

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ÍRIS BRAZ DA SILVA ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO “PÉS DE FRANGO”:
POTENCIAL TECNOLÓGICO PARA SUA UTILIZAÇÃO NA
INDÚSTRIA CÁRNEA**

JOÃO PESSOA/PB

2017

ÍRIS BRAZ DA SILVA ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO “PÉS DE FRANGO”:
POTENCIAL TECNOLÓGICO PARA SUA UTILIZAÇÃO NA
INDÚSTRIA CÁRNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Suely Madruga

JOÃO PESSOA/PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663v Araújo, Íris Braz da Silva.

Valorização do subproduto "pés de frango": potencial tecnológico para sua utilização na indústria cárnea / Íris Braz da Silva Araújo. - João Pessoa, 2017.
177 f. : il.

Orientação: Marta Suely Madruga.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Extração de colágeno - Pés de frango. 3. Emulsões cárneas. I. Madruga, Marta Suely. II. Título.

UFPB/BC

ÍRIS BRAZ DA SILVA ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO “PÉS DE FRANGO”:
POTENCIAL TECNOLÓGICO PARA SUA UTILIZAÇÃO NA
INDÚSTRIA CÁRNEA**

Tese _____ em 13/09/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Marta Suely Madruga – PPGCTA/UFPB
Coordenadora da banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha – PPGCTA/UFPB
Examinador interno

Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva – PPGCTA/UFPB
Examinador interno

Prof. Dra. Mônica Tejo Cavalcanti – UATA/UFCG
Examinador externo

Prof. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco- ITAL/SP
Examinador externo

*Aos meus pais, meu esposo e meu irmão, pelo
grande incentivo que tive; aos meus avós Júlio,
Nair, Bernadete e Durval (in memoriam), que me
iluminam lá do céu, todos os dias.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me proporciona a realização de um sonho, que durante a graduação me parecia impossível.

Aos meus pais Camilo e Vânia, por todo incentivo que tive desde a graduação até aqui, e também meu irmão Iago, por sempre entenderem as minhas ausências e minhas angústias.

Ao meu esposo Lúcio, que me acompanha há muito tempo nesta história e me ajudou de todas as formas possíveis na condução deste estudo e deste sonho.

À professora Marta Suely Madruga, pela oportunidade que tive de fazer parte de seu grupo de pesquisa e conhecer todos os passos para que um dia me torne uma grande profissional, assim como ela é. Muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas de trabalho do IFPB, onde permaneci nos dois primeiros anos de meu doutorado, e mais recentemente da UFPB – Campus III, em especial ao Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial e à coordenação dos cursos técnicos do Colégio Agrícola Vidal de Negreiros, por me acolherem tão bem no momento em que não pude contribuir plenamente com a instituição, e também pela compreensão pelas ausências e indisponibilidades em função dos meus estudos.

Aos meus amigos da academia para a vida toda: Valquíria, Fábio, Sinara, Estefânia e Ingrid, que sempre me ajudaram na ciência ou no cotidiano. Muito obrigada! Contem comigo sempre que precisarem!

A toda a equipe do Laboratório de Análises Químicas de Alimentos, especialmente aos que convivi diariamente nesses quatro anos: Taliana, Narciza, Ana Rita, Ângela, Carol, Mércia, Leila, Sérgio, à minha querida PIBIC e anjo Darlinne, à querida Rafaela Paseto, ex pós-doc, por tanta ajuda recebida e pela condução das análises quando tive que trabalhar. Sou muito grata a vocês! À querida Juliana de Cássia, que tanto contribuiu comigo nas noites em que tive que passar no laboratório. Obrigada por toda a ajuda!

Ao Laboratório de Proteômica Estrutural (LAPROTE), em nome do professor Dr. Carlos Gadelha e Edilza, por me ajudarem nas eletroforeses, na liofilização de minhas amostras e na paciência que sempre tiveram comigo. Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DN/CCS/UFPB) em nome do professor Dr. Evandro Leite, pela assistência com a centrífuga refrigerada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na composição deste sonho. Muito obrigada!

RESUMO

ARAÚJO, I, B. S. **Valorização do subproduto “pés de frango”: potencial tecnológico para sua utilização na indústria cárnea.** Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2017. 178p.

Os pés de frango são considerados subprodutos da indústria frigorífica, sendo muitas vezes subaproveitados ou até mesmo desperdiçados. Entretanto, trata-se de uma fonte de nutrientes, especialmente proteínas, como o colágeno, que podem ser extraídas e estudadas, visando seu melhor aproveitamento em termos tecnológicos e biológicos. Objetivou-se neste estudo extrair colágeno de pés de frango e determinar as condições ótimas de extração, segundo a concentração de ácido acético, teor de pepsina e tempo de hidrólise, além de determinar suas propriedades tecnológicas e bioativas nos isolados obtidos, para introduzir como substituto de gordura em salsichas de frango. Foi realizado um projeto piloto que consistiu em um planejamento fatorial 2^3 , com três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. Esse experimento utilizou concentrações de pepsina entre 0,1 e 0,2%. A variável resposta foi o teor de colágeno nos isolados obtidos. Também foram determinados o perfil eletroforético, o perfil de aminoácidos, a hidrofobicidade dos isolados, a solubilidade em água, a capacidade de absorção de água a 60 °C e a atividade emulsificante. Foi observado que o maior teor de colágeno dos extratos foi obtido na concentração de 0,3 mol/L de ácido acético, 0,2% de pepsina e 12 horas de hidrólise (72,98 g/100 g). Ficou evidente que o teor de enzima influenciou diretamente no rendimento em colágeno, o qual poderia ser melhorado. Logo, um novo planejamento foi delineado (com 11 experimentos), mantendo-se as concentrações de ácido acético e os tempos de hidrólise, aumentando-se o teor de pepsina (0,1 – 1%). Também foram determinados nos isolados obtidos, as propriedades bioativas como capacidade antioxidante e habilidade quelante de ferro. O teor de colágeno máximo entre os isolados foi de 78,85 g/100g. Todos os tratamentos apresentaram altos teores de aminoácidos hidrofóbicos. No perfil eletroforético foi observada a predominância de colágeno tipo I nos isolados. No isolado ICmin, com o teor mínimo de colágeno, houve maior solubilidade e absorção de água, além de maior inibição do radical ABTS, maior poder redutor e capacidade quelante de ferro. O isolado ICmax, com maior teor de colágeno, apresentou condições opostas de extração aos isolados de maior rendimento. Com a condição de extração de ICmax, foi extraído o gel de colágeno, o qual foi aplicado como substituto de 50% de gordura em salsichas de frango, a qual comparada com uma salsicha padrão e uma salsicha com 50% de redução de gordura por colágeno comercial em pó, as quais foram analisadas quanto aos aspectos sensoriais, físico-químicos, propriedades antioxidantes e tecnológicas ao longo de 42 dias a 4°C. A salsicha com gel de colágeno apresentou propriedades tecnológicas satisfatórias, além de ter contribuído para a estabilidade da emulsão. Foi observado um baixo efeito de oxidação lipídica. Impactos negativos foram obtidos foram observados nos parâmetros de textura, sendo necessários mais estudos sobre novos níveis de gel de colágeno ou combinações do gel com outros substitutos de gordura para ser aplicado nas salsichas.

PALAVRAS-CHAVE: Otimização, Pés de frango, Colágeno, Emulsões cárneas, Salsichas, Atividade antioxidante.

ABSTRACT

ARAÚJO, I. B. S. **Valorization of the "chicken feet" by-product: technological potential for its use in the meat industry.** Doctoral thesis. Postgraduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Paraiba. João Pessoa, 2017. 178p.

Chicken feet are considered as by-products of the meat industry, often under-provisioned and even desperate. However, it is a source of nutrients, especially proteins, such as collagen, which can be extracted and studied, with its best use in technological and biological terms. The objective of this study was to extract collagen from chicken feet and to determine the optimal extraction conditions, according to acetic acid concentration, pepsin content and hydrolysis time, as well as to define its technological and bioactive conditions in the following results, to introduce as a substitute of chicken sausages. The pilot project consisted of a factorial design of 2^3 , with three replicates in the center, totaling 11 experiments. This experiment used pepsin concentrations between 0.1 and 0.2%. One response was selected for the following collapse index. The electrophoretic profile, the amino acid profile, the hydrophobicity of the isolates, the water solubility, the water absorption capacity at 60 ° C and the emulsifying activity were also placed. It was observed that the highest collagen content of the extracts was obtained in the concentration of 0.3 mol/L of acetic acid, 0.2% of pepsin and 12 hours of hydrolysis (72.98 g/100g). It was evident that the enzyme content directly influenced the yield of collagen, which could be improved. Thus, the first plan was drawn (with 11 experiments), keeping as the acetic acid units and hydrolysis times, increasing the pepsin content (0.1-1%). In the isolated data, bioactive properties such as antioxidant capacity and iron chelating ability were also obtained. The maximum collagen content between the levels was 78.85 g / 100g. All treatments are high levels of hydrophobic amino acids. No electrophoretic profile was observed with predominance of type I collagen. In the case of ICmin, with a higher collagen content, higher solubility and water absorption, besides a greater inhibition of the ABTS radical, greater reducing power and iron chelating capacity. The isolated ICmax, with higher collagen content, released under extraction conditions for higher yield. With an ICmax extraction condition, the collagen gel was extracted, which was used as a substitute of 50% fat in chicken sausages, a comparison with a standard sausage and a sausage with 50% fat reduction by collagen. commercially available powder, which were analyzed for sensory, physicochemical, antioxidant and technological properties over 42 days at 4 ° C. The sausage gel of collagen was used data processing, in addition to contributing to a stability of the emulsion . It was a lipid oxidation effect. Negative impacts were observed in texture parameters, with more recent studies on new levels of collagen gel or gel combinations with other fat substitutes for use in sausages.

KEYWORDS: Optimization, Chicken feet, Collagen, Meat emulsions, Sausages, Antioxidant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Arranjo de fibrilas em fibras de colágeno.....	20
Figura 2 – Esquema de extração de colágeno de pés de frango	34

ARTIGO 1

Figure 1 - Response surface generated for the collagen content (Y_1) from chicken feet	53
Figure 2 - Response surface generated for the collagen yield (Y_1) from chicken feet	54
Figure 3 - Chromatograms of peptides detected in collagen extracted from chicken feet	54
Figure 4 - Distribution of molecular weights of the protein fractions obtained in collagen from chicken feet extracted under different conditions	55

ARTIGO 2

Figura 1 - Superfície de resposta gerada para o teor de colágeno dos isolados extraídos de pés de frango	72
Figura 2 - Superfície de resposta gerada para o rendimento de extração de colágeno em pés de frango	74
Figura 3 - Perfil eletroforético dos isolados de colágeno extraídos de pés de frango	78
Figura 4 - Cromatogramas do HPLC (a) e somatório das áreas dos cromatogramas (b) obtidos de isolados de colágeno extraídos de pés de frango	79
Figura 5 – Atividade antioxidante pela inibição do radical ABTS (A), poder redutor pelo método FRAP (B) e habilidade quelante de ferro (C)	86

ARTIGO 3

Figure 1 - PCA analysis performed for the parameters studied in chicken sausages with fat reduction by collagen	128
---	-----

ARTIGO 4

Figura 1 - Representação gráfica das médias e desvios obtidos para a dureza e a maciez das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	161
Figura 2 - Representação gráfica das médias e desvios obtidos para o teor de colágeno e de proteínas das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	162
Figura 3 - Representação gráfica das médias e desvios obtidos para o teor de lipídeos e número de TBARS das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	163
Figura 4 - Eletroforese SDS-PAGE para as salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	164
Figura 5 - Análise de Componentes Principais para os parâmetros de qualidade das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2^3 para otimização do processo de extração e obtenção de colágeno de pés de frango	32
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^3 para a segunda otimização do processo de extração e obtenção de colágeno de pés de frango	33

ARTIGO 1

Table 1 - 2^3 factorial design for optimization of the extraction process and obtain collagen from chicken feet	52
Table 2 - Means and standard deviations of the response variables of the 2^3 factorial design for chicken feet collagen extraction	53
Table 3 - Mean values of amino acids contained in the collagen extracted from chicken feet	54

ARTIGO 2

Tabela 1 - Planejamento estatístico 2^3 para extração de colágeno em pés de frango	63
Tabela 2 - Composição química de pés de frango desossados ¹	69
Tabela 3 - Médias e desvios padrão das funções resposta teor de colágeno e rendimento dos isolados de colágenos obtidos de pés de frango sob diferentes condições de extração	70
Tabela 4 - Efeitos estimados das variáveis independentes na variável resposta teor de colágeno	71
Tabela 5 - Efeitos estimados das variáveis independentes na variável resposta rendimento em peso	73
Tabela 6 - Perfil de aminoácidos dos isolados de colágeno extraídos de pés de frango (Médias e desvios)	76

Tabela 7 - Propriedades Funcionais dos isolados de colágeno extraídos de pés de frango (Médias e desvios)	81
--	----

ARTIGO 3

Table 1 – Formulations of chicken sausages with the replacement of fat with collagen powder and with chicken feet gelatin	120
Table 2 – List of descriptors and references generated in the quantitative descriptive analysis of chicken sausages with replacement of fat with hydrolyzed collagen powder and with gelatin	121
Table 3 - Chemical composition of chicken feet gelatin and commercial collagen powder used as fat replacers in chicken sausages	123
Table 4 - Means and standard deviations from the quantitative descriptive analysis and the instrumental texture profile analysis of chicken sausages with fat replacement with collagen	124
Table 5 - Means and standard deviations of the chemical composition on a dry basis, pH, WHC, color and emulsion parameters of chicken sausages with fat replacement with collagen	125
Table 6 - Means and standard deviations of the percentages of fatty acids and quality indices of chicken sausages with replacement of fat with collagen	126

ARTIGO 4

Tabela 1 - Formulações das salsichas de frango com redução de gordura por colágeno em pó e por gel de colágeno extraído de pés de frango	155
Tabela 2 - Médias e desvios dos parâmetros sensoriais da ADQ realizada nas salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	156
Tabela 3 - Médias e desvios dos parâmetros químicos, físicos e de perfil de textura de salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado	157

Tabela 4 - Médias e desvios da atividade de captura do radical DPPH e poder antioxidante redutor férrico(FRAP) das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado 159

Tabela 5 - Médias e desvios das somatórias e índices dos ácidos graxos obtidos em percentual de área para as salsichas de frango com substituição de gordura por gel de colágeno ao longo do armazenamento
160

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 A AVICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO: MERCADO, PRODUTOS E SUBPRODUTOS GERADOS.....	19
2.2 ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE COLÁGENO.....	20
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E HIDRÓLISE DE COLÁGENO E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	23
2.4 APLICAÇÃO DE COLÁGENO EM ALIMENTOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	31
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA.....	32
3.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COLÁGENO.....	33
3.2.1 Experimento piloto: planejamento fatorial 2 ³	33
3.2.2 Segundo experimento para extração de colágeno: planejamento fatorial 2 ³	33
3.2.3 Processo de extração de colágeno em pés de frango	34
3.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS DOS ISOLADOS DE COLÁGENO	36
3.4.2 Perfil de aminoácidos	36
3.4.3 Análise de hidrofobicidade dos peptídeos.....	36
3.4.4 Perfil eletroforético (SDS-PAGE).....	37
3.4.5 Determinação das propriedades tecnológicas	37
3.4.6 Atividade antioxidante e habilidade quelante	38
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISES DAS SALSICHAS FRANKFURT DE FRANGO COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE GORDURA POR GEL DE COLÁGENO OBTIDO DE PÉS DE FRANGO.....	39
3.5.1 Processamento das salsichas de frango	39
3.5.2 Análises realizadas na salsicha Frankfurt: caracterização e estabilidade durante o armazenamento.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
ARTIGO 1: OPTIMAL CONDITIONS FOR OBTAINING COLLAGEN FROM CHICKEN FEET AND ITS CHARACTERIZATION	52

ARTIGO 2: CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO DE COLÁGENO E PEPTÍDEOS EM PÉS DE FRANGO E SUAS PROPRIEDADES BIOATIVAS	60
ARTIGO 3: QUALITY OF LOW-FAT CHICKEN SAUSAGES WITH ADDED CHICKEN FEET COLLAGEN.....	98
ARTIGO 4: EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE SALSICHAS DE FRANGO PRODUZIDAS COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE GORDURA POR GEL DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PÉS DE FRANGO	134
5. CONCLUSÕES GERAIS	172
APÊNDICE	173
APÊNDICE 1 - Lista de descritores e referências geradas na Análise Descritiva	
Quantitativa de salsichas de frango com redução de gordura por colágeno hidrolisado em pó e por gel de colágeno	173
ANEXOS.....	175
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Seres Humanos (HULW/UFPB).....	
	175
ANEXO 2 – Comprovante de submissão do Artigo 3 à revista Poultry Science.....	
	178

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de corte teve significativo aumento no Brasil ao longo das últimas décadas. Concomitantemente com o aumento na produção e abate de frangos, muitos subprodutos são gerados, incluindo vísceras, penas, cérebro e pés. De acordo com a União Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (UBABEF, 2014), o Brasil ocupa a posição de maior exportador mundial de carne de frango desde 2004. Consequentemente, houve uma maior produção e oferta de subprodutos do abate, a exemplo da produção de pés de frango, que chega aos patamares de 200 mil toneladas produzidas exportadas ao ano. Os maiores importadores destes subprodutos, do Brasil, são os países asiáticos, especialmente China e Hong Kong (ABPA, 2016).

Os subprodutos dos abatedouros avícolas em sua maioria são destinados à alimentação animal, muitas vezes transformados em farinhas a serem incorporadas em rações. Tais farinhas são bastante utilizadas na formulação de dietas para animais pelo seu alto conteúdo de proteína aliado a um baixo custo de obtenção (CANCHERINI *et al.*, 2005). Entretanto, observa-se que alguns subprodutos, como o pé de frango, possuem maior potencial de aproveitamento, e dependendo do componente a ser obtido este poderia ser incorporado na alimentação humana, especialmente na suplementação proteica.

O pé de frango apresenta em sua estrutura muitos tendões e ligamentos, sendo rico em proteínas como o colágeno (TANAKA; SHIMOKOMAKI, 1996; LIU *et al.*, 2001; LIN; LIU, 2006a). O colágeno é uma proteína abundante em animais, localizado no tecido conjuntivo, representando aproximadamente 30% da proteína. Corresponde a um polímero formado pela agregação de monômeros de tropocolágeno, os quais são formados pela sequência glicina, prolina e hidroxiprolina, sendo suas extremidades ligadas a outros aminoácidos (BANNISTER; BURNS, 1972; PEREZ-TAMAYO, 1978).

O colágeno é um subproduto cárneo cujo bastante utilizado na produção de gelatina, usada amplamente como aditivo para melhorar a textura, a capacidade de retenção de água e a estabilidade dos alimentos (LI *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2012). Vários tipos de colágeno podem ser encontrados, sendo o tipo I o mais abundante em pele, tendões ligamentos e ossos, chegando a representar 90% da matéria seca (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002). Este tipo de colágeno constitui em um

biopolímero importante e tem sido amplamente utilizado em biomateriais, devido à sua excelente biocompatibilidade e propriedades biodegradáveis (LEE *et al.*, 2001). Em pés de frango, vários estudos comprovaram a predominância deste tipo de colágeno (LIU *et al.*, 2001; LIN; LIU, 2006a; LIN; LIU, 2006b; HASHIM *et al.*, 2014) nos extratos obtidos.

Para extrair o colágeno dos pés de frango, os métodos ácidos com hidrólise enzimática são os mais utilizados, sendo o ácido acético e a pepsina os experimentos com melhores rendimentos de extração, entretanto tais variáveis precisam ser melhores estudadas para se chegar às condições que maximizem o teor de colágeno e o rendimento de extração. O ácido acético intumesce e dissolve o tecido colagenoso para que haja uma melhor hidrólise enzimática (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Dentre as enzimas comerciais que podem ser utilizadas para hidrolisar o colágeno, a pepsina possui maior eficácia para hidrolisar pés e ossos de frango (CHENG *et al.*, 2008; LASEKAN *et al.*, 2013). A pepsina (EC 3.4.23.1) cliva as ligações peptídicas das proteínas pelo lado aminoterminal dos resíduos de aminoácidos cíclicos aromáticos, rompendo as longas cadeias polipeptídicas em peptídeos menores (WHITAKER, 1994). O pH em que a pepsina atua é de 1 a 4, na qual a maioria das enzimas ou proteínas sofre desnaturação (YAMAMOTO, 1975).

Recentemente, a hidrólise enzimática vem sendo utilizada também para produção de peptídeos, que constitui um meio eficaz para recuperar as proteínas a partir de subprodutos do processamento animal. A proteólise enzimática é leve e controlável, o que ajuda a melhorar a qualidade e as propriedades funcionais da proteína (DONG *et al.*, 2014; MORIMURA *et al.*, 2002). Os peptídeos hidrolisados podem ter diversas utilizações em alimentos, com funções importantes no organismo, chamado de peptídeos bioativos. Alguns estudos relatam o uso de peptídeos como redutores de pressão arterial (HARTMAN; MEISEL, 2007; JAMDAR *et al.*, 2010) e antioxidantes naturais (LI *et al.*, 2007); especialmente para aqueles que são derivados do colágeno (ZHANG *et al.*, 2007).

O colágeno extraído pode ser aplicado em alimentos para conferir propriedades tecnológicas e funcionais. Atualmente, podem ser encontrados no mercado aplicações de colágeno em barras de cereais para reduzir açúcar, em iogurtes para a redução de gordura, em sorvetes para conferir maior cremosidade, em bebidas para o

enriquecimento proteico e clarificação, em chocolates para a redução de gordura, e em bebidas para a clarificação, além de produtos de confeitaria e sobremesas. Em produtos cárneos, especialmente em embutidos, o colágeno é usado como revestimento, mas há poucos registros de aplicação em massas cárneas, seja para redução de gordura ou suplementação proteica (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016; GELITA, 2017, SOUSA et al., 2017).

Diante do conteúdo exposto, a pesquisa foi realizada enfocando-se inicialmente em um teste piloto para a otimização do processo de extração de colágeno de pés de frango utilizando extração com diferentes concentrações de ácido acético e pepsina por período de hidrólise de 12 a 36 horas. As frações de colágeno obtidas em ambos os experimentos foram analisadas em relação às suas propriedades físico-químicas e quanto às suas atividades funcionais e bioativas. O isolado obtido com maior rendimento de extração foi utilizado no processamento de salsichas Frankfurt de frango na redução de gordura, sendo este estudo dividido em caracterização do produto e estudo de vida de prateleira durante 42 dias de armazenamento refrigerado, visando observar o potencial antioxidante do colágeno extraído de pés de frango.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A AVICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO: MERCADO, PRODUTOS E SUBPRODUTOS GERADOS

A avicultura de corte no Brasil cresce a cada ano, e os fatores para este crescimento são vários. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), é o setor produtivo responsável por 1,5% do PIB brasileiro, gerando cerca de 5 milhões de empregos diretos e indiretos e detendo 40% do mercado mundial de carne de frango. Devido ao seu baixo custo comparada a outras carnes, como a bovina, por exemplo, seu consumo no país é crescente, chegando em 2013 a 42 kg/habitante/ano (ABPA, 2014).

Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), nas últimas três décadas a avicultura brasileira apresentou altos índices de crescimento. Seu bem principal, o frango, conquistou os mais exigentes mercados, se tornando líder em exportação. Em 2015, a produção brasileira de carne de frango totalizou 13,15 milhões de toneladas, volume 3,58% superior ao registrado no ano de 2014. Tal produção fez o país ser consolidado como segundo maior produtor de carne de frango do mundo, superando a China. Outras aves, como peru e avestruz, também têm se destacado nos últimos anos, contribuindo para diversificar a pauta de exportação do agronegócio brasileiro (BRASIL, 2014; ABPA, 2016).

No Brasil, a maior produção de carne de frango se concentra na região Sul, especialmente nos Estados do Paraná e Santa Catarina (ABPA, 2014). Fatores como qualidade, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor. O Brasil buscou modernização e empregou instrumentos como o manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. A parceria entre indústria e avicultores também contribuiu para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, resultando em reduzidos custos de transação e na qualidade, que atende às demandas de todo o mundo (BRASIL, 2014).

A carne de frango se tornou a mais consumida pelos brasileiros. Entre outros motivos, destacam-se o aumento do preço da carne bovina e a consolidação do frango como uma das proteínas favoritas do consumidor. A razão desta preferência se dá pelo fato desta carne ser considerada uma opção saudável para a dieta pelo seu alto teor de proteínas (15 a 20%), de aminoácidos essenciais, sais minerais e vitaminas, além de ser

mais macia e de melhor digestibilidade do que a carne vermelha (ALEXANDRAKIS et al., 2009; KHULAL et al., 2016).

Juntamente com o aumento da produção e comercialização da carne de frango, muitos subprodutos provenientes do abate são gerados, dos quais se destacam a pele, a gordura e a carne mecanicamente separada (CMS). Estes podem ser utilizados na produção de embutidos cárneos, enquanto subprodutos como cartilagem, ossos, cabeça e pés são empregados na maioria das vezes na produção de ração animal (EMBRAPA, 2007). Entretanto, alguns deles possuem alto valor biológico, apresentando maior potencial de aproveitamento, o que poderia ser pesquisado e incorporado em produtos de maior valor agregado.

Os pés de frango contêm tendões e ligamentos em sua estrutura, apresentando em sua composição cerca de 85% de proteína, essencialmente colágeno, e 2,7% de gordura (TANAKA; SHIMOKOMAKI, 1996; LIU *et al.*, 2001). O colágeno é uma proteína fibrosa com uma estrutura em tripla hélice, insolúvel, podendo ser convertido à gelatina, ficando solúvel através de hidrólise (LEE et al., 2015). Uma vez extraído, o colágeno pode ser aplicado em diversas preparações, alimentícias ou farmacêuticas. Almeida et al. (2012) desenvolveram geleia a partir da gelatina extraída dos pés de frango. Lee et al. (2015) desenvolveram um filme proteico a partir de pés de frango e óleos essenciais, e observaram que tal filme conferiu segurança microbiológica e preservação da qualidade no revestimento de queijos.

2.2 ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE COLÁGENO

O colágeno representa uma grande parte das proteínas fibrosas, sendo de fundamental importância aos seres vivos, desde o suporte estrutural em células e tecidos de mamíferos e invertebrados até a função de locomoção. As fibras de colágeno são essencialmente inextensíveis e portanto, promovem força e permitem flexibilidade em vários órgãos (BAILEY, 1998).

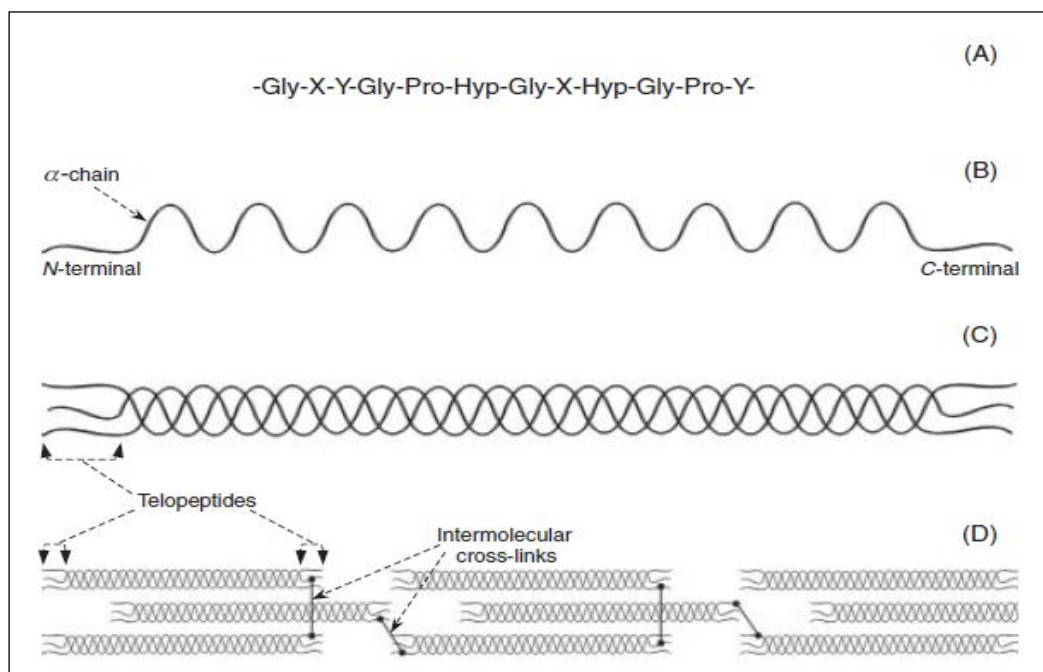
O termo colágeno é tipicamente usado para abranger uma grande família de proteínas distintas, cada uma com estruturas específicas, funções, e distribuições nos tecidos na matriz extracelular. O monômero do colágeno é uma proteína cilíndrica longa, com cerca de 2800 Å de comprimento e 14-15 Å de diâmetro (FENNEMA, 2010). Esta proteína é formada a partir do tropocolágeno, uma proteína que consiste em

três polipeptídeos, denominados de cadeias α , as quais se entrelaçam formando uma estrutura de tripla hélice.

A molécula de colágeno apresenta três α -cadeias entrelaçadas, chamadas de tripla hélice. Esta estrutura particular, é estabilizada principalmente por pontes de hidrogênio intra e inter-cadeias. As cadeias polipeptídicas desta estrutura primária têm, cada uma, a sequência repetida glicina-prolina-hidroxiprolina-glicina-[outro aminoácido]. Foi observado que uma em cada três cadeias apresenta composição de aminoácidos diferente das outras duas, sendo estas chamadas de α_1 e α_2 (LAWRIE; LEDWARD, 2006; ICHIKAWA et al., 2010; DONG et al., 2013).

Cada cadeia α forma uma hélice para o lado esquerdo, e as três cadeias entrelaçam entre si para o lado direito, sendo mais estável que uma cadeia separada (WONG, 1989). Na Figura 1 está apresentada a molécula de colágeno e suas fibrilas, polipeptídeos e sequência de aminoácidos da cadeia.

Figura 1 - Arranjo de fibrilas em fibras de colágeno. A: Sequência de aminoácidos de um polipeptídeo; B: Polipeptídeo de colágeno; C: Tropocolágeno; D: Colágeno. Fonte: Simpson et al. (2012).



A estrutura em tripla hélice da molécula de colágeno é estabilizada por pontes de hidrogênio, decorrente da repetição dos aminoácidos Glicina – Prolina – Hidroxiprolina. A prolina e a hidroxiprolina são dois iminoácidos específicos do colágeno e responsáveis pela estrutura em hélice de cada cadeia, devido por sua estrutura conter

anéis que, por meio de impedimento estérico, forçam a cadeia a formar a hélice e são orientadas para fora. O grupo hidroxila da hidroxiprolina é o principal responsável pelas pontes de hidrogênio. A glicina é orientada para o centro de cada hélice e, por não ter nenhum impedimento estérico permite que as três cadeias se entrelacem fortemente em sua forma final, possuindo um núcleo hidrofóbico (USHIKI, 2002; OKUYAMA et al. 2012; FERRARO et al., 2016).

Na estrutura do colágeno, em cada cadeia estão contidos terminais com peptídeos de cadeia curta, chamados de telopeptídeos. Tais estruturas contêm cerca de 25 aminoácidos no terminal carboxílico e 16 resíduos no terminal amino. Os telopeptídeos não conseguem se entrelaçar em tripla hélice por causa da presença da lisina e da hidroxilisina, aminoácidos muito maiores quando comparados aos da sequência Gli-Pro-HyPro (LIU et al., 2015; FERRARO et al., 2016).

Apesar de não promover o entrelaçamento das cadeias em hélices, os telopeptídeos representam uma função importante no colágeno, pois foi observado que é nesta região que se formam as ligações cruzadas (*cross-linking*). No espaço extracelular, moléculas de colágeno alinham-se em microfibrilas, em arranjo quaternário. A ligação cruzada é iniciada e as fibrilas de maior diâmetro são formados através da adição de microfibrilas ou por associação com outras fibras. O *cross-linking* ocorre nos telopeptídeos por desaminação oxidativa da lisina e da hidrolisina, devido à enzima lisil oxidase. Como resultado, são formadas ligações trivalentes, tendo como consequência fibrilas de colágeno em estado sólido ou fracamente solúveis. Durante o envelhecimento, as fibras de colágeno são estabilizadas principalmente por ligações covalentes *crosslinkings*, as quais conferem resistência mecânica à fibra (BAILEY; SHIMOKOMAKI, 1971; BELITZ et al., 2004; GOMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Ao longo do envelhecimento do animal, por ação da enzima lisil oxidase, as ligações cruzadas formadas na molécula de colágeno passam de imaturas para maduras. Como composto de ligação cruzada imaturo tem-se a hidroxil-lisil-ceto-norleucina (HLKNL), sendo aos poucos transformada em compostos maduros. Dentre esses, a piridinolina (PYR) representa a principal forma de ligação cruzada madura derivada de dois HLKN, que estabiliza a molécula de colágeno (ROBINS et al., 2002).

O aumento de piridinolina ao longo da vida do animal está relacionado com a estabilidade das moléculas de colágeno, e consequentemente com a textura da carne e a

insolubilidade do colágeno. O tempo de transformação total dos compostos imaturos em maduros variam de acordo com a espécie. Bailey e Shimokomaki (1971) concluíram em um estudo sobre mudança de compostos de ligações cruzadas redutíveis que para tecidos humanos, a maturidade do colágeno acontece entre 17 e 20 anos e em bovinos ocorre entre 4 e 5 anos. Coró et al. (2002) estudaram as mudanças com relação à formação de piridinolina e à textura da carne com a idade em peito de frangos, e verificaram que a concentração de piridinolina aumentou 4,5 vezes entre 20 e 40 dias de idade, consequentemente diminuindo sua solubilidade.

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E HIDRÓLISE DE COLÁGENO E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

O colágeno é uma proteína estrutural de fundamental importância para os vertebrados, chegando a representar 30% da proteína total contida no organismo, estando presente em tendões, pele, ossos, cartilagens, entre outras estruturas. Tem ampla utilização na área clínica e cosmética, aos poucos sendo inserida na indústria de alimentos. A depender da espécie ou da modificação física ou química que a molécula sofre, existem diferenças nas suas propriedades físicas e químicas (BANNISTER; BURNS, 1972; CHEN et al., 2016; LIN; LIU, 2006a).

O colágeno é uma das poucas proteínas que contêm grandes quantidades de hidroxiprolina. É um subproduto de baixo custo cujo produto principal é uma gelatina, usada extensivamente como um aditivo alimentar para aumentar a textura, a capacidade de retenção de água e a estabilidade de diversos produtos alimentares (LAWRIE; LEDWARD, 2006; LI et al., 2007). Em outras proteínas, este aminoácido apresenta-se em teores insignificantes. Por isso, a determinação de hidroxiprolina é utilizada como uma medida do teor de colágeno em alimentos (SIMPSON *et al.*, 2012).

Cada cadeia α da molécula de colágeno é específica para um tipo particular de colágeno. Atualmente, foram descobertos 29 tipos de colágeno e 47 diferentes tipos de cadeias, de acordo com o Quadro 1. Do total, sete tipos diferentes de colágenos fibrilares são conhecidos: I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII. Os tipos I e II são abundantes em tecidos conectivos (colágenos principais), enquanto os demais estão normalmente envolvidos na formação de fibrilas (OMELYANENKO et al., 2013).

Quadro 1 – Tipos de colágeno, cadeias polipeptídicas, fórmulas e localização no organismo

Tipos	Cadeias polipeptídicas	Fórmula molecular	Localização
<i>Colágenos formadores de fibrilas</i>			
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I),$	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I),$	Distribuído em tecidos sólidos e moles, a proteína básica em ossos, derme, tendões, músculo (epimísio)
II	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$, ver também tipo XI	Tecido cartilaginoso hialino, humor vítreo, núcleo pulposo do disco intervertebral
III	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	Tecidos moles, paredes de órgãos ocos; distribuído em período embrionário.
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V),$ $[\alpha 1(V)]_2 \alpha (V),$	Tecidos moles, paredes de vasos sanguíneos, placenta, córion; $\alpha 2(V)$ pode substituir $\alpha 2(XI)$ no humor vítreo
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 1(II)$	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 1(II),$ $\alpha 1(XI)\alpha 2(V)\alpha 1(II)$	Tecido cartilaginoso hialino, humor vítreo
XXIV	$\alpha 1(XXIV)$	$[\alpha 1(XXIV)]_3$	Tecido ósseo e córnea embrionária
XXVII	$\alpha 1(XXVII)$	$[\alpha 1(XXVII)]_3$	Tecido cartilaginoso hialino
<i>Colágenos não fibrilares</i>			
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Tecido cartilaginoso hialino, humor vítreo, núcleo pulposo do disco intervertebral
XII	$\alpha 1(XII)$	$[\alpha 1(XII)]_3$	Tecidos fibrosos, tecido ósseo
XIV	$\alpha 1(XIV)$	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Tecidos fibrosos
XVI	$\alpha 1(XVI)$	$[\alpha 1(XVI)]_3$	Variada
XIX	$\alpha 1(XIX)$	$[\alpha 1(XIX)]_3$	
XX	$\alpha 1(XX)$	$[\alpha 1(XX)]_3$	
XXI	$\alpha 1(XXI)$	$[\alpha 1(XXI)]_3$	Músculos cardíaco e esquelético, estômago, rins, placenta
XXII	$\alpha 1(XXII)$	$[\alpha 1(XXII)]_3$	Músculos cardíaco e esquelético, derme

<i>Colágenos da membrana basal</i>			
IV	$\alpha 1(\text{IV}), \alpha 2(\text{IV}), \alpha 3(\text{IV}), \alpha 4(\text{IV}), \alpha 5(\text{IV}), \alpha 6(\text{IV})$	$[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV}) [\alpha 3(\text{IV})]_2 \alpha 4(\text{IV}) [\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 3(\text{IV})_3$	Várias membranas basais
<i>Colágenos de cadeia curta</i>			
VIII	$\alpha 1(\text{XXI})$	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	Músculos cardíaco e esquelético, estômago, rins, placenta
X	$\alpha 1(\text{X})$	$[\alpha 1(\text{X})]_3$	Zona hipertrófica de cartilagens epifisárias
<i>Colágeno de fixação das fibrilas</i>			
VII	$\alpha 1(\text{VII})$	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	Fibrilas na borda da derme e epiderme
<i>Colágenos de microfibrilas</i>			
VI	$\alpha 1(\text{VI}), \alpha 2(\text{VI}), \alpha 3(\text{VI}), \alpha 4(\text{VI}), \alpha 5(\text{VI}), \alpha 6(\text{VI})$	vários heterotrímeros	Microfibrilas em diferentes tecidos
XXVIII	$\alpha 1(\text{XXVIII})$	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$	Principalmente nervos periféricos; ossos do crânio
XV	$\alpha 1(\text{XV})$	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	Células do endotélio
<i>Multiplexins</i>			
XVIII	$\alpha 1(\text{XVIII})$	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	Células do endotélio
<i>Colágenos de transmembrana</i>			
XIII	$\alpha 1(\text{XIII})$	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	Membranas celulares
XVII	$\alpha 1(\text{XVII})$	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	Membrana celular da epiderme
XXIII	$\alpha 1(\text{XXIII})$	$[\alpha 1(\text{XXIII})]_3$	Coração, retina, alguns tumores
XXV	$\alpha 1(\text{XXV})$	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$	Junto com as fibrilas amilóides na doença de Alzheimer

Fonte: Shimokomaki *et al.*, (1990); Belitz *et al.* (2004); Omelyamenko *et al.* (2013).

Dentre os variados tipos de colágeno, o tipo I é o mais abundante, sendo o principal componente das estruturas fibrilares. É o componente principal do tecido

conjuntivo de mamíferos, podendo ser processado de várias formas, seja como gel, esponja, fibra ou como película na engenharia têxtil. O colágeno do tipo I tem sido amplamente extraído e isolado a partir de vários animais, incluindo pés de aves. Já o colágeno do tipo II está mais relacionado na diferenciação de cartilagens (DURAN et al., 2015; LIN; LIU, 2006b).

Para extrair o colágeno, diversas estratégias podem ser utilizadas, sendo os métodos mais conhecidos o tratamento térmico e a hidrólise enzimática. O primeiro extrai o colágeno com a aplicação de altas temperaturas, o que leva a sua desnaturação, transformando em gelatina. Tal produto extraído tem ampla aplicação na indústria de alimentos, pela sua capacidade de formação de gel, podendo ser aplicado como espessante, estabilizante ou retentor de umidade em doces, produtos de panificação, produtos cárneos, sorvetes e laticínios (SELVAKUMAR et al., 2012; TOLDRÁ et al., 2012).

A técnica de extração de colágeno por hidrólise enzimática faz-se a utilização de uma enzima protease, geralmente empregada para obter colágeno solúvel quando combinada a uma temperatura elevada. O tratamento com pepsina a 4°C é utilizado para a produção de colágeno nativo, que é insolúvel em água e mais difícil de digerir (LIN et al., 2010; SELVAKUMAR et al., 2012).

Nos estudos mais recentes, tem sido comum o emprego de ácidos orgânicos combinados com enzimas. Dentre os ácidos orgânicos já estudados, o ácido acético é considerado como o solvente mais promissor na extração de colágeno a partir de diferentes fontes. A solubilidade de colágeno em solução ácida desempenha um papel fundamental na eficiência da extração, pois o aumento dos íons H^+ melhora o acesso de água para as fibras de colágeno (HASHIM et al., 2014; KIEW; MAT DON, 2013).

Dentre as proteases utilizadas na extração de colágeno, a pepsina (EC 3.4.23.1) tem sido a mais utilizada. A pepsina é uma protease ácida produzida pela mucosa do estômago, com pH ótimo para sua atividade entre 1,0 e 4,0, apresentando baixa especificidade, embora prefira ligações entre aminoácidos hidrofóbicos. É formada por uma única cadeia de 321 aminoácidos, com peso molecular de 35 kDa, podendo ser inativada em pH superior a 6,0 (DAMODARAN, 1996; KIM, 2013).

No processo de hidrólise enzimática, a pepsina é necessária para digerir os sítios de ligações cruzadas da proteína, porque a estrutura de tripla hélice protege o colágeno da ação enzimática (SIMÕES et al., 2014). A atividade da enzima pode ser aumentada em pH baixo e temperatura próxima à do corpo humano. Entretanto, em várias pesquisas a extração de colágeno se limitaram a baixas temperaturas e curto tempo de exposição, a fim de manter a integridade da molécula (LIN; LIU, 2006a). Logo, na extração a 4°C é possível obter o colágeno nativo, enquanto que em temperaturas maiores o colágeno vai sendo hidrolisado.

Liu et al., (2001), ao estudar as condições ótimas de extração de colágeno em pés de frango, utilizou em suas condições ácidos a 5% (acético, clorídrico, hidrolórico e láctico) e diferentes tempos (12, 24, 36 e 48 horas), verificaram que a melhor condição de extração ocorreu com 5% de ácido láctico no tempo de 36 horas.

Saiga et al., (2008) extraiu o colágeno de pés de frango através da fervura, centrifugação e tratamento do sobrenadante com uma protease específica oriunda do *Aspergillus oryzae*, a fim de estudar as propriedades anti-hipertensivas do colágeno obtido hidrolisado, e verificaram que o material extraído pode ser facilmente incorporado na dieta humana. Lin e Liu, (2006a), ao comparar as propriedades de colágeno do tipo I de diferentes espécies, extraiu o colágeno de pés de frango na temperatura de 4°C, sendo estes previamente desengordurado, centrifugado e tratado com 5% de pepsina. Foi verificado que nas condições citadas o colágeno obtido apresentou alta estabilidade térmica, sendo adequado para a preparação de biomateriais estáveis, biocompatível com colágeno.

Em um estudo para determinar tipos de colágeno em carne de frango desossada mecanicamente, Tanaka e Shimokomaki (1996) realizaram a digestão com pepsina a 4°C para identificar os tipos I, II, III e V, e observaram que o tipo I foi o principal componente. A atividade da pepsina aumenta em baixo pH e temperatura ambiente. Várias condições podem perturbar a integridade das cadeias de colágeno, portanto a maioria dos estudos recentes utilizam baixas temperaturas e curto tempo de exposição (LIN; LIU, 2006a; NOMURA et al., 1996).

Ao avaliar as condições ótimas de extração de colágeno em túnica albugínea suína, Simões et al., (2014) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de ácido acético, de pepsina e diferentes tempos de hidrólise, e verificaram a que o isolado obtido

com maior teor de colágeno ocorreu nas seguintes condições: 0,83 mol/L de ácido acético, 0,24% de pepsina e 28 horas de hidrólise. Além disso, foi observado que o colágeno isolado apresentou um perfil de aminoácidos e propriedades químicas e funcionais adequados para uso em produtos à base de carne emulsionada.

Outros benefícios observados na hidrólise proteica são a formação de peptídeos bioativos. Estes são assim chamados por exercerem benefícios à saúde dos consumidores e à estabilidade dos produtos em que estes são aplicados através de funções biológicas (LAFARGA; HAYES, 2014; TOLDRÁ et al., 2012). Propriedades antioxidantes, antimicrobianas, quelantes de minerais, anticoagulantes e hipocolesterolêmicas e anti-hipertensivas (ECA) têm sido reportadas em diferentes hidrolisados (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Em um estudo com hidrolisados de fígado de frango obtidos por via fermentativa (*Pediococcus acidilactici*) e enzimática (alcalase), Chakka et al. (2015) determinaram a atividade antioxidante total e a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos. Foi observado que o hidrolisado obtido por via enzimática apresentou atividade antioxidante superior ao hidrolisado fermentado. Quanto à atividade antimicrobiana, verificou-se que o hidrolisado obtido por fermentação teve forte atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, enquanto o hidrolisado obtido por via enzimática apresentou inibição moderada contra *Micrococcus luteus*. Tais resultados atestam a utilização dos subprodutos de aves para fins biofuncionais.

2.4 APLICAÇÃO DE COLÁGENO EM ALIMENTOS

O colágeno pode ser aplicado em diversos alimentos, sendo importante pelas funções biológicas que podem apresentar, como antimicrobiana, quelante de minerais, antioxidantes, entre outras funções (GOMEZ-GUILLEN et al., 2011; TOLDRÁ et al., 2012). Na indústria de alimentos, pode ser utilizado por apresentar propriedades de formação de gel, retenção de água, emulsificantes, espessantes e de formação de filmes (HASHIM et al., 2015). Por estas razões, possui ampla utilização nos mais diversos tipos de produtos, incluindo produtos de confeitaria, sobremesas, produtos lácteos, bebidas e produtos cárneos (GELITA, 2017).

Em produtos de confeitaria, o colágeno é frequentemente utilizado na forma de gelatina. Segundo Edwards (2015), é um dos agentes de gelificação mais versáteis, sendo aplicados em recheios de tortas, sorvetes e sobremesas geladas, mantendo a textura dos produtos como agente gelificante. Além disso, pode ser aplicado como formador de espuma ou como camada selante na finalização destes produtos.

Em um estudo com queijos do tipo minas frescal *light*, Silva (2011) aplicou colágeno hidrolisado para verificar propriedades sensoriais e de textura com a redução de gordura e observaram boa aceitação sensorial, próximas ao conceito “Gostei moderadamente”, além de um perfil de textura semelhante ao padrão, com 25% de redução de gordura. Gerhardt et al. (2013) analisaram as características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas adicionada de soro de ricota e colágeno hidrolisado e observaram que a adição de colágeno hidrolisado diminuiu o índice de sinerese e sedimentação das amostras de bebida láctea fermentada, melhorando sua estabilidade.

A fim de conferir propriedades funcionais, o colágeno tem sido também aplicado em bebidas. Bilek e Bayram (2015) desenvolveram bebidas mistas de laranja, uva e maçã com adição de 2,5% colágeno hidrolisado de peixe e verificaram que as bebidas além de apresentarem aumento significativo no conteúdo proteico também foram preferidas no ponto de vista sensorial. Yamanaka et al. (2017) estudaram o uso de suplementos nutricionais com uso de peptídeos de colágeno para o preparo de bebidas e sua relação com a cura de úlceras e observaram que as bebidas que tinham adição do colágeno facilitaram a cicatrização da úlcera, uma vez que a bebida contendo tais peptídeos levou a mais mudanças nos escores DESIGN-R.

Em produtos cárneos, estudos com aplicação de colágeno têm sido desenvolvido visando principalmente suas propriedades tecnológicas. Ham et al. (2016) desenvolveram salsichas fermentadas com substituição de gordura por uma mistura de colágeno e fibra dietética e observaram que, além da consequente diminuição do conteúdo lipídico, o uso de colágeno e fibra reduziu a oxidação lipídica e manteve as propriedades sensoriais durante o armazenamento. Palamutoglu e Sariçoban (2016) adicionaram colágeno de peixe hidrolisado e encapsulado em salsichas fermentadas turcas e observaram que as salsichas adicionadas de colágeno encapsulado apresentaram maior atividade antioxidante durante 28 dias de armazenamento. Sousa et al. (2017)

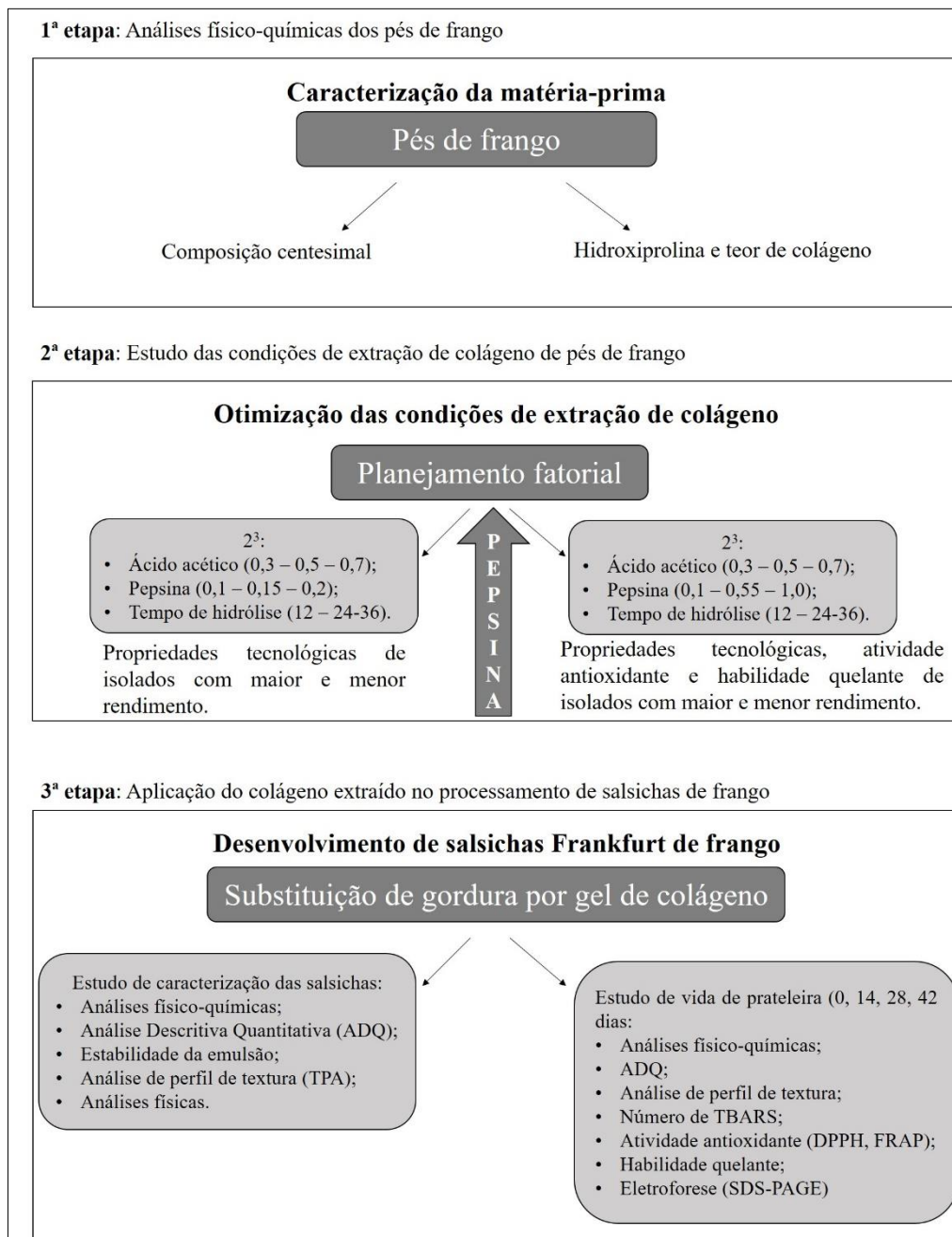
adicionaram colágeno hidrolisado em vários níveis de substituição de gordura em salsichas do tipo Frankfurt de frango e verificaram que a substituição de 50% de gordura por colágeno manteve as características físico-químicas, físicas e de textura, especialmente a capacidade retenção de água.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo de valorização dos pés de frango como potencial pra extração de colágeno foi dividido em três etapas, conforme esquema apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de delineamento de estudo de valorização de pés de frango para obtenção de colágeno e utilização em salsichas de frango



O estudo foi dividido em três etapas, onde a primeira consistiu nas análises da matéria-prima. Posteriormente, a segunda etapa consistiu na otimização das condições de extração de colágeno. A última etapa diz respeito à aplicação do colágeno obtido nas condições ótimas em salsichas Frankfurt de frango como substituto de gordura, avaliando a caracterização dos produtos e a estabilidade durante 42 dias de armazenamento refrigerado.

Os pés de frango foram adquiridos em frigoríficos do município de João Pessoa, com idade entre 42 e 47 dias. A pepsina suína (EC 3.4.23.1), acrilamida, bis-acrilamida, radical ABTS (2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)), reagente TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-s- triazine), ferrozina, cloreto de ferro III (FeCl₃), utilizados na extração e nas análises foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O reagente padrão L-hidroxiprolina foi adquirido pela empresa Merck (Darmstadt, Germany). Todos os reagentes utilizados na pesquisa foram de grau analítico ou do teor mais alto de pureza disponível. Foi utilizada água ultra-pura para o preparo de todas as soluções.

A extração de colágeno e suas análises posteriores foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas de Alimentos e Laboratório de Flavour, do Departamento de Engenharia de Alimentos, e no Laboratório de Proteômica Estrutural, do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba. O processamento das salsichas foi realizado no Laboratório de Processamento de Produtos Cárneos da Universidade Federal da Paraíba – Campus III/Bananeiras.

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

Foram determinados o teor de umidade, cinzas, proteínas, além do teor de colágeno, através da análise da hidroxiprolina dos pés de frango *in natura*, conforme metodologia proposta pela AOAC, (2007). O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Folch *et al.* (1957). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COLÁGENO

3.2.1 Experimento piloto: planejamento fatorial 2^3

Foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 , com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente, conforme Tabela 1. As variáveis independentes investigadas foram: concentração de ácido acético em mol/L (X_1), % de pepsina (X_2) e tempo de hidrólise enzimática em h (X_3). As variáveis resposta avaliadas foram o teor de colágeno (Y_1) obtido (g/ 100g de colágeno obtido), através da quantificação da hidroxiprolina (AOAC, 2007).

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2^3 para otimização do processo de extração e obtenção de colágeno de pés de frango

Ensaios	Ácido acético (mol/L) (X_1)	Pepsina (%) (X_2)	Tempo de hidrólise (h) X_3 (x_3)
1	0,3 (-1)	0,1 (-1)	12 (-1)
2	0,7 (+1)	0,1 (-1)	12 (-1)
3	0,3 (-1)	0,2 (+1)	12 (-1)
4	0,7 (+1)	0,2 (+1)	12 (-1)
5	0,3 (-1)	0,1 (-1)	36 (+1)
6	0,7 (+1)	0,1 (-1)	36 (+1)
7	0,3 (-1)	0,2 (+1)	36 (+1)
8	0,7 (+1)	0,2 (+1)	36 (+1)
9	0,5 (0)	0,15 (0)	24 (0)
10	0,5 (0)	0,15 (0)	24 (0)
11	0,5 (0)	0,15 (0)	24 (0)

A partir de cada função resposta, foram calculados os efeitos das variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3) e suas interações, por meio de modelo de regressão linear. Para ajustar tal modelo aos dados obtidos foi realizada ANOVA e determinado o valor de R^2 . Foi utilizado como ferramenta estatística o software STATISTICA 5.0 (STATSOFT, 2004).

3.2.2 Segundo experimento para extração de colágeno: planejamento fatorial 2^3

Diante da necessidade observada de ampliar os limites das variáveis independentes em estudo, foi realizado um novo processo de extração, com modificações no intervalo da variável concentração de pepsina (X_2), conforme observado na Tabela 2. Foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 , com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente. As variáveis independentes e as variáveis resposta, bem como a análise dos dados, foram as mesmas citadas na etapa 3.2.1.

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^3 para a segunda otimização do processo de extração e obtenção de colágeno de pés de frango

Ensaio	Ácido acético (mol/L) (X_1)	Pepsina (%) (X_2)	Tempo de hidrólise (h) X_3 (x_3)
1	0,3 (-1)	0,1 (-1)	12 (-1)
2	0,7 (+1)	0,1 (-1)	12 (-1)
3	0,3 (-1)	1,0 (+1)	12 (-1)
4	0,7 (+1)	1,0 (+1)	12 (-1)
5	0,3 (-1)	0,1 (-1)	36 (+1)
6	0,7 (+1)	0,1 (-1)	36 (+1)
7	0,3 (-1)	1,0 (+1)	36 (+1)
8	0,7 (+1)	1,0 (+1)	36 (+1)
9	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)
10	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)
11	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)

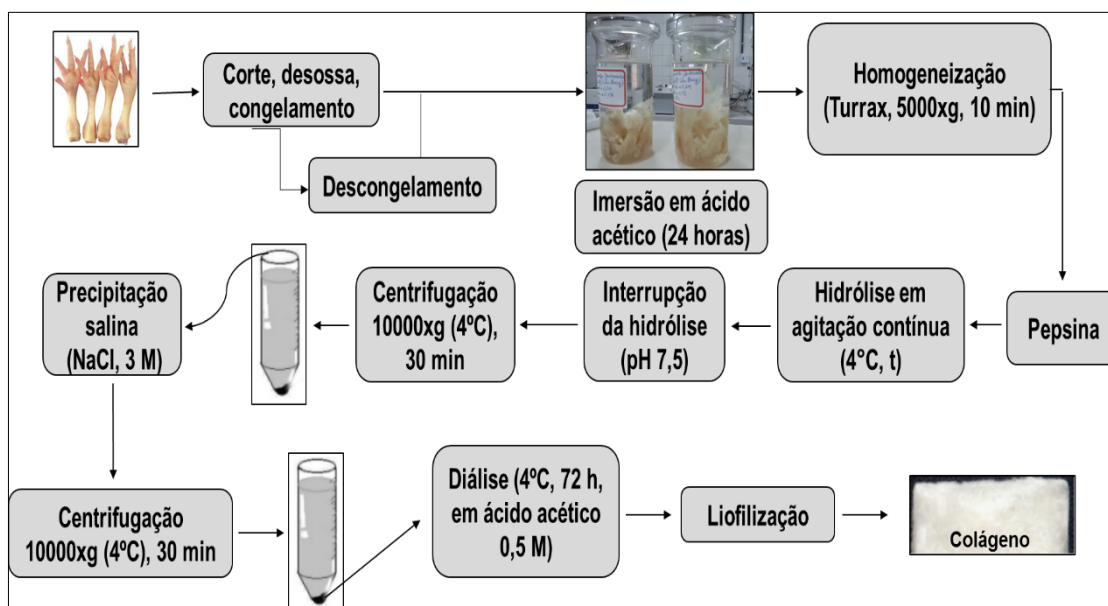
3.2.3 Processo de extração de colágeno em pés de frango

Os pés de frango desossados foram descongelados, moídos e submetidos à extração com ácido acético e pepsina conforme descrição de Shimokomaki *et al.* (1981) e Simões *et al.* (2014), com modificações. Foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 , com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente (Tabelas 1 e 2). As variáveis independentes investigadas foram: concentração de ácido acético em mol/L (X_1), % de pepsina (X_2) e tempo de hidrólise enzimática em h (X_3). As variáveis resposta avaliadas foram o teor de colágeno (Y_1) obtido (g/ 100g de colágeno obtido), através da quantificação da hidroxiprolina (AOAC, 2007).

O processo de extração está esquematizado na Figura 3. Os pés de frangos foram imersos em uma solução de ácido acético (X_1) por 24 h na proporção de 1:10 (p/v) em

concentrações que variaram de acordo com o planejamento fatorial (Tabela1). Em seguida, o material foi homogeneizado em *turrax* por 10 min a 5000 x g e obtido um material homogêneo. Na etapa de hidrólise, foi adicionada a pepsina (X_2) e estabelecido o tempo de hidrólise em h (X_3) conforme o planejamento fatorial (Tabela 1), mantidos à 4°C com agitação contínua.

Figura 3 – Esquema de extração de colágeno de pés de frango



Para interromper o processo de hidrólise, o pH foi elevado para 7,5 e centrifugado por 30 min a 10000 g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi precipitado com NaCl até concentração de 3 mol/L e centrifugado a 10000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi dialisado com solução de ácido acético 0,5 mol/L por 72 h, com troca diária de solução. O precipitado dialisado foi liofilizado e assim obtido o colágeno, utilizado para determinação da função-resposta Y_1 .

3.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS DOS ISOLADOS DE COLÁGENO

3.4.2 Perfil de aminoácidos

Todos os tratamentos da Tabela 1 foram submetidos a análise do perfil de aminoácidos conforme metodologia adaptada de White et al., (1986). As amostras foram submetidas a hidrólise ácida, derivatização, ressuspensão e injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), com fase móvel A tampão acetato e B acetonitrila a 60 %. Foram injetados 20 µL de cada amostra, inserida manualmente em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (VARIAN, Waters 2690, Califórnia, USA), acoplado com uma coluna C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). Foi utilizada como fase móvel A o tampão acetato de sódio com concentração 0,0011g/mL e pH 6,4, e a fase móvel B uma solução de acetonitrila a 60 %. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 254 nm, à temperatura de 35°C e fluxo de 1mL/min. Todos os tratamentos foram injetados em triplicata. Para quantificar os aminoácidos, foi elaborada uma curva padrão (padrão Sigma-Aldrich/código-AAS18). Para completar o perfil de aminoácidos, foi realizada por espectrofotometria a determinação de hidroxiprolina (AOAC, 2007), pois tal aminoácido (iminoácido) não pode ser quantificado na cromatografia devido à sua degradação no preparo da amostra.

3.4.3 Análise de hidrofobicidade dos peptídeos

A análise dos peptídeos dos isolados de colágeno por separação através da hidrofobicidade foi realizada no pé de frango e nas amostras de colágeno extraídas conforme a Tabela 1, de acordo com a metodologia utilizada por Bezerra et al. (2016), utilizando coluna Nova-Pak C18 (4,6 m x 250 mm, 4 µm de tamanho de partícula, cartridge, (Waters, Irlanda), conectada a um CLAE (Varian, Waters 2690, Califórnia, EUA). O volume de injeção do extrato solúvel (0,2 g/mL) foi 20 µL e a fase móvel foi constituída em: Eluente A (água ultra-pura à 1% de ácido trifluoroacético) e Eluente B (acetonitrila à 1% de ácido trifluoroacético). Um gradiente linear do eluente (A) e eluente (B) foi aplicado durante 60 minutos em fluxo de 1 mL / minuto e a detecção foi realizada a 218 nm.

3.4.4 Perfil eletroforético (SDS-PAGE)

Todos os isolados de colágenos obtidos das diversas condições de extração (Tabela 1) foram submetidos a eletroforese com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), corados com Comassie Brilhante Azul (LAEMMLI, 1970; TANAKA; SHIMOKOMAKI, 1996; VULCANI, 2004). A concentração de polimerização do gel de resolução foi de 7,5% e o de empilhamento foi de 4%.

As amostras foram preparadas segundo a metodologia Wang et al. (2007), onde estas foram dissolvidas em tampão de fosfato de sódio a 0,02 M (pH 7,2) a uma concentração final de 0,1% (m/v). Em seguida, os isolados dissolvidos foram misturados com o tampão de amostra com β -mercaptoetanol, na proporção de 1: 1 (v/v). As amostras foram aquecidas em banho seco a 60°C por 15 min, posteriormente resfriadas e aplicadas no gel de poliacrilamida. Para estimar o peso molecular das cadeias, foi utilizado o marcador de peso molecular 12–225 kDa (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

As condições de corrida foram inicialmente 20 mA de corrente e 50 V, até a completa migração das amostras do gel de empilhamento para o gel de resolução, quando houve o aumento da corrente para 30 mA e da voltagem para 125 V. O tempo médio de corrida foi de aproximadamente 4 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado com Comassie Brilhante Azul G-250 0,1%, descorado com solução de água destilada, metanol e ácido acético (8:1:1 v/v/v).

3.4.5 Determinação das propriedades tecnológicas

Os isolados de colágeno foram submetidos às seguintes análises: solubilidade em água a 70°C, de acordo com metodologia de Timpl *et al.* (1975); capacidade de retenção de água (CRA) a 60°C segundo metodologia de Montero *et al.* (1995); e capacidade emulsificante (CE), adaptado das metodologias de Dench *et al.* (1981) e Kim e Park (2005), na qual o colágeno em uma solução salina 3,5% (1:20) foi adicionada de 100 mL de óleo de milho e agitada por 1,5 minutos. A emulsão formada foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e a capacidade emulsificante foi calculada como a relação percentual entre a altura da camada emulsificada e a altura total do líquido no tubo. Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata.

3.4.6 Atividade antioxidante e habilidade quelante

3.4.6.1 Atividade antioxidante: método DPPH

O efeito de captura do radical DPPH pelos isolados de colágeno foi analisado conforme metodologia adaptada de Chandini et al. (2008) e Chakka et al. (2015), onde foi utilizada as amostras de colágeno dissolvidas em etanol para reagir com uma solução de DPPH em etanol. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto e logo após repousada em temperatura ambiente longe do abrigo da luz. A absorbância das amostras foi lida a 517 nm em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). A capacidade de capturar o radical DPPH foi calculada pela equação:

$$\text{Atividade de captura (\%)} = [1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco da amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

3.4.6.2 Atividade antioxidante: método ABTS

Os isolados de colágeno foram submetidos à análise de captura do radical ABTS de acordo com a metodologia proposta por Rufino et al. (2007), na qual foram dissolvidos em etanol e misturados a uma solução de ABTS em etanol e persulfato de amônio. A mistura foi homogeneizada e repousadas em temperatura ambiente longe do abrigo da luz por 6 minutos. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 734 nm, em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). A capacidade de capturar o radical ABTS foi obtida pela equação:

$$\text{Atividade de captura (\%)} = [1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco da amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

3.4.6.3 Atividade antioxidante: poder de redução pelo método FRAP

Os isolados de colágeno foram submetidos à determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Ability Power), de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996) e Pulido et al. (2000), na qual uma alíquota de amostra foi colocada para reagir por 30 minutos a 37 °C com uma solução de tampão acetato, TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-s- triazine) e FeCl₃.6H₂O. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 593 nm, em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). Os resultados foram expressos em µmol de Trolox/g de amostra (base seca).

3.4.6.4 Habilidade quelante de ferro

Os isolados de colágeno foram submetidos à análise da capacidade quelante de ferro, conforme metodologia adaptada de Stookey (1970) e Senevirathne et al. (2006), que consistiu no preparo de uma solução do isolado em etanol posta para reagir com FeCl_2 e após 10 minutos foi adicionada de ferrozina, agitada vigorosamente e colocadas para repousar por mais 10 minutos. A absorbância da amostra foi lida em 562 nm, em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). O cálculo da habilidade quelante de ferro foi realizado pela equação:

$$\text{Habilidade quelante} = [(A_{\text{branco}} - (A_{\text{amostra}} - A_0)) / A_{\text{branco}}] \times 100$$

3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISES DAS SALSICHAS FRANKFURT DE FRANGO COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE GORDURA POR GEL DE COLÁGENO OBTIDO DE PÉS DE FRANGO

3.5.1 Processamento das salsichas de frango

Foram processadas três formulações de salsichas, conforme insumos e quantidades listados na Tabela 3, sendo uma delas uma formulação padrão (SS), com 100% de pele de frango e toucinho utilizado; uma formulação com 50% de substituição de gordura por colágeno hidrolisado em pó comercial (SC) (Germina[®], Parnamirim/RN, Brazil); e outra com redução de 50% de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango (SG).

A carne de frango e o toucinho foram descongelados por 24 h em temperatura de 7°C, pesadas, cominuídas e emulsionadas em *cutter* (CR-4L, Skymsem, Brazil) juntamente com os demais ingredientes por cinco minutos. Em seguida as emulsões foram embutidas com o auxílio de um embutidor manual em tripa celulósica com diâmetro de 32 mm (Viscofan, Espanha), amarradas manualmente e cozidas em banho-maria por 80 min, com a temperatura interna atingindo 72°C, verificada com termômetro. Após o cozimento, houve a retirada manualmente das tripas e as salsichas foram resfriadas em água fria e embaladas a vácuo. As salsichas foram armazenadas sob refrigeração a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo submetidas a análises posteriores.

3.5.2 Análises realizadas na salsicha Frankfurt: caracterização e estabilidade durante o armazenamento

3.5.2.1 *Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)*

Foi realizada uma Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) das salsichas com redução de gordura de acordo com a metodologia proposta por Meilgaard (1999), a qual envolveu as etapas de pré-seleção de candidatos, desenvolvimento de terminologia descritiva (MOSKOWITZ, 1983), que gerou a Tabela de Descritores (Tabela 4), treinamento e seleção dos painelistas e avaliação final das amostras. O teste foi realizado com prévia aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CAAE: 65402717.8.0000.5188), para atender as exigências éticas e científicas dispostas na Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

Foram pré-selecionados 25 indivíduos, dos quais 16 estavam aptos para o desenvolvimento da terminologia descritiva. Após esta etapa os mesmos foram submetidos a treinamentos e após análise estatística, por meio de ANOVA ($p_{\text{tratamentos}} < 0,05$ e $p_{\text{repetições}} > 0,05$) e consenso com a equipe, foram selecionados 11 painelistas treinados, os quais realizaram a avaliação final das salsichas.

A avaliação final foi realizada por meio de três sessões por dia, sendo em cada uma servidas três amostras de forma monádica, aleatoriamente, através da intensidade dos atributos sensoriais medidas em escala não estruturada de 9 cm. Bolacha água e sal e água foram servidas entre as amostras.

3.5.2.2 *Composição química*

As salsichas foram submetidas às análises de umidade, proteínas e cinzas, de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2007). O conteúdo lipídico foi determinado através do método de Folch et al., (1957), por extração a frio. Foi determinado também o teor de colágeno por meio da análise de hidroxiprolina (AOAC, 2007). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5.2.3 *Perfil de ácidos graxos*

A partir dos extratos lipídicos obtidos na análise de gordura foi realizada a metilação dos ácidos graxos (HARTMAN; LAGO, 1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por injeção em cromatógrafo gasoso (VARIAN 430-GC), acoplado com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida

(CPWax), do tipo polar, com dimensões de 100m x 0,25 mm e 0,25µm de espessura. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com a uma vazão de 1 mL/min. O extrato de éster metílico foi injetado (1,0µL) em injetor tipo split/spliless a 250 °C, e o cromatograma foi registrado no Software Galaxy. As temperaturas iniciais e finais da coluna foram respectivamente, de 100 e 240 °C, com rampa intermediária de 2,5 °C/min. A temperatura do detector foi mantida a 260 °C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos dos extratos transesterificados com os padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos idênticos. A quantificação dos ácidos graxos foi expressa em percentual de área. Também foram determinadas as somatórias de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poli-insaturados (PUFA) e também a somatória dos ácidos graxos desejáveis (DFA), que corresponde à soma das proporções de C18:0 + PUFA + MUFA.

Diante dos percentuais dos ácidos graxos obtidos, foi calculado o Índice de Aterogenicidade (IA), que representa o potencial de estímulo à agregação plaquetária (TONIAL et al., 2011), calculado de acordo com a Equação 1:

$$IA = [C12:0 + 4(C14:0) + C16:0]/(\Sigma SFA + \Sigma PUFA) \quad (Eq.1)$$

As injeções para cada amostra de salsicha foram realizadas em triplicata.

3.5.2.4 Parâmetros físicos: pH, Capacidade retenção de água, estabilidade da emulsão e cor instrumental

Foi determinado o pH das salsichas por leitura direta das amostras dissolvidas em água destilada em pHmetro de bancada Q400AS (Quimis, São Paulo, Brasil), conforme metodologia da AOAC (2007).

A análise da capacidade de retenção de água (CRA) foi realizada segundo a metodologia de Huff-Lonergan e Lonergan (2005). Além disso, foi também determinada a estabilidade da emulsão segundo a metodologia de Horita et al. (2011), que quantificou a perda total de fluido, a perda de água e a perda de gordura da massa cárnea formada, uma vez submetida à cocção à 80 °C.

A determinação dos parâmetros de cor das salsichas foi realizada em um colorímetro Konika Minolta CR-400 (Minolta Chromameter Co., Ltd., Osaka, Japan), operando no sistema CIELab, operando com iluminante D65 e observador a 10°. Os parâmetros L* (luminosidade), +a* (intensidade de cor vermelha) e +b* (intensidade de

cor amarela) foram medidos na superfície interna das salsichas fatiadas em quatro locais escolhidos aleatoriamente, para cada tratamento.

3.5.2.5 Análise de Perfil de Textura (TPA)

As salsichas foram submetidas à Análise de Perfil de textura, utilizando um texturômetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Survey, UK) acoplado a um probe cilíndrico de aço inoxidável (P/6), de 6 mm. As salsichas foram cortadas em fatias de 1 centímetro e analisadas em triplicata para cada tratamento. As condições para a análise de textura foram as seguintes: velocidade de 2,0 mm/s no pré-teste e no teste e velocidade de 5,0 mm/s no pós-teste, força de 5,0 g e tempo de 5 s entre ciclos. Os parâmetros de textura de dureza, coesão, adesividade, elasticidade e mastigabilidade foram analisados utilizando o software Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems\TE32L\versão 6.1.4.0 Inglaterra).

3.5.2.6 Número de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A oxidação lipídica foi quantificada através da determinação do número de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em todos os tempos de armazenamento refrigerado, conforme método proposto por Rosmini et al. (1996), onde as amostras foram homogeneizadas em sulfanilamida 0,5%, ácido tricloroacético (TCA) 10% e água e em seguida, agitadas para favorecer a extração das TBARS. O número de TBARS foi quantificado por espectrofotometria, com comprimento de onda de 532 nm, e o resultado foi expresso em mg de malonaldeído (MDA)/kg de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.2.7 Atividade antioxidante: DPPH, FRAP e Habilidade quelante

O efeito de captura do radical DPPH nas salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em todos os tempos de armazenamento refrigerado foi analisado conforme metodologia adaptada de Chandini et al. (2008) e Chakka et al. (2015). As salsichas de frango também foram submetidas à determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Ability Power), de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996) e Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000), e à análise da habilidade quelante de ferro, nos dias 0, 14, 28 e 42, em armazenamento refrigerado, conforme metodologia adaptada de Stookey (1970) e Senevirathne et al. (2006). Todas as análises de atividade antioxidante foram realizadas em triplicata.

3.5.2.8 Eletroforese SDS-PAGE

Os tratamentos SS, SC e SG, nos dias 0, 14, 28 e 42, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme metodologia de Laemmli (1970), adaptada por Daguer et al. (2010), com extração das proteínas com ureia a 6 mol/L. As condições de corrida foram: gel de separação na concentração de 12%, gel de aplicação da amostra na concentração de 4%, corrente de 30 A e 125V. Foi utilizado o marcador de peso molecular Full-Range (12 – 225 kDa, GE Healthcare Lifesciences). A coloração dos géis ocorreu em solução contendo ácido acético 10% (v/v), álcool metílico 40% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R-250 1%, durante uma noite. Os géis foram descorados em solução contendo 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de álcool metílico, renovando-se a solução a cada 30 minutos, até a obtenção de revelação nítida.

3.5.2.9 Tratamento estatístico dos dados

Os dados obtidos das análises para os três tratamentos foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e em caso de significância ($p < 0.05$) as médias obtidas foram submetidas a teste de Tukey. Foi utilizado como ferramenta de análise de dados o software Assistat versão 7.7 (SILVA, 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Colágeno: entenda o que é**. Editora Insumos, n. 179, 2016.

ALEXANDRAKIS, D.; DOWNEY, G.; SCANNELL, A. G. M. Rapid Non-destructive Detection of Spoilage of Intact Chicken Breast Muscle Using Near-infrared and Fourier Transform Mid-infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 1, p. 338–347, 2009.

ALMEIDA, P. F.; ARAÚJO, M. G. O.; SANTANA, J. C. C. Collagen extraction from chicken feet for jelly production. **Acta Scientiarum Technology**, 34, 345-351, 2012.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, p. CD-ROM, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Panorama da avicultura nacional e perspectivas do setor**. ABPA, 2014. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Reuni%C3%A3o%20PNSA_%20Sanidade%20Av%C3%ADcola-Fortaleza%20Nacional_/2%20Dr_%20Ariel%20-%20Panorama%20da%20avicultura%20nacional%20e%20perspectivas%20para%20o%20setor.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015**. ABPA, 2016. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>> Acesso em: 24 jan. 2016.

BAILEY, A. J.; PAUL, R. G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 106, p. 1–56, 1998.

BAILEY, A. J.; SHIMOKOMAKI, M. Age related changes in the reducible cross-links of collagen. **FEBS Letters**. v. 16, p. 86–88, 1971.

BANNISTER, D. W.; BURNS, A. B. Pepsin treatment of avian skin collagen. Effects on solubility, subunit composition and aggregation properties. **Biochemical Journal**, v. 129, n. 3, p. 677–81, 1972.

BELITZ, H-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3. ed. Springer-Verlag, Berlin, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, **Analytical Biochemistry**, 239 (1996) 70–76.

BEZERRA, T. K. A. et al. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 196, p. 359–366, 2016.

BILEK, S. E.; BAYRAM, S. K. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 562–569, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Aves. 2014. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Comissão Nacional de Ética em Pesquisa**. Conselho Nacional De Saúde, 2012.

CANCHERINI, L. C. et al. Utilização de Subprodutos de Origem Animal em Dietas Formuladas com Base em Proteína Bruta e Proteína Ideal para Frangos de Corte de 22 a 42 Dias de Idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**. p. 535–540, 2005.

CHAKKA, A. K. et al. In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 8059–8067, 2015.

CHEN, J. et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 453–459, 2016.

CHENG, F. Y.; LIU, Y. T.; WAN, T. C.; LIN, L. C.; SAKATA, R. The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. *Animal Science Journal*, 79(1), 122–128, 2008.

CHANDINI, S.; GANESAN, P.; BHASKAR, N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India, **Food Chemistry**, v. 107, p. 707–713, 2008.

DAGUER, H.; STEPHAN, M. P.; BERSOT, L. S. Perfil eletroforético de lombo suíno adicionado de proteínas não cárneas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 434-440, 2010.

DAMODARAN, S. **Amino acids, peptides and proteins**. [s.l.: s.n.], 1996.

DENCH, J. E.; RIVAS, R. N.; CARGILL, J.C. Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, 32, 557-567, 1981.

DONG, X. et al. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. **Food chemistry**, v. 157, n. 3, p. 178–184, 15 dez. 2013.

DONG, X. et al. Development of a novel method for hot-pressure extraction of protein from chicken bone and the effect of enzymatic hydrolysis on the extracts. **Food chemistry**, v. 157, n. 2014, p. 339–46, 15 ago. 2014.

EDWARDS, W. P. **The science of bakery products**. The Royal Society of Chemistry, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Recomendações técnicas para a produção, abate, processamento e comercialização de frangos de corte coloniais. EMBRAPA, 2007. Disponível em: < <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/SistemaProducaoFrangosCorteColoniais/preparo.htm> >. Disponível em: 24 jan. 2016.

FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V. The sister's α -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application. **Trends in Food Science and Technology**. v. 51, p. 65-75, 2016.

FENNEMA, O.R. **Química de alimentos**. 4. ed. Editora Artmed, 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; **The Journal of Biological Chemistry**. v. 226, p. 497, 1957.

GELITA. **Proteínas de colágeno: tudo o que os especialistas em alimentos precisam**. GELITA, 2017. Disponível em: < <https://www.gelita.com/pt-pt/aplicacoes/alimentos> >. Acesso em jul. 2017.

GERHARDT, A.; MONTEIRO, B. W.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 41-50, 2013

GOMEZ-GUILLEN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.

HAM, Y. K.; Hwang, K. E.; Kim, H. W.; Song, D. H.; Kim, Y. J.; Choi, Y. S.; Kim, C. J. Effects of fat replacement with a mixture of collagen and dietary fibre on small calibre fermented sausages. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 96–104, 2016.

HARTMAN, R.; MEISEL, H. Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163–169, 2007.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, 22, 475–476, 1973.

HASHIM, P.; RIDZWAN, M. S. M.; BAKAR, J. Isolation and Characterization of Collagen from Chicken Feet. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 8, n. 3, p. 147–151, 2014.

HASHIM, P.; RIDZWAN, M. S. M.; BAKAR, J.; HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. **International Food Research Journal**, v. 22, p. 1 - 8, 2015.

HORITA, C. N.; MORGANO, M. A.; CELEGHINI, R. M. S.; POLLONIO, M. A. R. Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. **Meat Science**, v. 89(4), 426–433, 2011.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, v. 71(1), 194–204, 2005.

ICHIKAWA, S. et al. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 61, n. 1, p. 52–60, 2010.

JAMDAR, S. N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M. D.; JUAN, F.; YARDI, V.; SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 178–184, 2010.

KHULAL, U. et al. Nondestructive quantifying total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in chicken using hyperspectral imaging (HSI) technique combined with different data dimension reduction algorithms. v. 197, p. 1191–1199, 2016.

KIEW, P. L.; MAT DON, M. The Influence of Acetic Acid Concentration on the Extractability of Collagen from the Skin of Hybrid Clarias sp. and Its Physicochemical Properties : A Preliminary Study. **Focusing on Modern Food Industry**, v. 2, n. 3, p. 123–128, 2013.

KIM, S. K. **Seafood processing by-products: Trends and applications**. [s.l.: s.n.]. v. 97, n. 81, p. 461–495, 2013.

KIM, J.; PARK, J. Partially purified collagen from refiner discharge of Pacific whiting surimi processing. **Journal of food science**, v. 70, n. 8, p. c511–c516, 2005.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. **Bioactive peptides: Production and functionality** **International Dairy Journal**, 2006.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 227–239, 2014.
- LASEKAN, A.; ABU BAKAR, F.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, n. 3, p. 552–565, 2013.
- LAWRIE, R. A.; LEDWARD, D. A. **Lawrie's Meat Science**. [s.l.: s.n.].
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, 221, 1–22, 2001.
- LEE, J.-H.; LEE, J.; SONG, K. BIN. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 208–215, 2015.
- LI, B. et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1135–1143, 2007.
- LIN, Y. J. et al. Antioxidative peptides derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted acid pre-treatment and nitrogen protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 11, p. 4297–4308, 2010.
- LIN, Y. K.; LIU, D. C. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. **Food Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 244–251, 2006b.
- LIN, Y. K.; LIU, D. C. Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 621–625, 2006a.
- LIU, D. C.; LIN, Y. K.; CHEN, M. T. Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its Characteristics. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1638–1644, 2001.
- LIU, D.; NIKOO, M.; BORAN, G.; ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Collagen and gelatin. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v. 6, p. 527–557, 2015.
- MEILGAARD, C. Sensory evaluation techniques (Third Edition). Sensory Evaluation Techniques, Third Edition, 1999.
- MONTERO, P.; ALVAREZ, C.; MARTÍ, M. A.; BORDERIAS, A. J. Poultry skin collagen extraction and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1–3, 1995.
- MORIMURA, S.; NAGATA, H.; UEMURA, Y.; FAHMI, A.; SHIGEMATSU, T.; KIDA, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1403–1412, 2002.
- MOSKOWITZ, H. R. **New directions for product testing and sensory analysis of**

foods. Westport, Conn., Food and Nutrition Press. 371 p, 1983.

NOMURA, Y. et al. Preparation and Some Properties of Type I Collagen from Fish Scales. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 12, p. 2092–2094, 1996.

OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. (2002). **Meat: The search path**. 2th ed. Cocal do Sul: Imprint.

OKUYAMA, K.; MIYAMA, K.; MIZUNO, K.; BACHINGER, H. P. Crystal structure of (Gly-Pro-HyP): implications for the collagen molecular models. **Biopolymers**. v. 97, p. 607-616, 2012.

OMELYANENKO, N. P.; SLUTSKY, L. I.; MIRONOV, S. P. **Connective Tissue: Histophysiology, Biochemistry, Molecular Biology**. 1 ed. CRC Press, 2013.

PALAMUTOĞLU, R.; SARIÇOBAN, C. The Effect of the Addition of Encapsulated Collagen Hydrolysate on Some Quality Characteristics of Sucuk. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**. v. 36, p. 807–818, 2016.

PEREZ-TAMAYO, R. Pathology of Collagen Degradation. **American Journal of Pathology**, p. 509–566, 1978.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, p. 3396-3402, 2000.

ROBINS, S. P.; SHIMOKOMAKI, M.; BAILEY, A. J. The Chemistry of the Collagen Cross-Links: age-related changes in the reducible components of intact bovine collagen fibres. **Biochemistry Journal**. v. 131, p. 773-780, 1973.

ROSMINI, M. R.; PERLO, F.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; PAGÁN-MORENO, M. J.; GAGO-GAGO, A.; LÓPEZ-SANTOVEÑA, F.; ARANDA-CATALÁ, V. TBA test by extractive method applied to paté. **Meat Science**, v. 42, n. 1, p. 103-110, 1996.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, ISSN 1679-6535, 2007.

SAIGA, A. et al. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9586–9591, 2008.

SELVAKUMAR, P. et al. Enzymatic hydrolysis of bovine hide and recovery of collagen hydrolysate in aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 282–287, 2012.

SENEVIRATHNE, M.; KIM, S. H.; SIRIWARDHANA, N.; HA, J. H.; LEE, K. W.; JEON, Y. J. Antioxidant Potential of Ecklonia cava on Reactive Oxygen Species

Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 27–38, 2006.

SHIMOKOMAKI, M., DUANCE, V. C. BAILEY, A. J. Identification of two further collagenous fractions from cartilage. **Bioscience reports**, v. 1, p. 561-570, 1981.

SHIMOKOMAKI, M.; WRIGHT, D. W.; IRWIN, M. H. REST; M. V. D.; MAYNE, R. The Structure and Macromolecular Organization of Type IX Collagen in Cartilage. **Annals of the New York Academy Sciences**. v. 580, p. 1-7, 1990.

SIMÕES, G. S. SILVEIRA, E. T. F., OLIVEIRA, S. R., POLEZE, E., ALLISON, J. R. D., IDA, E. I., SHIMOKOMAKI, M. Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen. **Meat Science**, v. 96, p. 1460-1468, 2014.

SIMPSON, B. K.; NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F.; BENJAKUL, S.; PALIYATH, G.; HUI, Y. H. **Food Biochemistry and Food Processing**. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2012.

SILVA, F.A.S. **ASSISTAT - Software: statistical assistance**. Version 7.7 beta, 2016.

SILVA, T. F. **Efeito de colágeno hidrolisado sobre a qualidade tecnológica de queijo minas frescal light**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. UNESP, 2011.

SOUSA S. C., FRAGOSO, S. P., PENNA, C. R. A., ARCANJO, N. M. O., SILVA, F. A. P., FERREIRA, V. C. S. BARRETO, M. D. S. ARAÚJO, I. B. S. Quality parameters of frankfurter-type sausages with partial replacement of fat by hydrolyzed collagen. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 320-325, 2017.

STATSOFT . **Statistica for Windows Software**. v. 5.0, Tulsa, OK, USA, 2014.

STOOKEY, L. L. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 779-781, 1970.

TANAKA, M. C. Y.; SHIMOKOMAKI, M. Collagen types in mechanically deboned chicken meat. **Journal of Food Biochemistry**, 20, 215–225, 1996.

TIMPL, R.; GLANVILLE, R. W.; NOWACK, H.; WIEDEMANN, H.; FIETZEK, P. P.; KUHN, K. Isolation, chemical and electron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen from fetal bovine skin. **Hoppe-Seyler's Z Physiology and Chemistry**, 356, 1783-1792, 1975.

TOLDRÁ, F. et al. Innovations in value-addition of edible meat by-products. **Meat Science**, v. 92, n. 3, p. 290–296, 2012.

TONIAL, I. B., BRAVO, C. E. C., SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M., FURUYA, W. M., VISENTAINER, J. V. Qualidade nutricional dos lipídios de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com óleo de soja. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 103-112, 2011.

UNIÃO BRASILEIRA DA AVICULTURA. **História da avicultura no brasil: exportação**. UBABEF, 2014. URL http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil. Accessed 23.06.2014.

USHIKI, T. Collagen fibres, reticular fibres and elastic fibres. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives in Histological Cytology**. v. 65, p. 109-126, 2002.

VULCANI, V. A. S. **Collagen matrices for controlled liberation of progesterone**. Thesis (Paulista State University), School of Engineering of São Carlos, São Carlos, 2004.

WANG, L. et al. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. E450–E455, 2007.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2nd Ed. Marcel Dekker, New York, NY, p. 63–115, 1994.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation**. v. 8, p. 70-177, 1986.

YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. p. 123-179. London: Academic, 1975.

YAMANAKA, M. D. H.; OKADA, M. D. S.; SANADA, R. N. H. A multicenter, randomized, controlled study of the use of nutritional supplements containing collagen peptides to facilitate the healing of pressure ulcers. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**. v. 8, p. 51-59, 2017.

ZHANG, Y. et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 906–912, jan. 2007.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente estudo foram formatados em quatro artigos científicos, apresentados a seguir. O primeiro artigo trata-se o experimento piloto sobre extração de colágeno em pés de frango, que visou quantificar e verificar as propriedades do colágeno extraído de acordo com as condições de extração, segundo um planejamento experimental. O artigo do experimento piloto foi submetido e aceito para publicação na revista Food Science and Technology (Campinas).

O segundo artigo parte de uma adaptação das condições de extração utilizadas no primeiro estudo, verificando a quantificação do colágeno obtido, rendimento de extração e, além de algumas propriedades físicas, estudou-se também propriedades bioativas, como capacidade antioxidante e habilidade quelante de ferro, de acordo com os parâmetros definidos em um planejamento experimental. O artigo encontra-se formatado segundo as normas da revista Journal of Chromatography B (Elsevier).

O terceiro artigo contempla o emprego do gel de colágeno obtido de pés de frango na substituição parcial de gordura em salsichas de frango do tipo Frankfurt, realizando a caracterização sensorial e físico-química dos produtos. Este artigo foi escrito nas normas e submetido à revista Poultry Science.

O quarto artigo diz respeito ao estudo da estabilidade oxidativa das salsichas de frango tipo Frankfurt com substituição parcial de colágeno por gel de colágeno obtido de pés de frango, durante 42 dias de armazenamento refrigerado (4°C). Este artigo foi escrito nas normas da revista Food Research International.

**ARTIGO 1: OPTIMAL CONDITIONS FOR OBTAINING COLLAGEN FROM
CHICKEN FEET AND ITS CHARACTERIZATION**



Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization

Íris Braz da Silva ARAÚJO^{1*}, Taliana Kênia Alves BEZERRA¹, Edilza Silva do NASCIMENTO¹,
Carlos Alberto de Almeida GADELHA¹, Tatiane SANTI-GADELHA¹, Marta Suely MADRUGA¹

Abstract

The objective of this study was to extract collagen from chicken feet, determining optimal extraction conditions according to acetic acid concentration, pepsin content and time of enzymatic hydrolysis. A factorial design 2³ was used, with three replications at the central point, totaling 11 experiments. The response variable studied was the collagen content of the isolate obtained. In addition to the optimization, the characterization of the isolates with higher and lower collagen content, in relation to the amino acid profile, electrophoretic profile, peptide hydrophobicity and functional properties, such as water solubility, water retention capacity and emulsifying activity, were carried out. The proposed model was statistically significant, with conditions of higher collagen content of 0.3 mol/L of acetic acid, 0.2% of pepsin and 12 hours of hydrolysis. The collagen isolate under these conditions showed higher iminoacids content, higher sum of peptide areas, higher solubility in water and water retention at 60 °C. The treatment with lower collagen content showed high emulsifying activity. The collagen isolate of the chicken feet presented characteristics makes it suitable for application in the food industry.

Keywords: by-products; chicken meat; collagen; functional properties.

Practical Application: Collagen extraction allows the chicken feet to be recovered with high biological value for industry.

1 Introduction

Brazil has since 2004 the position of largest exporter of chicken meat and it reached a record of amount production in 2016, according to the Brazilian Association of Animal Protein (Associação Brasileira de Proteína Animal, 2016). With the increase in the production of meat and processed products, many byproducts are also generated, such as viscera, head and feet, for example, which are mostly underused for the production of animal feed. However, such byproducts contain proteins, such as collagen, that can be utilized in the food industry. With low production costs, chicken feet can be manipulated to get collagen.

Collagen is an abundant protein in mammals, and can be found in various products of animal origin, such as bird feet (Alves & Prudencio-Ferreira, 2002; Nomura et al., 1996; Liu et al, 2001; Lin & Liu, 2006a); fish scales, mammalian skin and tendons (Huang & Nimni, 1993). Type I collagen is the most abundant in the skin, tendons, ligaments and bones, which represents 90% of the dry matter (Olivo & Shimokomaki, 2002). In chicken feet, some studies have shown the prevalence of this type of collagen in extracts obtained (Lin & Liu, 2006a; Liu et al, 2001; Hashim et al, 2014).

For the extraction of collagen, acid and enzymatic hydrolysis methods are the most used, with the extraction experiments with acetic acid and pepsin being the most efficient. Pepsin is necessary to hydrolyze protein in cross-linking sites because the collagen triple helix structure protects of the enzymatic action

(Simões et al., 2014). Enzyme activity can be increased at low pH and temperature close to the human body, but at low temperature it is possible to obtain native collagen (Lin & Liu, 2006b).

In chicken feet there are isolated studies of extraction of collagen, either by cooking (Alves & Prudencio-Ferreira, 2002) or enzymatic methods (Hashim et al., 2014), but with low extraction yield. Thus, the objective of this study was to optimize the process of extraction of collagen in chicken feet, according to acetic acid concentration, pepsin content and hydrolysis time, in relation to yield, and to characterize the collagen isolated with maximum and minimum extraction yields in order to suggest future applications.

2 Materials and methods

2.1 Raw materials and reagents

Feet from broilers slaughtered between the ages of 42 and 47 days were purchased in the local market of João Pessoa/PB, Brazil. Porcine pepsin (EC 3.4.23.1), acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, AAS18 amino acid standard, used in extraction and analysis were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The L-hydroxyproline standard was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Other reagents used in the study were of analytical grade or the highest purity available.

Received 26 May, 2017

Accepted 06 Jan., 2018

¹ Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brasil

*Corresponding author: iris.bsaraujo@gmail.com

2.2 Optimization of collagen extraction in chicken feet

Initially, chicken feet were submitted to moisture, ash, protein and hydroxyproline analyzes for quantification of collagen, according to the methodologies proposed by AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2007). Lipid content analysis was performed according to Folch et al. (1957).

Chicken feet deboned were subjected to extraction with acetic acid and pepsin as described by Shimokomaki et al. (1981) and Simões et al. (2014), with modifications. To define the amount of acid, enzyme and hydrolysis time, a factorial design 2^3 was used, with three replications at the central point, totaling 11 assays (Table 1). The independent variables investigated were: acetic acid concentration (x_1), pepsin content (x_2) and time of enzymatic hydrolysis (x_3), the response variable being the collagen content (Y). The empirical model for planning 2^3 is presented in Equation 1, where β represents the coefficients of the model.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_1 x_2 + \beta_5 x_1 x_3 + \beta_6 x_2 x_3 \quad (1)$$

The extraction process was started by immersing the chicken feet in acetic acid solution (x_1) for 24 h in the ratio of 1:10 (w/v). The material was then homogenized in ultra turrax (IKA, model T25) for 10 min at 5,000 x g. In the hydrolysis, the pepsin (x_2) was added and the hydrolysis time (x_3) was established according to the factorial design (Table 1), at 4 °C with continuous agitation. To stop the hydrolysis process, the pH was elevated to 7.5 and centrifuged for 30 min at 10,000 x g at 4 °C. The precipitate was discarded and the supernatant was precipitated with NaCl to a concentration of 3 mol/L and centrifuged at 10,000 x g for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded and the precipitate obtained was dialyzed with 0.5 mol/L acetic acid solution for 72 h with daily solution exchange. The dialyzed precipitate was lyophilized and thus the collagen isolate was obtained. In all isolates, the collagen content obtained as the Y response function was determined.

2.3 Statistical analysis

The response function (Y) was used to perform analysis of variance (ANOVA) for the regression. The model of the equation was adjusted to the experimental data to produce the proposed model. The response surface graph and desirability parameters were generated for the response function (Y), the collagen content of the isolates. The performed analyzes, desirability and response surface were performed with STATISTICA 8.0 software (StatSoft, 2007). After the analysis of the response surface and the graphical representation of the desirability for the collagen content, the proposed model was validated by performing new tests in the optimal condition in triplicate, with the means of

each treatment. The results were compared with the estimated response (Y) by analysis of variance (ANOVA) and Student's t-test ($p < 0.05$).

2.4 Characterization of collagen isolates

The isolates with higher (ICmax) and lower (ICmin) contents of collagen and the chicken feet were submitted to the characterization and determination of functional properties. All analyzes were performed in triplicate. The results were submitted to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).

Amino acids profile

The methodology was adapted from White et al. (1986), in which the samples were subjected to acidic hydrolysis with HCl, derivatization, resuspension and injection in a high performance liquid chromatograph (Varian, Waters 2690, California, USA), coupled to a C18 column (PICO-TAG, 3.9 x 150 mm). It was used as the mobile phase A sodium acetate buffer (0.0011 g/mL, pH 6.4) and mobile phase B 60% acetonitrile solution. Detection was performed at 254 nm, at 35 °C and flow rate of 1 mL/min. All injections were performed in triplicate. The amino acid contents were expressed as percentage of area.

Electrophoretic profile of collagen isolates

Collagen isolates were analyzed by sodium dodecylsulfate on polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), according to Laemmli (1970). The concentration of resolution gel was 7.5% and the stacking gel was 4%. The preparation of the samples was performed according to the methodology of Wang et al. (2008), in which the samples were dissolved in 0.1% (w/v) 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) and in the sequence mixed with the sample buffer with β -mercaptoethanol, in the ratio 1: 1 (v/v). To estimate the molecular weight of the chains, a 12-225 kDa molecular weight marker (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) was used. The running conditions were 30 mA of current and 125 V. The running time was about 3 hours. At the end of the run the gel was stained with 0.1% G-250 Brilliant Coomassie Blue and then bleached with a solution of distilled water, methanol and acetic acid in the ratio of 8: 1: 1 (v/v/v).

Hydrophobicity of peptides

The separation of the peptides from the isolates and chicken feet by hydrophobicity was conducted according to the methodology reported by Bezerra et al. (2016) by a Nova-Pak C18 column (4.6 m x 250 mm, 4 μ M particle size, cartridge, Waters, Ireland), connected to a high performance liquid chromatograph (Varian 2690 Waters, CA). The mobile phase consisted of an eluent A (ultrapure water with 1% of trifluoroacetic acid) and an eluent B (acetonitrile with 1% of trifluoroacetic acid). A linear gradient of these eluents was performed for 60 minutes running in a flow rate of 1 mL/min. The first 30 minutes corresponded to the separation of peptides of hydrophilic character, while in the remaining 30 minutes were separated those of a hydrophobic character. Detection was performed at 218 nm.

Table 1. Real and coded variables used in factorial design 2^3 for extraction of collagen in chicken feet.

Factors	-1	0	1
Acetic acid (mol/L) - x_1	0.3	0.5	0.7
Pepsin (%) - x_2	0.1	0.15	0.2
Hydrolysis time (h) - x_3	12	24	36

Functional properties of collagen isolates

The collagen isolates (IC_{max} and IC_{min}) were submitted to water solubility (WS) analyzes according to the methodology of Timpl et al. (1975); water holding capacity (WHC) of the collagen isolates at 60 °C, according to the methodology adapted from Montero et al. (1995) and emulsifying activity (EA) according to the methodology of Kim & Park (2005), using Tween 80 as a commercial emulsifier.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of collagen extraction

The chicken feet submitted to analysis of chemical composition showed, on a dry basis, ash content: 2.33 ± 0.11 g/100g; lipid content: 14.96 ± 1.18 g/100g; protein content: 77.59 ± 2.05 g/100g; collagen content: 56.31 ± 1.98 g/100g. It was observed that 72.5% of the proteins of the chicken foot in the form of collagen. The protein content was similar and the ash content was lower than that obtained by Hashim et al. (2014), in chicken legs, and Liu et al. (2001), in bird feet, probably because the chicken feet of this study were deboned to be submitted to the extraction of collagen. According to the factorial design, it was possible to verify by means of the Pareto graph (Figure 1) that the pepsin content was the factor of major influence on the yield of the obtained isolates, being directly proportional to the amount of enzyme used in the extraction. It was observed that the hydrolysis time had an inverse influence on the amount of collagen in the isolates, where at the shortest time the isolates with the highest collagen content were obtained.

Also were significant ($p < 0.05$) the interaction effects between acetic acid and pepsin and the inversely proportional effect of acetic acid. Table 2 shows the mean values of collagen content in all the conditions proposed in factorial design 2^3 . Treatment 4 (0.7 mol/L acetic acid, 0.2% pepsin and 12 hours hydrolysis) presented the highest content of collagen (IC_{max}), while the treatment 6 (0.7 mol/L acetic acid, 0.1% pepsin and 36 hours hydrolysis) presented a lower collagen content (IC_{min}).

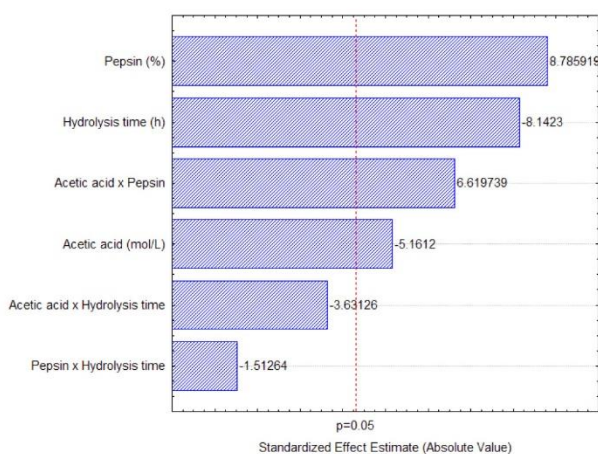


Figure 1. Pareto graph of the response variable collagen content (Y).

The pepsin content influenced positively the collagen content, and the treatments with the highest amount of the enzyme had the highest collagen content (treatments 3 and 4). According to Simões et al. (2014), pepsin probably digested the protein's cross-linking sites because the triple helix structure protects collagen from enzymatic action. Therefore, higher amounts of pepsin imply a higher content of extracted collagen.

In the ANOVA performed for the regression model, it was obtained the value of $R^2 = 88.21$. According to the F test, the F calculated value was 4.99, being lower than the F tabulated in the study conditions ($F_{tab} = 6.16$), indicating that the model was not statistically significant ($p < 0.05$). Considering the result obtained, a new ANOVA was performed, excluding the non-significant effects, according to the Pareto graph (Figure 1), which were the interactions x_1x_3 and x_2x_3 .

With the new condition for ANOVA, the value of $R^2 = 82.26$ was obtained. According to the F test, the value of F calculated obtained was equal to 6.96, higher than the F tabulated in the new condition ($F_{tab} = 4.53$), which indicates to be significant ($p < 0.05$). Therefore, Equation 2 represents the proposed regression of the reduced model of the coded variables, containing only the statistically significant terms:

$$Y = 59.60 - 3.93 x_1 + 6.70 x_2 - 6.21 x_3 + 5.04 x_1x_2 \quad (2)$$

From the Equation 2, the response surface (Figure 2) of the variable collagen content was generated as a function of its dependent variables pepsin content (%) and hydrolysis time (h), which had a greater impact on the response, as seen in the Pareto graph (Figure 1). An optimum favorable region was observed for a higher collagen content (Y close to 80%) when the variable x_2 corresponds to 0.2% of pepsin and x_3 corresponds to the 12 hours of hydrolysis.

In the desirability function shown in Figure 3, the estimated parameters indicated that the optimum value of Y was 73.62 g collagen/100 g sample, obtained with 0.7 mol/L acetic acid, 0.2% pepsin and 12 hours of hydrolysis time. The optimization value of desirability was 1.0, considered perfectly satisfactory, according to Akhanazarova & Kafarov (1982).

Table 2. Levels and results of the response variable of factorial design 2^3 for collagen extraction from chicken feet.

Treatment	x_1 - Acetic acid (mol/L)	x_2 - Pepsin (%)	x_3 - Hydrolysis time (h)	Y- Collagen (g/100g)
1	0.3 (-1)	0.1 (-1)	12 (-1)	59.61 ± 1.71
2	0.7 (+1)	0.1 (-1)	12 (-1)	53.87 ± 1.36
3	0.3 (-1)	0.2 (+1)	12 (-1)	71.90 ± 1.11
4	0.7 (+1)	0.2 (+1)	12 (-1)	72.98 ± 0.24
5	0.3 (-1)	0.1 (-1)	36 (+1)	61.72 ± 0.62
6	0.7 (+1)	0.1 (-1)	36 (+1)	31.54 ± 0.42
7	0.3 (-1)	0.2 (+1)	36 (+1)	56.03 ± 1.37
8	0.7 (+1)	0.2 (+1)	36 (+1)	59.41 ± 0.41
9	0.5 (0)	0.15 (0)	24 (0)	60.63 ± 1.38
10	0.5 (0)	0.15 (0)	24 (0)	63.02 ± 1.78
11	0.5 (0)	0.15 (0)	24 (0)	64.94 ± 1.00

The estimated desirability for the model under study (Figure 2) shows that increased pepsin concentration and shorter hydrolysis time resulted in higher collagen contents. Regarding the acetic acid

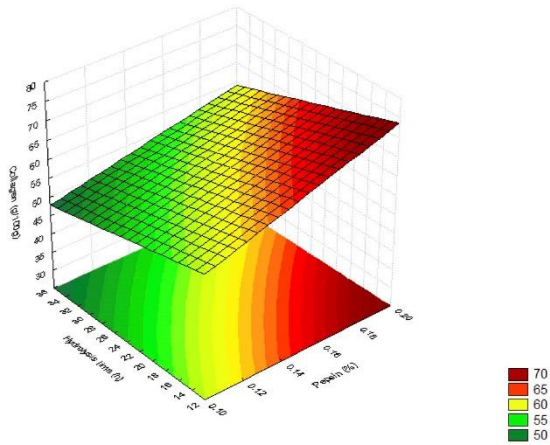


Figure 2. Response surface generated for the collagen content response function in the extraction of collagen in chicken feet.

concentration, it was observed between 0.5 and 0.7 mol/L there were no significant changes in the response function. Therefore, the level of 0.5 mol/L would be sufficient to obtain an isolate with a higher collagen content. The conditions presented as optimal in Figure 3 are similar to treatment 4, which presented higher collagen content compared to the other treatments (Table 1).

In a study of collagen extraction from egg shell Mohammadi et al. (2016) observed the dependence of the collagen content with the amount of enzyme, but because it was not the effect of greater influence must be considered so that there is no increase in the costs of production. Simões et al. (2014) observed a great influence of the pepsin concentration, optimizing the extraction process in pig tunica albuginea, reaching a collagen content of 75.8 g of collagen/100 g of isolate.

3.2 Validation of the model

According to the conditions obtained from the desirability for the extraction of collagen, it was estimated from Equation 2 that from the variables $x_1 = 0.7$ mol/L, $x_2 = 0.2\%$ pepsin and $x_3 = 12$ hours hydrolysis an isolated of collagen with 73.62 g of collagen/100 g would be obtained. Under these conditions, three extractions were reproduced and the mean response obtained was 74.98 ± 0.73 g of collagen/100 g of isolate, which did not differ

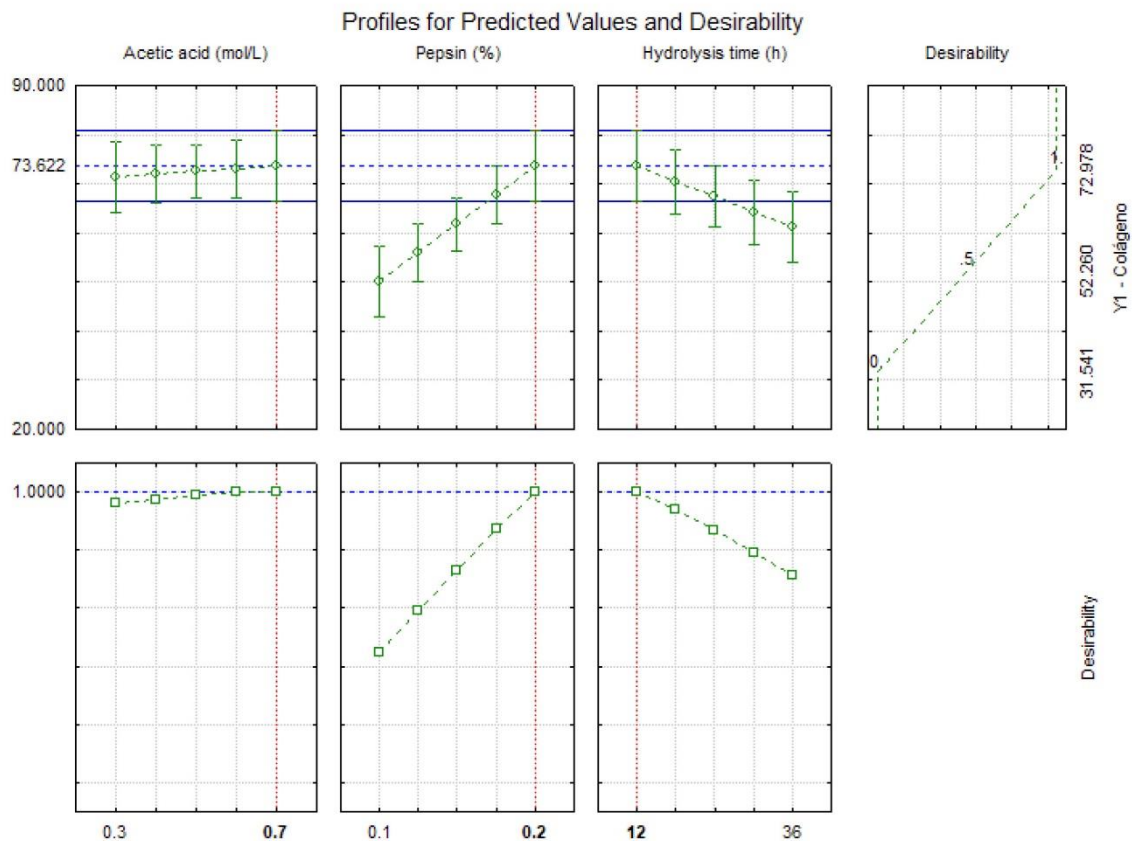


Figure 3. Profile of predicted values and desirability for the collagen content extracted from chicken feet.

significantly from the value obtained by the model ($p < 0.05$), which conferred the validation of the proposed model.

3.3 Characterization of collagen isolates

Amino acids profile

Regarding the content of imino acids (proline and hydroxyproline), which according to Kittiphattanabawon et al. (2010) and Chen et al. (2016) who relate to the thermal stability and formation of binding sites by means of hydrogen bonds in the collagen molecule, it was verified that the IC_{max} (Table 3) had a higher content (20.66%), since it contains higher levels of the two amino acids. This value was close to that found by Ran

& Wang (2014) in bovine skin and tendons, and by Chen et al. (2016) in skin and tilapia scales.

The hydroxyproline content increased with the extraction of collagen compared to the chicken feet. IC_{max} with higher percentage of the amino acid, presented higher value than those obtained by Hashim et al. (2014), in a study of collagen isolation in chicken feet. According to Okuyama et al. (2012) and Ferraro et al. (2016), hydroxyproline, as well as proline, has rings that force the chain to form a helix due to steric hindrance, and that hydroxyproline is the main responsible for the hydrogen bonds. Regarding the percentage of tyrosine, it was observed that the extraction of collagen decreased the concentration of the amino acid. The low values are in agreement with collagen molecules extracted from other sources (Zhang et al., 2007). Among the collagen isolates obtained, IC_{min} presented a higher content. According to Nomura et al. (1996), Bailey & Shimokomaki (1971) and Gómez-Guillén et al. (2011), the presence of this amino acid is related to telopeptides that remained after the enzymatic hydrolysis, which are related to the cross-linked sites in the collagen structure, making it less soluble in water.

Electrophoretic profile and peptide hydrophobicity analysis

Figure 4a shows the electrophoretic profile of the collagen isolates obtained from chicken feet. All treatments presented the same distribution, with a β chain and two distinct α chains (α_1 and α_2), indicating the predominance of type I collagen (Chen et al., 2016; Hashim et al., 2014). The electrophoretic positions of the α_1 and α_2 chains are close to the marker band with a molecular weight of 150 kDa. This molecular weight is similar to the profile obtained by Lin & Liu (2006a) in bird feet.

Regarding the chromatograms and areas (Figure 4b and 4c) it was observed that the chicken foot contains more peaks than the isolated ones, because the process of extraction of collagen probably succeeded in isolating some specific peptides. According to Bezerra et al. (2016) peptides that are eluted between 0 and 30 min are predominantly hydrophilic in nature and from 30 to 60 min most peptides tend to be hydrophobic in nature. Thus, the peptides generated in the probably predominate

Table 3. Amino acid profile of chicken feet and isolates obtained with higher and lower collagen content.

Amino acids (% area)	Chicken feet	ICmax	ICmin
Aspartic acid	8.14 $\pm$ 0.15a	6.77 $\pm$ 0.24bc	7.08 $\pm$ 0.17b
Glutamic Acid	10.63 $\pm$ 0.17a	9.45 $\pm$ 0.01b	9.15 $\pm$ 0.02b
Hydroxyproline	11.10 $\pm$ 0.27a*	10.85 $\pm$ 0.04a	9.15 $\pm$ 0.10b
Serine	*	4.14 $\pm$ 0.12	3.95 $\pm$ 0.01
Glycine	15.20 $\pm$ 0.48c	17.65 $\pm$ 0.19b	20.83 $\pm$ 0.39a
Histidine	4.97 $\pm$ 0.11b	5.99 $\pm$ 0.22a	4.98 $\pm$ 0.01b
Alanine	2.39 $\pm$ 0.05a	1.94 $\pm$ 0.03b	2.04 $\pm$ 0.09a
Arginine	3.89 $\pm$ 0.11b	10.27 $\pm$ 0.18a	10.20 $\pm$ 0.40a
Proline	3.32 $\pm$ 0.01b	9.81 $\pm$ 0.40a	9.68 $\pm$ 0.21a
Tyrosine	5.53 $\pm$ 0.06a	0.85 $\pm$ 0.01c	1.38 $\pm$ 0.03b
Valine	4.69 $\pm$ 0.16a	3.41 $\pm$ 0.08b	3.56 $\pm$ 0.02b
Methionine	4.27 $\pm$ 0.12a	1.34 $\pm$ 0.01b	1.86 $\pm$ 0.08b
Isoleucine	5.56 $\pm$ 0.08a	2.30 $\pm$ 0.01b	2.65 $\pm$ 0.07b
Leucine	9.46 $\pm$ 0.20a	5.43 $\pm$ 0.40b	5.69 $\pm$ 0.08b
Phenylalanine	4.99 $\pm$ 0.05a	2.75 $\pm$ 0.10b	2.75 $\pm$ 0.01b
Lysine	5.84 $\pm$ 0.10b	7.06 $\pm$ 0.32a	5.04 $\pm$ 0.34b
Imino acids (%)	14.42	20.66	18.83
Σ Hydrophobic Amino Acids	62.49	55.47	58.21

*Co-elution of Hydroxyproline+serine.

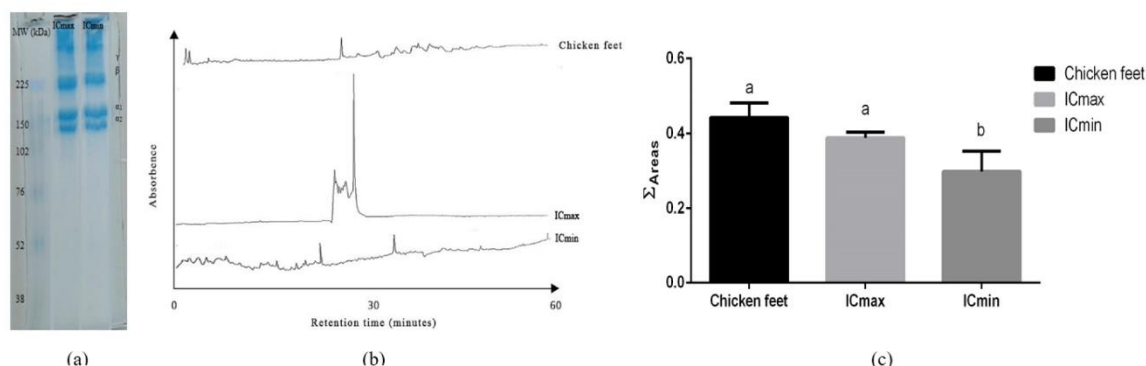


Figure 4. (a) Distribution of molecular weights (MW) of the collagen isolates extracted from chicken feet, (b) Chromatograms and (c) sum of the areas of the peptides obtained from chicken feet and from the isolates extracted with higher and lower collagen content.

hydrophobic nature, which justifies by the sum of hydrophobic amino acids in the profile obtained in Table 2.

Functional properties of collagen isolates

The functional properties such as water solubility at 70 °C (WS), water holding capacity at 60 °C (WHC) and emulsifying activity (EA) isolates with higher and lower collagen content are described below: the isolate IC_{max} presented WS of $68.81 \pm 1.84\%$, WHC of 20.15 ± 2.05 g water/g dry residue and EA of $38.25 \pm 0.99\%$. IC_{min} presented WS of $54.43 \pm 1.47\%$, WHC of 27.70 ± 1.76 g water/g dry residue and EA of $40.21 \pm 1.20\%$. In water solubility at 70 °C it was observed that IC_{max}, with higher collagen content, was more soluble than IC_{min}, which also presented higher tyrosine content, corroborating with Nomura et al. (1996), Bailey & Shimokomaki (1971) and Gómez-Guillén et al. (2011), and may be one of the factors contributing to the lower solubility of collagen in water. The values obtained in this study were higher than those found by Mizuta et al. (1999), in a study of hot water solubility (20-80 °C) of collagen extracted from cephalopod skin tissues. Simões et al. (2014) obtained swine tunica albuginea collagen values of solubility in hot water close to the IC_{max}.

In the WHC at 60 °C of the collagen isolates it was observed that the isolate with higher collagen content had lower water retention than IC_{min}. Probably, the longer hydrolysis time (36 h) caused a greater availability to form hydrogen bonds, adding more water molecules. The values obtained in WHC were similar to WHC of bovine skin collagen (Simões et al., 2014). The emulsifying activity of the collagen isolates was close to the activity of Tween 80 (EA = $41.02 \pm 0.93\%$), used as a commercial emulsifier. According to Bailey & Light (1989), the emulsifying power of collagen is associated with the hydrophobic amino acids, which in IC_{min} presented in high content, as well as also presents EA slightly superior to IC_{max}. Kim & Park (2005) found higher values of partially purified collagen in solid waste from surimi processing (50.4%).

4 Conclusion

The optimum conditions of extraction that resulted in collagen isolate from chicken leg with the highest yield were: 0.7 mol/L acetic acid, 0.2% pepsin and 12 hours enzymatic hydrolysis. The collagen isolate presented higher iminoacid content under these conditions, which made the isolate more thermally stable and able to bind to water molecules by hydrogen bonds. Compared to other sources of collagen extraction, the optimized collagen isolate obtained from chicken feet presented functional characteristics that make it suitable for application in the food industry due to its technological properties, such as high water retention and emulsifying activity for its application.

References

- Akhanazarova, S., & Kafarov, V. (1982). *Experiment optimization in chemistry and chemical engineering*. Moscow: Mir Publishers.
- Alves, S. G. T., & Prudencio-Ferreira, S. H. (2002). Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 52(3), 289-293. PMID:12448344.
- Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. (2016). *Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015*. São Paulo: ABPA. Retrieved from <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (2007). *Official methods of analysis of association of official analytical chemists* (18th ed.). Maryland: AOAC.
- Bailey, J. A., & Shimokomaki, M. (1971). Age related changes in the reducible cross-links of collagen. *FEBS Letters*, 16(2), 86-88. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80338-1](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(71)80338-1). PMID:11945908.
- Bailey, J. A., & Light, N. D. (1989). *Connective tissue in meat and meat products*. New York: Elsevier Applied Science.
- Bezerra, T. K. A., Araujo, A. R. R., Nascimento, E. S., Matos Paz, J. E., Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. T. B., Egypto Queiroga, R. C. R., Oliveira, M. E. G., & Madruga, M. S. (2016). Proteolysis in goat "coalho" cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 196, 359-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.066>. PMID:26593502.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 66, 453-459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>.
- Ferraro, V., Anton, M., & Santé-Lhoutellier, V. (2016). The sister's α -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 65-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.006>.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. PMID:13428781.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>.
- Hashim, P., Ridzwan, M. S. M., & Bakar, J. (2014). Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *International Journal of Biological, Agricultural, Biosystems. Life Science and Engineering*, 8, 231-235.
- Huang, L. H., & Nimni, M. E. (1993). Preparation of type I collagen fibrillar matrices and the effect of collagen concentration on fibroblast contraction. *Biomedical Engineering-Applications Basis Communications*, 5, 60-71.
- Kim, J., & Park, J. (2005). Partially purified collagen from refiner discharge of Pacific whiting surimi processing. *Journal of Food Science*, 70(8), c511-c516. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11510.x>.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. PMID:5432063.
- Lin, Y. K., & Liu, D. C. (2006a). Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 99(2), 244-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.053>.
- Lin, Y. K., & Liu, D. C. (2006b). Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. *Food Chemistry*, 94(4), 621-625. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.007>.
- Liu, D. C., Lin, Y. K., & Chen, M. T. (2001). Optimum condition of extracting collagen from chicken feet and its characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(11), 1638-1644. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2001.1638>.

- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119(4), 1519-1526. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.037>.
- Mizuta, S., Yamada, Y., Miyagi, T., & Yoshinaka, R. (1999). Histological Changes in Collagen Related to Textural Development of Prawn Meat During Heat Processing. *Journal of Food Science*, 64(6), 991-995. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12266.x>.
- Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Rouhi, M., Ghasemi, J. B., & Delshadian, Z. (2016). Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 190, 186-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.073>. PMID:26212959.
- Montero, P., Alvarez, C., Marti, M. A., & Borderias, A. J. (1995). Plaice skin collagen extraction and functional properties. *Journal of Food Science*, 60(1), 1-3. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05593.x>.
- Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., & Shirai, K. (1996). Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(12), 2092-2094. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60.2092>. PMID:8988647.
- Olivo, R., & Shimokomaki, M. (2002). *Meat: the search path* (2th ed.). Cocal do Sul: Imprint.
- Okuyama, K., Miyama, K., Mizuno, K., & Bachinger, H. P. (2012). Crystal structure of (Gly-Pro-Hyp): implications for the collagen molecular models. *Biopolymers*, 97(8), 607-616. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.22048>. PMID:22605552.
- Ran, X. G., & Wang, L. Y. (2014). Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 585-590. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6299>. PMID:23832587.
- Shimokomaki, M., Duance, V. C., & Bailey, A. J. (1981). Identification of two further collagenous fractions from articular cartilage. *Bioscience Reports*, 1(7), 561-570. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01116305>. PMID:7295904.
- Simões, G. S., Silveira, E. T. F., Oliveira, S. R., Poleze, E., Allison, J. R. D., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2014). Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen. *Meat Science*, 96(4), 1460-1468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.038>. PMID:24412738.
- StatSoft. (2007). *Statistica for Windows Software. v. 8.0*. Tulsa: Statsoft Inc.
- Timpl, R., Glanville, R. W., Nowack, H., Wiedemann, H., Fietzek, P. P., & Kuhn, K. (1975). Isolation, chemical and electron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen and procollagen from fetal bovine skin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 356(11), 1783-1792. <http://dx.doi.org/10.1515/bchm2.1975.356.2.1783>. PMID:1107200.
- Wang, L., Yang, B., Du, X., Yang, Y., & Liu, J. (2008). Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 604-607. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.03.001>.
- White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *The Journal of Automatic Chemistry*, 8(4), 170-177. PMID:18925132.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., & Wu, X. (2007). Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103(3), 906-912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.053>.

**ARTIGO 2: CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO DE COLÁGENO E
PEPTÍDEOS EM PÉS DE FRANGO E SUAS PROPRIEDADES BIOATIVAS**

CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO E PROPRIEDADES BIOATIVAS DE COLÁGENO E PEPTÍDEOS DE PÉS DE FRANGO

Íris Braz da Silva Araújo¹, Darlinne Amanda Soares Lima¹, Rafaela de Paula Paseto¹,
Marta Suely Madruga¹

¹ Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se otimizar as condições de extração de colágeno de pés de frango, verificando a influência dos fatores de extração no teor de colágeno, na produção de peptídeos, além de pesquisar as propriedades funcionais e bioativas destas frações. Foi delineado um planejamento fatorial 2³, com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos, sendo os fatores estudados a concentração de ácido acético, o teor de pepsina e o tempo de hidrólise. As variáveis respostas foram o teor de colágeno e o rendimento de extração. Após extraídos, os isolados de colágeno foram submetidos às análises do perfil de aminoácidos, perfil eletroforético, hidrofobicidade dos peptídeos, propriedades funcionais como solubilidade em água, atividade emulsificante, capacidade de absorção de água e propriedades bioativas como atividade antioxidante e capacidade quelante de ferro. Na concentração máxima de pepsina e tempo de hidrólise de 12 horas (IC_{max}) foi possível extrair isolados com 78,85 g/100g de colágeno. Com 0,1% de pepsina e 36 horas de hidrólise foi obtido o menor teor de colágeno (IC_{min}), o qual apresentou maior somatória de aminoácidos hidrofóbicos. No perfil eletroforético foi observada a predominância de colágeno tipo I nos isolados. IC_{min} apresentou maior solubilidade e capacidade de absorção de água, enquanto IC_{max} apresentou maior

capacidade emulsificante. ICmin apresentou também maior inibição do radical ABTS e maior capacidade quelante de ferro. Portanto, o isolado ICmax pode ser utilizado para suplementação de colágeno em alimentos, enquanto que a condição de extração de ICmin torna o isolado disponível para desempenhar as propriedades tecnológicas e bioativas avaliadas neste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Otimização, Pés de frango, Hidroxiprolina, Antioxidantes.

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é uma proteína estrutural presente em vertebrados, constituindo cerca de 30% de toda a proteína animal. A estrutura molecular consiste de três cadeias, ligadas em tripla hélice, geralmente com uma sequência de aminoácidos Glicina-Prolina-Hidroxiprolina-outro aminoácido. Atualmente 29 tipos de colágenos foram identificados, havendo diferenças em sua estrutura molecular, sequência de aminoácidos e função. Os tipos I e II são abundantes em tecidos conectivos enquanto os demais estão normalmente envolvidos na formação de fibrilas [1, 2, 3].

As fontes de colágeno mais conhecidas são tendões, cartilagens, ossos e pele, sendo encontradas em subprodutos da indústria de carnes suína, bovina e de aves, além dos subprodutos do pescado. A indústria de aves, por exemplo, cresceu nas últimas décadas, chegando a 13,2 kg per capita mundialmente e 38,7 kg per capita no Brasil [4]. Tal crescimento leva, conseqüentemente, à geração de subprodutos, como os pés de frango, que muitas vezes são destinados à produção de ração animal, sem explorar seu alto valor biológico [5, 6].

Além de contribuir nutricionalmente, o colágeno apresenta propriedades funcionais, como formação de gel, espessante, ligante de água, estabilizante, emulsificante, protetor coloidal e capacidade de formação de película [7, 8]. Alguns

48 estudos realizados evidenciam também algumas propriedades bioativas atribuídas aos
49 peptídeos derivados do colágeno, como antioxidantes, antimicrobianas, antitrombóticas,
50 anti-hipertensivas e atividade quelante de minerais [6, 9, 10, 11].

51 Para extrair o colágeno, diversos métodos são utilizados, sendo os mais
52 conhecidos o tratamento térmico e a hidrólise enzimática. A aplicação de altas
53 temperaturas extrai o colágeno e o leva a sua desnaturação, transformando-o em
54 gelatina. A técnica de extração de colágeno por hidrólise enzimática faz-se geralmente
55 utiliza-se a pepsina, que na temperatura de 4°C permite a obtenção da molécula em seu
56 estado nativo, que é insolúvel em água e mais difícil de digerir [11,12].

57 O tratamento com pepsina é necessário para digerir os sítios de *crosslinking* da
58 molécula de colágeno, porque sua estrutura em tripla hélice protege da ação enzimática.
59 Tais sítios aparecem na estrutura da molécula à medida que o animal envelhece,
60 formando estruturas estáveis e maduras chamadas de piridinolina (PIR), que estabiliza
61 as moléculas de colágeno e aumenta textura da carne. Em frangos, pesquisas anteriores
62 afirmam que os primeiros 20 e 40 dias de vida, o teor de piridinolina pode aumentar em
63 4,5 vezes [14, 15, 16].

64 Visando o maior aproveitamento da matéria-prima a ser extraída e viabilizar
65 custos de processo, além de disponibilizar ao máximo as proteínas colagenosas e não
66 colagenosas, alguns estudos foram desenvolvidos no tocante à otimização de colágeno e
67 de peptídeos em subprodutos, a exemplo de túnica albugínea suína [16], barbatana de
68 lula gigante [17], membrana da casca de ovo [3], entre outros.

69 Além da importância do colágeno, pesquisas estão sendo conduzidas com foco
70 nas propriedades funcionais e bioativas dos peptídeos obtidos na hidrólise enzimática.
71 Saiga et al. [18] investigaram a presença de peptídeos inibidores da enzima conversora

de angiotensina em frangos, indicadores de propriedades anti-hipertensivas; Jeevithan et al. [19] estudaram as propriedades antioxidantes e de absorção intestinal em colágeno tipo II de tubarão baleia; Guo et al. [10] fracionaram e identificaram peptídeos em badejo do Alaska e determinaram suas propriedades quelantes de metais; Chakka et al. [20] investigaram as propriedades antimicrobianas e antioxidantes em hidrolisados de fígado de frango.

Este trabalho teve como objetivo determinar as condições ótimas para extração de colágeno em pés de frango para o máximo teor de colágeno e de rendimento em peso, segundo as concentrações de ácido acético e pepsina e o tempo de hidrólise, bem como avaliar as propriedades funcionais e bioativas dos peptídeos gerados durante a extração e qual condição maximizou estas propriedades.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e reagentes

Os pés de frango foram adquiridos em frigoríficos do município de João Pessoa, com idade entre 42 e 47 dias. A pepsina suína (EC 3.4.23.1), acrilamida, bis-acrilamida, radical ABTS (2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)), reagente TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-s- triazine), Ferrozina, cloreto de ferro III (FeCl_3), utilizados na extração e nas análises foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O reagente padrão L-hidroxiprolina foi adquirido pela empresa Merck (Darmstadt, Germany). Todos os reagentes utilizados na pesquisa foram de grau analítico ou do teor mais alto de pureza disponível. Foi utilizada água ultra-pura para o preparo de todas as soluções.

2.2 Caracterização da matéria-prima

Os pés de frango foram desossados e submetidos às análises de umidade, cinzas e proteínas, de acordo com as metodologias propostas pela AOAC [21]. A análise do teor de lipídeos foi realizada segundo Folch, Lees e Stanley [22]. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Extração de colágeno

Os pés de frango desossados foram moídos e previamente delipidados com hexano na proporção de 1:2 (m/v), por 24 horas. Após esta etapa, os pés foram submetidos à extração com ácido acético e pepsina conforme descrição de Shimokomaki, Duance e Bailey [23] e Simões et al. [16], com modificações. Para definir as quantidades de ácido, de enzima e o tempo hidrólise, foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 , com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, conforme listados na Tabela 1. As variáveis independentes investigadas foram: concentração de ácido acético em mol/L (X_1), % de pepsina (X_2) e tempo de hidrólise enzimática em h (X_3). Os pés de frangos foram imersos em uma solução de ácido acético (X_1) por 24 h na proporção de 1:10 (p/v) em concentrações que variaram de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 1). Em seguida, o material foi homogeneizado por 10 min a 5000 x g. Na etapa de hidrólise, foi adicionada a pepsina (X_2) e estabelecido o tempo de hidrólise em h (X_3) conforme o planejamento fatorial, mantidos à 4°C com agitação contínua.

Ensaio	Acido acético (mol/L)	Pepsina (%)	Tempo de hidrólise (h)
	X_1	X_2	X_3
CF1	0.3 (-1)	0.1 (-1)	12 (-1)
CF2	0.7 (+1)	0.1 (-1)	12 (-1)
CF3	0.3 (-1)	1.0 (+1)	12 (-1)
CF4	0.7 (+1)	1.0 (+1)	12 (-1)
CF5	0.3 (-1)	0.1 (-1)	36 (+1)
CF6	0.7 (+1)	0.1 (-1)	36 (+1)

CF7	0.3 (-1)	1.0 (+1)	36 (+1)
CF8	0.7 (+1)	1.0 (+1)	36 (+1)
CF9	0.5 (0)	0.55 (0)	24 (0)
CF10	0.5 (0)	0.55 (0)	24 (0)
CF11	0.5 (0)	0.55 (0)	24 (0)

Tabela 1- Planejamento estatístico 2^3 para extração de colágeno em pés de frango

Para interromper o processo de hidrólise, o pH foi elevado para 7,5 e centrifugado por 30 min a 10000 g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi precipitado com NaCl até concentração de 3 mol/L e centrifugado a 10000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi dialisado com solução de ácido acético 0,5 mol/L por 72 h. O precipitado dialisado foi liofilizado e assim obtido o colágeno, utilizado para determinação das funções-resposta Y_1 e Y_2 .

2.4 Teor de colágeno e rendimento em peso

As variáveis resposta avaliadas foram o teor de colágeno (Y_1) obtido (g/ 100g de colágeno obtido), através da quantificação da hidroxiprolina, multiplicado por um fator 8,0, de acordo com metodologia da AOAC [21] e o rendimento do colágeno (Y_2), obtido pela relação entre o peso colágeno obtido após liofilizado e o peso pés de frango desossados em base seca, multiplicado por 100.

2.5 Perfil de aminoácidos

Todos os isolados obtidos foram submetidos à análise de aminoácidos, segundo a metodologia adaptada de White, Hart e Fry [24]. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com HCl, derivatização, ressuspensão e injeção em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian, Waters 2690, California, USA), acoplado a uma coluna C18 (PICO-TAG, 3.9 x 150 mm), utilizando como fase móvel A tampão acetato de sódio (0,0011g/mL, pH 6.4) e fase móvel B solução de acetonitrila a 60%. A

detecção foi realizada a 254 nm, a temperatura de 35 °C e fluxo de 1 mL/min. Todas as injeções foram realizadas em triplicata. Os teores dos aminoácidos foram expressos em porcentagem de área.

2.6 Perfil eletroforético dos isolados de colágeno

Os isolados de colágeno foram analisados por eletroforese com dodecilsulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli [25]. A concentração de polimerização do gel de resolução foi de 7,5% e do gel de empilhamento de 4%. O preparo das amostras foi realizado conforme metodologia de Wang et al. [26], no qual as amostras foram dissolvidas em tampão de fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,2) na concentração de 0,1% (w/v) e na sequência misturadas ao tampão de amostra com β -mercaptoetanol, na proporção 1: 1 (v/v).

Para estimar o peso molecular das cadeias, utilizou-se um marcador de peso molecular de 12-225 kDa (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). As condições de corrida foram 30 mA de corrente e 125 V. O tempo de corrida foi de cerca de 3 horas. Ao final da corrida, o gel foi corado com Azul de Coomassie Brilhante G-250 a 0,1%, e posteriormente descorado com uma solução de água destilada, metanol e ácido acético na proporção de 8:1:1 (v/v/v).

2.7 Hidrofobicidade dos isolados de colágeno

A separação dos peptídeos pela hidrofobicidade foi conduzida nos isolados de colágeno (Tabela 1), de acordo com a metodologia reportada por Bezerra et al. [27], por meio de uma coluna Nova-Pak C18 (4.6 m x 250mm, 4 μ M particle size, cartridge, Waters, Ireland), conectado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian 2690 Waters, CA).

A fase móvel consistiu de um eluente A (água ultra-pura com 1% de ácido trifluoracético) e um eluente B (acetonitrila com 1% de ácido trifluoracético). Um gradiente linear destes eluentes foi realizado por 60 minutos de corrida, em fluxo de 1 mL/minuto. Os primeiros 30 minutos corresponderam à separação de peptídeos de caráter hidrofílico, enquanto que nos 30 minutos restantes foram separados aqueles de caráter hidrofóbico. A detecção foi realizada em 218 nm.

2.8 Propriedades funcionais dos isolados de colágeno

2.8.1 Solubilidade em água a 70 °C (SA)

Os isolados de colágeno foram submetidos à análise de solubilidade em água conforme a metodologia de Timpl [28], na qual o colágeno foi suspenso em água ultra-pura na proporção de 1:150, aquecido em banho-maria a 70 °C por 1 hora, em seguida resfriado e centrifugado a 15000 g. No sobrenadante, foi determinado o teor de colágeno através da análise de hidroxiprolina [21] e a solubilidade foi calculada como a relação entre o colágeno no sobrenadante e o colágeno presente na amostra.

2.8.2 Capacidade de absorção de água a 60°C (CAA)

Foi determinada a capacidade de absorção de água dos isolados de colágeno através de uma suspensão de colágeno em água ultra-pura na proporção de 1:30, conforme metodologia adaptada de Montero et al. [29]. Após homogeneização, a solução foi aquecida em banho-maria a 60°C por 30 minutos e logo após resfriada. Após incubação a 4°C por 24 horas, a solução foi centrifugada a 18000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido à pesagem e posterior secagem em estufa a 105 °C até peso constante. O cálculo foi obtido pela seguinte relação:

CAA (g/g) = (massa do precipitado úmido – massa do resíduo seco)/(massa do precipitado úmido)

2.8.3 Atividade emulsificante (AE)

Foi utilizada para a atividade emulsificante a metodologia de Kim e Park [30], na qual os isolados de colágenos foram adicionados de 20 mL de ácido acético e 20 mL de água fervente. A mistura foi homogeneizada e adicionada de 20 mL de óleo de milho e novamente homogeneizada em ultra-turrax (IKA, modelo T25). A atividade emulsificante foi determinada pela relação:

$$AE = \frac{\text{Altura da amostra depois da centrifugação}}{\text{Altura da amostra antes da centrifugação}} \times 100$$

2.9 Propriedades bioativas: atividade antioxidante e habilidade quelante de ferro

As propriedades bioativas realizadas neste estudo foram: atividade antioxidante pela captura dos radicais DPPH, ABTS e FRAP; e a habilidade quelante de ferro. Além dos isolados, tais análises foram realizadas em duas amostras comerciais: gelatina (Bionatus Laboratório Botânico) e colágeno hidrolisado (Apsen Farmacêutica). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.9.1 Atividade antioxidante: método DPPH

O efeito de captura do radical DPPH pelos isolados de colágeno foi analisado conforme metodologia adaptada de Chandini et al. (2008) e Chakka et al. (2015), onde foi utilizada as amostras de colágeno dissolvidas em etanol para reagir com uma solução de DPPH em etanol. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto e logo após repousada em temperatura ambiente longe do abrigo da luz. A absorbância das amostras foi lida a 517 nm em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). A capacidade de capturar o radical DPPH foi calculada pela equação:

$$\text{Atividade de captura (\%)} = [1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco da amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

2.9.2 Atividade antioxidante: método ABTS

Os isolados de colágeno foram submetidos à análise de captura do radical ABTS de acordo com a metodologia proposta por Rufino et al. (2007)], na qual foram dissolvidos em etanol e misturados a uma solução de ABTS em etanol e persulfato de amônio. A mistura foi homogeneizada e repousadas em temperatura ambiente longe do abrigo da luz por 6 minutos. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 734 nm, em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). A capacidade de capturar o radical ABTS foi obtida pela equação:

$$\text{Atividade de captura (\%)} = [1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco da amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

2.9.3 Atividade antioxidante: poder de redução pelo método FRAP

Os isolados de colágeno foram submetidos à determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Ability Power), de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain [33] e Pulido, Bravo e Saura-Calixto [34], na qual uma alíquota de amostra foi colocada para reagir por 30 minutos a 37 °C com uma solução de tampão acetato, TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-s- triazine) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 593 nm, em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). Os resultados foram expressos em μmol de Trolox/g de amostra (base seca).

2.9.4 Habilidade quelante de ferro

Os isolados de colágeno foram submetidos à análise da capacidade quelante de ferro, conforme metodologia adaptada de Stookey [35] e Senevirathne et al. [36], que consistiu no preparo de uma solução do isolado em etanol posta para reagir com FeCl_2 e após 10 minutos foi adicionada de ferrozina, agitada vigorosamente e colocadas para

repousar por mais 10 minutos. A absorbância da amostra foi lida em 562 nm, em espectrofotômetro (Quimis, modelo Q798U). O cálculo da habilidade quelante de ferro foi realizado pela equação:

$$\text{Habilidade quelante} = [(A_{\text{branco}} - (A_{\text{amostra}} - A_0)) / A_{\text{branco}}] \times 100$$

2.10 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados obtidos na extração como rendimento e teor de colágeno foram submetidos à análise de variância de regressão – ANOVA a 5 % de significância, nos casos em que houve diferença significativa foram geradas superfícies de resposta. Tais análises foram realizadas com ajuda de um software estatístico Statistica 5.0 [37]. Os dados obtidos nas análises das propriedades funcionais e das propriedades bioativas dos isolados de colágeno foram submetidos a ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software estatístico Assistat versão 7.7 Beta [38].

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição centesimal da matéria-prima

As médias das análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos, bem como o teor de hidroxiprolina e de colágeno nos pés de frango estão listadas na Tabela 2. Foi observada a predominância de proteínas, as quais correspondem à aproximadamente 82% do extrato seco. Do total de proteínas presentes, a maioria está na forma de colágeno. Comparando os valores obtidos com outras pesquisas em pés de frango, de acordo com a Tabela 2, observa-se que apesar de haver diferenças no teor de umidade, cinzas e lipídeos, o teor proteico nos pés foi semelhante entre os estudos. O teor de cinzas obtido foi inferior ao obtido por Hashim, Ridzwan e Bakar [5] e Liu, Lin e Chen [39] pelo fato de os mesmos terem sido desossados para ser submetidos à extração de colágeno.

255 Tabela 2 - Composição química de pés de frango desossados¹

Componente	Média ± DP	Hashim, Ridzwan e Bakar [5]	Liu, Lin e Chen [39]
Umidade (g/100g)	77,80 ± 0,79	65,08 ± 0,90	62,05 ± 0,60
Cinzas (g/100g)	0,51 ± 0,02	8,16 ± 1,92	5,98 ± 0,37
Lipídeos (g/100g)	3,62 ± 0,63	3,90 ± 1,16	12,04± 0,44
Proteínas (g/100g)	18,31± 0,93	20,10 ± 0,98	17,42 ± 0,73
Hidroxiprolina (g/100g)	2,24 ± 0,08	Não determinado	Não determinado
Colágeno (g/100g)	17,91 ± 0,33	Não determinado	9,07 ± 0,18

256 ¹ valores em média ± desvio padrão.

257

258 O conteúdo lipídico dos pés de frango foi semelhante ao teor obtido por Hashim,
 259 Ridzwan e Bakar [5] e inferior ao encontrado por Liu, Lin e Chen [39]. Os lipídeos
 260 contidos na matéria-prima podem trazer problemas na extração de proteínas [40],
 261 diminuindo o rendimento do colágeno a ser obtido. Como a quantidade de lipídeos nos
 262 pés poderia interferir na extração, foi realizada uma previa delipidação da matéria-prima
 263 antes da extração de colágeno.

264 **3.2 Teor de colágeno e rendimento em peso**

265 Os resultados das variáveis resposta Y₁ (teor de colágeno) e Y₂ (rendimento em
 266 base seca) obtidas em função da concentração de ácido acético, do teor de pepsina e do
 267 tempo de hidrólise estão dispostos na Tabela 3.

268 Tabela 3 – Médias e desvios padrão das funções resposta teor de colágeno e rendimento
 269 dos isolados de colágenos obtidos de pés de frango sob diferentes condições de extração

Tratamento	x ₁ - Ac. Acético (mol/L)	x ₂ - Pepsina (%)	x ₃ - tempo hidrólise (h)	Y ₁ - Colágeno (g/100g)	Y ₂ - Rendimento (%)
CF1	0,3 (-1)	0,1 (-1)	12 (-1)	89,06 ± 1,40	6,02 ± 1,04
CF2	0,7 (+1)	0,1 (-1)	12 (-1)	83,40 ± 0,96	5,62 ± 1,21
CF3	0,3 (-1)	1,0 (+1)	12 (-1)	98,56 ± 1,51	4,33 ± 0,80
CF4	0,7 (+1)	1,0 (+1)	12 (-1)	86,83 ± 1,60	3,11 ± 0,84
CF5	0,3 (-1)	0,1 (-1)	36 (+1)	43,19 ± 0,53	13,35 ± 0,97
CF6	0,7 (+1)	0,1 (-1)	36 (+1)	44,87 ± 1,35	11,30 ± 1,77
CF7	0,3 (-1)	1,0 (+1)	36 (+1)	57,89 ± 2,07	16,92 ± 1,41
CF8	0,7 (+1)	1,0 (+1)	36 (+1)	59,82 ± 1,84	23,14 ± 2,05
CF9	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)	55,13 ± 1,82	22,78 ± 2,93
CF10	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)	52,42 ± 1,61	22,81 ± 2,10
CF11	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)	53,13 ± 2,20	21,84 ± 1,97

270

271 Quanto ao teor de colágeno dos isolados, foi observado que as médias diferiram
 272 significativamente ($p < 0.05$), conforme os fatores aumentavam ou diminuía. Na
 273 ANOVA realizada, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi de 11,94, maior que o F tabelado para o
 274 modelo de regressão linear ($F_{\text{tabelado}} = 4,35$), havendo diferença significativa entre os
 275 tratamentos. O valor de R^2 obtido para o modelo foi de 83,66. A Tabela 4 contém os
 276 efeitos estimados das variáveis em estudo. Observou-se que as variáveis que exerceram
 277 influência no teor de colágeno foram a pepsina e o tempo de hidrólise.

278 Tabela 4 – Efeitos estimados das variáveis independentes na variável resposta teor de
 279 colágeno

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-value
Média	65,8476	0,423592	155,4505	0,000041*
x ₁ - Ácido acético (mol/L)	-1,7233	0,496706	-3,4695	0,073973
x ₂ - Pepsina (%)	5,3221	0,496706	10,7147	0,008598*
x ₃ - Tempo hidrólise (h)	-19,0096	0,496706	-38,2713	0,000682*
x ₁ .x ₂	-0,7274	0,496706	-1,4645	0,280657

$x_1.x_3$	2,6260	0,496706	5,2868	0,033966*
$x_2.x_3$	2,0897	0,496706	4,2070	0,052122

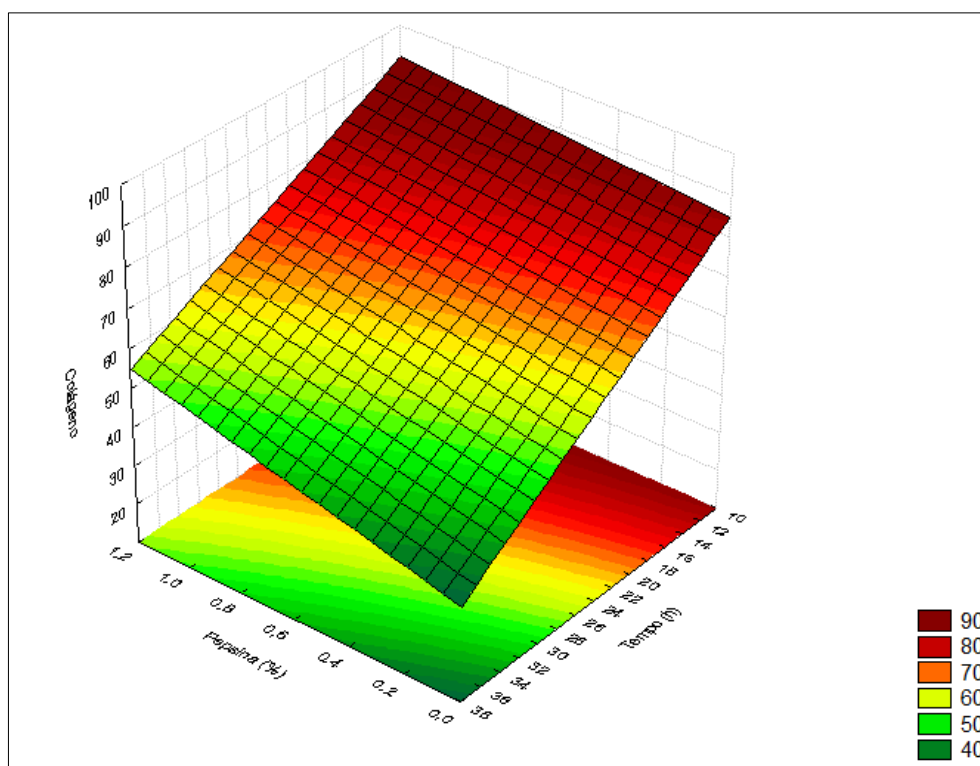
*Valores de p estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Diante dos coeficientes de regressão apresentados na Tabela 4, a pepsina exerceu influência positiva no teor de colágeno dos isolados. Por outro lado, o tempo de hidrólise exerceu maior efeito na variável resposta, sendo esta influência negativa. Ou seja, maiores teores de colágeno foram encontrados em maiores concentrações de pepsina e menores tempos de hidrólise. O tratamento CF3 apresentou maior quantidade de colágeno, enquanto que CF5 apresentou o menor teor de colágeno, justificados pela influência das variáveis x_2 e x_3 . A Equação 1 relaciona as variáveis significativas com a resposta Y_1 .

$$Y_1 = 65,84 + 5,32x_2 - 19,01x_3 + 2,63x_1x_3 \text{ (Eq. 1)}$$

Além das variáveis isoladas x_2 e x_3 , a Equação 1 aponta a influência positiva da interação entre as variáveis concentração de ácido acético e tempo de hidrólise. Mohammadi et al. [3] em um estudo de extração de colágeno em casca de ovo observaram a dependência do teor de colágeno com a quantidade de enzima, mas por não ter sido o efeito de maior influência deve ser ponderado para não haver aumento nos custos de produção. No presente estudo, de acordo com a Tabela 4 e a Equação 1, o maior efeito observado foi o do tempo de hidrólise no processo de extração. A Figura 1 representa a superfície de resposta gerada para o teor de colágeno, em função do teor de pepsina e do tempo de hidrólise. Conforme observado, o efeito do tempo de hidrólise foi maior do que o efeito da pepsina, sendo menores tempos, em torno de 12 horas necessários para a máxima obtenção de colágeno.

301 Figura 1 - Superfície de resposta gerada para o teor de colágeno dos isolados extraídos
 302 de pés de frango



304 Para o rendimento de extração em base seca (Y_2), foi observado que os
 305 tratamentos com maior tempo de hidrólise apresentaram maiores quantidades extraídas.
 306 Na ANOVA realizada foi observada que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi de 60,46 maior que o F
 307 tabelado para o modelo de regressão linear ($F_{\text{tabelado}} = 4,35$), havendo diferença
 308 significativa entre os tratamentos, sendo neste caso o modelo considerado preditivo
 309 ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} \geq 5$). O valor de R^2 foi de 69,52. De acordo com a Tabela 3, este efeito
 310 pode ser observado a partir do tratamento CF5 até CF11, quando comparado aos
 311 tratamentos CF1 a CF4, com apenas 12 horas de extração. A Tabela 5 contém todas as
 312 variáveis que influenciaram estatisticamente o rendimento dos isolados obtidos.

313 Tabela 5 - Efeitos estimados das variáveis independentes na variável resposta
 314 rendimento em peso

Variáveis	Coefficiente	Erro	t(2)	p-value
-----------	--------------	------	------	---------

	de regressão	padrão		
Média	10,47223	0,011841	884,3924	0,000001*
x ₁ - Ácido acético (mol/L)	12,33890	0,022674	544,1850	0,000003*
x ₂ - Pepsina (%)	0,31944	0,011841	26,9772	0,001371*
x ₃ - Tempo hidrólise (h)	1,39934	0,011841	118,1755	0,000072*
x ₁ .x ₂	5,70500	0,011841	481,7941	0,000004*
x ₁ .x ₃	0,93040	0,011841	78,5734	0,000162*
x ₂ .x ₃	0,72288	0,011841	61,0479	0,000268*

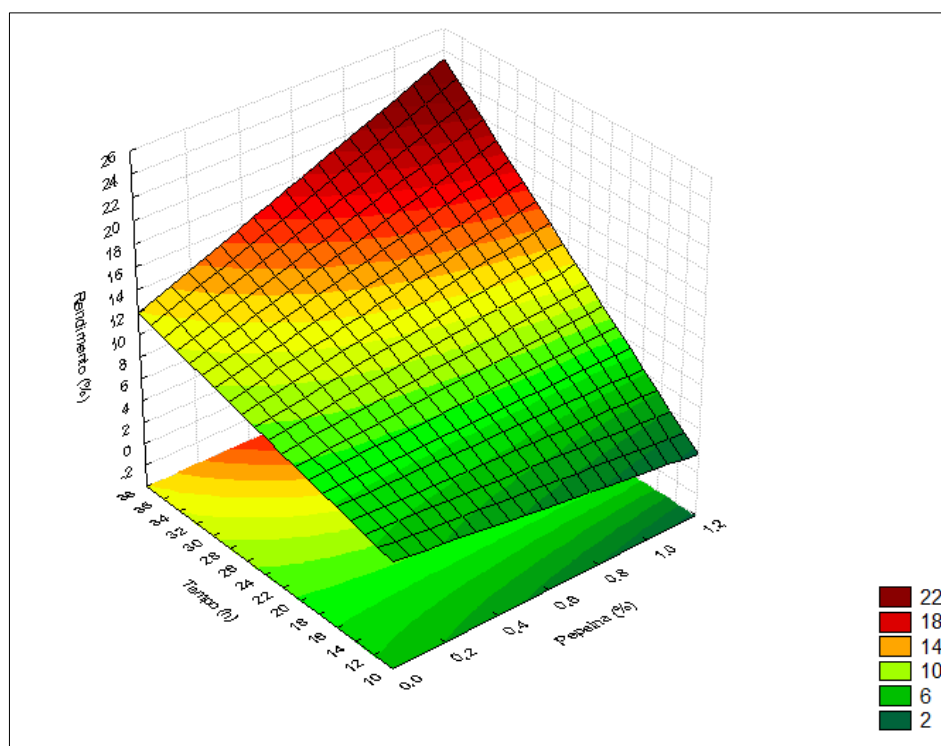
315

316 Todas as variáveis contribuíram de forma positiva para a resposta Y₂, ou seja, à
317 medida que todos os fatores aumentam o rendimento também aumentou, sendo os de
318 maior influência a concentração de ácido acético e sua interação com o teor de pepsina.
319 A Equação 2 relaciona todas as variáveis significativas com o rendimento. Na extração
320 de colágeno em pele de bagre, Kiew e Don [41] obtiveram o máximo rendimento de
321 extração em 0,7 M de ácido acético, semelhante às condições deste estudo.

322
$$Y_2 = 10,47 + 12,34x_1 + 0,32x_2 + 1,40x_3 + 5,70x_1x_2 + 0,93x_1x_3 + 0,72x_2x_3 \text{ (Eq. 2)}$$

323 A Figura 2 contém a superfície de resposta gerada a partir das variáveis em
324 estudo. Observou-se que o rendimento máximo ocorreu no tratamento CF8, com 0,7 M
325 de ácido acético, 1% de pepsina e 36 horas de extração. As condições máximas dos
326 fatores favoreceram um maior rendimento. Hashim, Ridzwan e Bakar [5] encontraram
327 rendimento inferior em comparação ao tratamento CF8 no isolamento e caracterização
328 de colágeno em pés de frango, utilizando 0,5 M de ácido acético e 0,1% de pepsina.

329 Figura 2 - Superfície de resposta gerada para o rendimento de extração de colágeno em
 330 pés de frango



331

332 De maneira análoga, os experimentos com menores concentrações de ácido, de
 333 pepsina e menor tempo de hidrólise apresentaram menores rendimentos. Ao comparar
 334 os resultados obtidos para o teor de colágeno e o rendimento de extração (Tabela 3), foi
 335 observado que o presente estudo traz dois resultados distintos: um para maiores teores
 336 de colágenos e outro para maiores rendimentos em peso.

337 3.3 Perfil de aminoácidos

338 A porcentagem de área de cada aminoácido dos isolados de colágeno obtidos
 339 estão listados na Tabela 6. Foi observado que, assim como relata a literatura [42],
 340 praticamente 30% do total de aminoácidos dos isolados corresponde à glicina. Em todos
 341 os tratamentos, os aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina somam
 342 aproximadamente 50% do perfil de aminoácidos.

Conforme esperado, de acordo com o modelo matemático obtido para a extração de colágeno, foi observado que os tratamentos com menor tempo de hidrólise (CF1, CF2, CF3 e CF4) apresentaram os maiores valores de hidroxiprolina, o que implica em maiores teores de colágeno.

O teor de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina) nos isolados variou entre 17,4 em CF9 e 25,6% em CF3, que apresentou maior teor de hidroxiprolina. Simões et al. (2014) encontraram 21,3% de iminoácidos em isolados de colágenos de túnica albugínea suína; Lin e Liu [43] encontraram valores inferiores de iminoácidos em um estudo com pés de aves, pele bovina, pele de tubarão e pele suína variando de 13,4 a 17,7%. Estudos anteriores afirmam que o teor de prolina e hidroxiprolina no colágeno está relacionado à sua estabilidade térmica, pelo fato de tais aminoácidos atuarem na estabilização da tripla hélice, devido à ligação não-covalente do anel de pirrolidina [44, 45].

357 Tabela 6 – Perfil de aminoácidos dos isolados de colágeno extraídos de pés de frango (Médias e desvios)

Aminoácidos (% area)	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7	CF8	CF9	CF10	CF11
Ac. Aspártico	4,76 ± 0,13	3,08 ± 0,29	2,74 ± 0,37	4,74 ± 0,13	3,61 ± 0,19	3,44 ± 0,13	3,91 ± 0,35	3,89 ± 0,39	5,48 ± 0,15	4,38 ± 0,51	5,41 ± 0,33
Ác. Glutâmico	7,68 ± 0,13	7,79 ± 0,23	5,73 ± 0,04	7,48 ± 0,21	5,20 ± 0,14	4,92 ± 0,02	4,79 ± 0,13	4,39 ± 0,82	7,87 ± 0,14	7,32 ± 0,48	8,09 ± 0,36
Hidroxiprolina	9,35 ± 0,04	9,40 ± 0,21	11,33 ± 0,19	9,09 ± 0,16	7,81 ± 0,21	8,36 ± 0,12	7,92 ± 0,15	8,13 ± 0,20	7,75 ± 0,19	8,58 ± 0,09	7,92 ± 0,36
Serina	3,20 ± 0,23	3,10 ± 0,04	2,99 ± 0,12	3,48 ± 0,86	1,30 ± 0,03	1,03 ± 0,04	1,17 ± 0,25	1,33 ± 0,21	3,88 ± 0,28	3,66 ± 0,19	3,66 ± 0,34
Glicina	28,80 ± 0,28	28,90 ± 0,79	27,39 ± 0,54	28,70 ± 0,58	26,73 ± 0,05	28,39 ± 0,67	28,56 ± 0,78	28,63 ± 0,63	26,64 ± 0,53	27,79 ± 0,16	26,84 ± 0,42
Arginina	2,22 ± 0,12	2,21 ± 0,09	1,95 ± 0,23	2,16 ± 0,18	1,30 ± 0,03	1,37 ± 0,30	1,76 ± 0,08	1,94 ± 0,41	2,34 ± 0,32	2,15 ± 0,55	1,92 ± 0,19
Alanina	10,59 ± 0,62	10,61 ± 0,31	14,31 ± 0,31	9,74 ± 0,97	10,98 ± 0,19	11,68 ± 0,43	11,31 ± 0,92	11,27 ± 0,17	10,15 ± 0,24	10,99 ± 0,23	9,82 ± 0,12
Prolina	11,84 ± 0,13	12,22 ± 0,32	11,45 ± 0,14	12,69 ± 0,88	13,88 ± 0,37	13,97 ± 0,47	13,72 ± 0,85	13,23 ± 0,71	11,38 ± 0,09	11,97 ± 0,34	11,19 ± 0,41
Tirosina	6,00 ± 0,03	6,08 ± 0,29	5,51 ± 0,51	5,64 ± 0,46	5,64 ± 0,15	5,61 ± 0,02	5,48 ± 0,09	5,45 ± 0,13	5,29 ± 0,15	5,54 ± 0,16	5,50 ± 0,15
Valina	2,34 ± 0,04	2,30 ± 0,30	2,41 ± 0,05	2,42 ± 0,10	2,89 ± 0,18	2,63 ± 0,18	2,64 ± 0,21	2,90 ± 0,23	2,64 ± 0,33	2,50 ± 0,18	2,50 ± 0,32
Metionina	1,95 ± 0,03	1,94 ± 0,73	1,53 ± 0,37	1,62 ± 0,33	2,45 ± 0,19	2,05 ± 0,28	1,76 ± 0,59	2,64 ± 0,78	1,71 ± 0,89	1,07 ± 0,54	1,99 ± 0,34
Isoleucina	1,29 ± 0,12	1,38 ± 0,03	1,45 ± 0,19	1,40 ± 0,14	1,88 ± 0,21	1,60 ± 0,17	1,76 ± 0,08	1,69 ± 0,16	1,78 ± 0,17	1,43 ± 0,17	1,81 ± 0,52
Leucina	3,59 ± 0,11	3,68 ± 0,20	3,86 ± 0,09	3,61 ± 0,24	6,07 ± 0,35	5,14 ± 0,39	5,28 ± 0,17	4,83 ± 0,31	4,55 ± 0,11	4,38 ± 0,19	4,91 ± 0,17
Fenilalanina	1,60 ± 0,15	1,76 ± 0,06	2,28 ± 0,05	2,00 ± 0,17	3,46 ± 0,34	2,73 ± 0,59	2,82 ± 0,56	3,13 ± 0,59	2,27 ± 0,23	2,05 ± 0,14	2,30 ± 0,33
Lisina	4,79 ± 0,14	5,54 ± 0,07	5,06 ± 0,10	5,22 ± 0,14	6,79 ± 0,10	7,08 ± 0,65	7,13 ± 0,29	6,52 ± 0,63	6,27 ± 0,45	6,16 ± 0,20	6,14 ± 0,39
Iminoácidos (%)	19,94	20,01	25,64	18,83	18,79	20,04	19,23	19,4	17,9	19,57	17,74
Σ aminoácidos hidrofóbicos	80,55	81,37	84,51	80,39	83,09	83,19	82,42	83,23	78,04	79,96	78,44

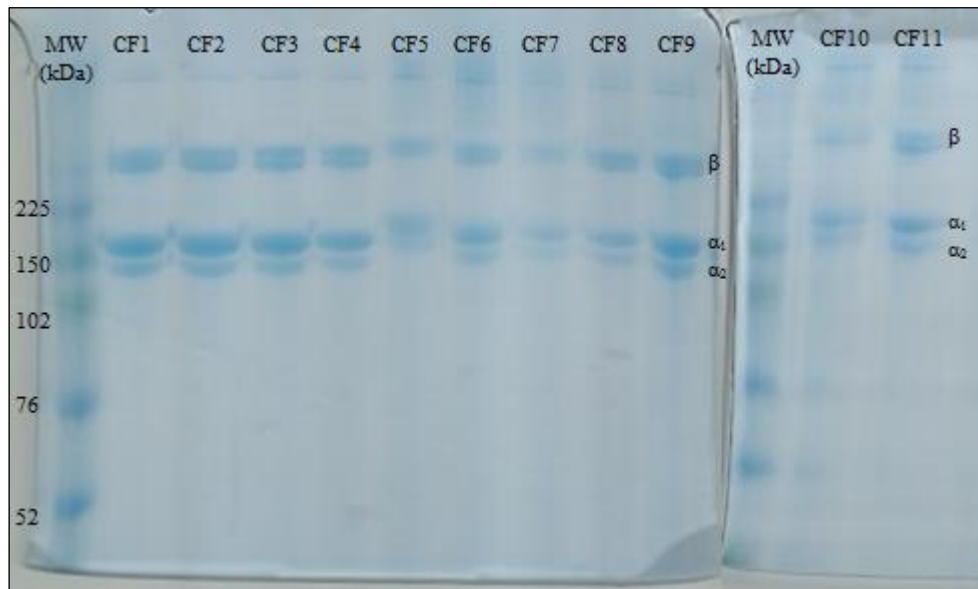
Foi observado também nos isolados obtidos a presença do aminoácido tirosina, sendo maiores nos tratamentos CF1 e CF2. Segundo a literatura, a presença deste aminoácido está relacionada a telopeptídeos que permaneceram após a hidrólise enzimática (Nomura et al., 1994). Os telopeptídeos estão relacionados aos sítios de ligações cruzadas na estrutura do colágeno, tornando-o menos solúvel em água [8, 46].

Do total de 16 aminoácidos investigados, 11 apresentam caráter hidrofóbico. Para Bailey e Light [47], altos teores de aminoácidos hidrofóbicos no colágeno o torna disponível para uso na indústria como emulsificante, porém sua solubilidade em água diminui. Os tratamentos do ponto central CF9, CF10 e CF11 apresentaram menores somatórias de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto que o tratamento CF3 apresentou a maior somatória, totalizando 84,51%.

3.4 Perfil eletroforético dos isolados de colágeno

A distribuição de peso molecular das cadeias encontradas nos isolados de colágeno obtidos nos tratamentos CF1 a CF11 está apresentada na Figura 3. Foi observado que todos os tratamentos apresentaram a mesma distribuição, com uma cadeia β e duas cadeias α distintas (α_1 e α_2), o que indica a predominância do colágeno tipo I. O mesmo perfil foi encontrado por Lin e Liu [48], em estudo com colágeno pobre em telopeptídeos de pés de aves. Entre os tratamentos, foi observado que para a mesma quantidade de amostra utilizada na análise, os tratamentos CF5, CF6, CF7 e CF8, todos com 36 horas de hidrólise, apresentaram bandas mais claras que os demais tratamentos, indicando provavelmente menores teores de colágeno, como visto na Tabela 2.

Figura 3 - Perfil eletroforético dos isolados de colágeno extraídos de pés de frango

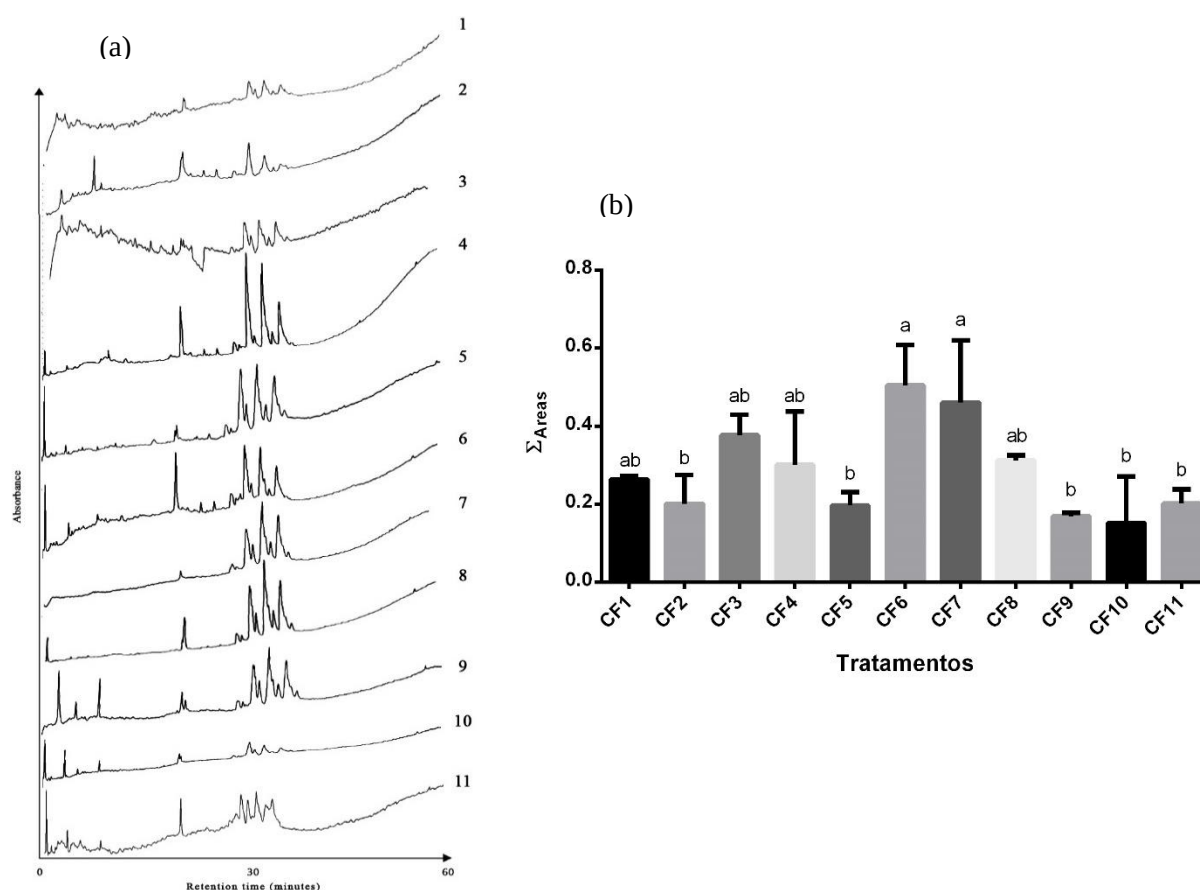


Quanto à distribuição do peso molecular das cadeias, as cadeias α_1 e α_2 apresentaram peso molecular próximo a 150 kDa, semelhante à distribuição encontrada por Hashim, Ridzwan e Bakar [5] em colágeno de pés de frango extraídos com pepsina e papaína, e por Lin e Liu [43], ao estudar colágeno tipo I em diferentes espécies.

3.5 Hidrofobicidade dos peptídeos obtidos

Os cromatogramas obtidos para os peptídeos obtidos nos isolados de colágenos e o gráfico com o somatório das áreas dos cromatogramas estão dispostos na Figura 4. O processo de extração de colágeno, devido ao uso de ácido e de enzima proteolítica, faz a quebra da proteína collagenosa em peptídeos, a depender das quantidades de ácido, de enzima e do tempo que pode durar este processo.

392 Figura 4 - Cromatogramas do HPLC (a) e somatório das áreas dos cromatogramas (b)
 393 obtidos de isolados de colágeno extraídos de pés de frango



394 Foi observado nos cromatogramas (Figura 4a) que em todos os tratamentos a
 395 maior parte dos picos ocorreu por volta dos 30 minutos em diante. De acordo com
 396 Bezerra et al. [27] a separação dos peptídeos foi realizada utilizando um gradiente linear
 397 (100-0%) de água durante 60 min, portanto, aqueles que são eluídos entre 0 e 30 min
 398 apresentam predominância da natureza hidrofílica e de 30 a 60 min a maioria dos
 399 peptídeos tendem a apresentar natureza hidrofóbica. Sendo assim, os peptídeos gerados
 400 na provavelmente predominam natureza hidrofóbica, o que justifica pela predominância
 401 de aminoácidos hidrofóbicos no perfil obtido da Tabela 6. No gráfico correspondente à
 402 somatória das áreas dos cromatogramas (Figura 4b), foi verificado que os maiores
 403 valores se encontraram nos tratamentos CF6 e CF7, ambos com 36 horas de hidrólise.

Nos pontos centrais foi verificado juntamente com os tratamentos CF2 e CF5 as menores somatórias, indícios de apresentarem menos peptídeos detectados.

3.6 Propriedades funcionais dos isolados de colágeno

3.6.1 Solubilidade em água a 70 °C (SA)

As médias e desvios obtidos para a solubilidade em água a 70 °C estão listados na Tabela 7. Foi observado que os valores foram muito baixos quando o tempo de hidrólise foi o mínimo, de 12 horas. O tratamento CF5, seguido dos tratamentos do ponto central (CF9, CF10 e CF11), apresentaram maior solubilidade em água.

Provavelmente, o tempo de hidrólise influenciou diretamente na solubilidade dos isolados em água, por permitir que em tempos maiores ocorram mais rupturas de ligações e os terminais de aminoácidos livres podem se ligar à água por pontes de hidrogênio [49]. Os tempos correspondentes ao ponto central e o tratamento CF5 com 36 horas de hidrólise apresentaram os maiores valores de SA. Entretanto, os tratamentos CF6, CF7 e CF8 apresentaram uma diminuição progressiva da solubilidade. Este comportamento pode ser justificado pelo fato de outros fatores que contribuíram com a hidrólise, como concentração de ácido e teor de pepsina, ao tornar a molécula de colágeno mais fragmentada provavelmente expuseram mais aminoácidos, que de acordo com o perfil de aminoácidos obtido na Tabela 6 são em sua maioria de natureza hidrofóbica, não permitindo ligações com moléculas de água.

Tabela 7 – Propriedades Funcionais dos isolados de colágeno extraídos de pés de frango (Médias e desvios)

Tratamento	x ₁ - Ac. Acético (mol/L)	x ₂ - Pepsina (%)	x ₃ - tempo hidrólise (h)	SA(%)	AE (%)	CAA (g/g)
CF1	0,3 (-1)	0,1 (-1)	12 (-1)	1,72 ± 0,54 de	72,10 ± 1,92 e	0,98 ± 0,21 ab
CF2	0,7 (+1)	0,1 (-1)	12 (-1)	2,10 ± 0,45 de	74,81 ± 1,38 cd	0,97 ± 0,18 b

CF3	0,3 (-1)	1,0 (+1)	12 (-1)	$1,27 \pm 0,10$ e	$72,13 \pm 1,21$ de	$0,98 \pm 0,33$ a
CF4	0,7 (+1)	1,0 (+1)	12 (-1)	$1,12 \pm 0,27$ e	$71,82 \pm 1,13$ e	$0,98 \pm 0,30$ a
CF5	0,3 (-1)	0,1 (-1)	36 (+1)	$11,94 \pm 0,93$ a	$76,19 \pm 1,30$ c	$0,84 \pm 0,19$ h
CF6	0,7 (+1)	0,1 (-1)	36 (+1)	$9,73 \pm 0,68$ b	$78,33 \pm 0,79$ a	$0,88 \pm 0,11$ e
CF7	0,3 (-1)	1,0 (+1)	36 (+1)	$5,03 \pm 0,43$ c	$73,77 \pm 1,87$ bc	$0,93 \pm 0,27$ d
CF8	0,7 (+1)	1,0 (+1)	36 (+1)	$3,77 \pm 0,58$ cd	$75,33 \pm 1,81$ c	$0,95 \pm 0,09$ c
CF9	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)	$10,03 \pm 0,47$ ab	$75,91 \pm 1,82$ bc	$0,86 \pm 0,11$ fg
CF10	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)	$11,52 \pm 0,48$ ab	$75,78 \pm 1,59$ bc	$0,85 \pm 0,23$ g
CF11	0,5 (0)	0,55 (0)	24 (0)	$11,73 \pm 0,62$ ab	$77,38 \pm 1,50$ b	$0,85 \pm 0,20$ g

SA: Solubilidade em água a 70 °C; AE: Atividade emulsificante; CAA: Capacidade de absorção de água a 60 °C.

Os valores obtidos de solubilidade em água de modo geral foram baixos, quando comparados a estudos com colágeno de outras espécies. Simões et al. [16] encontrou valores de solubilidade mais elevados em túnica albugínea suína (70,02 %). Kong et al [50] obteve para o colágeno em peito de frango tratado a 121 °C solubilidade de 36,1%, justificando o baixo valor obtido pelo fato de o frango ser mais rico em ligações cruzadas, e, por conseguinte, de uma maior estabilidade. Coró, Youssef e Shimokomaki [15] ao estudarem as mudanças relacionadas à idade em peito de frangos, com relação à formação de piridinolina e à textura da carne, verificaram que tal concentração aumentou 4,5 vezes entre 20 e 40 dias de idade, consequentemente diminuindo sua solubilidade. Outro indicativo de estabilidade das ligações é a porcentagem de tirosina no perfil de aminoácidos dos isolados (Tabela 6), que foi maior nos tratamentos CF1 e CF2, com menor solubilidade, indicando que podem estar ainda presentes as ligações cruzadas nos isolados.

3.6.2 Atividade emulsificante (AE)

De forma oposta à solubilidade em água, os isolados obtidos de modo geral apresentaram alta atividade emulsificante quando comparado a outras espécies. Kim e Park [30] encontraram valores entre 43,7 e 50,4% para a atividade emulsificante em

colágeno parcialmente purificado de descartes do processamento de surimi; Simões et al. [16] obtiveram em túnica albugínea suína atividade média de 31,56 %.

Os isolados de colágeno apresentaram médias de atividade emulsificante que variaram de 71,82 a 78,33%, sendo o valor mais alto obtido no tratamento CF6, com 0,7 mol/L de ácido acético, 0,1% de pepsina e 36 horas de hidrólise. Os tratamentos CF1, CF3 e CF4 apresentaram menor atividade emulsificante, tendo os três isolados em comum o mesmo tempo de hidrólise, de 12 horas. Provavelmente, maiores tempos de hidrólise podem ocasionar em maior exposição dos aminoácidos hidrofóbicos, que de acordo com Bailey & Light [47] os altos teores destes aminoácidos tornam o colágeno com propriedades emulsificantes.

3.6.3 Capacidade de absorção de água (CAA)

Os resultados da capacidade de absorção de água variaram de 0,84 a 0,98 g de água por grama de extrato seco, sendo maior a absorção nos tratamentos com menor tempo de hidrólise: CF1, CF3 e CF4. Paralelamente, tais tratamentos obtiveram os menores valores de solubilidade, corroborando as observações de Gómez-Guillén et al. [8], os quais afirmam que a neutralização do colágeno nativo em meio ácido gera um gel caracterizado por ter boa retenção de água e insolubilidade em água. Moraes & Cunha [51] em um estudo sobre propriedades de gelificação e capacidade de retenção de água de colágeno em diferentes condições de temperatura e de pH, obtiveram valores semelhantes para a retenção de água na condição de hidrólise a 50°C e 60°C, com pH 7.

3.7 Propriedades bioativas: atividade antioxidante e habilidade quelante de ferro

3.7.1 Atividade antioxidante: método DPPH

No método de determinação da atividade antioxidante pela captura do radical DPPH, nenhum dos isolados de colágenos extraídos apresentaram sensibilidade, não havendo atividade mensurada por esta análise.

3.7.2 Atividade antioxidante: método ABTS

Os valores obtidos para a porcentagem de inibição do radical ABTS pelos isolados de colágeno extraídos estão plotados graficamente na Figura 5A, juntamente com os valores obtidos para as amostras comerciais de gelatina e colágeno hidrolisado. Foi observado que o colágeno hidrolisado comercial apresentou maior porcentagem de inibição do ABTS, e dentre os isolados o tratamento CF5 apresentou a maior atividade antioxidante. Ao comparar os tratamentos CF1 e CF5, os quais apresentaram respectivamente mínima e máxima inibição de ABTS, a diferença entre eles está apenas no tempo de hidrólise, o que prova sua relação direta com a atividade antioxidante do colágeno extraído. A amostra GLT, por se tratar de um produto extraído em altas temperaturas, apresentou baixa atividade antioxidante, provavelmente por inativação de parte das estruturas responsáveis pela inibição.

A amostra CLGH apresentou maior percentual de inibição do radical ABTS, provavelmente pelo seu método de obtenção permitir maior hidrólise do colágeno, em relação aos isolados obtidos neste estudo. A porcentagem de inibição dos isolados variou de 8,42% (CF3) a 37,48% (CF5), atingindo maior atividade antioxidante do que os hidrolisados obtidos por hidrólise enzimática de fígado de frango no estudo conduzido por Chakka et al. [20], cujos valores variaram de 8,61 a 19,29%.

3.7.3 Atividade antioxidante: poder de redução pelo método FRAP

O poder de redução dos isolados de colágeno e das amostras comerciais de gelatina e colágeno hidrolisado estão distribuídas graficamente na Figura 5B. Conforme

observado no ensaio de inibição do radical ABTS, o colágeno hidrolisado comercial apresentou maior absorbância em relação aos demais tratamentos, provavelmente pelo fato do processo de hidrólise ter permitido maior fragmentação das estruturas em peptídeos. Dentre os isolados de colágeno extraídos de pés de frango, o tratamento CF8 apresentou maior absorbância, indicando maior poder de redução e maior atividade antioxidante. Provavelmente, a combinação dos fatores em quantidade máxima aumentou o potencial de redução deste isolado. Todos os demais tratamentos com 36 horas e os tratamentos do ponto central do planejamento estatístico (CF9, CF10, CF11) apresentaram baixo poder redutor.

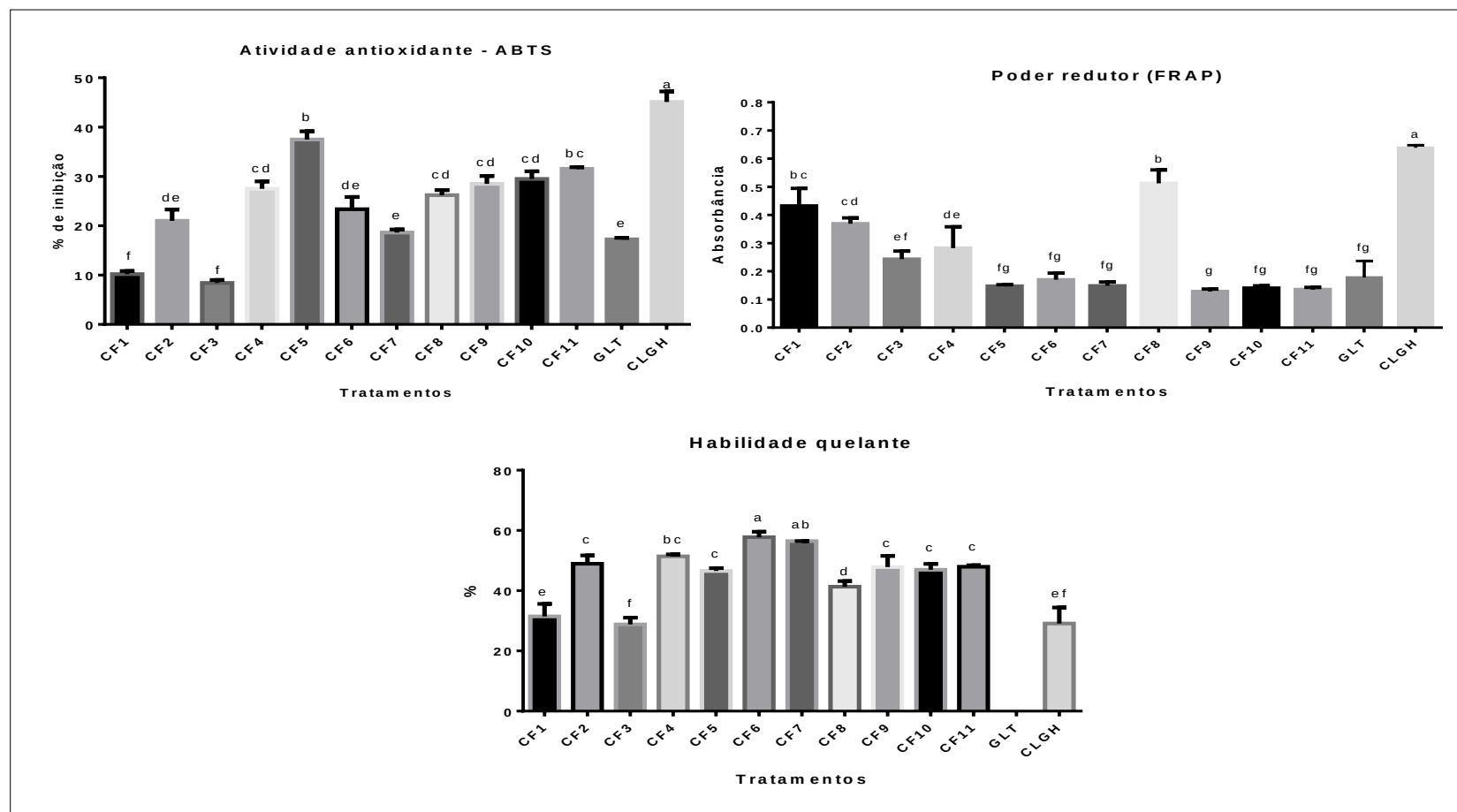
Os valores de absorbância dos isolados de colágeno variaram entre 0,129 (CF9) e 0,512 (CF8). Jeevithan et al. [19], em um estudo sobre as propriedades de colágeno tipo II de tubarão-baleia obtiveram valores máximos de 0,18 de absorbância, apresentando poder redutor muito baixo comparado a este e outros estudos com outras espécies [52].

3.7.4 Habilidade quelante de ferro

Os valores das porcentagens de atividade quelante dos isolados de colágeno e das amostras comerciais estão distribuídos graficamente na Figura 5C. Inicialmente, foi observado que a gelatina comercial GLT não apresentou atividade quelante de ferro, provavelmente devido ao seu método de obtenção. O colágeno hidrolisado apresentou atividade quelante dentro do intervalo encontrado para os isolados. Dentre os tratamentos, CF6 e CF7 apresentaram maior porcentagem de atividade quelante, provavelmente pelo efeito do maior tempo de hidrólise associado à interação das variáveis concentração de ácido acético (x_1) e teor de pepsina (x_2). Os menores valores foram obtidos nos tratamentos CF3 e CF1, ambos com menor concentração de ácido acético e menor tempo de hidrólise. Li et al. [53], em um estudo sobre isolamento e

515 identificação de peptídeos antioxidantes de colágeno hidrolisado suíno obtiveram
516 valores que variaram de 9,5%, para a extração com pepsina, a 37,4%, quando o
517 colágeno foi hidrolisado com um coquetel de proteases microbianas. No presente
518 estudo, o uso de pepsina aliado a controle de fatores como concentração de ácido e
519 tempo de hidrólise permitiu o alcance de maiores resultados de atividade quelante de
520 ferro nos isolados de colágeno.

521 Figura



523 Atividade antioxidante pela inibição do radical ABTS (A), poder redutor pelo método FRAP (B) e habilidade quelante de ferro (C)

524 (A)

525

526

527

528

(C)

529

530

531

532

533 GLT: amostra comercial de gelatina; CLGH: amostra comercial de colágeno hidrolisado

4. CONCLUSÕES

O processo de obtenção de colágeno em pés de frango a partir das condições estudadas apresentou duas diferentes conclusões: visando o máximo teor de colágeno, foi possível obter isolados com mais de 95% de colágeno aumentando a concentração de pepsina (1%) e diminuindo o tempo de hidrólise (12 horas). Entretanto, as moléculas nesta condição apresentaram baixas propriedades funcionais e bioativas, podendo atuar apenas como emulsificantes na indústria. Isolados com alto rendimento de extração com propriedades satisfatórias de solubilidade, absorção de água, capacidade antioxidante e quelante de ferro foram obtidos nos tratamentos com altos teores de pepsina e maior tempo de hidrólise (36 horas), porém a hidrólise estendida diminuiu o teor de colágeno.

REFERÊNCIAS

- [1] R. Perez-Tamayo, Pathology of Collagen Degradation. *American Journal of Pathology*, (1978) 509–566.
- [2] N. P. Omelyanenko, L. I. Slutsky, S. P. Mironov, *Connective Tissue: Histophysiology, Biochemistry, Molecular Biology*, First edition, CRC Press, 2013.
- [3] R. Mohammadi, M. A. Mohammadifar, A. M. Mortazavian, M., Rouhi, J. B. Ghasemi, Z. Delshadian, Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM), *Food Chemistry*, 190 (2016) 186–193.
- [4] OECD, Meat consumption (indicator). [http:// 10.1787/fa290fd0/](http://10.1787/fa290fd0/), 2013 (accessed 05.07.2016)
- [5] P. Hashim, M. S. Ridzwan, J. Bakar, Isolation and Characterization of Collagen from Chicken Feet, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8 (2014)147–151.

- 557 [6] V. Ferraro, M. Anton, V. Santé-Lhoutellier, The sister's α -helices of collagen, elastin and
558 keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of
559 application, *Trends in Food Science and Technology*, 51 (2016) 65-75.
- 560 [7] R. Schrieber, H. Gareis, *Gelatin handbook: Theory and industrial practice*. Wiley-VCH,
561 2007.
- 562 [8] M. C. Gomez-Guillen, B. Giménez, M. E. López-Caballero, M. P. Monteiro, Functional
563 and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food*
564 *Hydrocolloids*, 25 (2011) 1813–1827.
- 565 [9] Y. Zhang, K. Olsen, A. Grossi, J. Otte, Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of
566 bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides, *Food chemistry*, 141 (2013)
567 2343–2354.
- 568 [10] L. Guo, P. A. Harnedy, M. B. O’Keeffe, L. Zhang, B. Li, H. Hou, R. J. FitzGerald,
569 Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating
570 peptides, *Food Chemistry*, 173 (2015) 536–542.
- 571 [11] J. H. Lee, J. Lee, K. B. Song, Development of a chicken feet protein film containing
572 essential oils, *Food Hydrocolloids*, 46 (2015) 208–215.
- 573 [12] Y. J. Lin, G. W. Le, J. Y. Wang, Y. X. Li, Y. H. Shi, J. Sun, Antioxidative peptides
574 derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted acid pre-treatment
575 and nitrogen protection, *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2010) 4297–4308.
- 576 [13] P. Selvakumar, T. C. Ling, A. D. Covington, A. Lyddiatt, Enzymatic hydrolysis of
577 bovine hide and recovery of collagen hydrolysate in aqueous two-phase systems, *Separation*
578 *and Purification Technology*, 89 (2012) 282–287.

- 579 [14] S. P. Robins, M. Shimokomaki, A. J. Bailey, The Chemistry of the Collagen Cross-
580 Links: age-related changes in the reducible components of intact bovine collagen fibres,
581 Biochemistry Journal, 131 (1973) 773-780.
- 582 [15] F. A. G. Coró, E. Y. Youssef, M. Shimokomaki, Age related changes in poultry breast
583 meat collagen pyridinoline and texture, Journal of Food Biochemistry, 26 (2003) 533-541.
- 584 [16] G. S. Simões, E. T. F. Silveira, S. R. Oliveira, E. Poleze, J. R. D. Allison, E. I. Ida, M.
585 Shimokomaki, Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of
586 immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen,
587 Meat Science, 96 (2014) 1460-1468.
- 588 [17] D. A. Cuevas-Acuña, R. M. Robles-Sanchez, W. Torres-Arreola, E. Marquez-Rios, J. M.
589 Ezquerra-Brauer, Collagen from jumbo squid fin: extracting conditions and influence of the
590 protease system on collagen hydrolysate antioxidant activity, CyTA - Journal of Food, 14:2
591 (2016) 193-199.
- 592 [18] A. Saiga, K. Iwai, T. Hayakawa, Y. Takahata, S. Kitamura, T. Nishimura, F. Morimatsu,
593 Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides Obtained from Chicken Collagen
594 Hydrolysate, J. Agric. Food Chem., 56 (2008) 9586–9591.
- 595 [19] E. Jeevithan, Z. Jingyi, N. Wang, L. He, B. Bao, W. Wu, Physico-chemical, antioxidant
596 and intestinal absorption properties of whale shark type-II collagen based on its solubility
597 with acid and pepsin, Process Biochemistry, 50 (2015) 463-472.
- 598 [20] A. K. Chakka, M. Elias, R. Jini, P. Z. Sakhare, N. Bhaskar, In-vitro antioxidant and
599 antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein
600 hydrolysates, Journal of Food Science and Technology, 52 (2015) 8059–8067.

- 601 [21] AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official
602 Analysis Chemists International, (2007) CD-ROM.
- 603 [22] J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of
604 total lipides from animal tissues, *The Journal of Biological Chemistry*, 226 (1957) 497-509.
- 605 [23] M. Shimokomaki, V. C. Duance, A. J. Bailey, Identification of two further collagenous
606 fractions from cartilage, *Bioscience reports*, 1 (1981) 561-570.
- 607 [24] J. A. White, R. J. Hart, J. C. Fry, An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the
608 amino-acid analysis of food materials, *Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory*
609 *Automation*, 8 (1986) 70-177.
- 610 [25] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the
611 bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 680–685.
- 612 [26] L. Wang, X. An, Z. Xin, L. Zhao, Q. Hu, Isolation and characterization of collagen from
613 the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*), *Journal of Food Science*, 72 (2007) 450-455.
- 614 [27] T. K. A. Bezerra, A. R. R. Araújo, E. S. Nascimento, J. E. M. Paz, C. A. Gadelha, T.
615 Santi-Gadelha, M. T. B. Pacheco, R. C. R. E. Queiroga, M. E. G. Oliveira, M. S. Madruga,
616 Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria, *Food*
617 *Chemistry*, 196 (2016) 359–366.
- 618 [28] R. Timpl, R. W. Glanville, H. Nowack, H. Wiedemann, P. P. Fietzek, K. Kuhn, Isolation,
619 chemical and électron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen
620 from fetal bovine skin, *Hoppe-Seyler’s Z Physiology and Chemistry*, 356 (1975) 1783-1792.
- 621 [29] P. Montero, C. Alvarez, M. A. Marti, A. J. Borderias, Plaiice skin collagen extraction and
622 functional properties, *Journal of Food Science*, 60 (1995) 1-3.

- 623 [30] J. Kim, J. Park, Partially purified collagen from refiner discharge of Pacific whiting
624 surimi processing, *Journal of food science*, 70 (2005) 511-516.
- 625 [31] S. Chandini, P. Ganesan, N. Bhaskar, In vitro antioxidant activities of three selected
626 brown seaweeds of India, *Food Chemistry*, 107 (2008) 707–713.
- 627 [32] M. S. M. Rufino, R. E. Alves, E. S. Brito, S. M. Moraes, C. G. Sampaio, J. Pérez-
628 Jiménez, F. D. Saura-Calixto, Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante
629 total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa*, ISSN
630 1679-6535, 2007.
- 631 [33] I. F. F. Benzie, J. J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure
632 of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239 (1996) 70-76.
- 633 [34] R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary as determined by a
634 modified ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*,
635 48 (2000) 3396-3402.
- 636 [35] L. L. Stookey, Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron, *Analytical*
637 *Chemistry*, 42 (1970) 779-781.
- 638 [36] M. Senevirathne, S. H. Kim, N. Siriwardhana, J. H. Ha, K. W. Lee, Y. J. Jeon,
639 Antioxidant Potential of Ecklonia cava on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal
640 Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition, *Food Science and Technology*
641 *International*, 12 (2006) 27–38.
- 642 [37] Statsoft, Statistica for Windows Software. v. 5.0, Tulsa, OK, USA, 2004.
- 643 [38] Silva, F.A.S. ASSISTAT - Software: statistical assistance. Version 7.7 beta, 2016.

- 644 [39] D. C. Liu, Y. K. Lin, M. T. Chen, Optimum condition of extracting collagen from
 645 chicken feet and its characteristics, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14 (2001)
 646 1638-1644.
- 647 [40] A. Zienkiewicz, J. D. Rejón, J. Dios Alché, M. I. Rodríguez-García, A. J. Castro, A
 648 protocol for protein extraction from lipid-rich plant tissues suitable for electrophoresis,
 649 *Methods Mol Biol.*, 1072 (2014) 85-91.
- 650 [41] P. L. Kiew, M. Don, The Influence of Acetic Acid Concentration on the Extractability of
 651 Collagen from the Skin of Hybrid *Clarias* sp. and Its Physicochemical Properties : A
 652 Preliminary Study, *Focusing on Modern Food Industry*, 2 (2013) 123–128.
- 653 [42] B. Giménez, J. Turnay, M. A. Lizarbe, P. Montero, M. C. Gómez-Guillén, Use of Lactic
 654 Acid for Extraction of Fish Skin Gelatin, *Food Hydrocolloids*, 19 (2005) 941–950.
- 655 [43] Y. K. Lin, D. C. Liu, Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from
 656 different species, *Food Chemistry*, 99 (2006b) 244–251.
- 657 [44] J. Jose, W. F. Harrington, Role of pyrrolidine in the structure and stabilization of
 658 collagen. *Journal of Molecular Biology*, 9 (1964) 269–287.
- 659 [45] M. Bhowmick, G. B. Fields, G. B, Stabilization of Collagen-Model, Triple-Helical
 660 Peptides for In Vitro and In Vivo Application, *Methods of Molecular Biology*, 1081 (2013)
 661 167–194.
- 662 [46] J. A. Bailey, M. Shimokomaki, Age related changes in the reducible cross-links of
 663 collagen, *FEBS Letters*. 16 (1971) 86-88.
- 664 [47] J. A. Bailey, N. D. Light, *Connective tissue in meat and meat products*, Elsevier Applied
 665 Science, New York, 1989.

- [48] Y. K. Lin, D. C. Liu, Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet, *Food Chemistry*, 94 (2006a) 621–625.
- [49] G. N. Ramachandran, A. H. Reddi, *Biochemistry of Collagen*, Plenum Press, Nova York, 1976.
- [50] F. Kong, J. Tang, M. Lin, B. Rasco, Thermal effects on chicken and salmon muscles: Tenderness, cook loss, area shrinkage, collagen solubility and microstructure. *LWT*, 41 (2008) 1210-1222.
- [51] M. C. Moraes, R. L. Cunha, Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at diferente temperature and pH values, *Food Research International*, 50 (2013) 213-223.
- [52] C. Y. Chang, K. C. Wu, S. H. Chiang, Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates, *Food Chemistry*, 100 (2007) 1537–1543.
- [53] B. Li, F. Chen, X. Wang, B. Ji, Y. Wu, Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 102 (2007) 1135–1143.

**ARTIGO 3: QUALITY OF LOW-FAT CHICKEN SAUSAGES WITH ADDED
CHICKEN FEET COLLAGEN**

LOW-FAT SAUSAGES WITH COLLAGEN GELATIN FROM CHICKEN FEET

Quality of low-fat chicken sausages with added chicken feet collagen

Íris B. S. Araújo*¹, Darlinne A. S. Lima[#], Sérgio F. Pereira[#], Marta S. Madruga[#]

*Department of Agroindustrial Management and Technology, Federal University of Paraíba, Campus III, Paraíba state (PB), Brazil.

[#]Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, Campus I, Paraíba state (PB), Brazil.

¹Corresponding author: iris@cchsa.ufpb.br, Telephone number: +55(83)3367-5571

Scientific section for the paper: Processing and Products.

ABSTRACT. The present study aimed to replace the fat in cooked chicken sausages with commercial hydrolyzed collagen powder and chicken feet gelatin and to assess the qualities underlying physicochemical and sensory parameters. Three sausages were prepared: SS (15% fat), SC (7.5% fat and 7.5% hydrolyzed collagen powder) and SG (7.5% fat and 7.5% chicken feet gelatin). The reduction of fat increased the values of a^* , b^* and Hue. With regard to emulsion stability, SG had the closest value (95.86%) to the standard (SS) value and was more stable than the SC sausage (87.33%). With regard to texture profile, the SC sausage had similar parameters to SS, and the SG sample had lower adhesiveness, gumminess and chewiness. With regard to fatty acid profile, SG had the lowest atherogenic and thrombogenic indices. The use of 50% gelatin was viable because it increased emulsion stability and water retention, in addition to using byproduct to prepare healthier sausages, especially regarding fat reduction.

Keywords: Byproducts, Cardiovascular diseases, Low-fat meat products, Water-holding capacity.

INTRODUCTION

Frankfurt-type sausages (frankfurters) are widely produced and consumed worldwide, either for their low cost or for convenience (Feiner et al., 2006; Choe et al., 2013). According to Villamonte et al. (2013), the levels of fat used that result in improved emulsion quality range from 30 to 40%. These high levels are added to formulations improve the flavor and texture of the products during chewing, and these sensations may be affected by fat reduction (Yilmaz, 2005). Brazilian law sets a maximum limit of 30% fat in frankfurters (Brazil, 2000).

Because these products have high fat content, excessive consumption may contribute to obesity, which is associated with chronic diseases, including diabetes, cardiac diseases, high blood pressure and some forms of cancer (WHO, 2009). To maintain the supply of meat products without causing such problems, the alternative would be to produce these foods with reduced fat content.

The simplest alternative for replacing fat in meat products is to use leaner cuts; however, this method implies an increase in the cost of production, rendering this procedure unfeasible for the industry. Other ways to reduce fat content consist of using flours, fiber, starches, gums (xanthan, carrageenan, konjac), lipid sources rich in polyunsaturated fatty acids, protein (such as hydrolyzed collagen) and other water-based ingredients, including gels and hydrocolloids (Choe et al., 2013; Prestes et al., 2015; Luereña-Martinez, Vivar-Quintana and Revilla, 2004; Jimenez-Colmenero et al., 2010; Marchetti, Andrés and Califano, 2014; Sousa et al., 2017; Furlán, Padilla and Campderrós, 2014).

The use of fat in meat products improves its sensory and physicochemical properties and quality characteristics. Therefore, its reduction may cause problems, including the loss of tenderness and juiciness, in addition to cooking weight losses due to decreased water

retention. Such problems may be minimized by adequately choosing the fat replacer and the level of fat reduction used in meat products (Ordoñez, Rovira and Jaime, 2001; Faria et al., 2015).

The choice of a fat replacer suitable for the meat product can increase the content of essential nutrients, such as fiber, vitamins, minerals, polyunsaturated fatty acids or proteins, while maintaining its quality (Triki et al., 2013; Alves et al., 2016). Several of these ingredients derive from food industry waste, thus also contributing to reduce production and environmental costs by utilizing this waste (Prestes et al., 2015).

Among the fat replacers derived from the meat packing industry, collagen is an animal protein source with considerable quantities of essential amino acids and may be produced from several byproducts, including poultry feet (Alves and Prudencio-Ferreira, 2002; Nomura et al., 1996; Liu et al, 2001; Lin, Liu, 2006), fish scales and mammal skin and tendons (Huang and Nimni, 1993). Adding collagen to meat products increases gelification and the water-holding capacity, thereby maintaining the juiciness of those products when replacing fat (Prestes, Carneiro and Demiate, 2012).

The use of hydrolyzed collagen powder in emulsified meat products can be disadvantageous to hardness, primarily because of the ability to bind water. Sousa et al., 2017, when characterizing chicken sausages with different levels of fat replacement with hydrolyzed collagen powder, determined that 50% replacement increased the water-holding capacity but adversely affected key textural parameters, including hardness, adhesiveness and cohesiveness. A means by which to minimize these effects would be adding gelatin to improve the water-holding capacity of the emulsified matrix without affecting the textural traits of the final product. Considering the aforementioned issues, this study aimed to assess

the effect of replacing fat with chicken feet gelatin and with commercial collagen powder on the physicochemical, physical and sensory characteristics of chicken frankfurters.

MATERIAL AND METHODS

Experimental material and inputs

Feet from chickens slaughtered between 42 and 47 days of age, condiments and the additives necessary to prepare the chicken sausages were purchased in the local market of the city of João Pessoa (Paraíba state (PB), Brazil). The chicken meat used was a gift from the company Mauricea Alimentos (Nazaré da Mata, Pernambuco state (PE), Brazil). The reagents and standards used in the tests were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The L-hydroxyproline standard was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Other reagents used in the study were analytical-grade reagents.

Extraction and chemical composition of chicken feet collagen

The chicken feet were boned, cut and subjected to acidic and enzymatic collagen extraction, following Shimokomaki et al. (1981) and Simões et al. (2014). The chicken feet were immersed in acetic acid (0.3 mol/L) for 24 hours at a 1:10 ratio (w/v). After homogenization in a Turrax blender (IKA, model T25) for ten minutes at 5000 g, 1% pepsin was added to the resulting mixture, maintaining the temperature of 4°C for 12 hours. The hydrolysis was interrupted by increasing the pH to 7.5 with 1 mol/L NaOH and subsequently centrifuging for 30 minutes at 10,000 g at 4°C. The supernatant was precipitated with NaCl to a concentration of 3 mol/L, and the mixture was centrifuged again at 10,000 g for 30 minutes at 4°C. The precipitate, the gelatin produced, was dialyzed for 72 hours in a 0.5 mol/L acetic acid solution, replacing the solution daily. The collagen in the resulting gel was quantified based on the hydroxyproline content according to the method by the AOAC (2007). All tests were performed in triplicate.

Preparation of low-fat chicken sausages

Three sausage formulations (Table 1) were processed, including a standard formulation with 15% backfat in the formulation (SS), a formulation with 7.5% backfat and 7.5% commercial hydrolyzed collagen powder (SC) (Germina[®], Parnamirim, RN, Brazil) and another with 7.5% backfat and 7.5% chicken feet gelatin (SG). A 50% fat replacement with collagen was used in this study because this was the best formulation obtained by Sousa et al. (2017) when studying different levels of fat replacement with collagen powder.

Chicken meat and backfat were thawed for 24 h at 7°C, weighed, comminuted and emulsified in a cutter (CR-4L, Skymsem, Brazil) together with the other ingredients for five minutes. Then, the emulsions were encased into a cellulose casing with a 32-mm diameter (Viscofan, Spain) using a manual sausage stuffer, manually bundled and cooked in a water bath for 80 min, at an internal temperature of 72°C as measured by a contact thermometer (Incoterm, Brazil). After cooking, the casings were manually removed, and the sausages were cooled in cold water and vacuum-packed in high-density polyethylene (HDPE) bags. The sausages were stored under refrigeration at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ and were analyzed after 12 hours. Two sausage-processing batches were prepared, and three samples were analyzed for each treatment.

Sensory Evaluation

Quantitative descriptive analysis (QDA) of the low-fat sausages was performed according to the method proposed by Meilgaard, Civille and Carr (1999), which involved the stages of candidate pre-selection and development of descriptive terminology (Moskowitz, 1983). The latter generated the following descriptors, outlined in Table 2: pink color, visual homogeneity, visual juiciness, tenderness, juiciness, granularity, water exudation, chewiness, chicken aroma, condiment aroma, rancid aroma, chicken flavor and saltiness. The panelists

were trained and selected, and only those who were approved evaluated the samples. The study was previously approved by the Human Research Ethics Committee (CAAE): 65402717.8.0000.5188), thus meeting the ethical and scientific requirements established in Resolution number 466 of the National Health Council (Brazil, 2012). The sausages were presented to the panelists only after compliance with the following microbiological parameters established by Brazilian law for cold cooked meat was assessed: positive *Staphylococcus* coagulase coliforms at 45 °C, sulfite-reducing Clostridia and *Salmonella* detection (Brasil, 2001).

Twenty-five potential consumers of sausages and other chicken meat-based products were pre-selected, of which 16 were eligible to develop descriptive terminology. After this stage, they were subjected to training, and after statistical analysis via analysis of variance (ANOVA; $p_{\text{treatments}} < 0.05$ and $p_{\text{replicates}} > 0.05$) and panel consensus, 11 trained panelists were selected to perform the final assessment of the sausages. The final assessment was performed in three sessions per day; three samples were randomly and separately served in each session. The intensity of the sensory traits was measured on a 9-point, unstructured scale. The sausages were prepared according to the method proposed by Morin et al. (2002), wherein cooked sausages, which were randomly encoded with three-digit numbers, were heated to 50°C and immediately served to the panelists. Soda crackers and water were served between samples to cleanse the palate between samples.

Assessment of sausage chemical composition

The sausages were subjected to moisture, protein and ash analysis, according to the method proposed by AOAC (2006). The lipid content was determined using the method by Folch, Lees and Stanley (1957) by cold extraction. The collagen content was also assessed by

hydroxyproline analysis, protocol 990.26 (AOAC, 2006). All tests were performed in triplicate.

Assessment of fatty acid profile

Fatty acids were methylated using the lipid extracts resulting from the analysis of fat (Hartman and Lago, 1973). Fatty acid esters were identified and quantified by injection into a gas chromatograph (VARIAN 430-GC) coupled with a flame ionization detector and a polar, fused silica capillary column (CPWax) whose size was 100 m × 0.25 mm with 0.25-μm thickness. Helium was used as carrier gas, at a 1-mL/min flow rate. The methyl ester extract was injected (1.0 μL) into a split/splitless injector at 250°C, and the chromatogram was recorded using Galaxy software. The initial and final temperatures of the column were 100 and 240 °C, respectively, with an intermediate ramp of 2.5 °C/min. The detector temperature was kept at 260 °C. The fatty acids were identified by comparing the retention times of the methyl esters of transesterified extracts with the standards derived for identical fatty acid methyl esters. The quantification of fatty acids was expressed as percentage of area to calculate the sums of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids. The atherogenic index (AI), which represents the potential for platelet aggregation (Tonial, Oliveira and Bravo, 2011), was calculated using the following equation: $AI = [(C12:0) + 4(C14:0) + C(16:0)]/(\Sigma SFA + \Sigma PUFA)$. The thrombogenic index (TI) was also calculated according to the following equation: $TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / [(0.5 \times \Sigma MUFA) + (0.5 \times n-6) + (3 \times n-3) + (n-3 / n-6)]$. The injections were performed in triplicate for each sausage sample.

Assessment of physical parameters of chicken sausages with fat replacement with collagen

pH, Water-holding Capacity and Emulsion Stability. The sausage pH was determined by directly reading approximately 5 g of sample dissolved in 50 mL distilled water using a

benchtop pH meter Q400AS (Quimis, São Paulo, Brazil), according to the AOAC (2006) method.

Water-holding capacity (WHC) was analyzed according to the method by Huff-Lonergan and Lonergan (2005). Furthermore, the emulsion stability was also determined according to the method by Horita et al. (2011) by quantifying the total loss of fluid, loss of water and loss of fat from the meat mass formed once subjected to cooking at 80°C.

Instrumental color. The color parameters of the sausages were determined in a Konika Minolta CR-400 colorimeter (Minolta Chromameter Co., Ltd., Osaka, Japan), operating in the CIELab system with a standard illuminant D65 and the observer at 10°. The parameters L* (luminosity), +a* (red color intensity) and +b* (yellow color intensity) were measured in the internal surface of sausages sliced in four randomly selected sites, for each treatment. Using the parameters measured, the total difference in color ΔE was calculated for each treatment, according to the following equation:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5}, \quad (\text{Eq.1})$$

wherein ΔL , Δa and Δb are the differences between each value of each treatment and the value of the standard sample. The Chroma values, which are related to sample color intensity, and the Hue values, regarding color saturation, were also calculated.

Texture profile analysis (TPA)

The sausages were subjected to texture profile analysis using a texturometer TA-XT2i (Stable Micro Systems, Survey, UK) coupled with a 6-mm, stainless steel, cylindrical probe (P/6). The sausages were sliced into cylinders 1 cm in height and 3.2 cm in diameter and were tested in triplicate for each treatment. The following conditions were used as the conditions for the texture profile analysis: a 2.0 mm/s rate in the pretest and a 5.0 mm/s rate in the

posttest at 5.0-g force and with a 5-s period between cycles. The textural parameters of hardness, adhesiveness, cohesiveness, gumminess, resilience and chewiness were analyzed using the software Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems\TE32L\version 6.1.4.0 England).

Statistical analysis

The data from the analysis of the three treatments were submitted to analysis of variance (ANOVA), and when significant ($p < 0.05$), the means were subjected to Tukey's test. The software Assistat version 7.7 (Silva, 2016) was used as data analysis tool. Subsequently, principal components analysis (ACP) was performed using the MultiVariate Statistical Package (MVSP) software (KCS, 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

Gelatin collagen content

The chemical composition means and standard deviations of the prepared gelatin and the commercial collagen are outlined in Table 3. Unsurprisingly, the moisture of the prepared gelatin was higher than that of the commercial collagen, and the collagen powder had lipid content that was not detected in the gelatin. The results showed that collagen accounted for 72.33% of the total protein in the gelatin, whereas collagen accounted for 62.72% of the total protein in the commercial collagen. The ash content was 11.38% for the gelatin and 0.64% for the collagen powder (dry basis). The ash content of the collagen powder was also lower on a wet basis. The presence of minerals in collagen may be associated with its ability to chelate metals (Gomez-Guillen et al., 2011). Most likely, collagen extraction at 4°C, under the conditions tested, may improve the quality of the isolate in terms of collagen ratio, increased mineral content and absence of lipids.

Effect of partial fat replacement on the sensory characteristics and texture profile of chicken sausages

All formulations (SS, SC and SG) were found to be in accordance with Brazilian law on microbiological standards for cold cooked meat (Brazil, 2001). Regarding the parameters tested in the QDA, the means and standard deviations of the descriptors evaluated in the QDA are outlined in Table 4. Regarding the appearance of chicken sausages, the traits of pink color and visual homogeneity varied significantly ($p<0.05$) due to fat replacement. The SC treatment, with hydrolyzed collagen powder, had a higher intensity of pink color than the SS control sample. The visual homogeneity of the SC treatment was similar to that of the SS, and the SG sausage was the least homogeneous. Most likely, the use of acetic acid in preparing the chicken feet collagen may have caused a decrease in emulsion pH due to the higher isoelectric point of myofibrillar proteins (Ordoñez, 2005). As shown in Table 5, the SG treatment had lower emulsion stability than the control sausage (SS).

The main sensory impacts occurred on sausage texture. The SG treatment had higher tenderness than the other samples, with no significant differences between SS and SC ($p<0.05$). In a study with different levels of hydrolyzed collagen-replacing fat, Sousa et al. (2017) concluded that the addition of collagen improved the texture of treated samples regarding their tenderness and juiciness. The sausage with added chicken feet gelatin had statistically similar juiciness to that of standard sausage, and the results were similar to the findings of Amaral (2016) in low-fat sausages (6.49 ± 0.59) using chitosan-glucose obtained by Maillard reaction. No significant differences in water exudation and sausage-filling granularity parameters were observed, thus indicating that fat replacement with collagen caused no changes in those parameters. The sausages' chewiness was significantly lower for SG than for that of other treatments, in agreement with the tenderness findings. Thus, the sausage with gelatin had higher tenderness and required shorter chewing time. The SG

treatment, with chicken feet collagen, had lower values for aroma and cooked chicken flavor. These results may be explained by the use of acetic acid in collagen extraction, which masked those sensory traits. No significant differences ($p>0.05$) were found in rancid aroma or in sausage saltiness.

Table 4 outlines the means and standard deviations of the textural parameters analyzed in chicken sausages. In the sausage hardness analysis, all treatments significantly differed from each other ($p<0.05$); the SS sausage had the highest hardness, and the SG sausage had the lowest. The results were similar to the hardness means found by Amaral et al. (2015) in pork sausages with 20% fat. According to Ramos and Gomide (2017), such an increase in texture may decrease consumer acceptability of meat products. The results of instrumental hardness showed a similar trend in the QDA of the sausages, wherein the panelists stated that the SG treatment had higher tenderness than the other formulations.

Regarding the adhesiveness parameter, which is measured as the negative force area and is related to sausage adhesion during chewing, the SS and SC treatments had similar results and higher adhesiveness values than the SG treatment. Verma, Sharma and Banerjee (2012), studying low-salt and low-fat chicken nuggets, and Verma, Banerjee and Sharma (2015), studying low-fat chicken nuggets with chickpea hull flour, found adhesiveness values similar to those assessed in this study. SG had lower adhesiveness, showing decreased adhesion in the mouth when chewed, most likely due to the higher tenderness of the product that resulted from the added gelatin, which thereby increased the water-holding capacity (Table 5) and decreased the chewing energy (decreased gumminess). Therefore, the final product was easier to swallow by decreasing adhesion during chewing. No significant differences ($p>0.05$) for resilience or cohesiveness were found among the treatments, most likely indicating the viability of fat replacement regarding these parameters.

Sausage gumminess, chewiness and springiness showed similar results: all significantly differed from each other ($p < 0.05$). SS had the highest means, and the sausage with chicken feet gelatin (SG) had the lowest values. The parameter gumminess was directly related to hardness and chewiness because, according to Civille and Szczesniak (1973), gumminess is the energy required to break down food to a food bolus ready for swallowing, whereas chewiness is related to the time required to chew food until swallowing. SG had the lowest hardness and the lowest chewiness and gumminess, in contrast to SS. Prestes et al. (2015), when assessing the textural parameters of low-fat chicken mortadella with native and modified starch, found the same relationship between hardness and chewiness, and we confirmed the correlation between the chewiness as measured by a texturometer and chewiness as assessed by QDA (Table 4).

Partial fat replacement effect on the physicochemical parameters of chicken sausages

The chemical composition means (dry basis) of chicken sausages are outlined in Table 5. SS and SC had similar ash content, which was lower than that of the SG treatment. Most likely, collagen extraction from chicken feet under the conditions applied (0.7 mol/L, 0.2% pepsin for 12 hours at 4°C) may have increased the mineral content because the peptides that were possibly formed may have had the ability to chelate metals (Liu et al., 2015; Ferraro, Anton and Santé-Lhoutellier, 2016; Bezerra et al., 2017). Regarding the protein content, the results showed that the SC and SG treatments had higher means than the SS. Such an increase was expected because of the fat replacement with sources of protein. The values of protein content were similar to those found by Sousa et al. (2017), who replaced fat with different levels of hydrolyzed collagen in chicken sausages, and higher than those found by Choe et al. (2013), who replaced fat with pig skin and wheat bran in frankfurters and whose protein content, at the highest replacement level, was 47.6% on a dry basis.

Regarding the lipid content, the SC and SG treatments showed 38.41 and 29.02% decreases, respectively, compared with the SS. Based on this decrease, SC and SG are classified as “light” sausages according to Brazilian law, because the lipid content was decreased by at least 25% (Brazil, 2012). The SG treatment had a higher lipid content on a dry basis than the SC treatment, most likely because the chicken feet collagen added as gelatin increased the wet basis of the sausages, thereby decreasing the dry basis ratio. The moisture content of SG was higher than that of SC, albeit remaining similar to SS. The values of low-fat SC and SG sausages were close to the ratio of lipids on a dry basis found in the study conducted by Prestes et al. (2015), who tested low-fat mortadella with added native and modified starches.

Regarding the collagen content, the SC treatment had the highest value due to supplementation with hydrolyzed collagen powder, ensuring a higher collagen concentration than that of SG (Table 3) with added chicken feet gelatin and similar to that of SS. Thus, the 50% fat replacement with hydrolyzed collagen powder or by chicken feet gelatin used in chicken sausages was an alternative with positive effects from a nutritional standpoint due to the replacement of fat with protein.

All treatments had significantly different mean pH values ($p < 0.05$), and the SG treatment with added gelatin extracted with acetic acid had the lowest pH (Table 3). This value is close to the isoelectric point of myosin (pH 5.4), according to Ordoñez (2005), which may compromise protein-binding properties and water absorption and may adversely affect the quality parameters of meat products supplemented with this gelatin. The pH values of SS and SC were similar to those obtained by Morin, Temelli and McMullen (2002) in low-fat sausages with barley β -glucan.

Regarding the water-holding capacity (WHC) of the sausages, the treatments with fat reduction, SG and SS, had the highest values and statistically similar results. Sousa et al. (2017) found similar values (74.67 to 80.49%), which were similar to the standard treatment up to 25% fat reduction and represented an increase from 50% fat replacement. In their studies, Cavestany et al. (1994) concluded that an increase in fat content increases the concentration and density of the continuous phase of the meat emulsion, which favors a structure that aggregates more water molecules. Collagen, according to Li, Wang and Wu (2007), is used to increase water retention in food, and the use of chicken feet gelatin most likely increased water retention, compared with hydrolyzed collagen powder. The CRA value of the SG treatment showed no significant difference from the SS possibly because the SG pH was very close to the isoelectric point of myosin, which hinders protein binding to water.

Regarding the emulsion stability of frankfurters (Table 3), the three treatments differed in most parameters. The emulsion stability of the SS was higher than that of the other treatments, and the sausage with added chicken feet gelatin (SG) had the closest emulsion stability to that of the SS. Furthermore, the SS had the lowest fluid release, either as water or fat. Among sausages with fat reduction, water accounted for approximately 90% of the total fluids released in the SC treatment (12.67%). This ratio was higher than the percentage of water released from the emulsion formed in SG. Regarding the fat released, the SC and SG treatments showed no significant difference ($p>0.05$). The addition of gelatin to chicken sausages minimized the losses of fluids compared with collagen powder addition, most likely due to their increased ability to form chemical bonds, thereby decreasing water losses. The SS and SG treatments had emulsion stability values similar to those obtained by Sousa et al. (2017) when studying low-fat chicken sausages with different levels of hydrolyzed collagen.

Regarding the color parameters (Table 3), the SG sausage had a significantly higher luminosity (L^*) intensity than the other treatments, possibly because fat replacement with

gelatin increased its transparency, thus increasing the L^* value. A similar effect was observed by Zhang et al. (2013) when studying fat replacement with starch in surimi and by Prestes et al. (2015) when assessing fat replacement with native and modified starches in low-fat mortadella. Regarding the red color intensity (a^*), SS had lower values than the treatments with collagen. These results are similar to the findings of Choe et al. (2013), wherein sausage fat reduction increased the red color parameter (a^*), with means ranging from 4.78 to 5.03; in that study, the quality of low-fat sausages with added pig skin and wheat fiber mixture as fat replacers was assessed. Regarding the yellow color intensity (b^*), the SS treatment had a lower value than the fat replacement treatments (SC and SG), which showed no significant difference from each other. Similarly, the replacement of fat with chitosan in low-fat sausages also decreases the b^* values, as noted by Amaral et al. (2015).

Regarding the chroma parameter (Table 3), which indicates sausage color intensity, the SG treatment was similar to standard sausage and more intense than the SC treatment, which tended towards gray. Pereira et al. (2011), when assessing the effect of adding mechanically deboned poultry meat (MDM) and collagen fibers to frankfurters, observed that adding collagen fiber increased the color saturation in the treatments with low MDM content, similarly to the effect of chicken feet gelatin. The total difference in color ΔE , assessed in the treatments with fat reduction, was highest in the SG treatment, with gelatin. Thus, this was the treatment that most differed from the standard. The values of hue, which expresses tonality, were highest in the fat reduction treatments, SC and SG. The hue value increased with the increase in the parameters a^* and b^* , and this trend was similar to that found by Verma, Sharma and Banerjee (2012) in low-sodium, low-fat nuggets, most likely due to the increase in pigment exposure with the decrease in fat of the food product. However, their means were higher than those obtained in this study, with values ranging from 45.64 to 50.76.

Fat-reduction effect on the fatty acid profile of chicken sausages

The mean area percentages of fatty acids are outlined in Table 6. All treatments predominantly showed palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2n6c) acids, which accounted for an average of 85% of the total composition of fatty acids. A similar prevalence of fatty acids was found by Yilmaz, Simsek and Isikli (2002) when assessing the composition of fatty acids in chicken sausages and by Ribeiro et al. (2014) in chicken meat supplemented with docosahexaenoic acid.

Regarding the totals of fatty acids, no significant differences in saturated and in monounsaturated fatty acids were assessed between treatments ($p>0.05$). Partial fat replacement with hydrolyzed collagen powder and by chicken feet gelatin caused no significant changes in the percentage of fatty acids, most likely due to their composition. Based on the analysis of the gelatin and on the composition of the hydrolyzed collagen used in SC sausages, as reported by Sousa et al. (2017), both fat replacers are rich in protein and most likely have low lip content. Significant differences were observed only in total polyunsaturated fatty acids. The SC treatment had the highest percentage of PUFAs, most likely resulting from the higher percentages of linoleic (C18:2n6c) and γ -linolenic (C18:3n6) acids. Regarding the ratio between the sum of polyunsaturated and the sum of saturated fatty acids ($\Sigma\text{PUFA}/\Sigma\text{SFA}$), no significant differences were observed ($p<0.05$). The values obtained were lower than those found by Yilmaz, Simsek and Isikli (2002) in low-fat beef and chicken sausages with added tomato juice and sunflower oil, which reached ratios of 3.65 upon supplementation with sunflower oil, which is rich in unsaturated fatty acids.

Regarding AI and TI, which are related to dietary fat quality, the treatments with fat reduction, SC and SG, had lower AI, with no significant differences from each other. Niroumand et al. (2015) related atherogenicity to the risk of cardiovascular diseases; AI values lower than 0.11 indicate a low risk of cardiovascular diseases (CVDs), values ranging from 0.11 to 0.21 suggest an intermediate risk, and values higher than 0.21 are suggestive of

an increased CVD risk. In the present study, the SG treatment showed a lower AI, albeit still considered at increased risk. TI, which is related to the ability to form blood vessel clots (Garaffo et al., 2011), was similar between the SG and SS treatments, which had lower TI than the SC treatment. The AI and TI values of the SG treatment were similar to the indices found by Romero et al. (2013) in sausages sold in Argentina.

Principal components analysis (PCA)

Figure 1, which corresponds to the PCA of low-fat chicken sausages, shows that the parameters were distributed near their most representative treatments. Initially, the results showed that the three treatments occupy different quadrants in the graph and are considered different and are thought to have different characteristics. According to the graphical representation, the SS sample was associated with the parameters chewiness, hardness, chicken aroma, emulsion stability, visual homogeneity and hardness. The treatments with fat replacement with hydrolyzed collagen powder added to the sausage formulation, SC, showed a stronger association with the parameters a^* , released water (%), total fluid released (%), pink color and hue saturation. The SG sausage had similar adhesiveness, tenderness, luminosity and water-holding capacity. Tomaschunas et al. (2013), when using PCA to study sensory changes in Lyon-style fat-pork and liver sausages with fat replacement with inulin and citrus fiber, concluded that fat reduction was correlated with color intensity, whereas samples with higher fat content were correlated with a typical meat aroma and juiciness for the sausages. This study showed that SS was correlated with the typical chicken aroma, whereas SC was correlated with fluid exudation, and SG was correlated with tenderness and water retention.

CONCLUSION

The results showed positive effects on chicken sausages, including increased emulsion stability and water-holding capacity, when compared with SC, and lower AI and TI. The alternative of gelatin extraction from chicken feet consists of simple techniques and contributes by improving the use of waste with high biological value; furthermore, this method positively impacts the quality of chicken sausages by replacing the fat used in the formulations. However, the method of gelatin preparation with acetic acid lowered the pH to approach the isoelectric point of myofibrillar proteins, which may have adversely affected the textural parameters. Thus, future studies with other fat replacement levels or other methods of gelatin extraction from chicken feet should be conducted.

REFERENCES

- Brazilian Animal Protein Association. ABPA. 2016. Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015. Accessed Jun 2017. <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>.
- Alves, S. G. T., and Prudencio-Ferreira, S. H. 2002. Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 4: 289-293.
- Alves, L. A. A. S., Lorenzo, J. M., Gonçalves, C. A. A., Santos, B. A., Heckd, R. T. and Cichoski, A. J. 2016. Production of healthier bologna type sausages using pork skin and green banana flour as a fat replacers. *Meat Science*. 121: 73-78.
- Amaral, D. S, Cardelle-Cobas, A., Nascimento, B. M. S., Monteiro, M. J., Madruga, M. S. and Pintado, M. M. E. 2015. Development of a low fat fresh pork sausage based on chitosan with health claims: impact on the quality, functionality and shelf life. *Food and Function*. 6: 2768–2778.

- 450 Amaral, D. 2016. Effect of the incorporation of chitosan and modified chitosan on the quality,
451 technological functionality and shelf life of sausages with reduced fat content. Thesis. Federal
452 University of Paraíba.
- 453 AOAC. 2007. Official methods of analysis of AOAC international. Association of Official
454 Analysis Chemists International. CD-ROM.
- 455 Brazil. National Health Surveillance Agency. 2001. Ministry of Health of Brazil. Technical
456 Regulation on microbiological standards for foods. Brasília, DF: Official Gazette of the
457 Federative Republic of Brazil.
- 458 Brazil. Ministry of Health of Brazil. 2012. National Commission of Ethics in Research.
459 National Health Council.
- 460 Brazil. National Health Surveillance Agency. Ministry of Health of Brazil. 2012. Provides for
461 the Technical Regulation on Complementary Nutrition Information. Accessed Jul 2017.
462 Available from:
463 [http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23f](http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864)
464 [d-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864](http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864).
- 465 Cavestany, M., Jimenez-Colmenero, F., Solas, M. T. and Carballo, J. 1994. Incorporation of
466 sardine surimi in Bologna sausage containing different fat levels. Meat Science. 38: 27-37.
- 467 Choe, J. H., Kim, H. Y., Lee, J. M., Kim, Y. J., and Kim, C. J. 2013. Quality of frankfurter
468 type sausages with added pig skin and wheat fiber mixture as fat replacers. Meat Science. 93:
469 849-854.
- 470 Civille, A.V. and Szczesniak, A.S. 1973. Guidelines to training a texture profile panel.
471 Journal of Texture Studies, 4: 204-209.

- 472 Faria, M. O., Cipriano, T. M., Cruz, A. G., Santos, B. A., Pollonio, M. A. R. and Campagnol,
473 P. C. B. 2015. Properties of bologna-type sausages with pork backfat replaced with pork skin
474 and amorphous cellulose. *Meat Science*. 104: 44–51.
- 475 Feiner, G. 2006. *Meat products handbook*. New York: CRC Press, Inc.
- 476 Ferraro, V., Anton, M. and Santé-Lhoutellier, V. 2016. The “sisters” α -helices of collagen,
477 elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends
478 of application. *Trends in Food Science and Technology*. 51: 65-75.
- 479 Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and
480 purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 226:
481 497-509.
- 482 Furlán, L. T. R., Padilla, A. P. and Campderrós, M. E. (2014). Development of reduced fat
483 minced meats using inulin and bovine plasma proteins as fat replacers. *Meat Science*. 96:762–
484 768.
- 485 Garaffo, M. A., Vassallo-Agius, R., Nengas, Y., Lembo, E., Rando, E., Maisano, R., Dugo, G.
486 and Giuffrida, D. (2011). Fatty Acids Profile, Atherogenic (IA) and Thrombogenic (IT)
487 Health Lipid Indices, of Raw Roe of Blue Fin Tuna (*Thunnus thynnus* L.) and Their Salted
488 Product “Bottarga”. *Food and Nutrition Sciences*. 2: 736-743.
- 489 Hartman, L. and Lago, R. C. A. 1973. Rapid preparation of fatty acids methyl esters.
490 *Laboratory Practice*. 22: 475-476.
- 491 Horita, C. N., Morgano, M. A., Celeghini, R. M. S. and Pollonio, M. A. R. 2011. Physico-
492 chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium,
493 magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Science*.
494 89: 426–433.

- 495 Huang, L. H., and Nimni, M. E. 1993. Preparation of type I collagen fibrillar matrices and the
496 effect of collagen concentration on fibroblast contraction. *Biomedical Engineering*
497 *Applications Basis Communications*, 5: 60–71.
- 498 Huff-Lonergan, E. and Lonergan, S. M. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat:
499 The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*. 71: 194-204.
- 500 KCS. 2007. MVSP Plus: Manual user's. Kovach Computing Services, Wales, U.K.
- 501 Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. and Wu, Y. 2007. Isolation and identification of
502 antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and
503 electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 102: 1135–1143.
- 504 Lin, Y. K., and Liu, D. C. 2006. Comparison of physical–chemical properties of type I
505 collagen from different species. *Food Chemistry*. 99: 244-251.
- 506 Liu, D. C., Lin, Y. K. and Chen, M. T. 2001. Optimum Condition of Extracting Collagen
507 from Chicken Feet and its Characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*.
508 14: 1638–1644.
- 509 Liu, D.; Nikoo, M.; Boran, G.; Zhou, P. and Regenstein, J. M. 2015. Collagen and gelatin.
510 *Annual Reviews of food Science and Technology*. 6: 527-557.
- 511 Lurueña-Martinez, M. A., Vivar-Quintana, A. M. and Revilla, I. 2004. Effect of locust
512 bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality
513 characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Science*. 68: 383–389.
- 514 Meilgaard, C. 1999. Sensory evaluation techniques (Third Edition). *Sensory Evaluation*
515 *Techniques*, Third Edition.

- 516 Morin, L. A., Temelli, F. and McMullen, L. 2002. Physical and Sensory Characteristics of
517 Reduced-Fat Breakfast Sausages Formulated With Barley β -Glucan. *Journal of Food Science*,
518 67: 2002-2391.
- 519 Moskowitz, H. R. 1983. New directions for product testing and sensory analysis of foods.
520 Westport, Conn., Food and Nutrition Press. 371 p.
- 521 Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., and Shirai, K. 1996. Preparation and some properties of type
522 I collagen from fish scales. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 60: 2092–2094.
- 523 Niroumand, S., Khajedaluee, M., Khadem-Rezaian, M., Abrishami, M., Juya, M., Khodaei,
524 G. and Dahgarmoghaddam, M. 2015. Atherogenic Index of Plasma (AIP): A marker of
525 cardiovascular disease. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 29: 240.
- 526 Ordóñez, M., Rovira, J., and Jaime, I. 2001. The relationship between the composition and
527 texture of conventional and low-fat frankfurters. *International Journal of Food Science and*
528 *Technology*. 36: 749–758.
- 529 Ordóñez, J.A. 2005. *Tecnologia dos alimentos: alimentos de origem animal*, vol. 2, Artmed,
530 Porto Alegre, Brasil.
- 531 Pereira, A. G. T., Ramos, E. M., Teixeira, J. T., Cardoso, G. P., Ramos, A. D. L. S., and
532 Fontes, P. R. 2011. Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen
533 fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. *Meat Science*. 89: 519-525.
- 534 Prestes, R. C., Carneiro, E. B. B. and Demiate, I. M. 2012. Hydrolyzed collagen, modified
535 starch and guar gum addition in turkey ham. *Ciência Rural*. 42: 1307-1311.
- 536 Prestes, R. C., Silva, L. B., Torri, A. M. P., Kubota, E. H., Rosa, C. S., Roman, S. S.,
537 Kempka, A. P. and Demiate, I. M. 2015. Sensory and physicochemical evaluation of low-fat

- 538 chicken mortadella with added native and modified starches. *Journal of Food Science and*
539 *Technology*. 52: 4360–4368.
- 540 Ramos, E. M. and Gomide, L. A. M. 2017. *Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e*
541 *metodologias*. 2. Ed. UFV, Viçosa.
- 542 Ribeiro, T., Lordelo, M. M., Costa, P., Alves, S. P., Benevides, W. S., Bessa, R. J. B., Lemos,
543 J. P. C., Pinto, R. M. A., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A., and Prates, J. A. M. 2014.
544 Effect of reduced dietary protein and supplementation with a docosahexaenoic acid product
545 on broiler performance and meat quality. *British Poultry Science*. 55:752-65.
- 546 Romero, M. C., Romero, A. M., Doval, M. M. and Judis, M. A. 2013. Nutritional value and
547 fatty acid composition of some traditional Argentinean meat sausages. *Food Science and*
548 *Technology*. 33: 161-166.
- 549 Shimokomaki, M., Duance, V. C. and Bailey, A. J. (1981). Identification of two further
550 collagenous fractions from cartilage. *Bioscience reports*. 1: 561-570.
- 551 Silva, F.A.S. 2016. ASSISTAT - Software: statistical assistance. Version 7.7 beta.
- 552 Sousa S. C., Fragoso, S. P., Penna, C. R. A., Arcanjo, N. M. O., Silva, F. A. P., Ferreira, V. C.
553 S. Barreto, M. D. S. and Araújo, I. B. S. 2017. Quality parameters of frankfurter-type
554 sausages with partial replacement of fat by hydrolyzed collagen. *LWT - Food Science and*
555 *Technology*. 76: 320-325.
- 556 Simões, G. S., Silveira, E. T. F., Oliveira, S. R., Poleze, E., Allison, J. R. D., Ida, E. I., and
557 Shimokomaki, M. 2014. Optimum conditions for extracting collagen from the tunica
558 albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated
559 collagen. *Meat Science*. 96: 1460-1468.

- 560 Tomaschunas, M., Zorb, R., Fischer, J., Kohn, E., Hinrichs, J. and Busch-Stockfisch, M.
561 2013. Changes in sensory properties and consumer acceptance of reduced fat pork Lyon-style
562 and liver sausages containing inulin and citrus fiber as fat replacers. Meat Science. 95: 629-
563 640.
- 564 Tonial, I. B., Bravo, C. E. C., Souza, N. E., Matsushita, M., Furuya, W. M. and Visentainer, J.
565 V. 2011. Qualidade nutricional dos lipídios de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas
566 com ração suplementada com óleo de soja. Revista Alimentos e Nutrição. 22: 103-112.
- 567 Triki, M., Herrero, A.M., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C.
568 2013. Chilled storage characteristics of low-fat, n-3 PUFA-enriched dry fermented sausage
569 reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. Food Control. 31:
570 158–165.
- 571 Verma, A. K., Banerjee, R. and Sharma, B. D. 2012. Quality of low fat chicken nuggets:
572 effect of sodium chloride replacement and added chickpea (*Cicer arietinum* L.) hull flour.
573 Asian-Australasian journal of animal sciences. 25: 291 -298.
- 574 Verma, A. K., Banerjee, R. and Sharma, B. D. 2015. Quality characteristics of low fat chicken
575 nuggets: effect of salt substitute blend and pea hull flour. Journal of Food Science and
576 Technology. 52: 2288-2295.
- 577 Villamonte, G., Simonin, H., Duranton, F., Cheret, R., and Lamballerie, M. 2013.
578 Functionality of pork meat proteins: Impact of sodium chloride and phosphates under
579 highpressure processing. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 18: 15–23.
- 580 World Health Organization. 2009. Preventing chronic diseases: a vital investment. Accessed
581 Jul 2017. Available from: http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/en.

- 582 Yilmaz, I., Simsek, O. and Isikli, M. 2002. Fatty acid composition and quality characteristics
583 of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil.
584 Meat Science. 62: 253-258.
- 585 Yilmaz, I. 2005. Physicochemical and sensory characteristics of low fat meatballs with added
586 wheat bran. Journal of Food Engineering. 69: 369–373.
- 587 Zhang, F., Fang, L., Wang, C., Shi L., Chang, T., Yang, T., Yang, H. and Cui, M. 2013.
588 Effects of starches on the textural, rheological, and color properties of surimi-beef gels with
589 microbial transglutaminase. Meat Science. 93: 533–537.
- 590

List of Tables

Table 1 – Formulations of chicken sausages with the replacement of fat with collagen powder and with chicken feet gelatin

Raw material/Ingredients	Formulations (%) ¹		
	SS	SC	SG
Chicken meat	65	65	65
Backfat	15	7.5	7.5
Chicken feet gelatin	-	7.5	-
Commercial collagen powder	-	-	7.5
Ice	15	15	15
Sodium chloride	1.8	1.8	1.8
Sodium nitrite	0.02	0.02	0.02
Sodium erythorbate	0.05	0.05	0.05
Sodium tripolyphosphate	0.20	0.20	0.20
White pepper	0.20	0.20	0.20
Coriander	0.08	0.08	0.08
Monosodium glutamate	0.25	0.25	0.25
Garlic	0.40	0.40	0.40
Nutmeg	0.10	0.10	0.10
Onion	0.40	0.40	0.40
Starch	1.5	1.5	1.5

¹SS: standard sausage, SC: sausage with 50% replacement of fat with commercial collagen powder, SG: sausage with 50% replacement of fat with chicken feet gelatin.

Table 2 - List of descriptors and references generated in the quantitative descriptive analysis of chicken sausages with replacement of fat with hydrolyzed collagen powder and with gelatin

	Trait	Definition	References
Appearance	Pink color (PC)	Pink color typical of meat-based products, ranging from pale (grayer) to dark (pinker)	Pale (beige): Ceratti chicken breast
			Dark (pink): Perdigão mixed sausage
	Visual homogeneity (Hvis)	Presence of meat fragments and condiment granules on the cross-sectional surface of the sausage, related to emulsion stability	Low: light Ceratti chicken mortadella
			High: Perdigão chicken mortadella
	Visual Juiciness (Jvis)	Release of a visible liquid on the cross-sectional surface of the sausage	Low: toast
			High: fresh ricotta
Texture	Tenderness (TD)	Textural property marked by offering little resistance to chewing, ranging from tough to tender	Low (tough): grilled chicken sausage
			High (tender): kitut ham
	Juiciness (JUC)	Moisture released while chewing	Low: well done beef steak at 80°C
			High: rare filet mignon at 65°C
	Water Exudation (EXS)	Quantity of water exuded upon the sample's first contact with the mouth	Low: Vienna sausage
			High: green apple
	Sausage Filling Granularity (FG)	Presence of solid particles during chewing and full mastication, related to meat fibers and to condiments.	Low: Vienna sausage
			High: light Ceratti chicken mortadella
Aroma	Chewiness (CHW)	Number of chews needed before swallowing	Low: milk bread
			High: yogurt chewing gum
	Cooked Chicken Aroma (CCA)	Aroma produced in cooked chicken meat	Reference: chicken breast cooked at 80°C
	Condiment Aroma (CA)	Aroma of the condiments used in sausage production	Weak: none
			Strong: solution of garlic, onion and white pepper in water (1:5)

	Acetic Acid Aroma (ACT)	Aroma from the acetic acid used in the sausage formulation	Weak: None
			Strong: 5% alcohol vinegar solution.
	Rancid Aroma (RNC)	Oxidized fat aroma	Weak: none
			Strong: oxidized fat
Flavor	Cooked Chicken Flavor (CF)	Flavor produced in cooked chicken meat	Reference: chicken breast cooked at 80°C
	Condiment Flavor (CF)	Flavor of the condiments used in sausage production	Weak: none
			Strong: solution of garlic, onion and white pepper in water (1:5)
	Saltiness (SF)	Perception of salt used in sausage production	Weak: 0.2% NaCl solution
			Strong: 1% NaCl solution
	Residual Condiment Flavor (RES)	Residual sensation from condiments after swallowing sausages	Weak: none
			Strong: solution of garlic, onion and white pepper in water (1:5)

1 Table 3 – Chemical composition of chicken feet gelatin and commercial collagen powder
 2 used as fat replacers in chicken sausages

Parameters (g/100 g)	Gelatin	Collagen powder
Moisture	91.83 ± 0.11	11.08 ± 0.13
Ash	0.93 ± 0.21	0.57 ± 0.16
Lipids	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.02
Protein	6.18 ± 0.09	83.41 ± 0.27
Collagen	4.47 ± 0.28	52.32 ± 0.15

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

Table 4 – Means and standard deviations from the quantitative descriptive analysis and the instrumental texture profile analysis of chicken sausages with fat replacement with collagen

Traits	Treatments ¹		
	SS	SC	SG
<i>Appearance</i>			
Pink color	1.11±0.69 c	3.09±0.93 a	2.40±1.13 b
Visual homogeneity	2.74±1.58 a	2.25±1.15 a	1.06±0.40 b
Visual juiciness	6.20±1.39 a	5.83±1.24 a	5.93±0.82 a
<i>Texture</i>			
Tenderness	6.67±1.43 b	7.23±1.01 b	8.14±0.71 a
Juiciness	7.20±0.76 a	6.72±0.91 b	7.23±0.98 a
Water Exudation	4.09±1.61 a	4.18±1.79 a	5.15±1.71 a
Sausage filling granularity	4.48±1.80 a	3.64±1.75 a	3.39±1.83 a
Chewiness	1.79±0.69 a	1.48±0.65 a	0.41±0.18 b
<i>Aroma</i>			
Cooked chicken	4.94±0.91 a	4.11±1.01 a	3.52±0.98 b
Condiments	2.01±0.86 a	1.86±0.87 a	1.95±0.73 a
Rancid	0.25±0.14 a	0.16±0.10 a	0.28±0.11 a
<i>Flavor</i>			
Cooked chicken	4.17±1.03 a	4.47±0.94 a	2.68±0.91 b
Condiments	2.26±0.84 a	1.51±0.84 b	2.58±0.99 a
Saltiness	2.65±1.06 a	2.99±1.07 a	3.38±1.14 a
<i>Instrumental Texture Profile Analysis</i>			
Hardness (g)	537.26±29.58 a	425.59±15.11 b	120.89±23.45 c
Adhesiveness (g.sec)	-69.98±7.30 a	-64.19±0.89 a	-7.85±2.84 b
Resilience	0.7119±0.01 a	0.6229±0.03 a	0.6890±0.01 a
Cohesiveness	0.4379±0.01 a	0.4028±0.03 a	0.4388±0.01 a
Gumminess (g)	226.00±3.39 a	123.20±6.93 b	40.37±3.37 c
Chewiness (g)	158.22±3.84 a	74.56±8.80 b	42.30±7.13 c
Springiness	0.1408±0.01 a	0.1204±0.01 b	0.0894±0.01 c

¹SS – Standard sausage, SC – sausage with 50% fat replacement with hydrolyzed collagen powder, SG – sausage with 50% fat replacement with chicken feet gelatin.

Table 5 – Means and standard deviations of the chemical composition on a dry basis, pH, WHC, color and emulsion parameters of chicken sausages with fat replacement with collagen

Parameters	Treatments ¹		
	SS	SC	SG
Moisture (g/100 g)	68.39 ± 0.27 a	62.81 ± 0.54 b	67.81 ± 0.01 a
Ash** (g/100 g)	5.40 ± 0.78 b	5.57 ± 0.57 b	6.11 ± 0.75 a
Protein** (g/100 g)	59.41 ± 0.37 b	70.56 ± 0.22 a	70.60 ± 1.15 a
Lipids** (g/100 g)	41.11 ± 0.27 a	25.32 ± 1.47 c	29.18 ± 0.44 b
Collagen (g/100 g)	2.39 ± 0.05 b	9.85 ± 0.71 a	2.96 ± 0.01 b
pH	6.62 ± 0.05 a	6.45 ± 0.06 b	5.36 ± 0.02 c
CRA (%)	75.99 ± 0.73 ab	75.19 ± 0.73 b	76.82 ± 0.25 a
<i>Emulsion parameters</i>			
ES (%)	95.86 ± 1.06 a	87.33 ± 0.06 c	91.17 ± 0.66 b
Total fluid released (%)	4.14 ± 1.06 c	12.67 ± 0.06 a	8.83 ± 0.66 b
Water released (%)	3.66 ± 0.95 c	11.37 ± 0.09 a	7.16 ± 0.54 b
Fat released (%)	0.48 ± 0.15 b	1.30 ± 0.03 a	1.68 ± 0.12 a
<i>Color parameters</i>			
L*	74.82 ± 0.08 b	74.25 ± 0.02 b	76.45 ± 0.12 a
a*	5.72 ± 0.08 b	6.75 ± 0.02 a	6.10 ± 0.07 a
b*	22.71 ± 0.01 b	23.68 ± 0.15 a	23.55 ± 0.20 a
ΔE	-	1.53 ± 0.10 b	1.87 ± 0.08 a
Chroma	1.324 ± 0.003 a	1.293 ± 0.002 b	1.317 ± 0.005 a
Hue	23.42 ± 0.02 b	24.63 ± 0.14 a	24.32 ± 0.18 a

¹SS – Standard sausage, SC – sausage with 50% fat replacement with hydrolyzed collagen powder, SG – sausage with 50% fat replacement with chicken feet gelatin; **Expressed on a dry basis.

Table 6 – Means and standard deviations of the percentages of fatty acids and quality indices of chicken sausages with replacement of fat with collagen

Fatty acids (% area)	Treatments ¹		
	SS	SC	SG
C14:0	4.00±0.28 c	4.63±0.12 b	5.11±0.02 a
C14:1n5c	2.15±0.15 a	0.76±0.04 b	0.88±0.02 b
C15:1n5c	0.05±0.01 a	0.04±0.02 a	0.10±0.00 a
C16:0	22.81±0.17 a	23.29±0.53 a	22.45±0.28 b
C16:1n9c	0.25±0.01 a	0.23±0.01 a	0.26±0.02 a
C16:1n7	2.97±0.12 b	3.58±0.08 a	3.17±0.11 a
C17:0	0.21±0.01 b	0.19±0.04 b	0.29±0.02 a
C17:1n7c	0.13±0.02 b	0.09±0.03 b	0.18±0.03 a
C18:0	8.92±0.47 b	8.23±0.08 b	9.40±0.06 a
C18:1n9c	31.81±0.96 b	32.93±0.42 a	33.04±0.12 a
C18:2n6c	20.56±0.05 b	22.20±0.15 b	20.68±0.02 a
C20:0	0.14±0.01 b	0.13±0.01 b	0.32±0.03 b
C18:3n6	1.06±0.09 b	1.30±0.07 a	1.20±0.18 a
C20:1n9	0.46±0.08 b	0.52±0.10 ab	0.61±0.11 a
C18:3n3	0.01±0.00 c	0.26±0.01 a	0.12±0.04 b
C21:0	0.28±0.02 a	0.02±0.01 b	0.36±0.03 a
C20:2n6c	0.01±0.00 b	0.20±0.03 a	0.02±0.00 b
C20:3n6c	0.16±0.02 b	0.00±0.00 c	0.25±0.04 a
C20:4n6c	0.51±0.14 b	0.78±0.02 b	1.01±0.11 a
C22:4n6	0.21±0.08 b	0.23±0.01 b	0.34±0.03 a
C22:5n6	0.01±0.00 a	0.03±0.01 a	0.02±0.01 a
C22:5n3	0.20±0.00 a	0.06±0.01 b	0.06±0.02 b
C22:6n3	0.02±0.01 a	0.05±0.03 a	0.02±0.01 a
ΣSFA	36.37±0.91 a	36.49±0.59 a	37.93±0.20 a
ΣMUFA	37.82±0.75 a	38.14±0.36 a	38.24±0.13 a
ΣPUFA	22.82±0.30 b	25.15±0.30 a	23.80±0.32 b
ΣPUFA/ΣSFA	0.63±0.04 a	0.69±0.03 a	0.63±0.03 a
AI	0.90±0.04 a	0.90±0.18 a	0.77±0.02 b
TI	1.10±0.09 b	1.27±0.51 a	1.08±0.05 b

35

¹SS – Standard sausage, SC – sausage with 50% fat replacement with hydrolyzed collagen powder, SG – sausage with 50% fat replacement with chicken feet gelatin. SFA: sum of saturated fatty acids; MUFA: sum of monounsaturated fatty acids; PUFA: sum of polyunsaturated fatty acids; AI: Atherogenic Index; TI: Thrombogenic Index.

39

40 **Figure captions**

41 Figure 1 - PCA analysis performed for the parameters studied in chicken sausages with fat
42 reduction by collagen. SS: Standard sausage. SC: Sausage with 50% fat replacement by
43 collagen commercial powder. SG: sausage with 50% fat replacement by collagen gel
44 extracted from chicken feet.

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

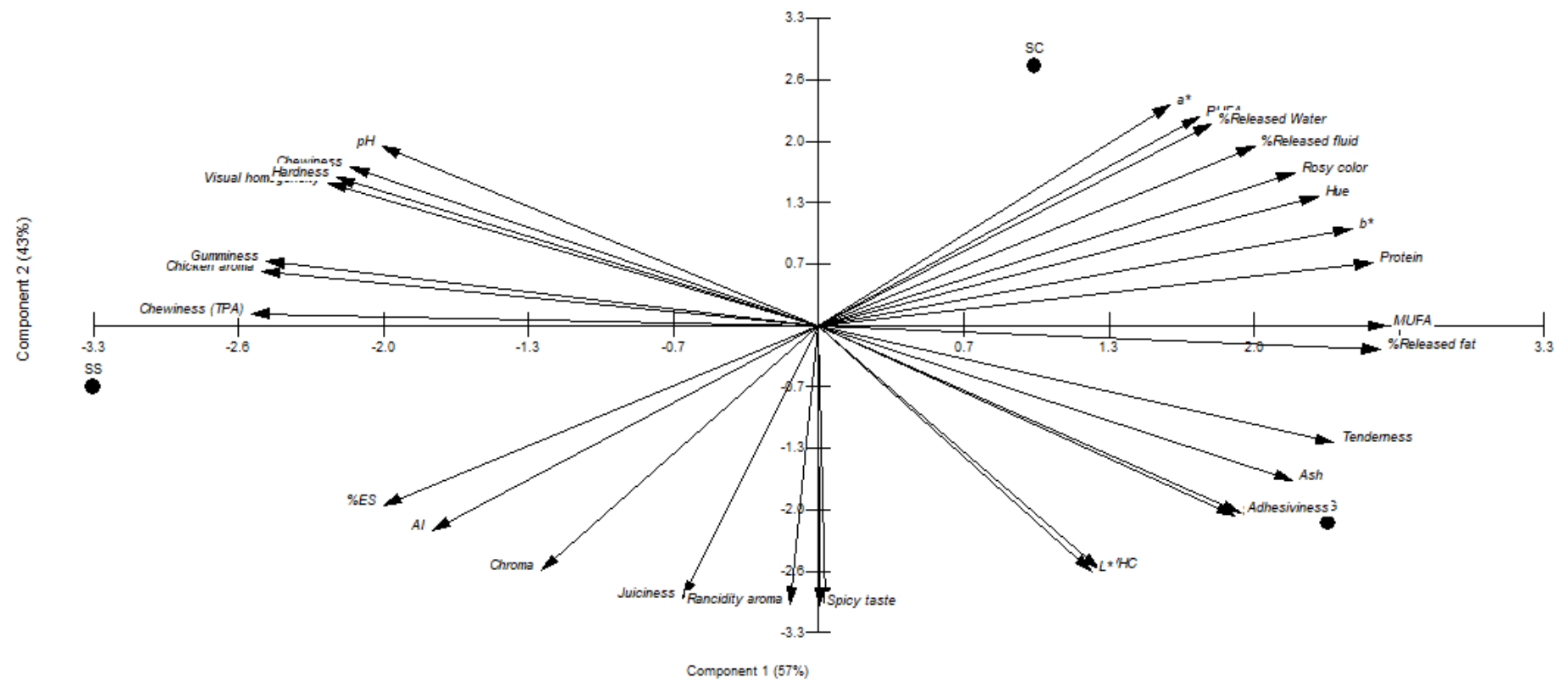
58

59

60

61

Figure 1- PCA analysis performed for the parameters studied in chicken sausages with fat reduction by collagen



**ARTIGO 4: EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE
SALSICHAS DE FRANGO PRODUZIDAS COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE
GORDURA POR GEL DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PÉS DE FRANGO**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE SALSICHAS
DE FRANGO PRODUZIDAS COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE GORDURA POR
GEL DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PÉS DE FRANGO**

Íris Braz da Silva ARAÚJO¹, Darlinne Amanda Soares de LIMA², Sérgio de Freitas

PEREIRA², Rafaella de Paula PASETO², Marta Suely MADRUGA²

¹Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal da Paraíba,
Campus III. Cep: 58220-000, Bananeiras/PB, Brasil.

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I.
Cep: 58051-900, João Pessoa/PB, Brasil.

ABSTRACT

Objetivou-se neste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de armazenamento na qualidade de salsichas de frango produzidas a partir da substituição parcial de gordura por colágeno extraído de pés de frango. Foram processadas três formulações de salsichas de frango, um padrão (SS), uma com substituição de 50% de gordura por colágeno em pó comercial (SC) e outra com substituição de 50% de gordura por gel de colágeno de pés de frango (SG). As salsichas foram armazenadas sob refrigeração comercial a 4°C por 42 dias, e analisadas em intervalos de sete dias em relação a sua composição química (composição centesimal, perfil de ácidos graxos, número de TBARs, perfil eletroforético e atividades antioxidantes – DPPH e FRAP), parâmetros físicos (cor, CRA, perfil de textura), e qualidade sensorial (teste de ADQ). No período de armazenamento foi observado que aos 42 dias alguns parâmetros como as somatórias dos ácidos graxos, atividade antioxidante teor de proteínas e colágeno decresceram significativamente. No perfil eletroforético, observou-se ao longo do armazenamento a fragmentação das proteínas. As salsichas SC e SG tiveram comportamento semelhante ao padrão nos parâmetros sensoriais de aparência e cor. A salsicha SG apresentou

menores valores de dureza, mastigabilidade, e coesividade, entretanto se mostrou superior na WHC (81,05 %), no menor número de TBARS (0,38 mg MDA/kg) e na maior atividade antioxidante, além de apresentar melhores índices de Aterogenicidade e Trombogenicidade comparada ao tratamento SC, tornando o gel de colágeno viável para substituir gordura e controlar os efeitos da oxidação lipídica.

KEYWORDS: Doenças cardiovasculares, Dislipidemia, Salsichas low-fat, TBARS, Oxidação lipídica

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento crescente nas vendas de carne de frango, o volume de subprodutos gerados consequentemente também aumenta. Muitos destes subprodutos são subaproveitados, embora possuam alto valor biológico. Dentre estes subprodutos, os pés de frango se destacam por apresentar em base seca altos teores de colágeno, que podem ser extraídos e utilizados pela indústria alimentícia, com aplicação nos mais diversificados tipos de alimentos, a exemplo de retentor de umidade, gelificante, estabilizante ou espessante (Li et al., 2007, Moraes e Cunha, 2013).

O colágeno pode apresentar também, a depender da forma como foi extraído ou hidrolisado, propriedades bioativas, como atividade quelante de minerais, antioxidantes, antimicrobiana, anticomgelante, anti-hipertensiva, (Toldrá et al., 2012, Zhang et al., 2013). Uma vez inserido em alimentos, pode melhorar as propriedades tecnológicas de textura e, de acordo com as propriedades bioativas que a molécula venha a desempenhar, pode manter a estabilidade do produto durante o armazenamento.

Em produtos cárneos, o colágeno pode ser empregado para desempenhar funções tecnológicas geralmente realizadas pela gordura utilizada nas formulações. As salsichas, por exemplo, são vistas pela população em termos nutricionais como alimentos com alto teor de

gordura, e seu consumo demasiado pode contribuir para a incidência de doenças cardiovasculares (DCV). Sousa et al. (2017), ao substituir a gordura de salsichas Frankfurt por colágeno hidrolisado em diferentes níveis verificaram a viabilidade de até 50% de substituição, sem causar danos à qualidade das salsichas e melhorando aspectos como a capacidade de retenção de água das salsichas, que as tornaram mais suculentas.

O uso de colágeno como substituto de gordura, devido às suas propriedades e tecnológicas, pode trazer vantagens na qualidade dos produtos cárneos quando comparado a outros substitutos de gordura. Kiliç e Özer (2017), ao substituir o toucinho por óleo de semente de palmeira interesterificado verificaram que ao longo do armazenamento o substituto de gordura não conseguiu conter os efeitos da oxidação, apresentando altos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico aos 30 dias de armazenamento.

A legislação brasileira permite o teor máximo de gordura de 30% em salsichas, a qual é utilizada para melhorar as características sensoriais e reduzir custos (Brasil, 2000). A World Health Organization (WHO, 2015) recomenda a ingestão de gordura para menos de 10% da energia total diária. Por outro lado, medidas de redução de gordura em industrializados devem ser adotadas para que os produtos de consumo prático continuem sendo ofertados aos consumidores. Com base na perspectiva apresentada, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do tempo de armazenamento por 42 dias, sob refrigeração, na qualidade de salsichas de frango produzidas a partir da substituição de gordura por colágeno extraído de pés de frango.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de colágeno de pés de frango

O gel de colágeno foi extraído através de um processo de extração ácida e hidrólise enzimática, conforme metodologia adaptada de Shimokomaki et al. (1981) e Simões et al.

(2014), a qual foi detalhada no Artigo “Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization” por Araújo et al (2018).

2.2 Processamento das salsichas

Foram processadas três formulações de salsichas, conforme insumos e quantidades listados na Tabela 1, sendo uma delas uma formulação padrão (SS), com 100% de pele de frango e toucinho utilizado; uma formulação com 50% de substituição de gordura por colágeno hidrolisado em pó comercial (SC) (Germina[®], Parnamirim/RN, Brazil); e outra com redução de 50% de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango (SG). A descrição do processamento das salsichas foi detalhado no intitulado “Qualidade de salsichas de frango low-fat adicionada de gel de colágeno de pés de frango” (Araújo et al., 2017). As salsichas foram armazenadas sob refrigeração a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 42 dias, sendo analisadas em intervalos de 7 dias.

2.3 Efeitos do uso de colágeno de pés de frango como substituto parcial de gordura nas características sensoriais, químicas e físicas das salsichas durante o armazenamento refrigerado

2.3.1 Análises químicas

As salsichas foram submetidas às análises de umidade, proteínas e cinzas, de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2007). O conteúdo lipídico foi determinado através do método de Folch et al. (1957), por extração a frio. Foi determinado também o teor de colágeno por meio da análise de hidroxiprolina (AOAC, 2007). O número de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinado conforme método proposto por Rosmini et al. (1996). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A partir dos extratos lipídicos obtidos na análise de gordura, em todos os tempos de armazenamento, foi realizada a metilação dos ácidos graxos (Hartman e Lago, 1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por injeção em cromatógrafo gasoso (VARIAN 430-GC), conforme metodologia detalhada no artigo intitulado “Qualidade de salsichas de frango low-fat adicionada de gel de colágeno de pés de frango” (Araújo et al., 2017). A quantificação dos ácidos graxos foi expressa em percentual de área para cálculos das somatórias de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poli-insaturados (PUFA), o Índice de Aterogenicidade (IA), que representa o potencial de estímulo à agregação plaquetária (Tonial, Oliveira e Bravo, 2011), calculado pela expressão $IA = [C12:0 + 4(C14:0) + C16:0]/(\Sigma SFA + \Sigma PUFA)$ e também foi calculado o Índice de Trombogenicidade (IT), de acordo com a expressão $IT = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[(0,5 \times AGMI) + (0,5 \times AGPI\ n-6) + (3 \times AGPI\ \omega-3) + (AGPI\ \omega-3/AGPI\ \omega-6)]$. As injeções para cada amostra de salsicha foram realizadas em triplicata.

2.3.2 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

A ADQ das salsichas com redução de gordura foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Meilgaard (1999). O teste foi realizado com prévia aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CAAE: 65402717.8.0000.5188), para atender as exigências éticas e científicas dispostas na Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 2012). O teste foi conduzido com 11 painelistas treinados, sendo a avaliação final realizada nos dias 0, 14 e 28 de armazenamento refrigerado (4°C), por meio de três sessões por dia, cada tratamento em três repetições, sendo as amostras apresentadas de forma monádica, aleatoriamente, através da intensidade dos atributos sensoriais medidas em escala não estruturada de 9 cm.

Os atributos avaliados sensorialmente foram: Cor rosada, Suculência visual, Maciez, Suculência, Exsudação de água, granulabilidade da massa, mastigabilidade, aroma de frango assado, aroma de ranço, sabor de frango cozido, e gosto salgado. Não foram realizadas análises sensoriais no dia 42, para garantir a segurança dos alimentos aos painelistas, pois apesar de serem analisadas microbiologicamente e estarem de acordo com os limites da legislação vigente (Brasil, 2001), as salsichas SC e SG apresentaram limosidade superficial, provavelmente devido ao colágeno que estava sendo exsudado no armazenamento. O preparo das salsichas foi executado segundo metodologia proposta por Morin et al. (2002), na qual as salsichas cozidas foram aquecidas a 50 °C e imediatamente servidas aos painelistas, codificadas com números aleatórios de três dígitos. Bolacha água e sal e água foram servidas entre as amostras.

2.3.3 Atividade antioxidante e perfil eletroforético

O efeito de captura do radical DPPH nas salsichas de frango foi analisado conforme metodologia adaptada de Chandini et al. (2008) e Chakka et al. (2015). A atividade antioxidante pelo método FRAP foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996) e Pulido et al. (2000).

As salsichas de frango foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme metodologia de Laemmli (1970), adaptada por Daguer et al. (2010), com extração das proteínas com ureia a 6 mol/L. Todas as análises de atividade antioxidante foram realizadas em triplicata.

2.3.4 Análises físicas

A análise da capacidade de retenção de água (CRA) foi realizada segundo a metodologia adaptada de Huff-Lonergan e Lonergan (2005). Todos os tratamentos foram analisados em triplicata. A determinação dos parâmetros de cor das salsichas foi realizada em

um colorímetro Konika Minolta CR-400 (Minolta Chromameter Co., Ltd., Osaka, Japan), operando no sistema CIELab, operando com iluminante D65 e observador a 10°. Os parâmetros L* (luminosidade), +a* (intensidade de cor vermelha) e +b* (intensidade de cor amarela) foram medidos na superfície interna das salsichas fatiadas em quatro locais escolhidos aleatoriamente, para cada tratamento.

As salsichas foram submetidas à Análise de Perfil de textura utilizando um texturômetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, UK) acoplado a um probe cilíndrico de aço inoxidável (P/6), de 6 mm, conforme metodologia detalhada por Araújo et al., 2017.

2.4 Tratamento estatístico dos dados

Os dados obtidos das análises químicas, sensoriais e físicas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) do tipo two-way ($p < 0,05$), para analisar efeitos de tratamento e de tempo (Steel et al., 1996), através do software estatístico Assistat versão 7.6 Beta (Silva, 2016). As médias obtidas foram submetidas ao teste de Tukey. As médias das análises foram submetidas à Análise de Componentes Principais (ACP), realizadas através do software estatístico MVSP (KCS, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos do tempo de armazenamento nas características sensoriais, químicas e físicas das salsichas frango produzidas a partir da substituição de gordura por colágeno extraído de pés de frango

3.1.1 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

As médias e desvios dos parâmetros sensoriais analisados por meio da ADQ estão listadas na Tabela 2. Com relação à aparência, no parâmetro “Cor rosada”, a salsicha SC, com adição de colágeno em pó, apresentou maiores escores durante o armazenamento. Com

relação à salsicha padrão SS, foi observado o aumento da cor rosada, enquanto que na salsicha SG, com gel de colágeno diminuiu a cor rosada. A mesma tendência de decréscimo verificada entre 0 e 14 dias de armazenamento na cor rosada foi observada para o parâmetro a^* , que mede a intensidade de cor vermelha das salsichas. Entre os dias 14 e 28, o comportamento inverso foi observado, exceto para SS que teve diminuição no valor de a^* .

Com relação à suculência visual, referente à ADQ, foi observado que durante o armazenamento a salsicha padrão manteve seus escores, enquanto que as salsichas low-fat SC e SG tiveram mesmo comportamento durante o armazenamento, aumentando entre 0 e 14 dias e diminuindo entre 14 e 28 dias. Entre os tratamentos, foi observada diferença significativa apenas no dia 28, em que SS apresentou maior suculência visual do que os tratamentos SC e SG. Nos parâmetros de textura sensorial das salsichas, foi verificado que na maciez entre os tratamentos SG se apresentou mais macia. No dia 28, foi observado que os tratamentos não diferiram entre si ($p < 0,05$). Com relação ao tempo de armazenamento, SS e SC se mantiveram constantes nos 28 dias, enquanto que SG diminuiu sua maciez entre os dias 14 e 28.

A suculência das salsichas, relacionada à liberação de água durante a mastigação, teve o mesmo comportamento com relação ao tempo de armazenamento, permanecendo estável entre 0 e 14 dias e diminuindo entre 14 e 28 dias de armazenamento. Quanto à exsudação de água, relacionada com a liberação de água no primeiro contato das salsichas com a boca, não foram observadas mudanças significativas ao longo do armazenamento ($p < 0,05$), porém entre as amostras a salsicha SG, com gel de colágeno de pés de frango teve menor exsudação que SC, sendo semelhante à salsicha padrão SS. Morin et al. (2002), em estudo com salsichas low-fat com uso de β -glucanas de cevada obtiveram em ADQ valores de suculência da salsicha padrão próximos a este estudo (7,27) e observaram diminuição deste valor quando a gordura foi substituída por carboximetilcelulose (CMC), devido à perda de retenção de água.

Provavelmente, o gel de colágeno apresenta maior habilidade de reter água que o colágeno hidrolisado em pó.

Na análise sensorial, não foram observados efeitos significativos de tempo para o parâmetro de mastigabilidade das salsichas, entretanto, ao comparar os tratamentos a salsicha SG apresentou os menores valores de mastigabilidade, em todos os tempos de armazenamento. A adição de gel de colágeno contraria os efeitos observados por Seo et al. (2015), ao avaliar a textura de salsichas com adição de amido de diferentes origens como substitutos de gordura.

Com relação aos parâmetros sensoriais de aroma e sabor das salsichas, o aroma e o sabor de frango cozido tiveram comportamento semelhante, onde a salsicha SC obteve valores semelhantes ao padrão SS. O tratamento SG, com adição de gel de colágeno, apresentou menores médias de aroma e sabor de frango cozido em todos os tempos de armazenamento. Provavelmente, o ácido acético utilizado na extração do gel de colágeno pode ter causado a inibição do aroma e do sabor. Segundo Venturini et al. (2011), ao avaliar sensorialmente salsichas low-fat de frango curadas, a redução de gordura diminui os escores de aroma e sabor nos produtos cárneos, devido aos seus ácidos graxos característicos. Não houve variações significativas de aroma de frango, entretanto o sabor de frango das salsichas aumentou com o tempo de armazenamento.

O aroma de ranço das salsichas de frango foi fracamente percebido pelos painelistas durante as sessões, mas foi observado que o mesmo aumentou durante o armazenamento refrigerado. As salsichas SS e SC, com adição de colágeno em pó comercial, tiveram variações significativas ($p < 0,05$) em todos os tempos, enquanto que a salsicha com gel de colágeno SG apresentou aumento significativo do aroma de ranço entre 14 e 28 dias de armazenamento. Entre os tratamentos, com exceção do dia 0, as salsichas com redução de

gordura apresentaram menor aroma de ranço do que a salsicha SS, e não diferiram entre si ($p < 0,05$). A redução do aroma de ranço pode ter ocorrido tanto pela redução da gordura adicionada à formulação quanto ao efeito antioxidante que o colágeno pode ter exercido. De Paula et al. (2017), ao analisar o efeito de diferentes embalagens no armazenamento refrigerado de linguiça toscana brasileira, verificaram forte correlação do aroma de ranço com a oxidação lipídica e proteica.

No tocante ao gosto salgado das salsichas, foi observado que entre os tratamentos não houve diferença significativa ($p < 0,05$). Com relação ao tempo de armazenamento, entre os dias 0 e 14 houve aumento nas médias para todos os tratamentos, as quais se mantiveram constantes entre 14 e 28 dias de armazenamento. Os valores obtidos foram próximos aos encontrados por Jakobsen et al. (2014), ao avaliar as características sensoriais de salsichas com redução de gordura por farelo de trigo, os quais obtiveram média 7,4, de uma escala de 15 cm.

3.1.2 Análises químicas e físicas

A Tabela 4 contém as médias e desvios para os parâmetros químicos, físicos e de perfil de textura instrumental das salsichas, durante os 42 dias de armazenamento. Com relação aos parâmetros químicos em base seca, inicialmente para os lipídeos foi verificado que, proporcionalmente à substituição realizada, os valores obtidos para os tratamentos SC e SG correspondem à aproximadamente metade dos valores obtidos para a salsicha padrão SS. Com relação ao efeito do armazenamento, foi observado em todos os tratamentos que o conteúdo lipídico foi diminuindo, especialmente entre os dias 0 e 14, período no qual a salsicha padrão teve a maior redução, sendo de aproximadamente 41,6%. Provavelmente, a redução pode ser justificada por uma possível oxidação lipídica, que tem relação com o aumento do aroma de ranço (Tabela 2). Os valores obtidos foram próximos aos obtidos por

Seo et al. (2015) em salsichas low-fat, para o tratamento controle (35,70 % em base seca) e no tratamento com substituição de gordura por 10% de amido de milho, 15% de peito de frango e 20% de surimi.

Com relação ao teor de cinzas, foi observado que ao longo do tempo houve aumento em todos os tratamentos. No dia 0, SG apresentou maior média, provavelmente devido à adição de cloreto de sódio na extração do gel de colágeno de pés de frango, mesmo após a etapa de diálise, que pode ter deixado resíduos de minerais. Os valores obtidos foram próximos aos encontrados por Bolger et al. (2016), em salsichas de frango adicionadas de α -tocoferol (5,78% em base seca).

O teor de proteínas foi menor para o tratamento padrão SS, em todos os tempos de armazenamento. Entre as amostras SC e SG, houve diferença estatística aos 42 dias, conforme visualizado na Figura 2. Observou-se também que para o teor de colágeno, as maiores médias foram obtidas para o tratamento SC, em todos os tempos de armazenamento. As diferenças obtidas se deram provavelmente à forma de introdução de colágeno, que é mais concentrado na forma em pó, comparado ao gel extraído de pés de frango. Com relação ao tempo de armazenamento, foi verificado que tanto o teor de proteínas quanto de colágeno apresentou um aumento entre 0 e 14 dias, que pode ser justificado pela queda acentuada dos lipídeos (Tabela 3), que faz aumentar a concentração dos demais componentes, seguido de queda constante até o dia 42. A diminuição das proteínas pode estar associada a variações de umidade, ou a uma possível oxidação, que segundo Estevez (2011) e Soladoye et al. (2015), pode modificar alguns aminoácidos, como metionina, cisteína, lisina, treonina e arginina.

Com relação à cor, no parâmetro referente à luminosidade foi observado que houve oscilação entre as amostras e durante o tempo de armazenamento. De modo geral, foi observado o aumento de L^* em função do tempo para o tratamento SG e o decréscimo de L^*

em SC. Serdaroğlu et al. (2016), ao estudar os efeitos da substituição de gordura por uma emulsão gelatinosa em hambúrgueres verificaram que as amostras com adição de gel apresentaram maior luminosidade, justificando que a presença da gelatina aumenta o valor de L^* devido à maior reflexão da luz do que os glóbulos de gordura animal, os quais são maiores. A exceção ocorreu no dia 14, onde coincidentemente houve o decréscimo mais acentuado de gordura no tratamento SS.

Os parâmetros de cor a^* e b^* , ao comparar os efeitos entre os tratamentos, tiveram o mesmo comportamento, onde as amostras com redução de gordura, de modo geral, apresentaram maiores valores quando comparadas ao tratamento SS, com exceção ao dia 14, que a amostra SG foi inferior aos demais tratamentos. Com relação ao tempo, foi observado que houve decréscimo de a^* e aumento de b^* , principalmente entre os dias 0 e 28. A diminuição do valor de a^* está associado com a oxidação lipídica, que implica no acúmulo de metamioglobina, conforme observado por Sohaib et al. (2017) em bifes de frango ao longo do armazenamento. Os valores de a^* se apresentaram próximos aos encontrados por Jin et al. (2016), em salsichas de frango emulsionadas, enquanto que os valores de b^* foram próximos aos obtidos por Bolger et al. (2016), em salsichas de frango enriquecidas com vitamina E. Conforme observado por Prestes et al. (2015), as mudanças de a^* e b^* causam reflexos semelhantes nos valores de Hue e Chroma, onde foi verificado que ao longo do armazenamento as salsichas apresentaram aumento do tom e da saturação da cor.

Quanto à capacidade de retenção de água das salsichas (Tabela 3), foi observado que entre os tratamentos, aqueles que tiveram redução de gordura (SC e SG) tiveram valores de WHC semelhantes ou superiores ao padrão SS ($p < 0,05$). Serdaroğlu et al. (2017) afirmam que os géis provenientes do colágeno possuem habilidade de ligar moléculas de água e reter gordura na matriz, o que em termos práticos pode tornar o produto low-fat mais próximo ao padrão. Com relação ao tempo, foi verificado em todos os tratamentos o aumento da retenção

ao longo dos 42 dias. Os valores obtidos neste estudo foram superiores aos encontrados por Méndez-Zamora et al. (2015), em salsichas tipo Frankfurt low-fat com adição de inulina e pectina, provavelmente devido às propriedades do colágeno de gelificação e ligação com a água e gordura.

Na Análise de Perfil de Textura os tratamentos SS e SC apresentaram maiores valores de durezas comparadas a SG, conforme Figura 1 e Tabela 4, e durante o tempo de armazenamento apenas a salsicha com gel de colágeno aumentou o valor de dureza. Enfatiza-se que o comportamento explicado para a maciez na ADQ é oposto ao comportamento obtido para dureza instrumental. Sousa et al. (2017), ao introduzir vários níveis de colágeno em pó para substituição de gordura em salsichas de frango, verificaram que as salsichas perderam maciez ao longo do acréscimo de colágeno em pó na formulação. Os valores da mastigabilidade obtidos no perfil de textura (TPA) tiveram semelhança no comportamento quando comparadas à ADQ.

A adesividade, que é relacionada à área da força negativa que corresponde ao quanto a amostra fica grudada durante a mastigação, foi observado que, com exceção do dia 14, a amostra SG apresentou menor área comparada aos demais tratamentos, sendo a salsicha menos adesiva. Em relação ao tempo de armazenamento, foi observado em todos os tratamentos um aumento entre 0 e 14 dias, seguida de redução até 42 dias de armazenamento. Quanto à elasticidade, foram observadas variações entre as amostras, onde o tratamento com gel de colágeno SCP apresentou maiores médias até o 28º dia de armazenamento, diminuindo no dia 42. Os valores deste estudo foram próximos aos obtidos por Prestes et al. (2015), em mortadelas de frango low-fat com substituição de gordura por amido.

No parâmetro de coesividade, foi observado que no dia 0 não houve diferenças entre os tratamentos, porém ao longo do armazenamento a salsicha padrão apresentou oscilações,

enquanto as salsichas SC e SG apresentaram efeito crescente na coesividade, que representa um efeito positivo, pois provavelmente o colágeno realizou mais ligações internas nas salsichas, dando maior estabilidade. Os valores foram semelhantes aos encontrados por Jin et al. (2016), em salsichas emulsionadas suínas, que variaram de 0,48 a 2,21%. Com relação à gomosidade, foi observado efeito semelhante à dureza (Figura 1), que também aumentou com o tempo de armazenamento. A gomosidade representa a energia de mastigação, sendo cada vez mais necessária à medida que as salsichas ficam mais duras. Os valores de gomosidade obtidos foram próximos aos encontrados por Serdaroğlu et al. (2016), em uma emulsão cárnea adicionada de uma emulsão gelificada, com valores entre 3,01 e 13,82 N.

3.1.3 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil eletroforético das salsichas em todos os tempos de armazenamento está apresentado na Figura 3. Inicialmente, ao comparar os tratamentos, verificou-se que no dia 0 as bandas correspondentes às moléculas de colágeno (cadeias α_1 e α_2 , próximas à banda correspondente a 150 kDa) apareceram mais claras nos tratamentos SS e SG, quando comparadas ao tratamento SC, que apresenta maior conteúdo de colágeno, conforme Tabela 3.

Com relação aos efeitos do armazenamento das salsichas, foi observado em todos os tratamentos, especialmente em SS e SC, uma maior intensidade das bandas de menor peso molecular conforme o avanço do tempo de refrigeração, o que pode ser efeito do armazenamento na fragmentação das proteínas. Na salsicha SG foi observado este efeito, porém com bandas mais claras. As últimas bandas do perfil eletroforético, de tamanho inferior à banda de 31 kDa, que ficam mais claras no dia 28, podem corresponder às cadeias de miosina, as quais segundo Feng et al. (2016) podem se reduzir se convertendo em polímeros proteicos durante o armazenamento.

3.2 Efeitos do tempo de armazenamento na oxidação das salsichas frango produzidas a partir da substituição de gordura por colágeno extraído de pés de frango

3.2.1 Perfil de ácidos graxos

As médias e desvios das somatórias dos percentuais de ácidos graxos estão listadas na Tabela 5. Foi observado em todos os tratamentos durante o armazenamento a predominância dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, chegando a atingir valores próximos a 70% do total de ácidos graxos, sendo um perfil comum à carne de frango, conforme visto por Yilmaz, Simsek e Isikli (2002), em salsichas low-fat de frango. Com relação aos ácidos graxos saturados, foi verificado que entre os tratamentos no dia 0 não houve diferença estatística, entretanto durante o armazenamento o percentual do tratamento SS decresceu em relação aos demais tratamentos, havendo comportamento semelhante para os ácidos graxos monoinsaturados entre dias 0 e 14, o que pode estar relacionado com a oxidação dos lipídeos, conforme resultados dos TBARs (Figura 4). Com relação aos ácidos graxos poli-insaturados, foi observado que os tratamentos SS e SG conservaram seus percentuais ao longo do armazenamento, enquanto que a salsicha SC decresceu a somatória entre os dias 28 e 42. Os valores de Σ PUFA foram próximos aos encontrados por Morais et al. (2013), em salsichas com carne de jacaré com adição de óleo de soja.

Com relação à razão Σ MUFA/ Σ SFA, foi observado com relação ao tempo de armazenamento que o tratamento SS aumentou, o tratamento SC conservou e SG decresceu entre os dias 14 e 42. Entre os tratamentos, SS apresentou maiores valores a partir do dia 28. Os valores obtidos foram próximos aos encontrados por Morais et al. (2013) em salsicha de carne de jacaré com redução de 50% de gordura, os quais obtiveram valor médio de 1,33%. Na relação Σ PUFA/ Σ SFA, foi verificado um comportamento semelhante entre os tratamentos,

com valores obtidos próximos aos encontrados por Berasategi et al. (2011), em salsichas tipo Bologna enriquecidas com ômega-3, os quais encontraram valores entre 0,49 e 0,84%.

Com relação aos índices, foi observado que o Índice de Aterogenicidade (IA) das salsichas SS e SG decresceram ao longo do armazenamento. A partir do dia 28, a salsicha SG apresentou menores valores de IA, o que pode ser um indício de menor risco de doenças cardiovasculares. Os valores de IA obtidos foram ligeiramente superiores aos encontrados por Stajíc et al. (2011), os quais obtiveram valores entre 0,46 e 0,61 em salsichas Sremska em 14 dias de armazenamento. Os Índices de Trombogenicidade apresentaram comportamento semelhante ao longo do tempo, estando os tratamentos SS e SG inferiores ao tratamento SC, com valores próximos aos encontrados por Berasategi et al. (2011), em salsichas tipo Bologna.

3.2.2 Número de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade antioxidante

Os valores obtidos para o número de TBARS das salsichas ao longo dos 42 dias de armazenamento refrigerado estão distribuídos graficamente na Figura 4, juntamente com o conteúdo lipídico de cada um dos tratamentos. Foi observada uma relação inversamente proporcional entre o teor de lipídeos e o número de TBARS ao longo do armazenamento, pois enquanto diminuiu o teor de lipídeos aumentou a concentração de malonaldeído das salsichas.

Em todos os tempos o tratamento SS apresentou maiores médias de TBARS. A amostra SG, com adição de gel de colágeno, apresentou menores médias comparada aos demais tratamentos, provavelmente pelo fato do gel de colágeno apresentar potencial antioxidante, ou pelo teor reduzido de lipídeos na substituição parcial de gordura. Em relação ao aroma de ranço analisado sensorialmente, apesar de haver diferenças significativas entre os tratamentos os escores foram baixos, indicando pouco aroma de ranço percebido por parte dos

painelistas. Esta relação corrobora a conclusão obtida por Ockerman e Kesh (1982), ao quais relataram que o flavour da oxidação da gordura, proveniente da deterioração dos ácidos graxos, seria percebido nos testes de avaliação sensorial ao chegar acima de 1,0 mg de malonaldeído/kg de carne, o que não ocorreu até os 28 dias de armazenamento. Seo et al. (2016), ao substituir gordura em salsichas de frango por amido de milho obtiveram valores de TBARS entre 0,46 e 1,59 mg de MDA/kg de amostra, superiores a este estudo.

Os menores valores de TBARS podem estar relacionados com possíveis atividade antioxidantes do colágeno utilizado nas salsichas de frango. As médias e desvios obtidos para a atividade antioxidante relacionada à captura do radical DPPH e ao poder redutor de ferro (FRAP), expressos em equivalente Trolox, estão listadas na Tabela 4. Com relação ao radical DPPH, foi observado que os tratamentos com adição de colágeno em substituição à gordura apresentaram maior porcentagem de inibição, visto em todos os tempos de armazenamento.

Com relação ao tempo de armazenamento, foi observado que os tratamentos apresentaram-se estáveis até os 28 dias de armazenamento, havendo um aumento significativo de todos entre os dias 28 e 42. Geeta (2017), ao avaliar a atividade antioxidante de salsichas fermentadas com dextrose e amido, encontraram valores entre 20,44 e 51,55%, superiores a este estudo, durante o período de fermentação, que provavelmente está associado à atividade do microrganismo inoculado. Com relação aos ensaios de poder redutor (FRAP) das salsichas, foi observado que, ao contrário das análises de DPPH, as amostras oscilaram entre os tempos, com a atividade da salsicha SG mais próxima ou semelhante ao padrão SS. Mejri et al. (2017) obtiveram maiores atividades de redução de ferro em salsichas fermentadas durante o armazenamento, com uso de peptídeos de baixo peso molecular, os quais verificaram que tal atividade foi atribuída às frações peptídicas de 3 kDa durante o período de refrigeração.

3.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

Na Análises de componentes principais (ACP) apresentada na Figura 5 foi observado que com relação aos parâmetros sensoriais as salsichas com adição de gel de colágeno ocuparam posições distribuídas no primeiro e no quarto quadrante, próximas aos atributos de maciez, exsudação de água (SG0 e SG14) e gosto salgado (SG28). O tratamento padrão no tempo 0 se correlacionou com o conteúdo de lipídeos. As salsichas SS e SC apresentaram maior proximidade e possível correlação com os parâmetros de aroma e sabor de frango, que corrobora o comportamento descrito na Análise Descritiva Quantitativa.

Nos demais atributos analisados nas salsichas (Figura 5b), foi verificado que todos os tratamentos nos tempos 0, 14 e 28 estavam dispostos no primeiro e do quarto quadrante, com exceção do tratamento SS no tempo 28, que correlacionou-se mais fortemente com o parâmetro mastigabilidade. Os tratamentos no tempo 42 permaneceram juntos no 2º quadrante, estando melhor correlacionados com o número de TBARS e os parâmetros de atividade antioxidante (DPPH, FRAP). Neste tempo, a salsicha SG correlacionou-se mais fortemente com a capacidade de retenção de água (WHC). Tomaschunas et al. (2013), ao estudar mudanças sensoriais em salsichas de fígado tipo Lyon substituição de gordura por inulina e fibra de citrino verificaram por meio da análise de componentes principais (PCA) que as amostras com maiores teores de gordura se correlacionaram com o aroma característico da carne e a suculência das salsichas.

4. CONCLUSÃO

Até os 28 dias de armazenamento, as salsichas apresentaram manutenção dos parâmetros de dureza, do teor proteico e poucas variações nos parâmetros sensoriais de textura. A redução de gordura por colágeno apresentou vantagens na redução do número de TBARS, sendo a amostra com gel de colágeno melhor na atividade antioxidante e nos índices

de aterogenicidade e trombogenicidade, quando comparada com a salsicha com colágeno hidrolisado. O armazenamento refrigerado por 28 dias foi importante para manter uma maior quantidade de parâmetros desejáveis de qualidade. Para melhores resultados, recomenda-se o estudo de armazenamento com outros níveis menores de substituição de gordura por gel de colágeno.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. (2016) Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015. URL: < <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>> Accessed in 20th may 2017.

AOAC. (2007). Official methods of analysis of AOAC international. Association of Official Analysis Chemists International. CD-ROM.

Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Berasategi, I., Legarra, S., Ciriano, M. G. I., Rehecho, S., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Navarro-Blasco, I., Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2011). “High in omega-3 fatty acids” bologna-type sausages stabilized with an aqueous-ethanol extract of *Melissa officinalis*. *Meat Science*, 88, 705–711.

Bolger, Z., Brunton, N. P., Lyng, J. G. & Monahan, J. F. (2016). Quality attributes and retention of vitamin E in reduced salt chicken sausages fortified with vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 3948–3959.

Brasil, (2012). Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Conselho Nacional De Saúde.

- 452 Brasil. (2001). Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02/
453 01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF:
454 Diário Oficial Da República Federativa Do Brasil.
- 455 Chakka, A. K., Elias, M., Jini, R., Sakhare, P. Z. & Bhaskar, N. (2015). In-vitro antioxidant
456 and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver
457 protein hydrolysates, *Journal of Food Science and Technology*, 52 (2015) 8059–8067.
- 458 Chandini, S., Ganesan, P. & Bhaskar, N. (2008). In vitro antioxidant activities of three
459 selected brown seaweeds of India, *Food Chemistry*, 107, 707–713.
- 460 Daguer, H., Stephan, M. P. & Bersot, L. S. (2010). Perfil eletroforético de lombo suíno
461 adicionado de proteínas não cárneas. *Ciência Rural*, 40, 434-440.
- 462 De Paula, R., Soares, J. M., Da Silva, P. F., Backes, G. T., Cansian, R. L., Treichel, H. &
463 Valduga, E. (2017). Assessment of different packaging structures in the stability of
464 refrigerated
- 465 Estévez, M., Ventanas, S. & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between
466 protein carbonyls— α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes—and leucine and
467 isoleucine. *Food Chemistry*, 128, 1051–1057.
- 468 Feng, X., Li, C., Jia, X., Guo, Y., Lei, N., Hackman, R. M., Chen, L. & Zhou, G. (2016).
469 Influence of sodium nitrite on protein oxidation and nitrosation of sausages subjected to
470 processing and storage. *Meat Science*, 116, 260–267.
- 471 Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and
472 purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1),
473 497-509.

- 474 Geeta, A. S. Y. (2017). Antioxidant and antimicrobial profile of chicken sausages prepared
475 after fermentation of minced chicken meat with *Lactobacillus plantarum* and with additional
476 dextrose and starch. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 249-258.
- 477 Hartman, L. & Lago, R.C.A. (1973). Rapid preparation of fatty acids methyl esters.
478 *Laboratory Practice*, 22, 475-476.
- 479 Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of
480 meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-
481 204.
- 482 Jakobsen, L. M. A., Vuholm, S., Aaslyng, M. D., Kristensen, M., Sørensen, K. V., Raben, A.
483 & Kehlet, U. (2014). Sensory characteristics and consumer liking of sausages with 10% fat
484 and added rye or wheat bran. *Food Science and Nutrition*, 2(5), 534–546.
- 485 Jin, S. K., Ha, S. R., Hur, S. J. & Choi, J. S. (2016). Effect of the Ratio of Raw Material
486 Components on the Physico-chemical Characteristics of Emulsion-type Pork Sausages. *Asian-
487 Australasian Journal of Animal Sciences*, 29, 263-270.
- 488 KCS. (2007). MVSP Plus: Manual user's. Kovach Computing Services, Wales, U.K.
- 489 Kılıç, B. & Özer, C. O. (2017). Effects of replacement of beef fat with interesterified palm
490 kernel oil on the quality characteristics of Turkish dry-fermented sausage. *Meat Science*.
491 Article in press.
- 492 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the
493 bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

- 494 Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. & Wu, Y. (2007). Isolation and identification of
495 antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and
496 electrospray ionization-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 102, 1135–1143.
- 497 Meilgaard, C. (1999). Sensory evaluation techniques (Third Edition). Sensory Evaluation
498 Techniques, Third Edition.
- 499 Mejri, L., Vázquez-Villanueva, R., Hassouna, M., Marina, M. L. & García, M. C. (2017).
500 Identification of peptides with antioxidant and antihypertensive capacities by RP-HPLC-Q-
501 TOF-MS in dry fermented camel sausages inoculated with different starter cultures and
502 ripening times. *Food Research International*. In Press, Corrected Proof.
- 503 Méndez-Zamora, G., García-Macías, J. A., Santellano-Estrada, E., Chávez-Martínez, A.,
504 Durán-Meléndez, L. A., Silva-Vázquez, R., & Quintero-Ramos, A. (2015). Fat reduction in
505 the formulation of frankfurter sausages using inulin and pectin. *Food Science and*
506 *Technology*, 35(1), 25-31.
- 507 Moraes, M. C. & Cunha, R. L. (2013). Gelation property and water holding capacity of heat-
508 treated collagen at diferente temperature and pH values. *Food Research International*, 50,
509 213-223.
- 510 Morais, C. S. N., Morais Júnior, N. N., Vicente-Neto, J., Ramos, E.M., Almeida J., Roseiro,
511 C., Santos, C., Gama, L. T. & Bressan, M. C. (2013). Mortadella sausage manufactured with
512 Caiman yacare (*Caiman crocodilus yacare*) meat, pork backfat, and soybean oil. *Meat*
513 *Science*, 95, 403–411.
- 514 Morin, L. A., Temelli, F. & McMullen, L. (2002). Physical and Sensory Characteristics of
515 Reduced-Fat Breakfast Sausages Formulated With Barley b-Glucan. *Journal of Food Science*,
516 67(6), 2002-2391.

- 517 Ockerman H. W., & Kesh, J. C. (1982). Dried pork as influenced by nitrate, packaging
518 method and storage. *Journal of Food Science*, 47, 1631–1634.
- 519 Prestes, R. C., Silva, L. B., Torri, A. M. P., Kubota, E. H., Rosa, C. S., Roman, S. S.,
520 Kempka, A. P. & Demiate, I. M. (2015). Sensory and physicochemical evaluation of low-fat
521 chicken mortadella with added native and modified starches. *Journal of Food Science and*
522 *Technology*, 52(7), 4360–4368.
- 523 R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary as determined by a
524 modified ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*,
525 48 (2000) 3396-3402.
- 526 Rosmini, M. R., Perlo, F., Pérez-Alvarez, J. A., Pagán-Moreno, M. J., Gago-Gago, A., López-
527 Santoveña, F. & Aranda-Catalá, V. (1996). TBA test by extractive method applied to paté.
528 *Meat Science*, 42, 103-110.
- 529 Seo, H. W., Kang, G. H., Cho, S. H., Ba, H. V. & Seong, P. N. (2015). Quality Properties of
530 Sausages Made with Replacement of Pork with Corn Starch, Chicken Breast and Surimi
531 during Refrigerated Storage. *Korean Journal for Food Science and Animal Resources*, 35(5),
532 638–645.
- 533 Serdaroğlu, M., Nacak, B., Karabıyıkoglu, M. & Keser, G. (2016). Effects of partial beef fat
534 replacement with gelled emulsion on functional and quality properties of model system meat
535 emulsions. *Korean Journal for Food Science and Animal Resources*, 36, 744-751.
- 536 Shimokomaki, M., Duance, V. C. & Bailey, A. J. (1981). Identification of two further
537 collagenous fractions from cartilage. *Bioscience reports*, v. 1, p. 561-570.
- 538 Silva, F.A.S. ASSISTAT - Software: statistical assistance. Version 7.7 beta, 2016.

- 539 Simões, G. S. Silveira, E. T. F., Oliveira, S. R., Poleze, E., Allison, J. R. D., Ida, E. I., &
540 Shimokomaki, M. (2014). Optimum conditions for extracting collagen from the tunica
541 albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated
542 collagen. *Meat Science*, 96, 1460-1468.
- 543 Sohaib, M., Anjum, F. M., Arshad, M. S., Imran, M., Imran, A. & Hussain, S. (2017).
544 Oxidative stability and lipid oxidation flavoring volatiles in antioxidants treated chicken meat
545 patties during storage. *Lipids in Health and Disease*, 16, 17-27.
- 546 Soladoye, O. P., Juarez, M. L., Aalhus, J. L., Shand, P. & Estevez, M. (2015). Protein
547 Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health.
548 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 106-122.
- 549 Sousa S. C., Fragoso, S. P., Penna, C. R. A., Arcanjo, N. M. O., Silva, F. A. P., Ferreira, V. C.
550 S. Barreto, M. D. S. Araújo, I. B. S. (2017). Quality parameters of frankfurter-type sausages
551 with partial replacement of fat by hydrolyzed collagen. *LWT - Food Science and Technology*,
552 76, 320-325.
- 553 Stajic, S., Perunović, M., Šobajić, S. & Vranić, D. (2011). Cholesterol content and
554 atherogenicity of fermented sausages made of pork meat from various breeds. *Procedia Food*
555 *Science*, 1, 568 – 575.
- 556 Steel, R.G.D., Torrie J.H., Dickey, D. (1996). Principles and Procedures of Statistics.
557 McGraw-Hill.
- 558 Toldrá, F., Aristoy, M. C., Mora, L. & Reig, M. (2012). Innovations in value-addition of
559 edible meat by-products. *Meat Science*, 92, 290–296.

- 560 Tomaschunas, M., Zorb, R., Fischer, J., Kohn, E., Hinrichs, J., Busch-Stockfisch, M. (2013).
561 Changes in sensory properties and consumer acceptance of reduced fat pork Lyon-style and
562 liver sausages containing inulin and citrus fiber as fat replacers. *Meat Science*, 95, 629-640.
- 563 Tonial, I. B., Bravo, C. E. C., Souza, N. E., Matsushita, M., Furuya, W. M., Visentainer, J. V.
564 (2011). Qualidade nutricional dos lipídios de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas
565 com ração suplementada com óleo de soja. *Revista Alimentos e Nutrição*, 22, 103-112.
- 566 Venturini, A. C., Cavenaghi, A. D., Castillo, C. J. C. & Quiñones, E. M. (2011). Sensory and
567 microbiological evaluation of uncured fresh chicken sausage with reduced fat content. *Food*
568 *Science and Technology*, 31(3), 629-634.
- 569 WHO. World Health Organization (2015). OPAS estabelece critérios para definir níveis
570 excessivos de açúcar, sal e gorduras em alimentos e bebidas processados. URL:
571 [http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=320:opas-](http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=320:opas-estabelece-criterios-para-definir-niveis-excessivos-de-acucar-sal-e-gorduras-em-alimentos-e-bebidas-processados&Itemid=183)
572 [estabelece-criterios-para-definir-niveis-excessivos-de-acucar-sal-e-gorduras-em-alimentos-e-](http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=320:opas-estabelece-criterios-para-definir-niveis-excessivos-de-acucar-sal-e-gorduras-em-alimentos-e-bebidas-processados&Itemid=183)
573 [bebidas-processados&Itemid=183](http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=320:opas-estabelece-criterios-para-definir-niveis-excessivos-de-acucar-sal-e-gorduras-em-alimentos-e-bebidas-processados&Itemid=183)> Acesso em: 01 ago. 2017.
- 574 Yilmaz, I., Simsek, O. & Isikli, M. (2002). Fatty acid composition and quality characteristics
575 of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil.
576 **Meat Science**, 62, 253-258.
- 577 Zhang F., Fang L., Wang C., Shi L., Chang T., Yang T., Yang H., Cui M. (2013) Effects of
578 starches on the textural, rheological, and color properties of surimi-beef gels with microbial
579 transglutaminase. *Meat Science*, 93(3), 533–537.
- 580
- 581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592 **Lista de Tabelas**

593 Tabela 1 – Formulações das salsichas de frango com redução de gordura por colágeno em pó
 594 e por gel de colágeno extraído de pés de frango

Matéria-prima/ Ingredientes	Formulações (%) ¹		
	SS	SC	SG
Carne frango	65	65	65
Toucinho	15	7,5	7,5
Colágeno de pés de frango	-	7,5	-
Colágeno comercial	-	-	7,5
Água (gelo)	15	15	15
Cloreto de sódio	1,8	1,8	1,8
Nitrito de sódio	0,02	0,02	0,02
Eritorbato de sódio	0,05	0,05	0,05
Tripolifosfato de sódio	0,20	0,20	0,20
Pimenta branca	0,20	0,20	0,20
Coentro	0,08	0,08	0,08

Glutamato monossódico	0,25	0,25	0,25
Alho	0,40	0,40	0,40
Noz-moscada	0,10	0,10	0,10
Cebola	0,40	0,40	0,40
Amido	1,5	1,5	1,5

SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango.

605 Tabela 2 – Médias e desvios dos parâmetros sensoriais da ADQ realizada nas salsichas de
 606 frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado

Atributos		Tratamentos	0	14	28
Aparência	Cor rosada	SS	1,11±0,69 cB	1,11±0,80 aB	2,69±0,82 bA
		SC	3,09±0,93 aA	1,41±0,99 aB	3,47±0,90 aA
		SG	2,40±1,13 bA	1,52±0,88 aB	2,06±0,93 cAB
	Suculência visual	SS	6,20±1,39 aA	6,41±1,00 aA	6,56±0,86 aA
		SC	5,83±1,24 aB	6,67±0,96 aA	5,74±1,25 bB
		SG	5,93±0,82 aB	6,66±0,87 aA	5,66±1,23 bB
Textura	Maciez	SS	6,67±1,43 bA	7,18±0,96 bA	6,51±1,40 aA
		SC	7,23±1,01 bA	6,99±0,89 bA	6,83±1,09 aA
		SG	8,14±0,71 aA	8,45±0,57 aA	7,23±1,21 aB
	Suculência	SS	7,20±0,76 aA	7,18±0,79 aA	6,90±0,71 aB
		SC	6,72±0,91 bA	6,83±0,96 bA	6,43±1,17 aB
		SG	7,23±0,98 aA	6,81±0,95 abA	6,42±0,98 aB
	Exsudação de água	SS	4,09±1,61 bA	4,57±1,94 abA	4,43±1,89 aA
		SC	4,18±1,79 bA	3,45±1,88 bA	4,35±1,85 aA
		SG	5,15±1,71 aA	4,60±1,79 aA	4,27±1,53 aA
	Granulosidade da massa	SS	4,48±1,80 aA	2,88±1,79 bB	4,81±1,88 aA
		SC	3,64±1,75 aB	4,06±1,89 aB	5,89±1,71 aA
		SG	3,39±1,83 aB	2,37±1,53 bB	5,34±1,90 aA
Aroma	Mastigabilidade	SS	1,79±0,69 aA	1,78±0,91 aA	2,14±0,97 aA
		SC	1,48±0,65 aA	1,64±0,87 aA	1,19±0,98 bA
		SG	0,41±0,18 bB	0,27±0,19 bB	1,55±0,92 bA
	Frango cozido	SS	4,94±0,91 aA	4,28±1,10 aA	4,48±1,05 aA
		SC	4,11±1,01 aA	4,51±1,07 aA	4,32±0,96 aA
		SG	3,52±0,98 bA	3,29±1,04 bA	3,40±0,94 bA
	Ranço	SS	0,22±0,14 aC	0,54±0,29 aB	1,14±0,33 aA
		SC	0,14±0,10 bC	0,31±0,20 bB	0,51±0,19 bA
		SG	0,37±0,20 aB	0,24±0,18 bB	0,52±0,29 bA
Sabor	Frango cozido	SS	4,17±1,03 aA	4,52±0,97 aA	4,36±0,93 abA
		SC	4,47±0,94 aAB	4,11±0,88 abB	4,91±0,91 aA
		SG	2,68±0,91 bB	3,61±1,05 bA	3,80±0,97 bA
	Gosto salgado	SS	2,65±1,06 aB	4,14±1,08 aA	4,07±1,04 aA
		SC	2,99±1,07 aB	3,80±1,19 aA	3,86±1,11 aA
		SG	3,38±1,14 aB	4,58±1,13 aA	4,56±1,21 aA

607 SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó
 608 comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de
 609 pés de frango. Letras minúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo de linhas e
 610 letras maiúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo nas colunas (p<0,05).

612 Tabela 3 – Médias e desvios dos parâmetros químicos, físicos e de perfil de textura de
 613 salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado

Parâmetro	Salsicha1	Tempo de Armazenamento (Dias)			
		0	14	28	42
Lipídeos*	SS	41,11 ± 0,27 aA	24,02 ± 0,30 aB	24,85 ± 0,64 aB	25,06 ± 0,82 aB
	SC	25,32 ± 1,47 cA	20,96 ± 0,54 cB	20,33 ± 1,26 bB	14,12 ± 1,05 cC
	SG	29,18 ± 0,44 bA	22,09 ± 1,18 bB	19,42 ± 0,15 bBC	18,26 ± 0,20 bC
Cinzas	SS	5,40 ± 0,78 bC	6,70 ± 0,11 aB	6,51 ± 0,83 aB	7,48 ± 0,08 aA
	SC	5,57 ± 0,57 bB	6,07 ± 0,02 aA	6,08 ± 0,37 aA	6,42 ± 0,34 bA
	SG	6,11 ± 0,75 aB	6,70 ± 0,20 aB	6,34 ± 1,00 aB	7,53 ± 0,38 aA
Proteínas*	SS	59,41 ± 0,37 bB	64,16 ± 0,32 bA	61,94 ± 1,44 bAB	50,93 ± 1,38 bC
	SC	70,56 ± 0,22 aB	72,73 ± 0,41 aAB	74,22 ± 0,52 aA	60,85 ± 0,65 aC
	SG	70,60 ± 1,15 aA	71,59 ± 0,32 aA	73,07 ± 0,39 aA	48,55 ± 0,53 bB
Colágeno* (g/100g)	SS	2,39 ± 0,05 bC	4,69 ± 0,03 bA	3,66 ± 0,03 cB	3,81 ± 0,08 cB
	SC	9,85 ± 0,71 aB	10,58 ± 0,01 aA	10,08 ± 0,42 aAB	10,09 ± 0,09 aAB
	SG	2,96 ± 0,01 bC	4,96 ± 0,17 bA	4,20 ± 0,05 bB	4,49 ± 0,03 bAB
<i>Parâmetros físicos</i>					
L*	SS	74,82 ± 0,08 bB	76,10 ± 0,21 aA	73,71 ± 0,23 bC	76,70 ± 0,43 aA
	SC	74,25 ± 0,02 cA	74,14 ± 0,24 bA	73,11 ± 0,09 cB	73,26 ± 0,18 cB
	SG	76,45 ± 0,12 aA	74,04 ± 0,17 bB	76,28 ± 0,12 aA	75,83 ± 0,35 b
a*	SS	5,72 ± 0,08 cB	6,18 ± 0,08 aA	4,85 ± 0,11 bC	5,29 ± 0,11 bB
	SC	6,75 ± 0,02 aA	5,62 ± 0,22 bB	5,35 ± 0,20 aB	6,43 ± 0,07 aA
	SG	6,10 ± 0,07 bA	4,77 ± 0,19 cC	5,20 ± 0,19 aB	5,95 ± 0,41 abA
b*	SS	22,71 ± 0,01 bB	24,50 ± 0,17 aA	24,29 ± 0,20 bA	22,86 ± 0,34 bB
	SC	23,68 ± 0,15 aB	24,37 ± 0,14 aB	25,43 ± 0,09 aA	25,58 ± 0,35 aA
	SG	23,55 ± 0,20 aB	23,05 ± 0,81 bB	25,31 ± 0,56 aA	22,41 ± 0,62 bB
Hue	SS	23,42 ± 0,02 bB	25,22 ± 0,17 aA	24,77 ± 0,21 bA	23,71 ± 0,23 bB
	SC	24,63 ± 0,14 aB	25,01 ± 0,08 aB	25,99 ± 0,06 aA	26,16 ± 0,44 aA
	SG	24,32 ± 0,18 aB	23,54 ± 0,81 bC	25,83 ± 0,58 aA	23,36 ± 0,44 bC
C	SS	1,32 ± 0,01 aB	1,32 ± 0,03 bB	1,37 ± 0,01 aA	1,35 ± 0,01 aA
	SC	1,29 ± 0,01 bD	1,34 ± 0,01 bC	1,36 ± 0,01 aA	1,32 ± 0,01 bB
	SG	1,32 ± 0,01 aB	1,37 ± 0,01 aA	1,37 ± 0,01 aA	1,31 ± 0,01 bB
CRA	SS	75,99 ± 0,73 abA	74,79 ± 1,10 bC	77,81 ± 0,58 aB	79,56 ± 0,95 bA
	SC	75,19 ± 1,73 bB	75,95 ± 1,09 aB	76,46 ± 1,17 aB	79,24 ± 1,21 bA
	SG	76,82 ± 0,25 aB	76,49 ± 1,14 aB	74,78 ± 1,06 bC	81,05 ± 0,68 aA
<i>Análise de Perfil de Textura (TPA)</i>					
Dureza (g)	SS	537,26 ± 29,58 aA	521,81 ± 24,37 aA	521,90 ± 7,08 aA	330,92 ± 9,07 bB
	SC	425,59 ± 15,11 bB	488,06 ± 20,10 aA	225,01 ± 1,04 bD	365,65 ± 2,04 aC

	SG	120,89±23,45 cC	192,30±5,43 bB	243,66±10,17 bA	130,72±21,04 cC
Adesividade	SS	-69,98±7,30 aB	-246,95±12,65 aA	-69,31±2,44 bB	-73,58±2,92bB
	SC	-64,19±0,89 aC	-215,44±0,79 bA	-88,05±1,89 aB	-91,92±4,44 aB
	SG	-7,85±2,84 bB	-244,65±8,03 aA	-3,01±1,78 cB	-8,35±0,83 cB
Flexibilidade	SS	0,7119±0,01 aB	0,2304±0,01 bC	0,6243±0,03 bB	0,8659±0,14 aA
	SC	0,6229±0,03 aA	0,2399±0,02 bC	0,4755±0,02 cB	0,6686±0,01 bA
	SG	0,6890±0,01 aB	0,7781±0,01 aAB	0,8084±0,06 aA	0,6957±0,01 bB
Coesividade	SS	0,4379±0,01 aB	0,1522±0,01 bC	0,5369±0,01 aA	0,4447±0,05 aB
	SC	0,4028±0,03 aB	0,1650±0,01 bD	0,3194±0,01 cC	0,5083±0,01 aA
	SG	0,4388±0,01 aA	0,3099±0,01 aB	0,3875±0,09 bA	0,3705±0,01 bAB
Gomosidade	SS	226,00±3,39 aA	74,73±3,45 aD	121,87±8,97 aC	140,74±9,35 bB
	SC	123,20±6,93 bB	78,61±1,94 aC	76,83±2,52 bC	178,37±2,58 aA
	SG	40,37±3,37 cB	53,17±9,92 bB	133,88±6,01 aA	44,66±6,35 cB

*calculados em base seca.

SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango. Letras minúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo de linhas e letras maiúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo nas colunas (p<0,05).

Tabela 4 – Médias e desvios da atividade de captura do radical DPPH e poder antioxidante redutor férrico(FRAP) das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado

Parâmetros	Tratamentos	Tempo			
		0	14	28	42
DPPH (% de inibição)	SS	8,02±0,52 bB	7,81±0,33 bB	7,26±0,39 bB	16,47±0,29 aA
	SC	10,01±0,43 aB	8,65±0,27 bC	10,09±0,91 aB	17,94±1,38 aA
	SG	10,13±0,64 aB	11,06±0,31 aB	11,40±0,07 aB	16,11±0,57 aA
FRAP (mg Trolox/g)	SS	20,69±0,01 aD	29,39±0,09 aC	37,95±0,31 aB	43,17±0,94 aA
	SC	11,99±0,01 cC	19,06±0,14 bB	36,30±0,05 aA	33,25±0,13 bA
	SG	16,60±0,40 bC	14,98±0,08 cC	36,05±0,16 aB	41,85±0,83 aA

SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango. Letras minúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo de linhas e letras maiúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo nas colunas (p<0,05).

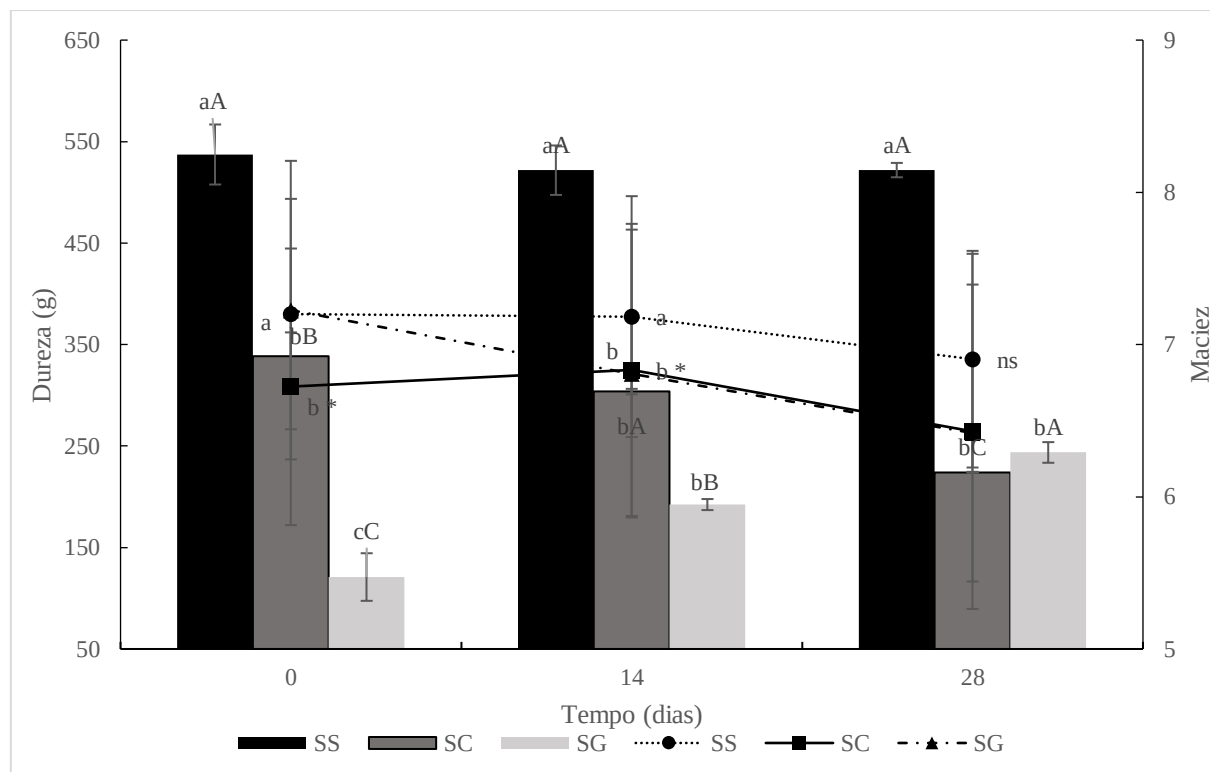
Tabela 5 – Médias e desvios das somatórias e índices dos ácidos graxos obtidos em percentual de área para as salsichas de frango com substituição de gordura por gel de colágeno ao longo do armazenamento

Parâmetros	Tratamentos	Tempo			
		0	14	28	42
ΣSFA	SP	36,37±0,90 aA	37,50±0,14 aA	36,91±0,75 bA	30,82±0,59 bB
	SC	36,49±0,58 aB	30,95±0,54 bC	39,49±0,94 aA	40,19±0,42 aA
	SG	37,93±0,20 aB	32,37±0,62 bB	42,67±0,22 aA	40,30±0,45 aA
ΣMUFA	SP	37,82±0,75 aB	37,31±0,13 bB	37,86±0,76 aB	43,61±0,84 aA
	SC	38,14±0,35 aB	42,26±0,70 aA	37,95±0,54 aB	42,05±0,81 aA
	SG	38,24±0,12 aB	43,81±0,57 aA	34,19±0,54 bB	35,88±0,56 bB
ΣPUFA	SP	22,82±0,30 bA	24,73±0,01 aA	25,21±0,52 aA	25,76±0,61 aA
	SC	25,15±0,30 aA	25,17±0,02 aA	27,17±0,48 aA	19,97±0,94 bB
	SG	23,80±0,32 bA	23,82±0,02 bA	23,10±0,77 bA	23,78±0,50 aA
ΣMUFA/ΣSFA	SP	1,04±0,05 aB	1,02±0,01 bB	1,02±0,01 aB	1,41±0,05 aA
	SC	1,05±0,02 aA	1,34±0,02 aA	0,83±0,02 bA	1,05±0,37 bA
	SG	1,01±0,01 aB	1,24±0,02 aA	0,80±0,01 bB	0,89±0,01 bB
ΣPUFA/ΣSFA	SP	0,63±0,02 bB	0,68±0,01 aB	0,68±0,01 aB	0,84±0,05 aA
	SC	0,69±0,02 aA	0,65±0,14 aA	0,69±0,06 aA	0,48±0,07 bA
	SG	0,63±0,02 bA	0,25±0,01 bB	0,54±0,02 bA	0,50±0,12 bA
IA	SP	0,70±0,02 aA	0,52±0,02 bB	0,90±0,04 aA	0,49±0,08 bB
	SC	0,71±0,02 aA	0,37±0,07 cB	0,90±0,18 aA	0,79±0,06 aA
	SG	0,72±0,01 aA	0,66±0,01 aA	0,77±0,02 bA	0,59±0,03 bB
IT	SP	1,18±0,05 aA	1,17±0,01 aA	1,10±0,09 aA	0,68±0,02 bB
	SC	1,15±0,03 aA	0,77±0,06 bB	1,27±0,51 aA	1,30±0,11 aA
	SG	1,19±0,03 aA	1,14±0,02 aA	1,08±0,05 aA	0,68±0,15 bB

SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango. Letras minúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo de linhas e letras maiúsculas diferentes indicam efeito estatístico significativo nas colunas (p<0,05).

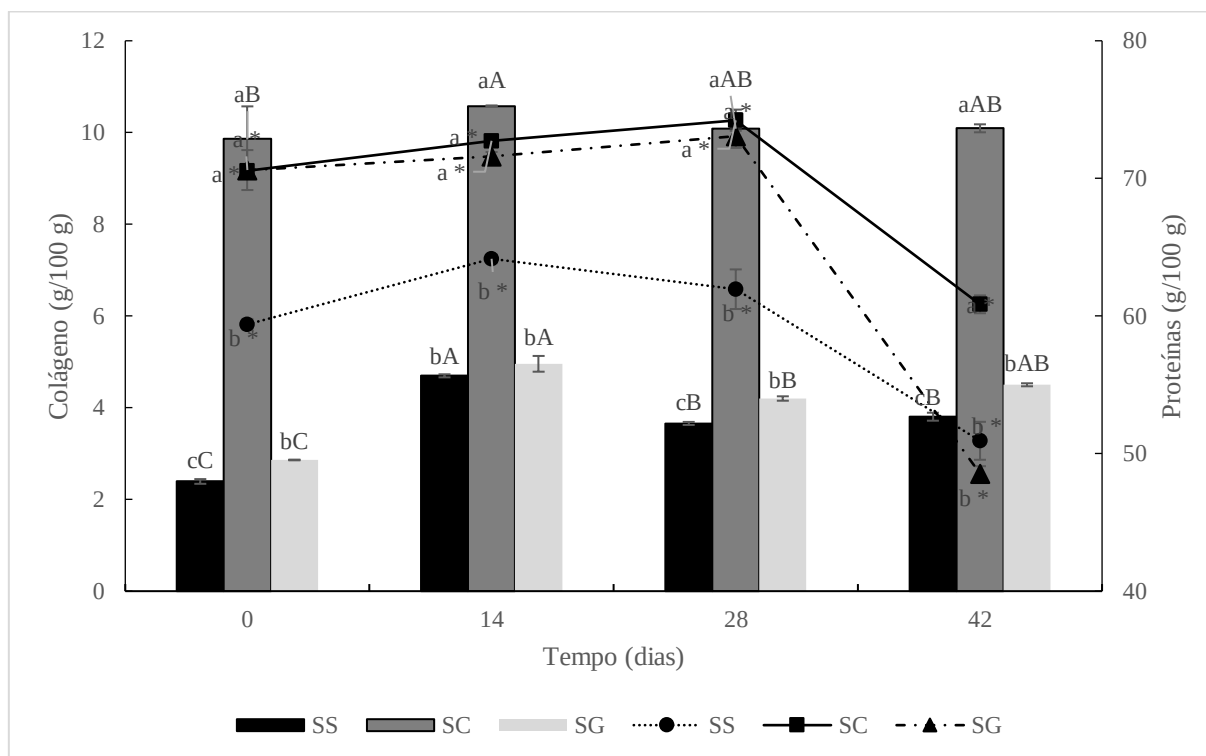
Lista de Figuras

Figura 1 – Representação gráfica das médias e desvios obtidos para a dureza e a maciez das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado



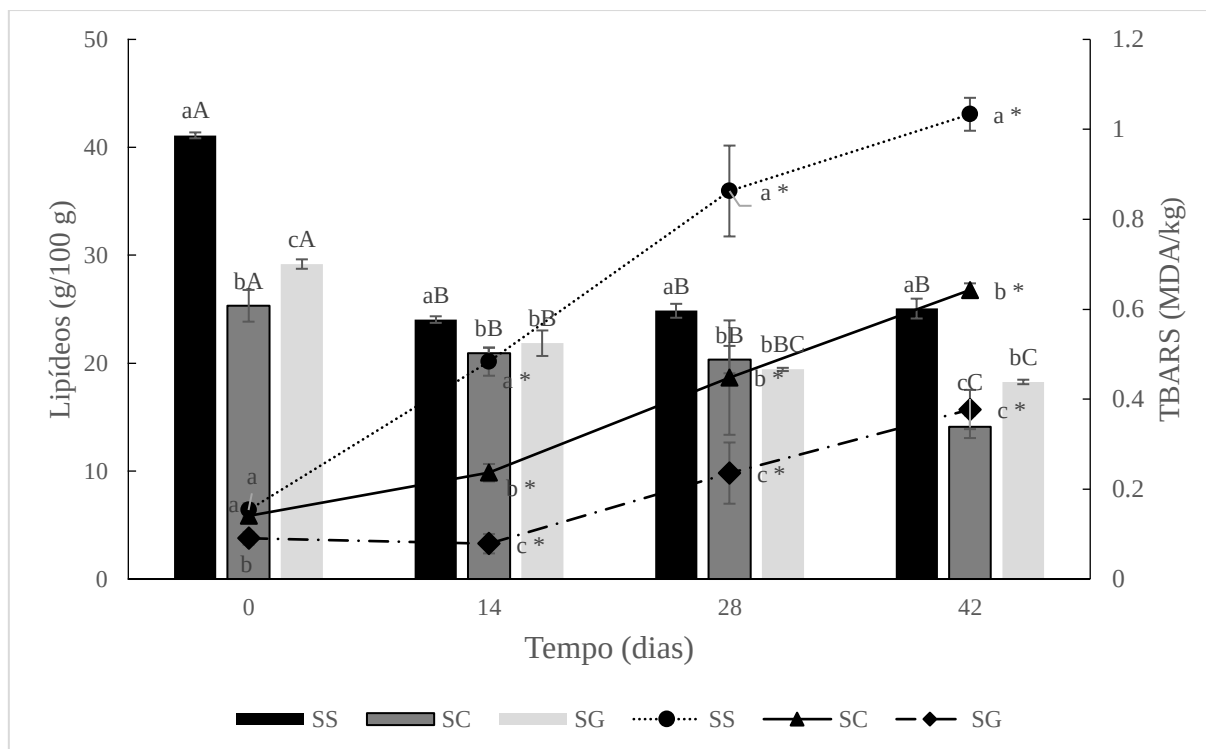
SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango. Barras: médias de dureza; Linhas: médias de maciez ao longo do armazenamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos, maiúsculas indicam diferenças com relação ao tempo ($p < 0,05$). *diferenças significativas com relação ao tempo para os gráficos de maciez ($p < 0,05$).

Figura 2 - Representação gráfica das médias e desvios obtidos para o teor de colágeno e de proteínas das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado



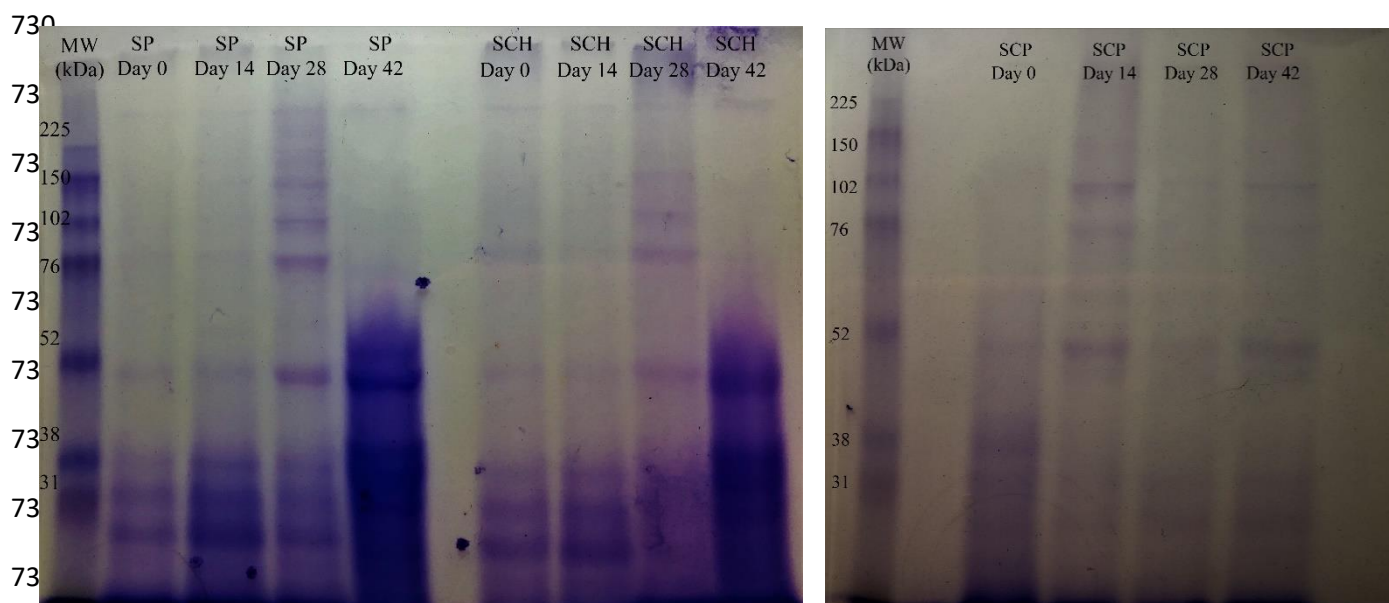
SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango. Barras: médias de teor de colágeno; Linhas: médias do teor de proteínas ao longo do armazenamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos, maiúsculas indicam diferenças com relação ao tempo ($p < 0,05$). *diferenças significativas com relação ao tempo para os gráficos de proteínas ($p < 0,05$).

Figura 3 - Representação gráfica das médias e desvios obtidos para o teor de lipídeos e número de TBARS das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado



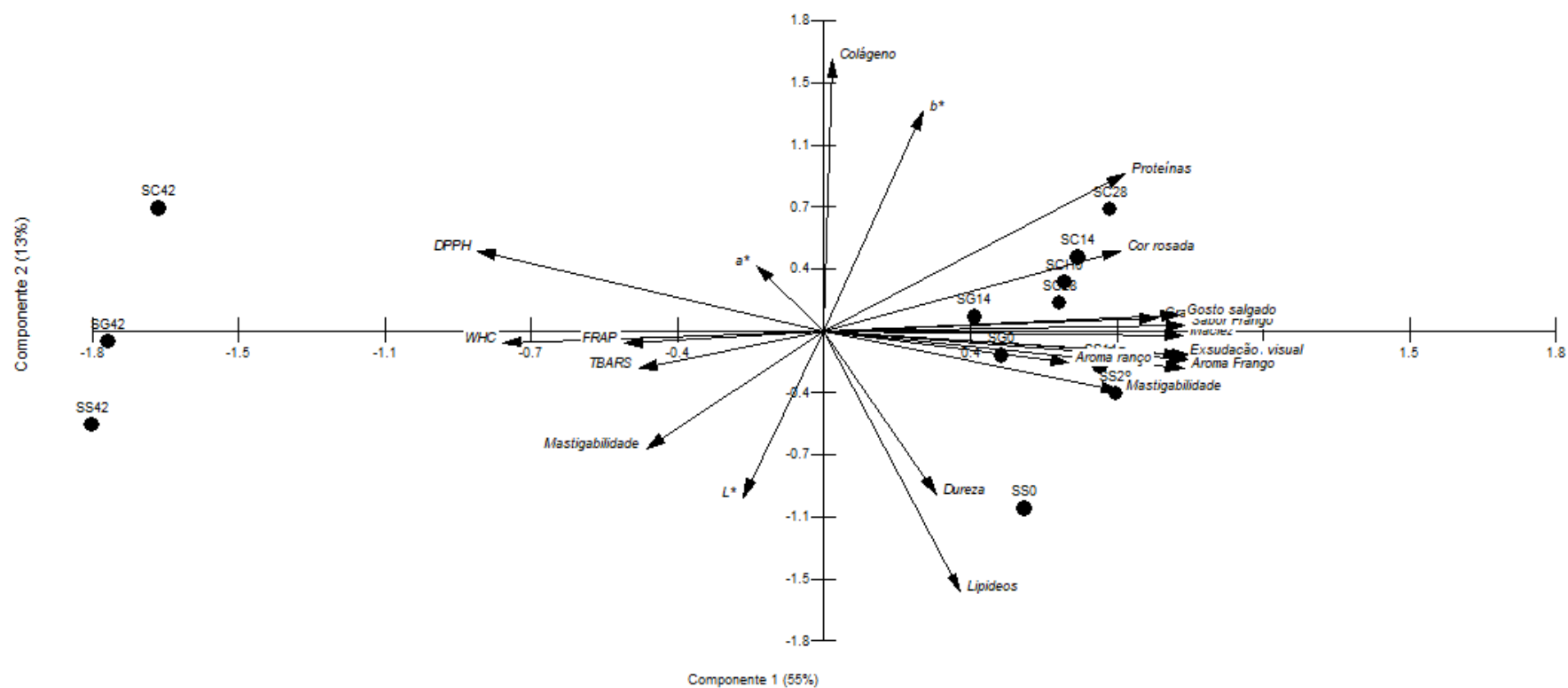
SS: salsicha padrão, SC: salsicha com 50% de substituição de gordura por colágeno em pó comercial, SG: salsicha com 50% de substituição de gordura por gel de colágeno extraído de pés de frango. Barras: médias do teor de lipídeos; Linhas: médias do número de TBARS ao longo do armazenamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos, maiúsculas indicam diferenças com relação ao tempo ($p < 0,05$). *diferenças significativas com relação ao tempo para os gráficos de TBARS ($p < 0,05$).

Figura 4 – Eletroforese SDS-PAGE para as salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado



MW: Molecular weight (kDa).

Figura 5 – Análise de Componentes Principais para os parâmetros de qualidade das salsichas de frango com substituição de gordura por colágeno em armazenamento refrigerado



5. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os experimentos realizados pôde-se concluir que:

- a) O uso do subproduto “pé de frango” para extração de colágeno representa uma alternativa viável de aproveitamento de resíduos para obtenção de um produto com maior valor biológico e tecnológico quando comparado com as formas de aproveitamento mais usuais, que são as farinhas para inclusão na alimentação animal;
- b) Com relação aos métodos de extração, foi visto que os isolados podem ser aproveitados de duas formas distintas, sendo o de maior teor de colágeno indicado para suplementação proteica e o de menor teor indicado para desempenhar funções tecnológicas quando aplicado em alimentos, pelo seu potencial de retenção de água, maior solubilidade, poder emulsificante e capacidade antioxidante;
- c) O uso maior de enzima entre o primeiro e o segundo experimento aumentou muito pouco o teor de colágeno obtido, provavelmente por ter atingido o limite de substrato disponível, sendo recomendada a primeira condição por razões de economia de produtos utilizados;
- d) Uma vez aplicado em salsichas de frango, o colágeno extraído de pés de frango não só se apresenta viável do ponto de vista econômico e ambiental, mas na redução de gordura desses produtos desempenha suas propriedades tecnológicas, além de ter contribuído para a estabilidade da emulsão. Sensorialmente a salsicha com colágeno comercial apresentou-se melhor, enquanto que nos parâmetros tecnológicos, especialmente na retenção de água o gel de colágeno mostrou-se superior, o que poderia ser melhor verificado em outros níveis de redução de gordura;
- e) No estudo de armazenamento das salsichas *low-fat* sob refrigeração, o uso do colágeno dos pés de frango trouxe impactos positivos na retenção de água e na oxidação de lipídeos, exercendo papel protetor. Alguns impactos negativos de textura foram observados, o que pode ser melhorados em estudos futuros que testem outros níveis de substituição ou combinações de possíveis substitutos de gordura.
- f) O processo de extração de gel de colágeno consiste em uma técnica simples que pode ser utilizada por frigoríficos da região, gerando menos desperdícios, menores custos, além de proporcionar uma maior oferta de produtos cárneos do segmento *low-fat* a partir de subprodutos da própria indústria.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - Lista de descritores e referências geradas na Análise Descritiva Quantitativa de salsichas de frango com redução de gordura por colágeno hidrolisado em pó e por gel de colágeno

	Atributo	Definição	Referências
Aparência	Cor rosada (CR)	Cor rósea característica de produto à base de carne, variando de pálido (mais acinzentado) a corado (mais rosada).	Pouco (cor bege): Peito de frango Ceratti
			Muito (cor rosada): Salsicha mista Perdigão
	Homogeneidade visual (Hvis)	Presença de fragmentos de carne e grânulos dos condimentos na superfície de corte transversal da salsicha, relacionada com a estabilidade da emulsão.	Pouco: Mortadela de frango <i>light</i> Ceratti
			Muito: Mortadela de frango Perdigão
	Suculência visual (Svis)	Liberação de líquido visivelmente observada na superfície da salsicha após cortada transversalmente.	Pouco: torrada
			Muito: ricota fresca
Textura	Maciez (MC)	Propriedade da textura que oferece pouca resistência à mastigação, variando de firme a macio.	Pouco (firme): salsicha de frango grelhada
			Muito (macia): kitut
	Suculência (SCL)	Umidade liberada durante a mastigação.	Pouca: contra-filé bovino bem passado, a 80°C
			Muita: filé mignon mal passado, a 65°C
	Exsudação de água (EXS)	Quantidade de água exsudada no primeiro contato da amostra na boca.	Pouca: Salsicha tipo Viena
			Muita: Maçã verde
	Granulosidade da massa (GM)	Presença de partículas sólidas durante a mastigação e na mastigação plena, relacionada com as fibras da carne e os condimentos.	Pouca: salsicha tipo Viena
			Muita: Mortadela de frango <i>light</i> Ceratti
Aroma	Mastigabilidade (MST)	Número de mastigações necessárias antes da deglutição.	Pouco: pão bisnaguinha
			Muito: bala de iogurte
	Aroma de frango cozido (AF)	Aroma produzido na carne de frango cozida.	Referência: Peito de frango cozido a 80°C;
	Aroma de condimento (AC)	Aroma dos condimentos utilizados na fabricação de salsichas	Fraco: nenhum
			Forte: Solução de alho, cebola e pimenta branca em água (1:5)
	Aroma de ácido acético (ACT)	Aroma proveniente do ácido acético utilizado na formulação das salsichas.	Fraco: Nenhum
			Forte: solução de vinagre de álcool a 5%.

	Aroma de ranço (RNC)	Aroma de gordura oxidada.	Fraco: nenhum Forte: Gordura oxidada
Sabor	Sabor de frango cozido (SF)	Sabor produzido na carne de frango cozida.	Referência: Peito de frango cozido a 80°C;
	Sabor de condimento (SC)	Sabor dos condimentos utilizados na fabricação de salsichas	Fraco: nenhum Forte: Solução de alho, cebola e pimenta branca em água (1:5)
	Gosto salgado (GS)	Relativo à percepção de sal utilizado na fabricação de salsichas	Pouco: Solução de NaCl a 0,2% Muito: Solução de NaCl a 1%
	Sabor residual dos condimentos (RES)	Sensação residual proveniente dos condimentos após a deglutição das salsichas	Fraco: nenhum Forte: Solução de alho, cebola e pimenta branca em água (1:5)

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Seres Humanos (HULW/UFPB)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de salsichas de frango com substituição parcial de gordura por colágeno

Pesquisador: Íris Braz da Silva Araújo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65402717.8.0000.5188

Instituição Proponente: Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.984.622

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa a elaboração de salsichas de frango com a substituição parcial da gordura por colágeno extraído de pés de frango, a fim de verificar suas características de qualidade quando comparada à formulação tradicional e também comparada à formulação com substituição de gordura por uma fonte de colágeno comercial.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Elaborar salsicha de frango substituindo parcialmente a gordura adicionada por colágeno extraído de pés de frango, verificando seus parâmetros microbiológicos, sensoriais e físico-químicos ao longo de seu armazenamento.

Objetivo Secundário: Extrair o colágeno dos pés de frango mediante uso de ácido acético e pepsina; Utilizar o colágeno obtido na formulação de salsichas de frango como substitutos de gordura em salsichas; Realizar análises microbiológicas e físico-químicas nos dias 0, 14, e 28 dias de armazenamento; Realizar testes sensoriais nos dias 0, 14, e 28 dias de armazenamento; Analisar a presença de compostos da oxidação lipídica durante os 28 dias de armazenamento.

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

**UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA**



Continuação do Parecer: 1.984.622

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os produtos podem oferecer riscos à pessoas alérgicas a alguns dos condimentos utilizados nas salsichas.

Os benefícios esperados são: ofertar embutidos cárneos que sejam destinados às pessoas susceptíveis às doenças cardiovasculares, devido à redução de gordura e consequentemente reduzir os problemas de saúde decorrentes da ingestão demasiada de gordura na população brasileira.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, em consonância com os objetivos e metodologia

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos necessários

Recomendações:

Colocar os Os benefícios esperados nas informações básicas do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_872218.pdf	07/03/2017 02:09:26		Aceito
Outros	Curriculo_SFP.pdf	07/03/2017 02:07:20	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito
Outros	Curriculo_MSM.pdf	07/03/2017 02:01:12	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito
Outros	Curriculo_Iris.pdf	07/03/2017 01:51:33	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito
Outros	Dec_compromissoassinado.pdf	07/03/2017 01:45:26	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito
Outros	Termo_Anuencia_Assinado.pdf	07/03/2017 01:35:55	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Salsichas.doc	07/03/2017 01:32:07	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito
Projeto Detalhado	Proposta_Sergio_revisado.docx	07/03/2017	Iris Braz da Silva	Aceito

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 1.984.622

/ Brochura Investigador	Proposta_Sergio_revisado.docx	01:30:36	Araújo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostoassinada.pdf	07/03/2017 01:28:29	Iris Braz da Silva Araújo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 27 de Março de 2017

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br

ANEXO 2 – Comprovante de submissão do Artigo 3 à revista Poultry Science

ScholarOne Manuscripts™
Íris Araújo ▾
Instructions & Forms
Help
Log Out

OXFORD
UNIVERSITY PRESS
Poultry Science

Home
Author
Review

Author Dashboard

Author Dashboard
1 Submitted Manuscripts >
2 Manuscripts with Decisions >
Start New Submission >
Legacy Instructions >
5 Most Recent E-mails >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EIC: Taylor, Jr., Robert EO: Busboom, David	PS-17-07237	Quality of low-fat chicken sausages with added chicken feet collagen View Submission	29-Aug-2017	27-Nov-2017
Undergoing Review		Cover Letter		