, 2010). A fibra de colágeno em pó é obtida por processo similar, porém submetida a temperaturas mais elevadas e posterior moagem.

O objetivo deste estudo foi avaliar a desnaturação térmica de 18 diferentes amostras de colágenos bovinos (amostras *in natura* e hidrolisadas enzimaticamente com e sem o emprego concomitante de ultrassom), utilizando a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS) e nos Laboratórios de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, PR).

Foram testadas 18 diferentes amostras de colágeno bovino (6 amostras *in natura* e 12 amostras hidrolisadas enzimaticamente com e sem o emprego concomitante de ultrassom). As amostras denominadas *in natura* foram: a fibra natural de colágeno (FNC) (Novaprom Food Ingredients, Lins, SP), fibra de colágeno em pó (FP) (Novaprom Food Ingredients, Lins, SP), colágeno parcialmente hidrolisado 1 ou gelatina 1 (GEL1) (Gelita South America, Maringá, PR), colágeno parcialmente hidrolisado 2 ou gelatina 2 (GEL2) (Gelatina, Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda., São Paulo, SP) colágeno hidrolisado 1 (HID1) (Peptiplus, Gelita South America, Maringá,

PR) e colágeno hidrolisado 2 (HID2) (Peptan B, Rousselot Gelatinas do Brasil Ltda., São Paulo, SP).

As amostras de colágeno *in natura* foram hidrolisadas enzimaticamente com e sem o emprego de ultrassom concomitantemente a hidrólise. Foi utilizada a enzima Alcalase 2.4L® (Tovanni Benzaquen Ingredientes, endopeptidase de *Bacillus licheniformis* com 2.4 AU/g). A reação enzimática foi conduzida à temperatura e pH de máxima atividade catalítica da enzima, 55 °C e pH 7,5 de acordo com a literatura e seguindo a metodologia utilizada por Schmidt & Salas-Mellado (2009), com algumas modificações. O substrato foi homogeneizado em uma solução tampão fosfato 0,2 M. Pesou-se uma determinada quantidade de colágeno que correspondeu a uma concentração total de proteína em solução de 5 % (m/v). A enzima foi adicionada ao meio variando-se sua concentração em relação à massa total de proteínas de 8,0 % (g de enzima/g proteína). Para as amostras que foram hidrolisadas com ultrassom foi utilizado banho ultra-sônico (Modelo USC – 1800A, UNIQUE). A potência utilizada foi de 132 W e frequência de 40 KHz ao mesmo tempo em que ocorreu a hidrólise enzimática.

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA), o qual foi previamente calibrado com índio de alto grau de pureza de 99,99 %, $p_f = 156,6$ °C, $\Delta H = 28,56$ J.g⁻¹. Para registrar a entalpia e as temperaturas do processo de desnaturação das amostras, foi utilizado os seguintes parâmetros: fluxo de ar de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, a faixa de aquecimento foi de -10 a 100 °C, foram pesadas cerca de 3,0 mg de colágeno, que foi misturado com água deionizada em uma proporção de 6:1 (água: colágeno, m/m) e a mistura foi mantida em repouso durante 120 minutos sob refrigeração (7 °C) a fim de equilibrar o teor de umidade e hidratar. A realização da análise foi com cadinhos de alumínio selado.

O delineamento experimental foi casualizado e foram realizadas duas repetições para cada teste. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância – ANOVA e Teste de Tukey com nível de significância ($p < 0,05$) utilizando o programa Statistica® 9.0 (STATSOFT, INC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A DSC é comumente utilizada para avaliar a estabilidade e desnaturação térmica do colágeno e seus derivados. Foram mensuradas as temperaturas de ocorrência das alterações decorrentes da desnaturação do colágeno: temperatura inicial (T_0), temperatura de pico (T_p), temperatura de conclusão (T_c) e a entalpia da reação endotérmica (absorção de calor) ou ΔH (J.g⁻¹). A DSC se mostrou uma técnica adequada para avaliação da desnaturação térmica para 10 das 18 amostras de colágeno testadas. Os resultados podem ser observados na Tabela 1. Algumas amostras após a hidrólise com ou sem ultrassom não apresentaram picos nem entalpia de desnaturação,

pois já se encontravam hidrolisadas completamente ou não apresentaram a transição de gel para sol.

Tabela 1 – Resultados de DSC de desnaturação para as diferentes amostras de colágeno testadas.

Amostras	DSC de desnaturação*			
	$T_o/^{\circ}\text{C}$	$T_p/^{\circ}\text{C}$	$T_c/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/\text{J.g}^{-1}$
FNC <i>in natura</i>	22,2±0,55 ^c	41,49±0,01 ^b	57,34±0,17 ^b	605,76±9,11 ^b
FNC hidrolisada com US	3,62±0,37 ⁱ	14,9±0,17 ^h	21,84±0,15 ⁱ	52,69±2,96 ^e
FNC hidrolisada sem US	6,59±0,16 ^g	18,54±0,28 ^g	33,40±0,05 ^f	95,04±3,95 ^d
FP <i>in natura</i>	36,29±0,23 ^a	41,82±0,16 ^b	44,44±0,08 ^c	2,70±0,26 ^h
GEL1 <i>in natura</i>	26,47±0,03 ^b	58,13±0,01 ^a	69,83±0,04 ^a	1153,0±4,35 ^a
GEL1 hidrolisada sem US	26,53±0,04 ^b	29,43±0,02 ^c	34,12±0,14 ^e	17,44±1,0 ^g
GEL2 <i>in natura</i>	16,37±0,01 ^e	23,51±0,01 ^f	28,60±0,03 ^h	102,6±0,98 ^d
GEL2 hidrolisada com US	20,8±0,01 ^d	25,26±0,01 ^e	29,89±0,02 ^g	19,80±0,17 ^g
HID1 <i>in natura</i>	4,47±0,16 ^h	25,76±0,02 ^d	36,17±0,02 ^d	200,23±6,51 ^c
HID1 hidrolisado sem US	8,47±0,31 ^f	15,11±0,01 ^h	21,39±0,03 ^j	37,56±0,88 ^f

(*) T_o “onset” temperatura inicial, T_p temperatura de pico, T_c “endset” temperatura de conclusão, ΔH entalpia de desnaturação

(**) Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

(***) FNC corresponde a: Fibra Natural de Colágeno, FP corresponde a Fibra de Colágeno em pó, GEL1 corresponde a Gelatina 1, GEL2 corresponde a Gelatina 2 e HID corresponde ao Colágeno Hidrolisado 1.

A temperatura inicial (T_o) variou entre 3,62 a 26,53 °C, a temperatura de pico (T_p) de 14,9 a 58,13 °C e a temperatura de conclusão (T_c) de 21,39 a 57,34 °C para as amostras avaliadas. Os maiores valores de entalpia (ΔH) foram encontrados para a GEL1 e FNC ambas *in natura* (1153,00 e 605,76 J.g⁻¹ respectivamente). Menores valores de entalpia foram encontrados para as amostras de FP *in natura* (2,70 J.g⁻¹) e GEL1 hidrolisada sem ultrassom. Quando comparados os resultados de entalpia e temperaturas para a amostra de FNC percebeu-se que houve redução das temperaturas e

entalpia em decorrência do processo de hidrólise, e quando a hidrólise foi combinada com ultrassom os valores foram ainda menores. Estes resultados podem ser justificados pela estrutura mais íntegra da FNC e da GEL1.

Segundo Torley *et al.* (2000), a molécula do colágeno é constituída de três cadeias polipeptídicas (duas α_1 e uma α_2) sendo que em geral a estrutura contém cerca de 30 % de glicina, 12 % de prolina, 11 % de alanina, 10 % de hidroxiprolina, 1 % de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e carregados (Scrieber & Gareis, 2007; Deman, 1999; Damoradan *et al.*, 2010). A estabilidade térmica do colágeno está relacionada com seu conteúdo de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina). Quanto mais elevado o conteúdo de aminoácidos maior é a estabilidade das hélices. O colágeno se desnatura a temperaturas superiores gerando uma mescla de espécies com uma, duas ou três cadeias polipeptídicas enroladas ao acaso (Wong, 1995). Pode-se verificar indiretamente que algumas das amostras analisadas perderam a estrutura secundária (hélice) e que houve diferenças entre a FNC, FP, GEL1, GEL2 e HID1, mostrando que há influência do processo de extração e comprovando que a hidrólise enzimática com ou sem ultrassom afetou a estrutura e características destes colágenos.

Li *et al.* (2009) relataram que a utilização de ultrassom permitiu aumentar o rendimento e diminuir o tempo de processo de extração de colágeno de tendão bovino. Segundo estes autores há um aumento da dissolução do substrato, permitindo uma maior dispersão e abertura das fibrilas de colágeno facilitando a ação da enzima.

Rochdi *et al.* (2000) mencionaram temperaturas de desnaturação de colágeno de epimísio e colágeno intramuscular entre 58,6 e 61,6 °C e entalpia (J/g de amostra seca) de 45,6±0,2 a 78,1±1,2. Segundo Zhao & Chi (2009) a temperatura de desnaturação de colágeno da pele de suínos e bovinos está entre 60 e 65 °C. Outros estudos mencionaram temperaturas de desnaturação do colágeno variando entre 30 °C e 60 °C, dependendo da origem e tipo de colágeno testado, sendo evidenciadas menores temperaturas para os colágenos de pescados e maiores para os de origem bovina e suína (Liu *et al.*, 2014 e Sinthusamran *et al.*, 2013).

A presença de aminoácidos, particularmente a hidroxiprolina e prolina, contribui para a estabilidade da tripla hélice através das pontes de hidrogênio entre as cadeias α . As variações nas temperaturas (T_0 , T_p e T_c) entre os colágenos, podem ser correlacionadas com o conteúdo de aminoácidos e com os processos de extração e hidrólise. Menores temperaturas de desnaturação indicam menor estabilidade e este é um dos fatores que afetaria a aplicação posterior destes colágenos. A redução da estabilidade está diretamente relacionada ao conteúdo de prolina e hidroxiprolina (Veeruraj *et al.*, 2013; Nagai *et al.*, 2008; He *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Kaewdang *et al.*, 2014 e Pati *et al.*, 2010).

A utilização da DSC permitiu avaliar a desnaturação térmica de 56% das amostras de colágeno testadas sendo mais adequada para as amostras de colágeno com estrutura intacta ou mais próxima do colágeno natural e com maior massa molar. Como era esperado, após a hidrólise, algumas amostras não apresentaram picos devido da perda da propriedade de transição de gel para sol.

As amostras submetidas ao tratamento de ultrassom concomitantemente com a hidrólise enzimática foram as que apresentaram menor entalpia e menores temperaturas, comprovando-se os efeitos da sonicação em proporcionar maior contato enzima-substrato e maior rendimento do processo (maior grau de hidrólise).

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a DSC é uma alternativa de técnica complementar para os processos de avaliação, caracterização e discriminação (origem bovina, suína ou de aves ou ainda colágenos *in natura* ou hidrolisados) de diferentes tipos de colágeno. Também pode ser empregada para a detecção de fraudes e no estudo do comportamento dos colágenos em determinadas condições que se aproximam das condições a que estes são submetidos a nível industrial.

4. CONCLUSÕES

Os resultados da DSC permitiram avaliar a estabilidade e desnaturação térmica dos diferentes tipos de colágeno bovinos testados e mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) na temperatura de pico (T_p) e entalpia (ΔH). T_p variou de 18,90 °C a 58,13 °C e ΔH de 2,7/ J.g⁻¹ a 1153,00/ J.g⁻¹. Os maiores valores de T_p e ΔH foram encontrados para a fibra de colágeno e gelatina 1 *in natura*, em decorrência da estrutura mais íntegra destes colágenos. As amostras submetidas ao ultrassom apresentaram menores valores de T_p e ΔH . A avaliação da desnaturação térmica pode auxiliar na caracterização e seleção destes colágenos para as mais diversas aplicações industriais tais como: produtos biomédicos e farmacêuticos, indústria de cosméticos, encapsulamento, produção de embalagens biodegradáveis e na área de alimentos como agente gelificante e espumante.

5. REFERÊNCIAS

- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.R.; *Química de Alimentos de Fennema*, 4ªed., Artmed: Porto Alegre, 2010.
- DEMAN, J.M. *Principles of food Chemistry*. Aspen: Maryland, p.147-149p, 1999.
- HE, L.; MU, C.; LI, D.; LIN, W. Revisit the pre-transition of type I collagen denaturation in dilute solution by ultrasensitive differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta*, v. 548, p.1-5, 2012.

- KAUSDANG, O.; BENJAKUL, S.; KAUSDANEE, T.; KISHIMURA, H. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*). *Food Chem.*, v.155, p.264-270, 2014.
- LI, D.; MU, C.; CAI, S.; LIN, W. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrason. Sonochem.*, v.16, p.605-609, 2009.
- LIU, W.; TIAN, Z.; LI, C.; LI, G. Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. *Thermochim. Acta*, v.581, p.32-40, 2014.
- MAXIMO, G.J.; CUNHA, R.L. Mechanical properties of collagen fiber and powder gels. *J. Texture Stud.* 2010, Doi:10.1111/j.1745-4603.2010.00528.x.
- NAGAI, T.; SUZUKI, N.; NAGASHIMA, T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutotostrata*) unesu. *Food Chem.*, 111, p.296-301, 2008.
- OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. *Industrialización de subproductos de origen animal*. Zaragoza : Acribia, 133 – 160p., 1994.
- PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technol.*, v.101, p.3737-3742, 2010.
- ROCHDI, A.; FOUCAT L.; RENOU, J. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. *Food Chem.*, v.69, p.295-299, 2000.
- SANTANA, R.C.; SATO, A.C.K.; CUNHA, R.L. Emulsions stabilized by heat-treated collagen fibers. *Food Hydrocolloid.*, v.26, p.73-81, 2012.
- SCHMIDT, C.G.; SALLAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Quim. Nova*, v.32, n.5, p.1144-1150, 2009.
- SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industry Practice*. Hardcover, 371p. 2007.
- SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. *Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes*, São Paulo: Varela, 2006, 236p.
- 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 Chem.*, v.138, p.2435-2441, 2013.
- TORLEY, P.J.; D'ARCY, B.R.; TROUT, G.R. The effect of ionic strength polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. *Meat Sci.*, v.55, p.451-462, 2000.
- VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochem.*, v.48, p.1592-1602, 2013.
- ZHAO, Y.H.; CHI, Y.J. Characterization of collagen from eggshell membrane. *Biotechnol.*, v. 8, n.2, 254-258, 2009.

- WANG, L.; LIANG, Q.; WANG, Z.; XU, J.; LIU, Y.; MA, H. Preparation and characterization of type I collagens from skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Chem.*, v.148, p.410-414, 2014.
- WONG, D.W.S. *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*. Zaragoza: Zaragoza, 109-116p, 1995.