



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GISLAINE SILVEIRA SIMÕES

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO DE FRIGORÍFICO:
EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
COLÁGENOS DE TÚNICA ALBUGÍNEA DE SUÍNOS
IMUNOCASTRADOS**

Londrina
2013

GISLAINE SILVEIRA SIMÕES

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO DE FRIGORÍFICO:
EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
COLÁGENOS DE TÚNICA ALBUGÍNEA DE SUÍNOS
IMUNOCASTRADOS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. PhD. Massami Shimokomaki.
Coorientadora: Profa. Dra. Elza Ioko Ida.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S593a Simões, Gislaine Silveira.

Aproveitamento de subproduto de frigorífico : extração, isolamento e caracterização de colágenos de túnica albugínea de suínos imunocastrados / Gislaine Silveira Simões. – Londrina, 2013.

119 f. : il.

Orientador: Massami Shimokomaki.

Coorientador: Elza Ioko Ida.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Carne – Qualidade – Teses. 2. Frigoríficos – Subprodutos – Teses. 3. Colágeno – Extração – Teses. 4. Alimentos – Textura – Teses. 5. Suíno – Castração – Abate – Teses. I. Shimokomaki, Massami. II. Ida, Elza Ioko. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 664.91

GISLAINE SILVEIRA SIMÕES

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO DE FRIGORÍFICO:
EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENOS
DE TÚNICA ALBUGÍNEA DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Massami Shimokomaki
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Paulo Cesar Stringheta
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Profa. Dra. Marta Suely Madruga
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Mayka Rhegiany Pedrão
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 13 de dezembro de 2013.

À MINHA FAMÍLIA,

MEUS PAIS ANTÔNIO E LUIZA,

MINHAS IRMÃS CRISTIANE E LIGIANE,

E MEU ESPOSO CLEITON.

OBRIGADO POR ESTAREM SEMPRE AO MEU LADO,

PELO CONSTANTE AMOR E INCENTIVO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Massami Shimokomaki, pela orientação e confiança atribuída no desenvolvimento desta Tese, pelos conselhos e ensinamentos que serão sempre lembrados.

À Professora Dra. Elza Louko Ida, pelo exemplo de profissional, por sempre estar disposta a colaborar e por orientar meus passos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Pfizer Saúde Animal pelo apoio no projeto e auxílio financeiro concedido.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, por meio do Dr. Expedito Tadeu Facco Silveira (*in memoriam*) pelo fornecimento de amostras de testículos de suínos imunocastrados e colaboração no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À Professora Dra. Ana Paula Bracarense do Departamento de Medicina Veterinária pelos auxílios e espaço cedidos para a realização das análises histológicas.

À Cooperativa Frimesa Sudcoop, Unidade de Medianeira, pela doação de amostras de testículos de suínos imunocastrados.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta instituição pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta instituição, em especial à Sandra Rezende, Dra. Elza Youssef e Neusa Cassula,

pela atenção em todos os momentos acadêmicos e administrativos vivenciados no doutoramento.

Ao Instituto Federal do Paraná pelo apoio e liberação parcial para a realização do Doutorado, em especial à Professora Dra. Michele Rosset pela colaboração acadêmica e didática e principalmente pela amizade.

À amiga Ms. Gleice Rocha dos Santos, pelas constantes colaborações e principalmente pela amizade e atenção.

Aos professores, alunos e ex-alunos do Grupo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Carnes, em especial: Profa. Dra. Adriana Soares, Dra. Fernanda Paião, Dra. Lara Ferracin, Dra. Cristiane Canan, Dra. Cassiana Kissel, Dra. Cleusa Weber, Dr. Denis Marchi, Ms. Danielle Honorato, Ms. Rafael Carvalho e Ms. Juliana Almeida, pela amizade e convivência durante os seis anos de pós-graduação no Mestrado e Doutorado.

À amiga Marinês Paula Corso pelos auxílios com a estatística, pela moradia temporária, pela companhia e amizade.

Às minhas amigas-irmãs, Karla Bigetti Guergoleto e Giselle Nobre Costa, simplesmente por fazerem parte da minha vida ontem, hoje e sempre. Obrigada pela amizade, carinho, apoio e por serem tão amáveis.

À família Simões, por me receberem com amor e estarem sempre na torcida para que tudo dê certo.

À Deus, pelo dom da vida e da sabedoria, por estar no comando da minha vida e permitir que eu alcance meus objetivos.

*“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo,
mas aos meus, tenho impressão de ter sido apenas como uma criança
brincando à beira-mar,
divertindo-me em encontrar de vez em quando uma pedrinha mais lisa
ou uma concha mais bonita que o normal,
enquanto o grande oceano da verdade
permanecia completamente por descobrir à minha frente”*

Isaac Newton

SIMÕES, Gislaine Silveira. **Aproveitamento de subproduto de frigoríficos: Extração, isolamento e caracterização de colágenos de túnica albugínea de suínos imunocastrados**. 2013. 119f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A castração imunológica de suínos machos é uma técnica que assegura o bem estar dos animais e previne o desenvolvimento dos hormônios androsterona e do escatol que causam odor indesejável à carne. Os suínos imunocastrados têm os seus testículos removidos durante o abate e posteriormente, descartados. Os testículos são anatomicamente circundados por um tecido conjuntivo denso denominado túnica albugínea, que é composta principalmente por fibras de colágeno. Os objetivos deste trabalho foram otimizar o processo de extração de colágeno da túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados para produção de isolado de colágeno (IC) e identificar parcialmente os tipos de colágeno presente na túnica albugínea de suínos imunocastrados por métodos histológicos e bioquímicos. Para obtenção do IC foi verificado o efeito das condições de extração e hidrólise de colágeno aplicando o planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) e as seguintes variáveis independentes: concentração de ácido acético, tempo de tratamento com ácido acético, percentagem de pepsina e tempo de hidrólise com pepsina. Para otimizar o processo de extração foi aplicado o delineamento composto central rotacional (2^3) e as seguintes variáveis independentes foram avaliadas: concentração de ácido acético, percentagem de pepsina e tempo de hidrólise com pepsina. Foi verificada a composição química, o perfil de aminoácidos e as propriedades funcionais do isolado de colágeno. Para visualizar as fibras de colágeno na túnica albugínea foram realizadas colorações clássicas com hematoxilina/eosina ou tricrômico de Masson. Os tipos de colágenos presentes foram investigados por aplicação da imunohistoquímica e análise das frações de colágeno por eletroforese SDS-PAGE. As condições ótimas para extração foram: tratamento com ácido acético $0,83 \text{ mol L}^{-1}$ por 12 h a 4°C e hidrólise com 0,24% de pepsina por 28 h a 4°C . Estas condições proporcionaram a obtenção de um isolado com 82,54 g de colágeno por 100 g de amostra e este produto apresentou perfil de aminoácidos, propriedades químicas e funcionais adequadas para aplicação em produtos cárneos emulsionados. As análises histológicas e bioquímicas evidenciaram que a túnica albugínea é composta basicamente por fibras de colágeno e foram identificados os colágenos dos tipos I, III e V, além de componentes não caracterizados que sugerem a complexidade das fibras de colágeno que constituem a túnica albugínea.

Palavras-chave: imunocastração de suínos, propriedades funcionais de colágeno,
□ □ □ perfil de aminoácidos, imunohistoquímica, eletroforese.

SIMÕES, Gislaine Silveira. **Utilization of slaughterhouses by products: Extraction, isolation and characterization of collagen from tunica albuginea of immunocastrated pigs.** 2013, 119f. Thesis (Doctorate in Food Science) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The immunological castration of male pigs is a technique that ensures the welfare to the animals and prevents the development of androsterone and skatole hormones that cause an undesirable meat odor. The testes are currently removed during slaughter in the immunologically castrated pigs. Anatomically, they are surrounded by a capsule of dense connective tissue called the tunica albuginea, which is characterized structurally by a resistant tissue composed in majority by collagen fibers. The aim of this work was to optimize the conditions of extraction and isolation by pepsin hydrolysis subsequently purifying the collagen from the immunocastrated pigs testes tunica albuginea and finally to evaluate partially its types by histological and biochemical methods. In order to obtain the isolated collagen (IC), it was examined the effect of the pepsin hydrolysis extraction conditions in an acetic acid solution using the factorial design (2^{4-1}) and the following independent variables: mol L⁻¹ acetic acid, time of acetic acid treatment, pepsin percentage, time of pepsin hydrolysis. To implement this optimization, an experiment was conducted by applying a central composite rotatable design (2^3) and the following independent variables were evaluated: mol L⁻¹ acetic acid, pepsin percentage and time of pepsin hydrolysis. It was verified chemical composition, amino acid profile and the functional properties of IC. To observe the collagen fibers distribution within the tunica albuginea, the classic staining with hematoxylin/eosin or Masson was carried out. The collagen types within the tissue was carried by using immunohistochemical assessment and analysis of collagen fractions by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. The optimum collagen isolation was observed under the following conditions: 0.83 mol L⁻¹ acetic acid, 0.24% pepsin during 28 h at 4°C. These conditions resulted in the isolation of 82.54 g of collagen per 100 g and this product presented amino acid profile, chemical properties and functional properties suitable for producing emulsified meat products. The tunica albuginea is almost exclusively composed by collagen fibers as determined by chemical composition analysis and by its histological evaluation. Types I, III, V and others components are present within this tissue and constitute the collagen fibers and suggest they would not have a simple structural role in tunica albuginea.

Key-words: immunological castration, functional properties of collagen amino acid
□ □profile, immunohistochemical assessment, electrophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	(a) Sequência de aminoácidos na tripla hélice; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla formando o tropocolágeno18
Figura 2 -	Esquema do fibroblasto responsável pela produção de pró-colágeno e do meio extracelular onde é formado o tropocolágeno e as fibrilas de colágeno.....19
Figura 3 -	Rota biossintética de fibras de colágeno, principal constituinte dos tecidos conjuntivos, como a pele20
Figura 4 -	Estrutura química e fórmula molecular do hormônio androstenona e do escatol.....30
Figura 5 -	Ilustração de como a vacina atua no sistema imunológico do suíno macho e bloqueia a função testicular31
Figura 6 -	Representação de um testículo indicando a túnica albugínea que o recobre, os septos e os lóbulos testiculares. Adaptado de http://www.becomehealthynow.com/popups/male_testes.htm32
Figura 7 -	Testículos de suínos imunocastrados (A) e túnica albugínea (B).....34

Artigo Científico 1

Figure 1 -	Location of tunica albuginea in the testes. Source: <i>Encyclopedia Britannica Online</i> , 201376
Figure 2 -	Fluxogram showing the step-by-step the extracting of collagen from the tunica albuginea of pig testes. FD: factorial design; CCRD: central composite rotatable design.....77
Figure 3 -	Contour curves for conditions of pepsin hydrolysis to obtain the IC as a function of the X1 (mol L ⁻¹ acetic acid) and X3 (pepsin percentage), setting the variable X4 (h of pepsin hydrolysis) to 24 h.....78
Figure 4 -	Surface response model for extraction and hydrolysis to obtain the IC as a function of the X5 (mol L ⁻¹ acetic acid) and

	X6 (pepsin percentage), setting the variable X7 (h of pepsin hydrolysis) to 24 h.....	79
Figure 5 -	Parameters of estimated desirability for the variables X5 (mol L-1 acetic acid), X6 (pepsin percentage) and X7 (h of pepsin hydrolysis) for extraction and hydrolysis to obtain the IC	80
Artigo Científico 2		
Figure 1 -	Fluxogram showing the step-by-step sequential salt fractionation of the solubilised collagens from the tunica albuginea with NaCl at pH 2.5 (right side) and 7.5 (left side). P: Precipitate; S: Supernatant.....	108
Figure 2 -	SDS-PAGE pattern of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation with NaCl at pH 2.5. Lines: 1: MW markers; 2: Type I collagen from rat tail (control); 3 and 4: P0.7; 5 and 6: P1.2; 7 and 8: P1.8; 9 and 10: P2.0. (+) with and (-) without β -mercaptoethanol (ME)	109
Figure 3 -	SDS-PAGE pattern of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation with NaCl at pH 7.5. Tracks: 1: MW markers; 2 and 3: Type I collagen from rat tail (control); 4 and 5: P1.5; 6 and 7: P2.0; 8 and 9: P3.5. (+) with and (-) without β -mercaptoethanol.....	110
Figure 4 -	Optical microscopy with haematoxylin/eosin (a) and Masson trichrome (b) staining of the tunica albuginea of the testes from immunologically castrated pigs. 1 - Collagen fibres with a wavy appearance; 2 - Fibroblast cell nucleus; 3 - Blood vessels. Scale bars: 50 μ m (a) and 100 μ m (b)	111
Figure 5 -	Immunohistochemistry with staining for collagen type I and type III in the tunica albuginea of the testes of immunologically castrated pigs. (a): positive staining of collagen type I fibres shown in brown on a blue background (scale bar = 20 μ m.); (b): positive staining of type III collagen fibres shown in brown on a blue background (scale bar = 50 μ m).....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tipos de colágenos, sua composição molecular e distribuição nos tecidos.....	22
Tabela 2 -	Planejamento fatorial fracionado (24-1) com as variáveis independentes e função-resposta (Y1) da extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno.....	37
Tabela 3 -	Delineamento composto central rotacional (23) com as variáveis independentes, níveis e respostas experimentais (Y2) da extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno	38

Artigo Científico 1

Table 1 -	Proximate chemical composition and collagen content of testis and tunica albuginea (g per 100 g)	81
Table 2 -	Factorial design (24-1) with the independent variables and response function (Y1) of the conditions of pepsin hydrolysis.....	82
Table 3 -	Effect estimates for the response function* from the results in the factorial design (24-1) of the conditions of pepsin hydrolysis	83
Table 4 -	Central composite rotatable design (23) with the independent variables, levels and experimental responses (Y2= g of collagen per 100 g) of the extraction and hydrolysis to obtain the IC	84
Table 5 -	Effect estimates for the response function* from the results in the central composite rotatable design (23) of the extraction and hydrolysis to obtain the IC.....	85
Table 6 -	ANOVA of the quadratic model for the extraction and hydrolysis to obtain the IC.....	86
Table 7 -	Amino acid profile of the isolated collagen from the tunica albuginea (results are expressed as residues per 1000 total amino acid residues).....	87

Table 8 - Mean and standard deviation of the water solubility at 70°C, the hot and cold water absorption capacity, the emulsifying capacity and the emulsion stability of the isolated collagen from the tunica albuginea and bovine skin collagen.....88

Artigo Científico 2

Table 1 - Quantity (mg) and percentage (%) of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation at pH 2.5 or pH 7.5 and the collagen types identified by SDS-PAGE..... 107

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	COLÁGENO	17
3.2	ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DO COLÁGENO	17
3.3	TIPOS DE COLÁGENO	22
3.4	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO	26
3.5	PROPRIEDADES FUNCIONAIS E APLICAÇÕES DO COLÁGENO.....	28
3.6	IMUNOCASTRACÃO DE SUÍNOS.....	29
3.7	TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS SUÍNOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	34
4.2	REMOÇÃO DA TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS.....	34
4.3	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONTEÚDO DE COLÁGENO TOTAL	35
4.4	OBTENÇÃO DO ISOLADO DE COLÁGENO	35
4.4.1	Preparo da túnica albugínea	35
4.4.2	Extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno	35
4.4.3	Planejamentos estatísticos aplicados para otimização da extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno	36
4.4.4	Cálculo de rendimento de obtenção de isolado de colágeno e grau de purificação.....	39
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNCIONAIS DO ISOLADO DE COLÁGENO DE TÚNICA ALBUGÍNEA	39
4.5.1	Composição química.....	39
4.5.2	Perfil de aminoácidos.....	40

4.5.3	Propriedades funcionais do isolado de colágeno de túnica albugínea e do colágeno de pele bovina comercial	40
4.6	CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS	42
4.6.1	Coloração clássica com hematoxilina/eosina ou tricrômico de masson	42
4.6.2	Imunohistoquímica	42
4.7	IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE COLÁGENO DA TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS	43
4.7.1	Extração e hidrólise de colágeno de túnica albugínea	43
4.7.2	Precipitação salina fracionada e separação das frações de colágeno	44
4.7.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida	45
REFERÊNCIAS		46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1: OPTIMUM CONDITIONS FOR EXTRACTING COLLAGEN FROM THE TUNICA ALBUGINEA OF IMMUNOLOGICALLY CASTRATED PIG TESTES AND THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE ISOLATED COLLAGEN	55
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2: PARTIAL BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERISATION OF COLLAGEN FROM THE TUNICA ALBUGINEA OF PIG TESTES	89
CONCLUSÕES		113
ANEXOS		114

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne suína e o quarto maior exportador. Em 2012, a produção de carne suína brasileira foi de 3,49 milhões de toneladas e a exportação de 581 mil toneladas de carne. Para atingir essa produção de carne suína foram abatidos aproximadamente 33 milhões de suínos em 2012 (ABIPECS, 2013). O mercado interno brasileiro consumiu em 2012 aproximadamente 2,9 milhões de toneladas de carne suína e o consumo *per capita* foi estimado em 15,1 kg (ABIPECS, 2013).

Os suínos machos destinados à produção de carne são castrados para evitar a instalação do hormônio androsterona e do escatol que conferem odor indesejável na carne e insatisfação dos consumidores. Atualmente no Brasil, a imunocastração é a técnica mais aplicada para impedir a instalação do odor indesejável na carne de suínos machos, pois proporciona bem estar aos animais, rendimento de carcaça e ganhos de qualidade da carne (DUNSHEA *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2008). Porém, os animais desenvolvem os testículos que são removidos durante o abate e são descartados. Portanto, o uso da imunocastração acarreta a geração de um resíduo, ou seja, os testículos. Assim, encontrar uma adequada utilização dos testículos de suínos imunocastrados pode gerar uma rentabilidade para as indústrias produtoras de carne suína.

Os testículos suínos são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea formada por fibras de colágeno (COPENHAVER *et al.*, 1978; ROSS & PAWLINA, 2010). Portanto, a túnica albugínea pode ser utilizada como matéria-prima para extração de colágeno e obtenção de isolado de colágeno. Porém, a caracterização da túnica albugínea que envolve os testículos de suínos não foi explorada.

O colágeno é a proteína dominante do tecido conjuntivo da pele e órgãos de mamíferos. O termo colágeno é utilizado para designar uma família de pelo menos 26 proteínas isoformas encontradas em tecidos conjuntivos, ossos, tendões, cartilagem, veias, pele, dentes e músculo (SHOULDERS & RAINES, 2009; RICARD-BLUM, 2011). Desde 1969 até os dias atuais, foram descobertos vinte e oito tipos de colágeno distintos geneticamente (Tipo I até Tipo XXVIII). A estrutura comum em todos os tipos de colágeno é a presença da tripla hélice compostas de três cadeias

alfa (α). O colágeno tipo I é considerado o principal e está presente em grande quantidade nos tecidos conjuntivos de mamíferos, é formado por duas cadeias polipeptídicas denominadas $\alpha_1(I)$ e por uma cadeia com uma sequência diferente de aminoácidos denominada $\alpha_2(I)$ (ROSS & PAWLINA, 2010; RICARD-BLUM, 2011).

O colágeno pode ser utilizado em diversas aplicações tanto na área de alimentos, cosméticos, farmacêutica e de embalagens. Isto se deve ao fato, do colágeno possuir propriedades emulsionantes, capacidade de formação de gel e espuma, capacidade estabilizante e clarificante, capacidade de formar embalagens biodegradáveis e de microencapsular substâncias (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Na área de alimentos, o colágeno influencia de forma preponderante a textura de produtos cárneos devido às suas propriedades funcionais. Porém, a utilização do colágeno depende de suas propriedades químicas e funcionais que são influenciadas por sua estrutura e peso molecular, e afetadas pelas condições de extração (HERMANSSON, 1975; SHON *et al.*, 2011).

No Brasil, devido a intensa produção de animais de corte, como bovinos, suínos e aves verifica-se uma grande disponibilidade de resíduos rico em colágeno, como peles, tendões e órgãos. Porém, não existe um aproveitamento adequado destes resíduos, os quais são descartados na forma de subprodutos. Entretanto, nas últimas décadas foi verificado um interesse crescente pela valorização de subprodutos industriais e, portanto, há muitas investigações sobre extração de colágeno de diferentes fontes animais. Sendo que os métodos mais estudados para a extração de colágeno de diferentes tecidos animais são a extração com ácidos orgânicos, como o ácido acético, seguido de hidrólise com enzima proteolítica, como a pepsina (BAILEY *et al.*, 1979; ALVES & PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2002; SADOWSKA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2008; WOO *et al.* 2008; YAN *et al.*, 2008; BENJAKUL *et al.*, 2010; NALINANON *et al.*, 2011; SHON *et al.* 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de extração de colágeno da túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados para produção de isolado de colágeno e identificar e os tipos de colágeno presente na túnica albugínea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a composição química e o teor de colágeno da túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados.

Verificar o efeito das condições de extração de colágeno da túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados para produção de isolado de colágeno.

Determinar as propriedades químicas e funcionais do isolado de colágeno de túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados.

Identificar os tipos de colágeno presente na túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados por métodos histológicos e bioquímicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COLÁGENO

O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada em grande quantidade no tecido conjuntivo. É a principal proteína dos mamíferos correspondendo a 30% do total de proteínas, componente estrutural do tecido conjuntivo e constituinte de peles, tendões, cartilagens, órgãos e ossos (RICARD-BLUM, 2011). Nos tecidos conjuntivos, o colágeno constitui a matriz extracelular, juntamente com as proteínas elastina e reticulina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

O colágeno desempenha papel estrutural e contribui para a organização, formação e propriedades mecânicas dos tecidos, sendo que alguns tipos de colágeno são restritos a alguns tecidos e, portanto, apresentam funções biológicas específicas. Desde 1969 até os dias atuais, foram descobertos vinte e oito tipos de colágeno distintos geneticamente. A denominação de cada tipo de colágeno é realizada utilizando-se algarismos romanos (Tipo I até Tipo XXVIII). A estrutura comum em todos os tipos de colágeno é a presença da tripla hélice compostas de três cadeias alfa (α -), porém cada tipo de colágeno apresenta uma sequência primária única, o que confere forma e propriedades específicas (RICARD-BLUM, 2011).

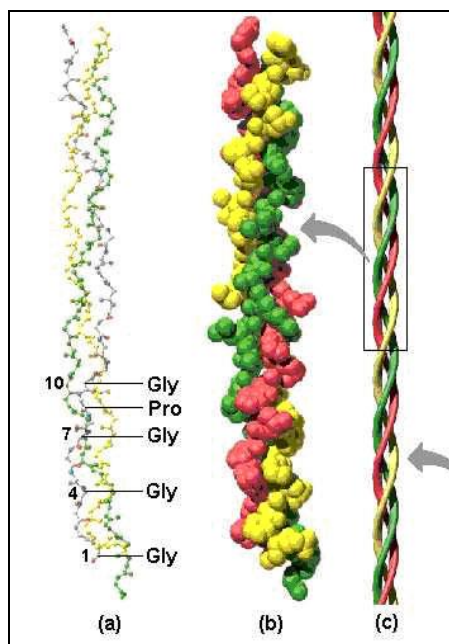
O colágeno é uma glicoproteína que contém pequena quantidade de galactose e glicose (XIONG, 1997). Quanto ao valor nutritivo, o colágeno não é uma proteína balanceada e seu valor biológico é baixo, pois os aminoácidos essenciais, como triptofano, tirosina e cistina estão presentes em baixos teores ou ausentes, enquanto que glicina e arginina estão em altos níveis (RAO & HENRICKSON, 1983).

3.2 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DO COLÁGENO

A unidade básica do colágeno é denominada de tropocolágeno que mede aproximadamente 300 nm de comprimento e 1,5 nm de espessura com peso molecular de 300 kDa. O tropocolágeno é formado por três cadeias de polipeptídeos, denominadas de cadeias alfa (α -) que se entrelaçam como uma bobina em um

formato helicoidal, como apresentado na Figura 1 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990; ROSS & PAWLINA, 2010).

Figura 1: (a) Sequência de aminoácidos na tripla hélice; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla formando o tropocolágeno (SMITH, 1968).



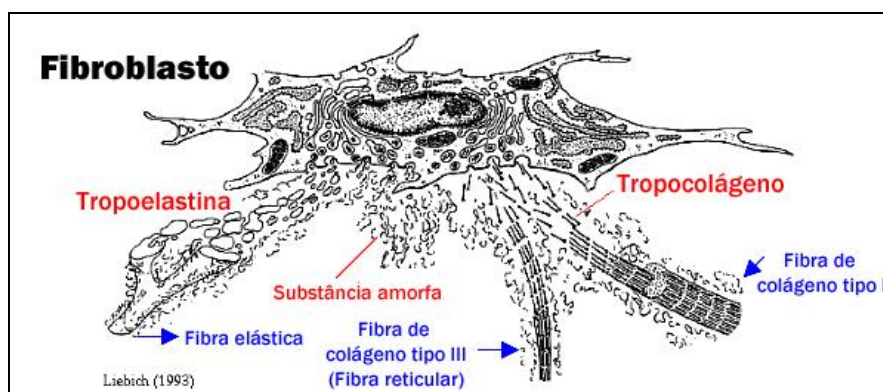
As cadeias alfa (α -) apresentam aproximadamente 100 kDa e podem conter de 600 até 3.000 aminoácidos, os quais podem apresentar sequência idêntica ou diferente, dependendo do tipo de colágeno. Cada cadeia α é formada por uma sequência de aminoácidos conhecida como (Glicina – X – Y)_n repetida ao longo da cadeia, sendo que o resíduo X é prolina e o Y pode ser hidroxiprolina ou hidroxilisina. Os outros aminoácidos são formados por hidroxilação pós-translacional de prolina e lisina pela prolil hidroxilase e pela lisil hidroxilase, respectivamente. Em geral, o colágeno contém 33% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e carregados (BAILEY & LIGHT, 1989; ROSS & PAWLINA, 2010). O aminoácido hidroxiprolina é responsável pela estabilidade térmica da molécula e absorção de umidade e é indicador do teor de colágeno, pois este aminoácido está presente em quantidade significativa somente em proteínas colagênicas (RICARD-BLUM, 2011).

As cadeias alfa (α -) são numeradas com algarismos arábicos. Por exemplo, o colágeno do tipo I é formado por duas cadeias polipeptídicas idênticas, denominadas de $\alpha_1(I)$ e por uma cadeia com uma sequência diferente de

aminoácidos denominada de $\alpha_2(I)$ enquanto o tipo III é formado por três cadeias iguais, denominadas $\alpha_1(III)$ (RICARD-BLUM, 2011). Quando o colágeno é submetido a temperaturas acima de 40°C ocorrem desnaturação e rompimento da estrutura helicoidal. Então, podem ser observados dois componentes α denominados α_1 e α_2 , dois β (beta) e outro componente γ (gama) com peso molecular similar ao da molécula de tropocolágeno, ou seja 300 kDa (BALIAN & BOWES, 1977).

As moléculas de colágeno são sintetizadas por células do tecido conjuntivo, incluindo fibroblastos em diversos tecidos, condrócitos na cartilagem e osteoblastos nos ossos. Os fibroblastos são responsáveis pela produção do pró-colágeno que irá formar o tropocolágeno e as fibrilas de colágeno na matriz extracelular (Figura 2).

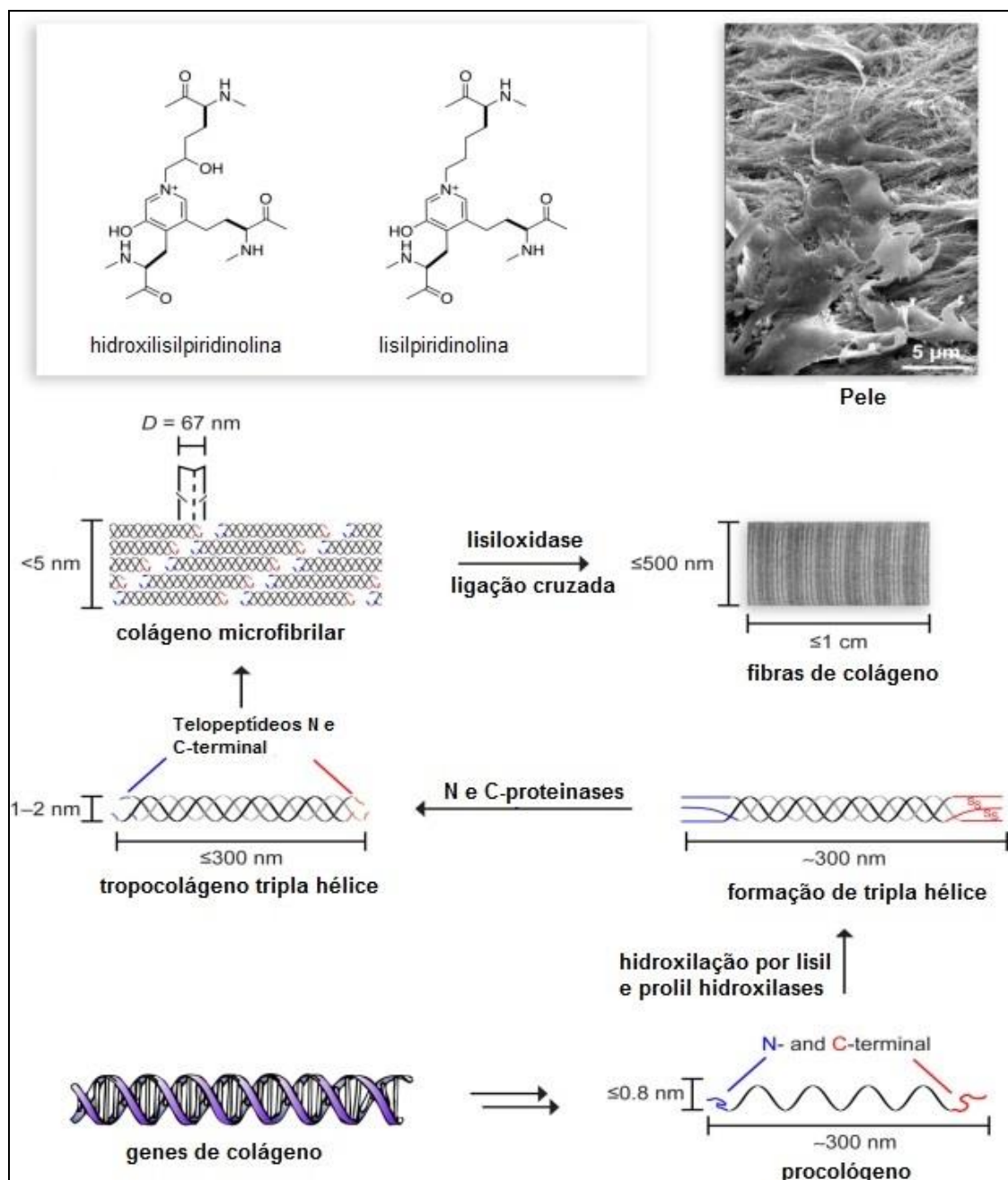
Figura 2: Esquema do fibroblasto responsável pela produção de pró-colágeno e do meio extracelular onde é formado o tropocolágeno e as fibrilas de colágeno (LIEBICH, 1993).



A biossíntese do colágeno fibrilar inicia no núcleo dos fibroblastos, onde os genes codificadores das cadeias α_1 e α_2 são ativados e produzem seus respectivos RNAs mensageiros (SHOULDERS & RAINES, 2009). A Figura 3 apresenta a rota biossintética de fibras de colágeno.

Os RNAs mensageiros se deslocam para o citoplasma e são traduzidos em cadeias polipeptídicas (cadeias alfa) que são internalizadas nas cisternas do retículo endoplasmático. As cadeias α que são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso são chamadas de pró-cadeias α ou pró-peptídeos de colágeno. As pró-cadeias α apresentam uma sequência amino terminal (N-terminal) e uma sequência carboxi-terminal (C-terminal) (Figura 3).

Figura 3: Rota biossintética de fibras de colágeno, principal constituinte dos tecidos conjuntivos, como a pele (SHOULDERS & RAINES, 2009).



No retículo endoplasmático, enquanto as pró-cadeias α ainda não estão no formato helicoidal, alguns resíduos de prolina e lisina são hidroxilados a hidroxiprolina e hidroxilisina por ação das enzimas prolil hidroxilase e lisil hidroxilase, tendo como cofator a vitamina C. Alguns resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina são glicosilados, assim as cadeias α passam a apresentar glicose ou

glicosilgalactose. Após, inicia-se a formação da estrutura globular na porção carboxi-terminal, a qual é estabilizada por ligações dissulfeto. A partir da porção carboxi-terminal as pró-cadeias α iniciam a formação da tripla hélice por ligações de hidrogênio e dissulfeto intra e intercadeias, gerando o pró-colágeno (Figura 3). As moléculas de pró-colágeno são secretadas para a matriz extracelular onde enzimas N e C-proteinases clivam as terminações não espiraladas (regiões telopeptídicas) do pro-colágeno, formando o tropocolágeno (Figura 3). As regiões telopeptídicas são caracterizadas por não possuírem a característica de hélice do colágeno, pois não apresentam a sequência Glicina-X-Y. Nessas regiões formam-se as ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias alfa (SHOULDERS & RAINES, 2009).

As moléculas de tropocolágeno se agregam e alinham-se para formar as microfibrilas de colágeno em processo denominado de fibrilogênese (Figura 3). A célula controla a disposição ordenada das microfibrilas que são enfileiradas longitudinalmente. Assim, iniciam-se as ligações cruzadas intermoleculares entre os grupos aldeídos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina presente nas regiões telopeptídicas, resultando na formação das fibrilas de colágeno. As fibrilas de colágeno apresentam bandas claras e escuras dispostas em uma periodicidade padrão de 67 nm ($D= 67$ nm), as quais são facilmente visualizadas por micrografia eletrônica. A etapa que precede a ligação cruzada é a desaminação oxidativa dos resíduos de lisina ou hidroxilisina, os quais formam respectivamente, alisina e hidroxialisina, por ação da enzima lisiloxidase. As reações subsequentes ocorrem pela condensação do aldol ou pela formação de Bases de Schiff, resultantes da condensação de grupos amina da lisina ou hidroxilisina com aldeídos da alisina ou da hidroxialisina. Essas reações formam ligações cruzadas divalentes reduzidas por boro-hidreto, sendo chamadas de “ligações cruzadas reduzíveis” (SHOULDERS & RAINES, 2009). Porém, ao longo do envelhecimento, as ligações divalentes reduzíveis se tornam mais estáveis, não reduzíveis e trivalentes. Dois compostos que caracterizam essas ligações cruzadas foram identificados e são denominados como hidroxilisilpiridinolina e lisilpiridinolina (Figura 3). As ligações cruzadas não redutíveis são estáveis ao calor e influenciam na textura do músculo ou da pele, aumentando sua dureza e reduzindo sua flexibilidade (BAILEY & SHIMOKOMAKI, 1971).

3.3 TIPOS DE COLÁGENO

A proteína de colágeno pode ser classificada nos seguintes grupos: colágenos formadores de fibrilas; colágeno de membrana basal; colágeno microfibrilar; fibrilas de ancoragem; colágeno de rede; colágenos associados a fibrilas; fibrilas de ancoragem; colágeno de transmembrana e outros colágenos com funções únicas (Tabela 1) (GELSEA *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Tipos de colágenos, sua composição molecular e distribuição nos tecidos.

Tipo	Composição Molecular	Distribuição nos tecidos
Colágenos formadores de fibrilas		
I	$[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$	Ossos, pele, tendões, ligamentos e córnea
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Cartilagem e corpo vítreo
III	$\alpha_1(III)_3$	Pele, parede de vasos, fibras reticulares da maioria dos tecidos (pulmões, fígado, baço, etc.) associado ao tipo I
V	$[\alpha_1(V)]_2, \alpha_2(V), [\alpha_1(V)]_3,$	Pulmão, córnea, ossos, membranas fetais, associado ao tipo I
XI	$\alpha_1(XI)\alpha_2(XI)\alpha_3(XI)$	Cartilagem, corpo vítreo
Colágeno de Membrana Basal		
IV	$[\alpha_1(IV)]_2 \alpha_2(IV), \alpha_3(IV), \alpha_4(IV), \alpha_5(IV)$	Membranas basais
Colágeno Microfibrilar		
VI	$\alpha_1(VI), \alpha_2(VI), \alpha_3(VI), \alpha_4(VI), \alpha_5(VI), \alpha_6(VI)$	Pele, cartilagem, placenta, pulmão, parede do vaso e disco intervertebral, cartilagem
Colágeno de Ancoragem		
VII	$[\alpha_1(VII)]_3$	Pele, junções dermo-epidérmica; mucosa oral, útero,
Colágeno de Rede		
VIII	$[\alpha_1(VIII)]_2, \alpha_2(VIII)$	Células endoteliais, córnea
X	$[\alpha_1(X)]_3$	Cartilagem hipertrófica
Colágenos associados a fibrilas		
IX	$\alpha_1(IX), \alpha_2(IX), \alpha_3(IX)$	Cartilagem, humor vítreo e córnea, associado ao tipo II
XII	$[\alpha_1(XII)]_3$	Pericôndrio, ligamentos e tendões, associado ao tipo I
XIV	$[\alpha_1(XIV)]_3$	Derme, tendão, parede de vasos, placenta, pulmão e fígado
XIX	$[\alpha_1(XIX)]_3$	Sarcoma das células embrionárias
XX	$[\alpha_1(XX)]_3$	Epitélio da córnea, pele embrionárias, cartilagem esternal, tendão, associado ao tipo I
XXI	$[\alpha_1(XXI)]_3$	Parede de vaso sanguíneo, associado ao tipo I
Colágeno de Transmembrana		
XIII	$[\alpha_1(XIII)]_3$	Epiderme, folículo piloso, endomísio, intestino, condrócitos, pulmões, fígado
XVII	$[\alpha_1(XVII)]_3$	Pele e epitélio do intestino
Colágeno Multiplexo		
XV	$[\alpha_1(XV)]_3$	Membrana basal, células do músculo liso, pâncreas rim,
XVI	$[\alpha_1(XVI)]_3$	Bolsa amniótica, queratinócitos, associado ao tipo II na cartilagem hialina e com microfibrilas na pele
XVIII	$[\alpha_1(XVIII)]_3$	Pulmões e fígado

Fonte: GELSEA *et al.*, 2003; RICARD-BLUM, 2011.

O grupo mais abundante e responsável por 90% dos tipos de colágeno existentes é representado pelos colágenos formadores de fibrilas, os quais desempenham papel estrutural e contribuem com as propriedades mecânicas dos tecidos (BIRK *et al.*, 1988; RICARD-BLUM, 2011).

Em músculos podem-se distinguir quatro tipos principais de colágenos: I, III, IV e V. Assim, no músculo, o epimísio é formado predominantemente por colágeno do tipo I, o perimísio pela mistura dos tipos I e III, enquanto que o endomísio é composto de lâmina basal fina composta pelo tipo IV, associado com fibras finas do tipo I, III e V (BAILEY & LIGHT, 1989).

O colágeno do tipo I [$\alpha_1(I)$]₂ $\alpha_2(I)$ é o mais abundante, sendo o maior constituinte da pele (80% da matéria seca da pele adulta), tendões (90% da matéria seca), ligamentos e ossos (90% da matéria seca) (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002). É classificado como colágeno fibrilar, formado por fibras espessas com até 20 μm de diâmetro que se associam em feixes e por essa característica o colágeno tipo I confere boa resistência mecânica, rigidez e elasticidade aos tecidos (RICARD-BLUM, 2011).

As fibrilas de colágeno tipo II são características e predominantes em cartilagem hialina, onde são responsáveis por 80% do conteúdo de colágeno total. O colágeno tipo II também é encontrado no corpo vítreo, no epitélio corneano, no núcleo pulposo dos discos intervertebrais e embrionários e nas transições epitelial-mesenquimal. A tripla hélice de colágeno tipo II é composta por três cadeias [$\alpha_1(II)$]₃ formando uma molécula homotrímera com propriedades e características semelhantes ao colágeno tipo I (GELSEA *et al.*, 2003). Na cartilagem, as fibrilas de colágeno apresentam além do dominante colágeno II, os colágenos tipos IX e XI. Comparado com o colágeno tipo I, as cadeias do tipo II apresentam um maior teor de hidroxilisina bem como resíduos de glucose e galactose que mediam a interação com proteoglicanos, componente altamente hidratado da matriz extracelular (MENDLER *et al.*, 1989).

O colágeno tipo III é um dos três homotrímeros de três cadeias $\alpha_1(III)$ e é amplamente distribuído em tecidos que contém o colágeno tipo I, com exceção dos ossos. É abundante em tecidos elásticos e foi detectado na parede das artérias, na pele e no útero. É um componente importante de fibras do interstício, tecidos dos pulmões, fígado, derme, baço e veias (VON DER MARK, 1981).

O colágeno tipo IV é o componente estrutural da membrana basal. Suas moléculas se agrupam e formam uma malha semelhante a uma lâmina que mantém a integridade estrutural das membranas basais. A forma predominante é representada por $[\alpha_1(\text{IV})_2 \alpha_2(\text{IV})]$, porém seis diferentes subunidades de cadeias alfa $[\alpha_1(\text{IV})$ até $\alpha_6(\text{IV})]$ podem ser incorporadas à molécula heterotrímica (GELSEA *et al.*, 2003). O colágeno tipo IV tem sido relacionado com o desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados e desempenha um papel na junção neuromuscular como um organizador do neurônio pré-sináptico (FOX *et al.*, 2008).

Os colágenos tipos V e XI são formados por heterotrimeros de três diferentes cadeias alfa ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$). Os colágenos tipos V e XI existem em vários tecidos, o colágeno tipo V forma tipicamente heterofibrilas com os colágenos tipos I e III e contribui para a matriz orgânica do osso, o estroma corneano e a matriz intersticial dos músculos, fígado, pulmões e placenta. O colágeno tipo V pode funcionar como uma estrutura central das fibrilas dos colágenos tipos I e III (BIRK, 1988; FESSLER *et al.*, 1986). O colágeno tipo XI participa da cartilagem articular de humanos, juntamente com o colágeno tipo II e forma o núcleo das heterofibrilas do colágeno II (GELSEA *et al.*, 2003).

O colágeno tipo VI pertence ao grupo de colágeno microfibrilar e é um heterotrímico de três cadeias alfa diferentes ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) que contribui com a integridade da epiderme (GELSEA *et al.*, 2003; RICARD-BLUM, 2011). As fibrilas de colágeno tipo VI aparecem como filamentos finos, embora nem todos filamentos finos representem o colágeno tipo VI (KEENE *et al.*, 2006).

O colágeno tipo VII apresenta importância para a integridade da pele, porém está presente em pequenas quantidades, 0,001% do total de colágeno da pele (BRUCKNER-TUDERMAN *et al.* 1987). Os colágenos dos tipos VIII e X são relatados como colágenos de cadeia curta e são homólogos, porém apresentam distribuições e funções diferentes (YAMAGUCHI *et al.*, 1991).

O colágeno tipo IX contribui com a formação do colágeno tipo II da cartilagem e do corpo vítreo. Sua molécula é heterotrimérica e constituída por três diferentes cadeias $[\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX})$ e $\alpha_3(\text{IX})]$ (VAN DER REST, 1985). As moléculas de colágeno tipo IX encontram-se ao longo da superfície das fibrilas de colágeno tipo II em direção antiparalela. Esta interação é estabilizada por ligações cruzadas covalentes de derivados de lisina com o N-telo-peptídeo do colágeno tipo II (WU &

EYRE, 1995). O colágeno tipo IX representa 1% do total de colágeno da cartilagem articular e está presente em todas as cartilagens hialinas. Foi identificado em cartilagem articular de suínos e em esterno de aves e denominado tipo M (SHIMOKOMAKI *et al.*, 1981).

O tipo X é componente característico da cartilagem hipertrófica na placa de crescimento fetal e juvenil, nas costelas e vértebras (KUHN, 1986). É um colágeno homotrimérico com um grande domínio C-terminal e um domínio N-terminal curto. O colágeno tipo X desempenha um papel na ossificação endocondral e contribui para a hematopoiese na junção condro-óssea (RICARD-BLUM, 2011). Em cartilagem fetal, o colágeno tipo X tem sido localizado como filamentos finos associado com o tipo II (KWAN *et al.*, 1989).

Os colágenos dos tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, e XX pertencem à classe denominada de colágenos associados a fibrilas. As estruturas desses colágenos são caracterizadas por domínios de colágeno interrompidos por curtos domínios não helicoidais e as moléculas triméricas estão associadas com as superfícies de diferentes fibrilas (GELSEA *et al.*, 2003).

O colágeno tipo XVI é encontrado na cartilagem hialina e pele e é associado com um subconjunto do colágeno tipo II. Os tipos XII e XIV são semelhantes em estrutura e contêm sequências homólogas ao tipo IX. Ambas as moléculas, associadas ou não com o tipo I, localizam-se na pele, periosteio, pericôndrio, tendões, pulmão, fígado, placenta, e as paredes dos vasos. A função desses colágenos, bem como dos tipos de colágeno XIX e XX dentro do tecido não foi ainda bem definida (GELSEA *et al.*, 2003). O colágeno tipo XXII está presente apenas nos cruzamentos dos tecidos que formam o músculo esquelético e cardíaco (KOCH *et al.* 2004). Alguns tipos de colágeno estão presentes em tecido neural, como os colágenos XIII, XVII e XXV e XXVIII que são predominantes em tecido neural (RICARD-BLUM, 2011) Colágeno tipo XIX é expresso pelos neurônios centrais, e é necessário para a formação de sinapses do hipocampo cerebral (SU *et al.*, 2010) enquanto que XXVI se localiza em testículos e ovários (SATO *et al.*, 2002).

3.4 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO

A extração de colágeno de tecido conjuntivo geralmente é realizada por solubilização do colágeno em ácido orgânico, obtendo-se a fração denominada de “colágeno solúvel em ácido”. Porém, este produto possui a estrutura nativa do colágeno, assim para degradação das ligações cruzadas covalentes nas regiões telopeptídicas é preciso utilizar uma enzima, sendo a pepsina a mais utilizada, desta forma obtém-se a fração “colágeno solúvel em pepsina”. O ácido acético provoca intumescimento do tecido e dissolução das fibras colagenosas permitindo melhor ação da pepsina para hidrólise do colágeno. Portanto, a extração de colágeno com ácido acético e posterior hidrólise com pepsina é o método mais recomendado para extração de colágeno (BALIAN & BOWES, 1977; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

O ácido acético é o solvente orgânico mais utilizado para a extração de colágeno devido sua elevada capacidade de extração e diversos pesquisadores utilizaram o ácido acético para extração do colágeno ácido solúvel de subprodutos de pescado, como pele de carpa-capim (WANG *et al.*, 2008), pele de merluza do Alaska (YAN *et al.*, 2008), pele de bacalhau báltico (SADOWSKA, *et al.*, 2003), pele de tilápia do Nilo (ZENG *et al.*, 2008), manto de lula gigante (URIARTE-MONTOYA *et al.*, 2010). Porém, a concentração de ácido acético pode alterar o valor de pH da solução e influenciar a extração do colágeno (CHENG *et al.*, 2009), portanto verifica-se a necessidade de investigar o efeito da concentração de ácido acético na extração de colágeno. Wang *et al.* (2008) otimizaram a extração de colágeno solúvel em ácido de pele de carpa-capim aplicando delineamento de Box-Behnken e verificaram que, a melhor condição para extração de colágeno ocorreu quando utilizaram $0,54 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético, temperatura de $24,7^{\circ}\text{C}$ e 32,1 h de tratamento com ácido acético obtendo rendimento de extração $19,3 \pm 0,5\%$.

A extração de colágeno com uso de pepsina e ácido acético é utilizada em vários estudos desde a década de 70, principalmente para caracterização de colágeno de diversos tecidos. Bailey *et al.* (1979) aplicaram a pepsina e o ácido acético para extração de colágeno de placenta humana e identificaram neste material a presença de colágeno tipo I, III e IV após a precipitação salina fracionada com NaCl. Shimokomaki *et al.* (1980) utilizaram a pepsina e ácido acético para extração de colágeno de cartilagem hialina de suínos e identificaram neste material

a presença do colágeno tipo II e um novo tipo de colágeno, o tipo IX, que também foi denominado de colágeno tipo M. Com o objetivo de identificar os tipos de colágeno em carne mecanicamente separada de frango, Tanaka & Shimokomaki (1996) utilizaram pepsina e ácido acético para extração de colágeno e identificaram neste material a presença dos colágenos do tipo I, II, III e V. Morales *et al.*, (2000) extraíram colágeno de moluscos marinhos utilizando ácido acético e pepsina e identificaram a presença de colágeno do tipo I e V no material.

Em muitos estudos de extração de colágeno de diferentes matérias primas foi evidenciado que a extração em meio ácido e hidrólise com pepsina aumenta o rendimento. Zhang *et al.* (2009) estudaram a extração de colágeno de pele de bagre (*Mystus macropterus*) e verificaram que a extração de colágeno com ácido acético 0,5 mol L⁻¹ seguido da hidrólise com 1,5% de pepsina proporcionou um rendimento de extração de 28% enquanto que, a extração de colágeno utilizando apenas ácido acético 0,5 mol L⁻¹, o rendimento foi de 16,8%. Muralidharan *et al.* (2013) investigaram métodos de extração de colágeno de peixe-porco (*Odonus niger*) e verificaram que a extração com ácido acético seguido da hidrólise com pepsina proporcionou a obtenção de um concentrado de colágeno com 70,94 g de colágeno por 100 g de amostra e quando foi aplicado apenas a extração com ácido acético, o produto apresentou menor conteúdo de colágeno, 46,48 g de colágeno por 100 g de amostra.

Outros pesquisadores aplicaram a extração com ácido acético e hidrólise com pepsina para obtenção de colágeno de pele de diferentes espécies de peixe, como carpa-capim (ZHANG *et al.* 2007), tubarão bambu (KITTIPIHATTANABAWON *et al.*, 2010) e atum (BENJAKUL *et al.*, 2010; NALINANON *et al.*, 2011) visando o aproveitamento dos resíduos gerados durante a filetagem destes peixes.

Para caracterização dos tipos de colágeno pode ser realizada a precipitação salina após a extração e hidrólise do colágeno. Para separação dos diferentes tipos de colágeno recomenda-se a precipitação salina em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) em pH neutro (7,5) ou ácido (2,5) (CHUNG & MILLER, 1974; SHIMOKOMAKI *et al.*, 1980).

3.5 PROPRIEDADES FUNCIONAIS E APLICAÇÕES DO COLÁGENO

As propriedades funcionais das proteínas são definidas como propriedades químicas e físicas que afetam o comportamento das proteínas em sistemas alimentares (HERMANSSON, 1975). A qualidade funcional de uma proteína pode ser avaliada pela capacidade de retenção de água e gordura, capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão e estas propriedades estão relacionadas com a solubilidade da proteína (WANG & ZAYAS, 1992).

O colágeno pode ser utilizado em diversas aplicações tanto na área de alimentos, cosméticos, farmacêutica e de embalagens. Isto se deve ao fato, do colágeno possuir propriedade emulsionante, geleificante, espumante, estabilizante e clarificante, além da capacidade de formar embalagens biodegradáveis e para microencapsulação de substâncias (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

Na área de alimentos, devido às suas propriedades funcionais, o colágeno influencia de forma preponderante na textura de produtos cárneos. Alguns autores sugerem que o colágeno apresenta capacidade de ligação de água e gordura similar à miosina e actina, sendo que estas proteínas são as principais responsáveis pela estabilização de emulsões e outros produtos cárneos. O colágeno participa da estabilização dos glóbulos de gordura, melhora a capacidade de retenção de água e a textura de produtos cárneos emulsionados e reestruturados (BALEY & LIGHT, 1989; OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002).

Olivo e Shimokomaki (2002) verificaram que, em emulsões cárneas o colágeno apresenta efeito benéfico quando aplicado na faixa de 15 a 18% de seu peso em relação à fração protéica ou aproximadamente 2% em relação ao peso total da massa. Porém, em produtos com alto teor de gordura foi verificado que o colágeno passa a prejudicar a estabilidade da massa quando adicionado em quantidade acima de 2%, isto ocorre devido a compressão física dos glóbulos de gordura e expansão térmica durante o cozimento com consequente coalescência dos glóbulos de gordura.

Bueno (2008) observou que a aplicação de 0,2% de fibra de colágeno em carne marinada com injeção de 14% de salmoura proporcionou um alto rendimento após o cozimento devido à alta capacidade de retenção de água do colágeno. O colágeno melhora a funcionalidade das proteínas cárneas por imobilização da água

livre e assim, aumenta a estabilidade e o rendimento de produtos cárneos cozidos (KENNEY *et al.*, 1992).

Uriarte-Montoya *et al.* (2010) extraíram colágeno do manto de lula gigante (*Dosidicus gigas*) e verificaram que o produto obtido apresentou adequadas propriedades plastificantes e possibilitou a obtenção de biofilmes com adequadas propriedades mecânicas.

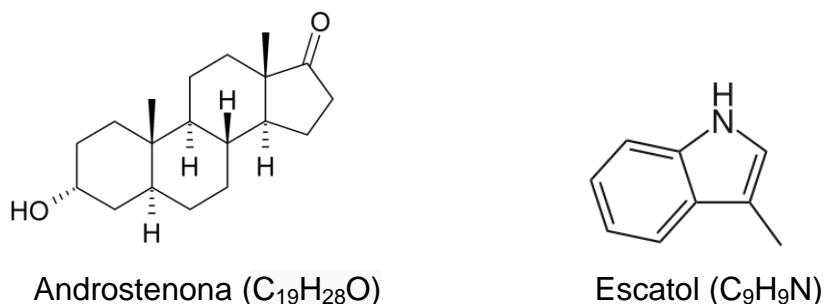
A utilização do colágeno nas áreas farmacêutica e biomédica, incluem a engenharia de tecidos para implantes em humanos, a inibição de doenças angiogênicas, o tratamento da hipertensão, da incontinência urinária e da osteoartrite (LEE, 2001). O colágeno é também um substrato atrativo para aplicações em perfumaria e cosméticos (TZAPHLIDOU, 2004).

Devido ao intenso abate de animais, como suínos, bovinos e aves, uma grande quantidade de colágeno é descartada na forma de subprodutos como peles, tendões, aponevroses e órgãos, os quais são destinados a produção de ração animal ou mesmo desprezados, poluindo o meio ambiente (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2002). Utilizar estes subprodutos para extração de colágeno pode gerar lucros para a indústria da carne, evitando o desperdício e aumentando o rendimento em produtos cárneos industrializados. Porém, a utilização do colágeno dependerá de suas propriedades químicas e funcionais e estas são altamente influenciadas por sua estrutura e peso molecular e afetadas pelas condições de processamento (HERMANSSON, 1975; SHON *et al.* 2011).

3.6 IMUNOCASTRACÃO DE SUÍNOS

Durante o desenvolvimento sexual, o suíno macho inteiro acumula substâncias em seu tecido adiposo, predominantemente a androstenona (5 α -androst-16-en-3-ona) e o escatol (3-metil-indol) (Figura 4) que causam formação de odor desagradável na carne (PATTERSON, 1968). Este odor pode ser percebido durante a cocção e causa a rejeição da carne pelos consumidores (BONNEAU *et al.*, 2000).

Figura 4: Estrutura química e fórmula molecular do hormônio androstenona e do escatol.



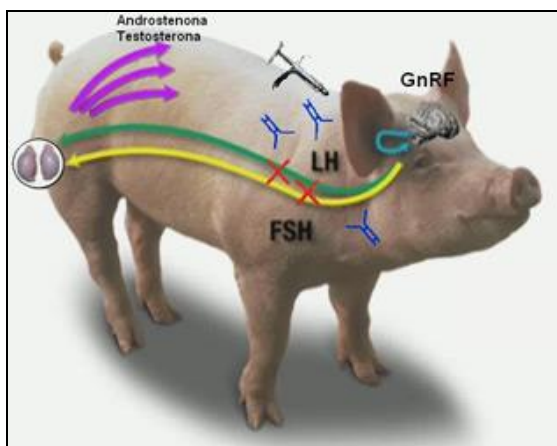
A androstenona é um hormônio esteróide, produzido pelas células de Leydig nos testículos, transportado via circulação sanguínea e secretado na saliva e no tecido adiposo (GOWER, 1972), reportado por causar forte odor de urina na carne. Escatol é produto da degradação do aminoácido triptofano por bactérias do intestino grosso e quando absorvido pelo trato gastrointestinal uma parte é transportada até o tecido adiposo, onde se acumula, e outra é eliminada por meio da urina. Este composto é relatado por causar intenso odor fecal na carne suína (BONNEAU *et al.*, 1998). Ambos compostos são lipofílicos e acumulam-se no tecido adiposo, causando odores desagradáveis e sabores estranhos, quando presentes em concentrações elevadas (BABOL, 1996).

No Brasil, o abate de suínos machos inteiros é proibido pela legislação brasileira conforme Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1952; BRASIL, 1988) sendo que a principal razão para a castração de suínos machos é a garantia de obtenção de carne livre de odores desagradáveis.

A imunização ativa e seletiva contra a androsterona ou seus precursores é uma das formas de diminuir as concentrações de androsterona (CLAUS, 1994). Por isso, a castração cirúrgica de suínos vem sendo utilizada há décadas na produção de suínos. Entretanto, atualmente a imunocastração é considerada uma técnica atrativa do ponto de vista científico e comercial. Thun *et al.* (2006) verificaram que o uso da imunocastração evitou o odor na carcaça suína, eliminou a dor da castração cirúrgica, promovendo o bem estar animal, melhorou os aspectos sensoriais relacionados à maciez, suculência, sabor, aroma, cor e aparência, e também os aspectos tecnológicos de pH, capacidade de retenção água e potencial antioxidante, melhorou a conversão alimentar dos animais, aumentou o crescimento e a produção de carne magra na carcaça de suínos.

Define-se como imunocastração, o método de castração por aplicação de vacina anti-GnRF (fator liberador de gonadotropinas) que inibe o início da puberdade, evita o odor e o sabor característico de macho inteiro na carne, melhora o desempenho e as características quantitativas de carcaça (DUNSHEA *et al.*, 2001). Duas doses da vacina são aplicadas, sendo a primeira quando o animal apresenta oito semanas de idade e a segunda quatro a cinco semanas antes do abate. Com a aplicação da vacina, os anticorpos neutralizam o fator liberador de gonadotrofinas (GnRF) nos suínos e, conseqüentemente, bloqueiam a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) e assim, bloqueiam a função testicular (Figura 5). Sendo a função testicular inibida, a produção de androstenona e de escatol será reduzida e não haverá acúmulo destas substâncias no tecido adiposo da carcaça (JAROS *et al.*, 2005). Atualmente, a imunocastração vem sendo utilizada na produção mundial de suínos em substituição ao método de castração cirúrgica dos suínos machos.

Figura 5: Ilustração de como a vacina atua no sistema imunológico do suíno macho e bloqueia a função testicular (GARDENAL, 2009)

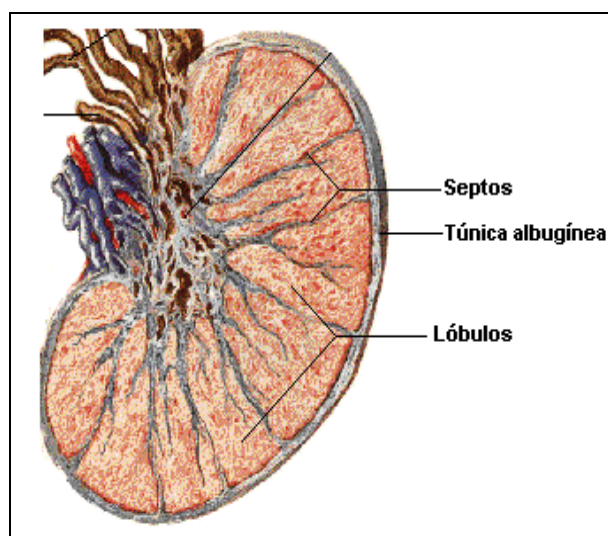


Dunshea *et al.* (2001), Jaros *et al.* (2005), Silveira *et al.* (2006) e Zamaratskaia *et al.* (2008) relataram que a imunocastração de suíno, utilizando a vacina Vivax® (Pfizer Saúde Animal) foi eficiente em controlar os compostos responsáveis pelo odor sexual (androstenona e escatol) a níveis inferiores ao do limiar de detecção de provadores.

3.7 TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS SUÍNOS

Os testículos de mamíferos são envolvidos por um tecido conjuntivo denso constituído por várias camadas, sendo que o principal componente é a túnica albugínea (Figura 6).

Figura 6: Representação de um testículo indicando a túnica albugínea que o recobre, os septos e os lóbulos testiculares. Adaptado de http://www.becomehealthynow.com/popups/male_testes.htm



A túnica albugínea é um resistente tecido formado por membranas fibrosas de colágeno e característico pela presença de fibroblastos. Externamente, a túnica albugínea é recoberta por mesotélio e uma camada fina de estreitos tecidos de fibras colágenas que se combinam com uma camada mais profunda composta por grossas fibras colágenas. A parte interna da túnica é composta por um tecido conjuntivo mais frouxo, sendo altamente vascularizado e denominado de túnica vasculosa. Abaixo da túnica vasculosa, estão os túbulos seminíferos e um delicado tecido conectivo (COPENHAVER *et al.*, 1978). A partir da túnica albugínea partem os septos fibrosos que penetram no testículo dividindo-o em compartimentos denominados de lóbulos testiculares (Figura 6). Cada lóbulo é ocupado por túbulos seminíferos que se alojam como novelos dentro de um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células intersticiais (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1990).

Chacon-Arellano & Woolley (1980) verificaram que a túnica albugínea de testículos suínos é formada por células musculares lisas típicas, além de abundantes células de fibroblastos e é constituída por uma matriz fibrosa, com predomínio de feixes de colágeno entrelaçados de forma aleatória e de fibras elásticas.

A túnica albugínea de testículos de diferentes mamíferos foi analisada e foi observada a presença de grande quantidade de fibroblastos, fibras de colágeno e elastina, além de células musculares lisas que estão relacionadas com a contração e transporte de espermatozoides (LEESON & COOKSON, 1974; HODGES, 1974 *apud* AIRE & OZEGBE, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

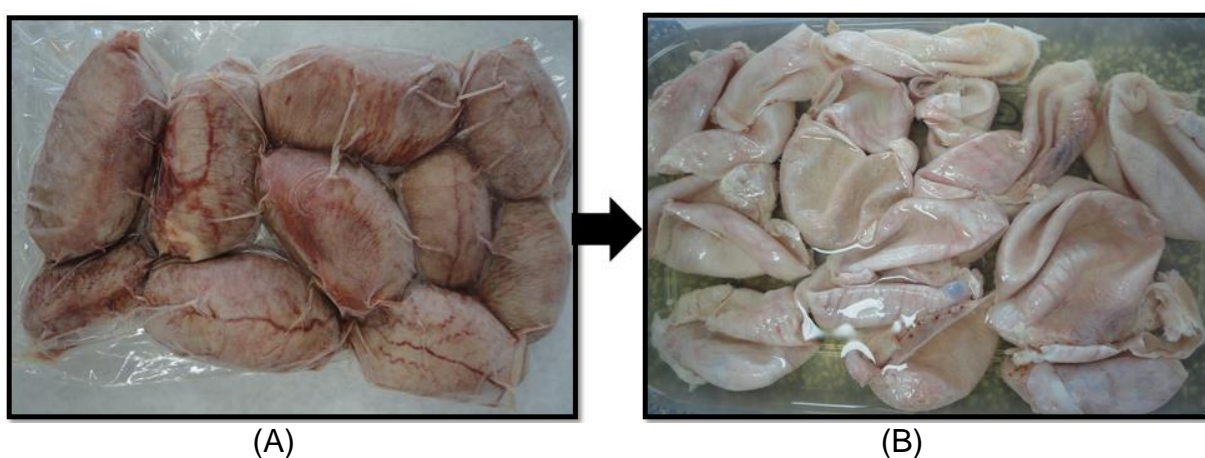
A matéria-prima utilizada foi a túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados. Os suínos da raça *Landrace* e *Large White* foram imunocastrados com a vacina Vivax[®] (Pfizer Saúde Animal) e os testículos foram removidos durante o abate em abatedouro comercial e mantidos congelados a -18°C.

O colágeno bovino da marca NovaProm[®] foi cedido pela empresa Food Ingredients Ltda e utilizado para comparar com as propriedades funcionais do isolado de colágeno de túnica albugínea. Todos os reagentes utilizados foram de diferentes procedências e com pureza de grau analítico.

4.2 REMOÇÃO DA TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS

A remoção da túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados foi realizada manualmente. Após a remoção, a túnica foi exaustivamente lavada com água destilada e armazenada a -18°C (Figura 7). A túnica albugínea foi utilizada nas análises de caracterização química, na identificação dos tipos de colágeno e na obtenção do isolado de colágeno.

Figura 7: Testículos de suínos imunocastrados (A) e túnica albugínea (B)



4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONTEÚDO DE COLÁGENO TOTAL

A composição química aproximada, dos testículos de suínos imunocastrados e da túnica albugínea foi determinada conforme AOAC (2005). O conteúdo de colágeno total nos testículos de suínos imunocastrados e na túnica albugínea foi determinado pelo teor do aminoácido hidroxiprolina conforme metodologia de Woessner (1961) multiplicado por 8,0 conforme Kolar (1990). As médias da composição química dos testículos de suínos imunocastrados e da túnica albugínea foram comparadas aplicando o teste de média de t de *Student*, considerando $p < 0,05$.

4.4 OBTENÇÃO DO ISOLADO DE COLÁGENO

4.4.1 Preparo da túnica albugínea

A túnica albugínea foi manualmente estendida, cortada em pedaços horizontalmente e verticalmente uniformes com 1 cm de comprimento e largura. Em seguida, foi realizado o preparo da túnica albugínea conforme descrito por Shimokomaki (1981). Assim, os pedaços de túnica albugínea foram imersos em água destilada na proporção de 1:10 (m/v) e submetida à agitação contínua a 4°C por 48 h em incubadora refrigerada com troca diária da água destilada. A remoção de compostos não fibrilares foi realizada com substituição da água destilada por solução de Tris-base 0,05 mol L⁻¹ e NaCl 1,0 mol L⁻¹ (pH 7,5) e agitação contínua a 4°C por 48 h em incubadora refrigerada com troca diária da solução. Ao final do tratamento, a solução foi removida e a túnica albugínea foi utilizada para obtenção do isolado de colágeno.

4.4.2 Extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno

A extração do colágeno com ácido acético e hidrólise com pepsina foi realizado conforme descrito por Shimokomaki (1981). A túnica albugínea limpa e preparada conforme item 4.4.1 foi submetida a extração com ácido acético na proporção de 1:10 (m/v) em diferentes concentrações (conforme planejamento fatorial ou delineamento composto central rotacional) por diferentes tempos em

horas (conforme planejamento fatorial ou delineamento composto central rotacional). Ao final do tratamento com ácido acético, a mistura foi homogeneizada em *turrax* por 10 min a 5000 x *g*, em seguida foi realizado a hidrólise com adição de uma percentagem de pepsina (conforme planejamento fatorial ou delineamento composto central rotacional) por diferentes tempos em horas (conforme planejamento fatorial ou delineamento composto central rotacional). Os processos de extração com ácido acético e hidrólise com pepsina foram realizados em incubadora refrigerada a 4°C com agitação contínua.

Após a hidrólise com pepsina, o pH da mistura foi ajustado para 7,5 utilizando NaOH 1,0 mol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹ e o material foi centrifugado a 10.000 x *g* por 30 min a 4°C. O precipitado (P₁) foi descartado e o sobrenadante (S₁) contendo o colágeno extraído e hidrolisado foi submetido à precipitação salina com NaCl até concentração de 3,0 mol L⁻¹ e novamente centrifugado a 10.000 x *g* por 30 min a 4°C. O sobrenadante (S₂) foi descartado e o precipitado de colágeno (P₂) foi dialisado em solução de ácido acético 0,5 mol L⁻¹ por 72 h a 4°C com troca diária da solução. O produto final com aspecto gelatinoso foi liofilizado e assim, obtido o isolado de colágeno (IC).

4.4.3 Planejamentos estatísticos aplicados para otimização da extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno

4.4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionado

O planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) foi aplicado para análise dos efeitos das variáveis na extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno. As quatro variáveis independentes estudadas foram: X_1 = mol de ácido acético L⁻¹, X_2 = h de tratamento com ácido acético, X_3 = % de pepsina e X_4 = h de hidrólise com pepsina em três níveis de variação e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios realizados aleatoriamente (Tabela 2).

A função-resposta (Y_1) foi expressa como g de colágeno em 100 g de isolado de colágeno. A partir da avaliação da função-resposta (Y_1) foram calculados os efeitos das variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3 e X_4) e suas interações. O ajuste do modelo aos dados experimentais foi verificado pela análise de variância da

regressão e pelo coeficiente de determinação (R^2). Todos os cálculos e a construção do gráfico das curvas de contorno foram realizados utilizando o programa STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

Tabela 2: Planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) com as variáveis independentes e função-resposta (Y_1) da extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno

Ensaio	Variáveis independentes e níveis de variação				Função resposta g de colágeno por 100 g
	X_1 mol de ácido acético L ⁻¹ (nível)	X_2 h de tratamento com ácido acético (nível)	X_3 % de pepsina (nível)	X_4 h de hidrólise com pepsina (nível)	Y_1 *
1	0,20 (-1)	12 (-1)	0,05 (-1)	12 (-1)	48,31 ±0,005
2	0,80 (+1)	12 (-1)	0,05 (-1)	36 (+1)	55,62 ±0,010
3	0,20 (-1)	36 (+1)	0,05 (-1)	36 (+1)	49,01 ±0,004
4	0,80 (+1)	36 (+1)	0,05 (-1)	12 (-1)	54,04 ±0,090
5	0,20 (-1)	12 (-1)	0,15 (+1)	36 (+1)	54,92 ±0,005
6	0,80 (+1)	12 (-1)	0,15 (+1)	12 (-1)	69,94 ±0,006
7	0,20 (-1)	36 (+1)	0,15 (+1)	12 (-1)	54,55 ±0,002
8	0,80 (+1)	36 (+1)	0,15 (+1)	36 (+1)	75,84 ±0,012
9 (C)	0,50 (0)	24 (0)	0,10 (0)	24 (0)	61,91 ±0,007
10 (C)	0,50 (0)	24 (0)	0,10 (0)	24 (0)	60,93 ±0,002
11 (C)	0,50 (0)	24 (0)	0,10 (0)	24 (0)	62,10 ±0,004

Função-resposta = g de colágeno por 100 g de isolado de colágeno.

*Médias e desvio padrão (n=3). C = ponto central.

4.4.3.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Para a otimização da extração e hidrólise para obtenção de isolado de colágeno foi aplicado o delineamento composto central rotacional (2^3) com cinco níveis de variação e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios que foram realizados aleatoriamente (Tabela 3). As variáveis independentes investigadas foram: X_5 (mol de ácido acético L⁻¹), X_6 (% de pepsina) e X_7 (h de hidrólise com pepsina).

A função-resposta (Y_2) foi expressa como g de colágeno em 100 g de isolado de colágeno. O ajuste do modelo aos dados experimentais foi verificado pela análise de variância da regressão e pelo coeficiente de determinação (R^2). Todos os

cálculos, o gráfico de curvas de contorno e os parâmetros de desejabilidade estimados foram realizados utilizando o programa STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004). Os parâmetros obtidos a partir do delineamento composto central rotacional (2^3) foram ajustados ao modelo conforme a equação 2:

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_5 X_5 + \beta_{55} X_5^2 + \beta_6 X_6 + \beta_{66} X_6^2 + \beta_7 X_7 + \beta_{77} X_7^2 + \beta_{56} X_5 \cdot X_6 + \beta_{57} X_5 \cdot X_7 + \beta_{67} X_6 \cdot X_7 + e$$

(Equação 1)

Onde:

Y_2 = função-resposta; x_5 , x_6 e x_7 = variáveis codificadas; β = coeficiente estimado para cada termo; e = resíduo.

Tabela 3: Delineamento composto central rotacional (2^3) com as variáveis independentes, níveis e respostas experimentais (Y_2) da extração e hidrólise para obtenção do isolado de colágeno.

Ensaio	Variáveis independentes e níveis de variação			Função resposta
	X_5 mol de ácido acético L ⁻¹ (nível)	X_6 % de pepsina (nível)	X_7 h de hidrólise com pepsina (nível)	g de colágeno por 100 g Y_2
1	0,5 (-1)	0,10 (-1)	18 (-1)	57,26 ±0,003
2	0,5 (-1)	0,10 (-1)	30 (+1)	58,07 ±0,001
3	0,5 (-1)	0,20 (+1)	18 (-1)	62,89 ±0,010
4	0,5 (-1)	0,20 (+1)	30 (+1)	63,61 ±0,005
5	0,9 (+1)	0,10 (-1)	18 (-1)	58,32 ±0,021
6	0,9 (+1)	0,10 (-1)	30 (+1)	58,39 ±0,002
7	0,9 (+1)	0,20 (+1)	18 (-1)	76,96 ±0,020
8	0,9 (+1)	0,20 (+1)	30 (+1)	77,75 ±0,006
9	0,3 (-1,68)	0,15 (0)	24 (0)	41,12 ±0,013
10	1,1 (+1,68)	0,15 (0)	24 (0)	50,76 ±0,007
11	0,7 (0)	0,05 (-1,68)	24 (0)	48,04 ±0,001
12	0,7 (0)	0,25 (+1,68)	24 (0)	81,68 ±0,056
13	0,7 (0)	0,15 (0)	12 (-1,68)	72,70 ±0,026
14	0,7 (0)	0,15 (0)	36 (+1,68)	74,63 ±0,005
15 (C)	0,7 (0)	0,15 (0)	24 (0)	75,17 ±0,037
16 (C)	0,7 (0)	0,15 (0)	24 (0)	74,80 ±0,011
17 (C)	0,7 (0)	0,15 (0)	24 (0)	75,00 ±0,016

Função resposta = g de colágeno por 100 g de isolado de colágeno.

*Médias e desvio padrão (n=3). C = ponto central.

4.4.3.2 Validação do modelo

O modelo proposto na otimização da extração e hidrólise para obtenção de isolado de colágeno foi validado com a realização em triplicata de um novo experimento e aplicando as condições otimizadas. Os resultados experimentais foram comparados com os estimados pelo modelo, utilizando o teste t de *Student* considerando $p < 0,05$.

4.4.4 Cálculo de rendimento de obtenção de isolado de colágeno e grau de purificação

O rendimento de obtenção do isolado de colágeno e o grau de purificação foram determinados após aplicação das condições ótimas de extração com ácido acético e hidrólise com pepsina. O rendimento em percentagem de obtenção do isolado de colágeno foi calculado como a relação entre massa (g) de isolado de colágeno final e massa (g) de túnica albugínea inicial multiplicado por 100. O grau de purificação foi calculado como a relação entre o conteúdo de colágeno (g por 100 g) do isolado de colágeno final e conteúdo de colágeno (g por 100 g) da túnica albugínea inicial.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNCIONAIS DO ISOLADO DE COLÁGENO DE TÚNICA ALBUGÍNEA

4.5.1 Composição Química

A composição química aproximada, do isolado de colágeno de túnica albugínea foi determinada conforme AOAC (2005) e o conteúdo de colágeno total foi determinado pelo teor do aminoácido hidroxiprolina conforme metodologia de Woessner (1961) multiplicado por 8,0 conforme Kolar (1990).

4.5.2 Perfil de aminoácidos

O perfil de aminoácidos em duplicata do isolado de colágeno foi realizado no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). A amostra previamente desengordurada foi pirolisada a 400°C por 8 h e hidrolisada em HCl 6N a 110°C por 22 h. Os aminoácidos foram derivados, separados e quantificados conforme método descrito por Bidlingmeyer *et al.* (1984) e Atherton (1989).

4.5.3 Propriedades funcionais do isolado de colágeno de túnica albugínea e do colágeno de pele bovina comercial

As propriedades funcionais do isolado de colágeno de túnica albugínea e do colágeno de pele bovina comercial foram determinadas e comparadas aplicando o teste t de *Student*, considerando $p < 0,05$.

A solubilidade em água à 70°C (TIMPL *et al.*, 1975) e conteúdo de colágeno solúvel (WOESSNER, 1961) foram determinados em triplicata e os resultados expressos como percentagem de colágeno solúvel em relação ao conteúdo de colágeno total da amostra. Uma suspensão de colágeno em água na proporção de 1:150 (p/v) foi homogeneizada em *turrax* por 1 min a 7000 rpm e aquecida em banho-maria à 70°C por 1 h. Após o aquecimento, a suspensão foi resfriada a temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 15.000 x g a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para determinar o conteúdo de colágeno solúvel. Os resultados foram expressos como percentagem de colágeno solúvel em relação ao conteúdo de colágeno total do isolado de colágeno de testículos de suínos imunocastrados.

A capacidade de retenção de água (CRA) à 60°C e 25°C foi realizada em triplicata, conforme método de Montero *et al.* (1995) e o resultado expresso como g de água retida por g de resíduo seco da amostra. Foi preparada uma suspensão de colágeno em água destilada na proporção de 1:30 (p/v) utilizando *turrax* a 7000 rpm por 1 min. Para a medida da capacidade de retenção de água a 60°C, o homogeneizado foi aquecido a 60°C por 30 min em banho-maria e então, resfriado a temperatura ambiente. As suspensões preparadas a 60°C e a 25°C foram

submetidas à agitação contínua a 100 rpm em incubadora refrigerada por 24 h à 4°C. Após foram centrifugadas a 18.000 x g durante 30 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi pesado e submetido a secagem em estufa à 105°C até peso constante, para determinar o conteúdo de resíduo seco. A capacidade de retenção de água foi calculada pela fórmula: CAA (g/g): (massa do precipitado úmido – massa do resíduo seco) / massa do precipitado úmido.

A capacidade emulsificante foi determinada em triplicata, conforme descrito por Montero & Borderías (1991) com substituição do ácido acético por água destilada para solubilização da amostra, e a proporção de amostra e água foi de 1:40 (m/v). Assim, 1,0 g de isolado de colágeno de testículos de suínos imunocastrados foi homogeneizado com 40 mL de água destilada utilizando *turrax* a 7000 rpm por 1 min. Esta mistura foi mantida sob agitação contínua a 100 rpm em incubadora refrigerada a 4°C por 24 h e então, centrifugada a 1.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi separado para preparar a emulsão e o precipitado foi descartado. No sobrenadante foi determinado o conteúdo de colágeno solúvel, seguindo método de Woessner (1961), o conteúdo de colágeno solúvel foi utilizado para calcular a capacidade emulsificante. Para preparar a emulsão, 5,0 g do sobrenadante contendo colágeno solúvel, 20,0 mL de água destilada e 4,2 g de óleo de milho foram misturados em homogeneizador *turrax* a 7000 rpm por 1 min, após este tempo foi adicionado óleo de milho em uma velocidade de 20,0 mL por min utilizando uma bureta e mantendo a agitação em 7000 rpm. O ponto de inversão da fase foi verificado através do aumento abrupto da resistência elétrica da emulsão registrado por um voltímetro, cujos eletrodos permaneceram imersos na emulsão. O volume de óleo de milho gasto foi utilizado para calcular a capacidade emulsificante, a qual foi expressa como g de óleo emulsificado por g de colágeno solúvel.

A estabilidade da emulsão foi verificada seguindo método de Ribeiro *et al.* (2009) em triplicata e o resultado foi expresso como percentagem de emulsão remanescente em relação à quantidade inicial de emulsão. Foi preparada uma suspensão contendo 1,0 g de colágeno, 10,0 mL de água destilada e 10,0 mL de óleo de milho em tubo de centrífuga com capacidade para 50 mL. Esta suspensão foi emulsificada em *turrax* a 12000 rpm por 2 minutos. A emulsão obtida foi aquecida em banho-maria a 80°C por 30 min e em seguida resfriada em água corrente por 15 min. O volume da camada emulsificada foi anotado e então, a emulsão foi

centrifugada a 1500 x g por 5 min. Após centrifugação, foi verificado o volume da camada de emulsão remanescente. A estabilidade da emulsão foi calculada pela expressão: $EE (\%) = (\text{volume da emulsão remanescente} / \text{volume de emulsão inicial}) \times 100$.

4.6 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS

Para a caracterização histológica da túnica albugínea foram coletados testículos de suínos imunocastrados no momento do abate em abatedouro comercial. As amostras de testículos foram refrigeradas e em seguida, a túnica albugínea foi removida manualmente. As amostras de túnica albugínea foram lavadas exaustivamente em água destilada e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24 h, sendo posteriormente transferidas para solução de álcool 70% onde permaneceram até o momento da realização das análises histológicas.

4.6.1 Coloração clássica com hematoxilina/eosina ou tricrômico de Masson

Para visualizar as fibras de colágeno na túnica albugínea foram aplicados os métodos clássicos de coloração com hematoxilina/eosina e tricrômico de Masson em amostras de túnica albugínea. Assim, cortes de túnica albugínea de aproximadamente 3 µm de espessura foram fixados em parafina e corados com os corantes hematoxilina/eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) ou com tricrômico de Masson (MASSON, 1952). Após a coloração, as fibras de colágeno presente na túnica albugínea foram visualizadas em microscópio óptico (Leica®) com objetiva de 100x e as imagens foram obtidas com o uso de uma câmera de vídeo conectada a um computador.

4.6.2 Imunohistoquímica

Para verificar a presença e a localização dos colágenos dos tipos I, III e IV foi aplicada a técnica de imunohistoquímica de acordo com BRACARENSE *et al.* (2012) utilizando os seguintes anticorpos: anticorpo de colágeno tipo I (Anti-Col1αI,

Sigma Aldrich), anticorpo de colágeno tipo III (Anti-Col3 α 1, Sigma Aldrich) e anticorpo de colágeno tipo IV (Anti-Col4 α 3, Sigma Aldrich).

Basicamente, cortes de túnica albugínea de aproximadamente 3 μ m de espessura foram desparafinados com xileno e desidratados em uma seção de álcool de diferentes graduações, em seguida foi realizado a recuperação do antígeno utilizando tampão de citrato pH 6,0 e aquecimento em forno micro-ondas com potência de 750 W durante 15 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação em solução de metanol e peróxido de hidrogênio na ausência de luz. Em seguida, foi realizada a incubação em separado, dos anticorpos de colágeno na diluição de 1:100 (Anti-Col1 α 1, Anti-Col3 α 1 e Anti-Col4 α 3) durante 12 horas a 4°C. Após a incubação, o anticorpo secundário foi aplicado e para finalizar foi adicionado o cromógeno (3,3-diaminobenzidina). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e finalmente montadas em lamínulas de vidro utilizando um meio de montagem permanente. A análise digital das imagens foi realizada utilizando um microscópio óptico (Leica[®]) conectado a um computador e uma câmera de vídeo. A marcação positiva do anticorpo foi considerada pela visualização de fibras de colágeno na cor marrom em um fundo azul.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE COLÁGENO DA TÚNICA ALBUGÍNEA DE TESTÍCULOS DE SUÍNOS IMUNOCASTRADOS

Os tipos de colágeno presente na túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados foram investigados por extração e hidrólise do colágeno seguido de fracionamento salino com cloreto de sódio (NaCl).

4.7.1 Extração e hidrólise de colágeno de túnica albugínea

A túnica albugínea limpa e preparada conforme item 4.4.1 foi submetida a extração com ácido acético 0,83 mol L⁻¹ na proporção de 1:10 (m/v) por 12 h a 4°C com agitação contínua em incubadora refrigerada. Ao final do tratamento com ácido acético, a mistura foi homogeneizada em *turrax* por 10 min a 5000 x *g*, em seguida foi realizado a hidrólise com adição de 0,24% de pepsina por 28 h a 4°C com agitação contínua em incubadora refrigerada. O material obtido foi centrifugado a 10000x *g* durante 30 min a 4°C, o precipitado obtido (P) foi descartado e o

sobrenadante (S) contendo o colágeno hidrolisado foi submetido ao fracionamento salino com NaCl em pH ácido (2,5) ou neutro (7,5) para separação das frações de colágeno e, posterior identificação dos tipos de colágeno por eletroforese.

4.7.2 Precipitação salina fracionada e separação das frações de colágeno

A separação das frações de colágeno da túnica albugínea foi realizada por precipitação salina fracionada em pH ácido (2,5) ou neutro (7,5) e seguiu recomendações de Shimokomaki *et al.* (1981).

Para o fracionamento salino com NaCl em pH 2,5 o pH do sobrenadante (S) foi ajustado para 2,5 com HCL 1,0 mol L⁻¹ e adicionou-se NaCl até concentração de 0,7 mol L⁻¹ com agitação contínua a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000x g durante 30 min a 4°C e foi obtido o sobrenadante S_{0.7} e o precipitado P_{0.7}. No sobrenadante S_{0.7} a concentração de NaCl foi aumentada para 1,2 mol L⁻¹ com agitação contínua a 4°C, seguido de centrifugação sob as mesmas condições e foi obtido o sobrenadante S_{1.2} e precipitado P_{1.2}. Seguindo o mesmo procedimento, o fracionamento salino foi realizado com o aumento da concentração de NaCl para 1,8 mol L⁻¹ e em seguida para 2,0 mol L⁻¹ para obter os sobrenadantes S_{1.8} e S_{2.0} e os precipitados P_{1.8} e P_{2.0}.

Para o fracionamento salino com NaCl em pH 7,5 uma alíquota do precipitado P_{0.7} foi homogeneizado com solução de Tris-base 0,05 mol L⁻¹ e NaCl 1,0 mol L⁻¹ e o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0 mol L⁻¹ ou HCL 1,0 mol L⁻¹. Após a neutralização do pH, foi adicionado NaCl até concentração de 1,5 mol L⁻¹ com agitação contínua a 4°C, seguido de centrifugação a 10000 x g durante 30 min a 4°C e obteve -se o sobrenadante S_{1.5} e o precipitado P_{1.5}. No sobrenadante S_{1.5} a concentração de NaCl foi aumentada até 2,0 mol L⁻¹ com agitação contínua a 4°C, seguido de centrifugação sob as mesmas condições e foi obtido o sobrenadante S_{2.0} e precipitado P_{2.0}. Seguindo o mesmo procedimento, o fracionamento salino foi realizado com o aumento da concentração de NaCl para 3,5 mol L⁻¹ para obter o sobrenadante S_{3.5} e o precipitado P_{3.5}.

Todos os precipitados P_{0.7}, P_{1.2}, P_{1.8} e P_{2.0} em pH 2,5 e P_{1.5}, P_{2.0} e P_{3.5} em pH 7,5 foram liofilizados, pesados para estimar a percentagem de extração e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os precipitados obtidos na precipitação salina fracionada foram analisadas por eletroforese dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguindo recomendações de Shimokomaki *et al.* (1980) e Tanaka & Shimokomaki (1996). Foram preparadas amostras com e sem adição de β -mercaptoetanol, o qual foi adicionado para hidrolisar as ligações dissulfeto da molécula de colágeno.

Foram pesadas 6 mg de cada precipitado e adicionado 1 mL de dodecil sulfato de sódio 2%. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão da amostra contendo 2% de glicerol, 1% mL de Tris-HCl 0,6 mol.L⁻¹ pH 6,8, 0,1% de azul de bromofenol e 2% de dodecil sulfato de sódio 10%. No caso das amostras desnaturadas, após a diluição em 1 mL de dodecil sulfato de sódio 2% foi adicionado tampão contendo 0,5% de β -mercaptoetanol.

Todas as amostras, com e sem β -mercaptoetanol foram aquecidas a 60°C por 30 min em banho-maria, resfriadas e aplicadas em gel de poliacrilamida. O gel de poliacrilamida foi preparado com concentração de 5% de acrilamida na porção separadora e 4% na porção empilhadora. Foram aplicados 10 μ L de marcador de peso molecular (10 – 220 kDa), 10 μ L de padrão de colágeno Tipo I de cauda de rato e 10 μ L de cada amostra com e sem β -mercaptoetanol.

As condições da corrida foram 100 V, 25 mA e 5 W por 4 h utilizando fonte de eletroforese. Após a corrida, o gel foi corado por 12 h com Coomassie blue G-250 0,1% dissolvido em água destilada, metanol e ácido acético (9:9:2 v/v/v) e descorado em solução de água destilada, metanol e ácido acético (8:1:1 v/v/v).

REFERÊNCIAS

ABIPECS, Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatório Abipecs 2012 – 2013**. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf. Acesso em 11/08/2013.

ALVES, S. G. T., PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H. Functional properties of collagenous material chicken feet. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, p.289-293, 2002.

AOAC, 2005. **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**, 18 ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland, United States.

AIRE, T. A., OZEGBE, P. C. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **Journal of Anatomy**, v.210, p.731–740, 2007.

ATHERTON, D. Successful PTC amino acid analysis at the picomol level. In: HUGLY, T. E (eds.) **Techniques in Protein Chemistry**. San Diego: Academic Press, Inc, p.273-283, 1989.

BABOL, J. SQUIRES, E. J. GULLETTB, E. A. Investigation of factors responsible for the development of boar taint. **Food Research International**, v.28, n.6, p.573-581, 1996.

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

BAILEY, A. J., SIMS, T. J., DUANCE, V. C., LIGHT, N. D. Partial characterization of a second basement membrane collagen in human placenta. **Febs Letters**, v.99, n.2, 1979.

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

BALIAN, G., BOWES, J. H. The structure and properties of collagen. In WARD, A. G., COURTS, A. (eds.), **The science and technology of gelatin**. London: Academic Press, p.1–30, 1977.

BENJAKUL, S., THIANILAKUL, Y., VISESSANGUAN, W., ROYTRAKUL, S., KISHIMURA, H., PRODPRAN, T., MEESANE, J. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). **Journal Science Food Agriculture**, v.90, p.132-138, 2010.

BIDLINGMEYER, B.A., COHEN, S.A., TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v.336, p.93-104, 1984.

BIRK, D.E., FITCH, J.M., BABIARZ, J.P., LINSENMAYER, T.F. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. **The Journal of Cell Biology**, v.106, p.999–1008, 1988.

BONNEAU, M. Use of Entire Males for Pig Meat in the European Union. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 257-272, 1998.

BONNEAU, M., WALSTRA, P., CLAUDI-MAGNUSSEN, C., KEMPSTER, A.J., TORNBERG, E., FISCHER, K., DIESTRE, A., SIRET, F., CHEVILLON, P., CLAUS, R., DIJKTERHUIS, G.B., PUNTER, P., MATTHEWS, K.R., AGERHEM, H., BEAGUE, M. P., OLIVER, M.A., GISPERS, M., WEILER, U., VON, SETH G., LEASK, H., FONT, I., FURNOLS, M., HOMER, D.B., COOK, G.L. An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: IV. Simulation studies on consumer dissatisfaction with entire male pork and the effect of sorting out carcasses on the slaughter line, main conclusions and recommendations. **Meat Science**, v.54, p.285-295, 2000.

BRASIL. Circular nº 47. Ementa: Autorização para abate de suínos não castrados. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1988.

BRASIL. Decreto nº 30.691. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p.10.785. Seção, n.1, 1952.

BRUCKNER-TUDERMAN L., SCHNYDER U. W., WINTERHALTER K. H. BRUCKNER, P. Tissue form of type VII collagen from human skin and dermal fibroblasts in culture. **European Journal of Biochemistry**, v.165, p.607–611, 1987.

BUENO, R. V. C. C. **Efeito da fibra de colágeno na qualidade funcional de “cooked frozen beef”**. 2008. 107 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHACON-ARELLANO, J. T., WOOLLEY, D. M. Smooth muscle cells in the testicular capsule of the horse, pig and sheep. **Journal of Anatomy**, v.131, n.2, p.263-273, 1980

CHAPMAN, J. A., TZAPHLIDOU, M., MEEK, K. M., KADLER, K. E. The collagen fibril – a model system studying the staining and fixation of a protein. **Electron Microscopy Reviews**, v.3, p.143-182, 1990.

CHENG, F.Y., HSU, F.W., CHANG, H.S., LIN, L.C., SAKATA, R. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food Chemistry**, n.113, p.563–567, 2009.

CIPOLLI, K. M. V. A. B. **Imunocastração e seus efeitos nas características sensoriais, físicas e químicas da carne suína**. 2012. 192 p. Tese (Doutorado em

Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CLAUS, R., WEILER, U., HERZOG, A. Physiological aspects of androstenedione and skatole formation in the boar: a review. **Meat Science**, v.38, p.289-305, 1994.

COPENHAVER, W. M., KELLY, D. E., WOOD, R. L. **Bailey's Textbook of Histology**. Chapter 19, The Male Reproductive System. Williams E Wilkins Company, 17 ed., USA, 1978.

DUNSHEA, F. R., COLANTONI, C., HOWARD, K., MCCAULEY, I., JACKSON, P., LONG, K. A., LOPATICKI, S., NUGENT, E. A., SIMONS, J. A., WALKER, J., HENNESSY, D. P. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2524-2535, 2001.

DUNSHEA, F.R., D'SOUZA, D.N., PETHICK, D.W. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. **Meat Science**, v.71, p.8-38, 2005.

FESSLER, L. I., BROSH, S., CHAPIN, S., FESSLER, J. H. Tyrosine sulfation in precursors of collagen V. **Journal Biol. Chem.** 261 (1986) 5034– 5040.

FLEISCHMAJER, R., MACDONALD, E.D., PERLISH, J.S., BURGESSON, R.E., FISHER, L.W. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. **Journal of Structural Biology**, v.105, p.162-169, 1990.

FOX, M.A. Novel roles for collagens in wiring the vertebrate nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**, v.20, p.508-513, 2008.

GARDENAL, I. Veterinária testa aceitação de carne de suíno imunocastrado. **Jornal da Unicamp**, Campinas, 12 de julho de 2010, ano XXIV, nº468. Vida acadêmica, página 10. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/julho2010/ju468_pag11.php. Acesso: 10/11/2013.

GELSE, K., POSCHL E., AIGNER T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p.1531–1546, 2003.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., TURNAY, J., FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D., ULMO, N., LIZARBE, M.A., MONTERO, P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.25-34, 2002.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1813-1827, 2011.

GOWER, D. B. 16-unsaturated C19 steroids: a review of their chemistry, biochemistry and possible physiological role. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.3, p.45-103, 1972.

HERMANSSON, A.M. Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. Effect on texture of a meat product. **Journal of Food Science**, v.40, p.611-614, 1975.

HODGES, R. D. **The Histology of the Fowl**. London: Academic Press, 1974.

JAROS, P., BÜRGI, E., STÄRK, K.D.C., CLAUS, R., HENNESSY, D., THUN, R. Effect of active immunization against GnRH on androstenedione concentration, growth performance and carcass quality in intact male pigs. **Livestock Production Science**, v.92, p.31-38, 2005.

JUNQUEIRA C. U., JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 65-100, 1990.

KEENE, D.R., ENGVALL, E., GLANVILLE, R. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. **The Journal of Cell Biology**, v.107, p.1995–2006, 1988.

KENNEY, P. B., KASTNER, C. L., KROPF, D. H. Raw and pre-heated epimysium and gelatin affect properties of low-salt, low-fat, restructured beef. **Journal of Food Science**. v.57, n.3, p.551-444, 1992.

KITTIPHATTANABAWON, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., KISHIMURA, H., SHAHIDI, F. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). **Food Chemistry**, v.119, p.1519–1526, 2010.

KOCH, M. SCHULZE, J., HANSEN, U., ASHWODT, T., KEENE D.R., BRUNKEN, W.J., BURGESSON, R.E., BRUCKNER-TUDERMAN, L. A novel marker of tissue junctions collagen XXII. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.22514-22521, 2004.

KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMK collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.73, 54-57, 1990.

KOTCH, F. W., RAINES, R. T. Self-assembly of synthetic collagen triple helices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.9, p.3028-3033, 2006.

KUHN, K. The collagen family-variations in the molecular and supermolecular structure. **Rheumatology**, v.10, p.29-69, 1986.

KWAN, A.P.L., DICKSON, I.R., FREEMONT, A.J., GRANT, M.E. Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. **The Journal of Cell Biology**, v.109, p.1849– 1856, 1989.

LEE, C. H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.221, p.1-22, 2001.

LEESON, T. S., COOKSON, F. B. The mammalian testicular capsule and its muscle elements. **Journal of Morphology**, v.144, 237-254, 1974.

LIN, Y. K., LIU, D. C. Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species. **Food Chemistry**, v.99, 244–251, 2006.

MASSON, P. J. Trichrome Stainings and their Preliminary Techniques. **J. Tech. Met.**, v.12, p.75, 1929.

MENDLER, M., EICH-BENDER, S.G., VAUGHAN, L., WINTERHALTER, K.H., BRUCKNER, P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. **The Journal of Cell Biology**, v.108, p.191–197, 1989.

MONTERO P., BORDERIAS, J. Emulsifying Capacity of Collagenous Material from the Muscle and Skin of Hake (*Merluccius merluccius* L.) and Trout (*Salmo irideus* Gibb): Effect of pH and NaCl Concentration. **Food Chemistry**, v.41, p.251-267, 1991.

MONTERO, P., ALVAREZ, C., MARTÍ, M. A., BORDERÍAS, A. J. Plaice Skin Collagen Extraction and Functional Properties. **Journal of Food Science**, v.60, p.1–3, 1995.

MURALIDHARAN, N., SHAKILA, R. J., SUKUMAR, D., JEYASEKARAN, G. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. **Journal of Food Science and Technology**, v.50, n.6, 1-8, 2013.

NALINANON, S., BENJAKUL, S., KISHIMURA, H., OSAKO, K. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. **Food Chemistry**, v.125, p.500–507, 2011.

OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: no caminho da pesquisa**. 2 ed., Cocal do Sul: IMPRINT, 2002.

PATTERSON, R. S. 5 α -androst-16 ene-3-ona: compound responsible for boar taint in boar fat. **Journal of Science Food Agriculture**, v.19, p.31, 1968.

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

RIBEIRO, H. J. S. DE S., PRUDENCIO, S. H., MYAGUI, D. T., RIBEIRO, E. L. DE A. Characterization of protein concentrates from new and aged dry black common beans, lapar 44 cultivar. *Food Science and Technology*, v.29, p.571-580, 2009.

RICARD-BLUM, S. The Collagen family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. January, 3:a004978, p.1-19, 2011.

ROSS, M. H., PAWLINA, W. **Histologia: Texto e Atlas**. Lippincott Williams & Wilkins, 6ed., 906 p., 2010

SADOWSKA, M., KOODZIEJSKA, L., NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, v.83, p.257–262, 2003.

SATO, K., YOMOGIDA, K., WADA, T., YORIHUZI, T., NISHIMUNE, Y., HOSOKAWA, N., NAGATA, K. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.37678–37684, 2002.

SEIFERT, J. **Collagen hydrolysate and its biological value**. In: ADAM, M. et al. Collagen Hydrolysate and its Relationship to Joint Health - A Scientific Compendium, Publisher: GELITA Health Initiative, 1st edition, 2004, chap: 3, p.44- 56. Disponível em: <www.gelita-health-initiative.com>.

SHIMOKOMAKI, M., DUANCE, V. C., BAILEY, A. J. Identification of a new disulfide bonded collagen from cartilage. **Febs Letters**, v.121, n.1, p.51 – 54, 1980.

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

SHON, J., E.O, J-H., HWANG, S. J., EUN, J-B. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja Kenojei*) skins. **Food Science Biotechnology**, v.20, p.99-106, 2011.

SHOULDERS, M.D., RAINES, R.T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v.78, p.929-958, 2009.

SILVEIRA, E. T. F., POLEZE, E. OLIVEIRA, F. T. T., TONIETTI, A. P., ANDRADE, J. C., HAGUIWARA, M. M. H., MIYAGUSKU, L., HENNESSY, D. Vaccination of boars with a GnRF vaccine (Improvac[®]) and its effects on meat quality. In: International Pig Veterinary Society Congress, Durban. **Proceedings...** n.20, p. 89, 2008.

SMITH, J.W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**. v.219, p.157-63, 1968.

STATSOFT. Inc. Corporate, 2004. **STATISTICA** (data analysis software), version 7. Tulsa, Oklahoma, USA.

SU, J., GORSE, K., RAMIREZ, F., FOX, M.A. Collagen XIX is expressed by interneurons and contributes to the formation of hippocampal synapses. **Journal of Comparative Neurology**, v.518, p.229-253.

TANAKA, M. C. Y., SHIMOKOMAKI, M. Collagen Types in Mechanically Deboned Chicken Meat. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p.215-225, 1996.

THUN, R., GAJEWSKI, Z, JANETT, F. Castration in male pigs: techniques and animal welfare issues. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.57, p.189-94, 2006.

TIMPL R., GLANVILLE R. W., NOWACK H., WIEDEMANN H., FIETZEK P. P., KÜHN K. Isolation, chemical and electron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen and procollagen from fetal bovine skin. **Hoppe Seylers Z. Physiology Chemistry**, v.356, p.1783-1792, 1975.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**. v.70, p.493-508, 2005.

URIARTE-MONTOYA, M. H., ARIAS-MOSCOSO, J. L., PLASCENCIA-JATOMEA, M., SANTACRUZ-ORTEGA, H., ROUZAUD-SÁNDEZ, O., CARDENAS-LOPEZ, J. L., MARQUEZ-RIOS, E., EZQUERRA-BRAUER, J. M. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms. **Bioresource Technology**, v.101, p.4212–4219, 2010.

VAN DER REST, M., MAYNE, R., NINOMIYA, Y., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., OLSEN, B.R. The structure of type IX collagen. **The Journal of Biological Chemistry**. v.260, p.220–225, 1985.

VON DER MARK, K. Localization of collagen types in tissues. **International Review of Connective Tissue Research**, v. 9, p. 265 – 324, 1981.

WANG, C.R, ZAYAS, J.F. Comparative study of com germ and soy proteins utilization in comminuted meat products, **Journal of Food Quality**, v.15,n.2, p.153-158.

WANG , L., YANG, B., DU, X., YANG, Y., LIU, J. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. **Innovative of Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.604–607, 2008.

WOESSNER Jr., J. F. The determination of hidroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.93, p.440-447, 1961.

WOO, J. W., YUA, S. J., CHOB, S. M., LEEA, Y. B., KIMA, S. B. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.879–887, 2008.

WU, J.-J., EYRE, D.R. Structural analysis of cross-linking domains in cartilage type XI collagen. . **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.18865– 18870, 1995.

XIONG, Y. L. Collagen. In: **Food Proteins and their applications**. DAMODARAM, S. (ed.). Taylor & Francis, 1997. p. 356-358.

YAMAGUCHI, N., MAYNE, R., NINOMIYA, Y. The alpha 1 (VIII) collagen gene is homologous to the alpha 1 (X) collagen gene and contains a large exon encoding the entire triple helical and carboxyl-terminal non-triple helical domains of the alpha 1 (VIII) polypeptide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.4508-4513, 1991.

YAN, M., BAFANG LI, B., ZHAO, X., REN, G., ZHUANG, Y., HOU, H., ZHANG, X., CHEN, L., FAN, Y. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v.107, p.1581–1586, 2008.

ZAMARATSKAIA, G., RYDHMERB, H., ANDERSON, K. H., CHEN, G., LOWAGIE, S., ANDERSON, K., LUNDSTRÖN, K. Long-term effect of vaccination against gonadotropinreleasing hormone, using Improvac[®] on hormonal profile and behaviour of male pigs. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.37-48, 2008.

ZENG, S-H-K., ZHANG, C-H., LIN, H., YANG, P., HONG, P-Z., JIANG, Z. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v.116, p.879–883, 2009.

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

ZHANG, Y., LIU W., LI, G., SHI, B., MIAO, Y., WUB, X. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, v.103, p.906–912, 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados e Discussão desta Tese foram redigidos na forma de dois Artigos Científicos, os quais estão apresentados a seguir.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: OPTIMUM CONDITIONS FOR EXTRACTING COLLAGEN FROM THE TUNICA ALBUGINEA OF IMMUNOLOGICALLY CASTRATED PIG TESTES AND THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE ISOLATED COLLAGEN

O artigo apresentado a seguir foi preparado de acordo com as normas do periódico científico *Meat Science*, ao qual foi submetido e aceito para publicação.

OPTIMUM CONDITIONS FOR EXTRACTING COLLAGEN FROM THE TUNICA ALBUGINEA OF IMMUNOLOGICALLY CASTRATED PIG TESTES AND THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE ISOLATED COLLAGEN

Gislaine Silveira Simões^a, Expedito Tadeu Facco Silveira^{b,+}, Simone Raymundo de Oliveira^b, Evandro Poleze^d, Jim R. D. Allison^e, Elza Iouko Ida^{a*}, Massami Shimokomaki^{a,c}

^aLondrina State University, Department of Food Science and Technology, Londrina, Paraná, Brazil, CEP: 86.057-970

^bMeat Technology Center, Institute of Food Technology, Campinas, Sao Paulo, Brazil, CEP: 13.070-178

^cFederal Technological University of Paraná, Londrina, Paraná, Brazil, CEP: 86.036-370

^dPfizer Animal Health, Brazil

^ePfizer Animal Health, Florham Park, New Jersey, U.S.A

⁺In memoriam

*Corresponding author. Tel +55-43-33714080. Email address: elida@uel.br

Abstract

This study evaluated alternative methods for extracting collagen from the tunica albuginea of pig testes and characterized the functional properties of the isolated collagen. Using the statistical tools of factorial design (2^{4-1}) and a central composite rotatable design (2^3), it was concluded that the best conditions were 0.83 molL^{-1} acetic acid, 0.24% pepsin and 28 h of hydrolysis to isolate 82.54 g of collagen per 100 g of sample. This purified collagen presented improved functional properties in relation to bovine skin collagen, including water solubility, water-holding capacity, emulsifying capacity and emulsion stability. These results suggested that isolated collagen from the tunica albuginea can be used in pharmaceutical and food emulsion products.

Keywords: factorial design, central composite rotatable design, hydroxyproline, collagen emulsified products.

1. Introduction

Collagen is the dominant and ubiquitous protein in the body and accounts for approximately 30% of total vertebrate protein. The term collagen describes a family of at least 28 protein isoforms (Ricard-Blum, 2011). Overall, collagen has been extracted from mammals, particularly cattle and pig skin, for food, cosmetics, and

medical products and is often treated with pepsin to increase the solubility and maximize extraction. Treatment with pepsin is necessary to digest the crosslinking sites of the protein because the triple helix structure protects collagen against this enzymatic activity. The presence of collagen crosslinking stabilizes the protein as the animal ages because the immature collagen crosslink, hydroxylysinoketonorleucine (HLKLN), is later biologically replaced by the main mature crosslink derived from two reducible HLKLN, forming pyridinoline (PYR), which stabilizes the collagen molecules and increases the meat texture (Robins, Shimokomaki and Bailey, 1973; Coró, Youssef and Shimokomaki, 2002). PYR bridges different types of collagen and further stabilizes the extra cellular macromolecular organization (Shimokomaki et al., 1990). Initially, pepsin digestion was used in various methods to isolate a new collagen type from pig cartilaginous tissue, known as type IX (Shimokomaki, Duance, and Bailey, 1980). Pepsin digestion was also used to identify different collagen types as I, II, III and V from the mechanically deboned chicken meat, and type I was found to be the major component (Tanaka & Shimokomaki, 1996). Recently, there has been a growing interest in evaluating industrial byproducts; thus, there have been many studies on the extraction of collagen from different animal sources (Alves & Prudêncio-Ferreira, 2002; Sadowska, Koodziejska, Niecikowska, 2003; Nalinanon, Benjakul, Kishimura and Osako, 2011; Wang et al., 2008; Woo et al., 2008; Yan et al., 2008; Benjakul et al., 2010; Shon, Eo, Hwang and Eun, 2011).

The immunological castration of male pigs is an alternative to surgical castration and enhances animal welfare preventing the development of the androsterone and skatole hormones, which cause an undesirable meat odor (Claus, Weiler and Herzog, 1994; Silveira et al., 2008). Brazil produces over 10 million immunologically pigs and the testis is quantitatively becoming an important economical sub product, representing around 0.3% to 0.6% of the carcass weight (Silveira et al., 2008) and currently it is removed during slaughter subsequently discarded. Pig testes are surrounded by a capsule of dense connective tissue called the tunica albuginea, which is characterized by a resistant tissue composed of collagen fibers (Copenhaver, Kelly, and Wood, 1978).

The aim of this work was to optimize the extraction and pepsin hydrolysis conditions for purifying collagen from the tunica albuginea of pig testes and to characterize the chemical and functional properties of the isolated collagen.

2. Material and Methods

2.1 Materials and reagents

Immunologically crosses of 110 to 115 kg Landrace and Large White pigs were slaughtered in a commercial pig slaughterhouse located in the São Paulo state countryside, and the testes samples were removed and frozen for collagen extraction. Only the tunica albuginea, which was manually removed from the testes, was used for collagen production. The Figure 1 shows the location of the tunica albuginea in the testes. The reagents were from different origins and of analytical grade purity.

2.2 Chemical composition and collagen content determination

The physicochemical composition of pig testes, tunica albuginea and the isolated collagen was determined in a dry matter basis according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). The collagen content of pig testes, tunica albuginea and the isolated collagen was determined by the amino acid hydroxyproline concentration according to the methodology of Woessner (1961) multiplied by a factor 8.0, as described by Kolar (1990). Student's t test was used to determine the differences the chemical composition means of the testes and the tunica albuginea, and $p < 0.05$ was adopted as the threshold of statistical significance.

2.3 Removal and preparation of the tunica albuginea

The tunica albuginea was manually removed from the testes, thoroughly washed in distilled water and carefully cut into cubes. Then, the collagen was prepared by immersing 10 g of tunica albuginea in 100 mL of distilled water and continuously stirring the immersion in a refrigerated incubator (Shaker, Marconi, São Paulo, Brazil) at 4°C for 48 h, with several water changes daily. To remove other proteins and contaminating components, the distilled water was replaced with 100 mL of 0.05 mol L⁻¹ Tris-base and 1.0 mol L⁻¹ NaCl (pH 7.5) solution under continuous

stirring in a refrigerated incubator at 4°C for 48 h, and the solution was changed daily. At the end of treatment, the solution was removed and the tunica albuginea was hydrolyzed with pepsin.

2.4 Pepsin hydrolysis conditions

To obtain isolated collagen (IC), it was examined the effect of the pepsin hydrolysis extraction conditions in an acetic acid solution using the factorial design (2^{4-1}) with four independent variables (X_1 = acetic acid concentration mol L⁻¹, X_2 = time of acetic acid treatment, X_3 = pepsin percentage and X_4 = time of pepsin hydrolysis) at three variation levels, with three replicates at the central point for a total of 11 assays (Table 2), which were performed randomly.

Collagen extraction was performed as described in Shimokomaki, Duance and Bailey (1980). In each assay, a 1:10 ratio of the tunica albuginea mass per mL of acetic acid solution, expressed as mol L⁻¹ (X_1), was used, and the acetic acid treatment was performed for different time periods, expressed in hours (X_2) and the pH values of this solution varied from 2.0 to 2.5. At the end of the defined time period, the mixture was homogenized for 10 min in a turrax homogenizer (Marconi São Paulo, Brazil). Then, a percentage of pepsin (X_3) was added (Sigma E.C. 3.4.23.1 pepsin), and the hydrolysis was performed for different time periods, expressed in hours (X_4). The extraction and hydrolysis were carried out in refrigerated incubator (Shaker, Marconi, São Paulo, Brazil) at 4°C with continuous stirring. After pepsin hydrolysis, the pH was adjusted to 7.5 using 1.0 mol L⁻¹ NaOH to inactivate the pepsin activity. The material was centrifuged (Eppendorf centrifuge, Hamburg, Germany) for 30 min at 10000 x g at 4°C, and the precipitate (P_1) was discarded. The supernatant (S_1) was subjected to saline precipitation with 3.0 mol L⁻¹ NaCl and was centrifuged for 30 min at 10000 x g and 4°C. The supernatant (S_2) was discarded, and the precipitate (P_2) was dialyzed in a 0.5 mol L⁻¹ acetic acid solution for 72 h at 4°C; the solution was replaced daily. The gelatinous precipitate was lyophilized (Christ Alpha lyophilizer, Osterode am Harz, Germany), resulting in the isolated collagen (IC), as shown in Figure 2.

The response function (Y_1) was expressed as g of collagen in 100 g of IC. Based on the evaluation of the response function (Y_1), the main effects of the

independent variables (X_1 , X_2 , X_3 and X_4) and the interactions of the variables were calculated and the contour curves were performed using STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. Corporate Tulsa, OK, EUA) (Statsoft, 2004).

2.5 Optimal conditions for the extraction and hydrolysis to obtain the isolated collagen (IC)

The optimization of the extraction and hydrolysis conditions to obtain the IC was performed after the analysis of the independent variable effects X_1 , X_2 , X_3 and X_4 and interactions. To implement this optimization, a new experiment was performed by applying a central composite rotatable design (CCRD) (2^3) with five variation levels and three replicates at the central point for a total of 17 assays (Table 4), which were conducted randomly. The following independent variables were evaluated: X_5 (mol L⁻¹ acetic acid), X_6 (pepsin percentage) and X_7 (h of pepsin hydrolysis).

Collagen extraction with acetic acid and pepsin hydrolysis was performed as described by Shimokomaki, Duance and Bailey (1980). For each assay, a ratio of 1:10 tunica mass per mL of mol L⁻¹ acetic acid solution (X_5) was used, and the acetic acid treatment time was fixed at 12 h. At the end of this time period, the mixture was homogenized for 10 min in turrax homogenizer (Marconi São Paulo, Brazil). Then, a percentage of pepsin (X_6) was added and the hydrolysis was performed for different periods of time, measured in hours (X_7). The extraction and hydrolysis were performed in a refrigerated incubator (Shaker, Marconi, São Paulo, Brazil) at 4°C with continuous stirring. The other procedures for IC isolation were performed as described in section 2.4 and shown Figure 2.

The response function (Y_2) was expressed as g of collagen in 100 g of IC. The model fit to the experimental data was verified by analysis of variance (ANOVA) and the coefficient of determination (R^2). The contour curves were plotted, and the desirability parameters were estimated using STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. Corporate Tulsa, OK, EUA) (Statsoft, 2004). The responses obtained through the CCRD (2^3) (Table 4) were fit to the model according to equation 1:

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_5 X_5 + \beta_{55} X_5^2 + \beta_6 X_6 + \beta_{66} X_6^2 + \beta_7 X_7 + \beta_{77} X_7^2 + \beta_{56} X_5 \cdot X_6 + \beta_{57} X_5 \cdot X_7 + \beta_{67} X_6 \cdot X_7 + e$$

(Equation 1)

where Y_2 = response function; x_5 , x_6 and x_7 = coded variables; β = estimated coefficient, e = residual (experimental error).

2.6 Model validation

The proposed model for the optimization of the extraction and hydrolysis conditions for IC isolation was validated in triplicate under the completion of a new experiment with the optimized conditions. The experimental results were compared with those estimated by the model using Student's t test ($p < 0.05$).

2.7 Yield and degree of purification the isolated collagen

The yield of the IC and the degree of purification were determined after applying the optimal extraction method with pepsin. The yield was calculated as the ratio between the weight (g) of the IC and the initial weight (g) of the tunica albuginea multiplied by 100. The degree of purification was calculated as the ratio between of collagen content of the IC (g per 100 g) and collagen content (g per 100 g) of the tunica albuginea.

2.8 Amino acid profile of isolated collagen

The IC amino acid profile was determined in duplicate at the Protein Chemistry Center, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto (FMRP-USP). The sample was previously defatted and pyrolyzed at 400°C for 8 h and hydrolyzed with HCl 6.0 mol L⁻¹ at 110°C for 22 h. The amino acid derivatives were separated and quantified according to the method described by Bidlingmeyer, Cohen and Tarvin (1984) and Atherton (1989).

2.9 Determination of the functional properties of the isolated collagen in comparison to bovine skin collagen

The functional properties analysed in the IC and in the bovine skin collagen (NovaProm Food Ingredients Ltda, São Paulo, Brazil) were as follows: water solubility at 70°C, water-holding capacity at 25°C and 60°C, emulsifying capacity and emulsion stability. All analyses were performed in triplicate and the difference between means was determined by Student's t test ($p < 0.05$).

The water solubility at 70°C (Timpl et al., 1975) and the soluble collagen content (Woessner, 1961) were determined and the results were expressed as a percentage of soluble collagen compared to the total sample collagen content. The water-holding capacity (WHC) at 25°C and 60°C was evaluated following the method of Montero, Alvarez, Martí and Borderías (1995), and the results were expressed as g of water held per g of dry sample. The emulsifying capacity was assessed following the method of Montero & Borderías (1991), substituting acetic acid for distilled water to solubilize the sample, and the ratio of sample to water was 1:40 (w/v). The emulsifying capacity was expressed as mL of emulsified oil per mg of soluble collagen. The stability of the emulsion was evaluated following the method of Ribeiro, Prudencio, Myagui, and Ribeiro (2009).

The pH values were determined in triplicate using a pH meter (Mettler Toledo, Switzerland) after homogenization of 1 g of sample in 10 mL of distilled water.

3. Results and Discussion

3.1 Proximate chemical composition

Table 1 shows the proximate chemical composition of the testes and tunica albuginea. The tunica albuginea presented approximately twice as much collagen, representing the totality of the tissue protein fraction because of the structural and protective role surrounding the testes (Copenhaver, Kelly and Wood, 1978). Conversely, the testes showed a higher amount of moisture, but the lipid and ash contents were not significantly different ($p > 0.05$). The collagen content of the

skin, tendons, bones and stomachs of mammals varies from 15% to 95% (Balian & Bowes, 1977; Bailey & Light, 1989). The comparison of the chemical composition of the tunica albuginea with calf skin and pig skin showed that the moisture contents of these tissues were similar, while the protein content was lower in the tunica, as reported in several other studies.

3.2 Conditions of pepsin hydrolysis

A factorial design (2^{4-1}) was used to evaluate the effects of the variables X_1 (mol L⁻¹ acetic acid), X_2 (h of acetic acid treatment), X_3 (pepsin percentage) and X_4 (h of pepsin hydrolysis) in the extraction and hydrolysis to obtain IC (Table 2).

The variables X_1 , X_3 and X_4 showed a positive and significant effect ($p < 0.05$) on the Y_1 response function (Table 3). These results indicate that the optimal conditions for extraction and hydrolysis occurred when using positive levels of variables X_1 (mol L⁻¹ acetic acid), X_3 (pepsin percentage) and X_4 (h of pepsin hydrolysis). Assay 8 (Table 2) showed that the isolated collagen had a value of $Y_1 = 75.84 \pm 0.012$ g of collagen per 100 g of IC. This result was obtained by applying the highest levels of the four variables, i.e., $X_1 = 0.8$ mol L⁻¹ acetic acid, $X_2 = 36$ h of acetic acid treatment, $X_3 = 0.15\%$ pepsin and $X_4 = 36$ h of hydrolysis. However, the effect of variable X_2 on the Y_1 response function was not significant; therefore, the effect of X_2 was removed from the model.

The effect of the interaction between the variables X_1 (mol L⁻¹ acetic acid) and X_3 (pepsin percentage) on the Y_1 response function (Table 3) was significant and positive ($p < 0.05$). This result was observed in assay 6 (Table 2), in which the highest levels of the variables X_1 and X_3 , i.e., $X_1 = 0.8$ mol L⁻¹ acetic acid and $X_3 = 0.15\%$ pepsin, were used, and an isolate with 69.94 ± 0.006 g of collagen per 100 g was produced.

The contour curves were plotted based on the Y_1 response function (g of collagen per 100 g) (Figure 3). The graph shows that using the variables X_1 (mol·L⁻¹ acetic acid), X_3 (pepsin percentage) and X_4 (h of pepsin hydrolysis) at higher levels results in a product with a higher collagen concentration ($Y_1 > 70$). Thus, these results confirmed that these three variables have a significant effect on acetic acid extraction and pepsin hydrolysis.

3.3 Optimal conditions for pepsin hydrolysis

In the first design, the acetic acid treatment time had no significant effect on IC production. Thus, to optimize the process, the CCRD (2^3) was used for the variables X_5 (mol L⁻¹ acetic acid), X_6 (pepsin percentage) and X_7 (h of pepsin hydrolysis) (Table 4), and the acetic acid treatment time was fixed at 12 h. The effects of the variables on the Y_2 response function and multiple regression coefficients are shown in Table 5.

The linear effects of the variables X_5 (mol L⁻¹ acetic acid), X_6 (pepsin percentage) and X_7 (h of hydrolysis) were positive and significant (Table 5). These results indicate the +1 level of these variables produced an IC with high collagen concentration. This result could be observed in assay 8 (Table 4), in which the variables $X_5 = 0.9$ mol L⁻¹ acetic acid, $X_6 = 0.20\%$ pepsin and $X_7 = 30$ h of pepsin hydrolysis were used and a IC with 77.75 ± 0.006 g of collagen per 100 g was produced.

The quadratic effects of the variables X_5 , X_6 and X_7 were significant and negative (Table 5). In assays 9 and 10 (Table 4), in which the lowest level of X_5 (0.3 mol L⁻¹ acetic acid) and the highest level of X_5 (1.1 mol L⁻¹ acetic acid), respectively, were used with X_6 (0.15% pepsin) and X_7 (24 h of hydrolysis) for the central points, the response function Y_2 was reduced. These results indicate that the optimum point of the variable X_5 (mol L⁻¹ acetic acid) is among these values. Because of the high extraction capacity, acetic acid is the most widely used organic solvent for collagen extraction, but the acetic acid concentration can affect the collagen extraction (Wang et al., 2008; Cheng et al., 2009). In the present study, the optimal concentration of acetic acid predicted by the model was 0.8 mol L⁻¹.

Assay 12 (Table 4) showed that applying the variable X_6 at the highest level (0.25% pepsin) with X_5 (0.7 mol L⁻¹ acetic acid) and X_7 (24 h of hydrolysis) at the central point increased the response function Y_2 (81.68 ± 0.056 g of collagen per 100 g of IC). However, in assay 11 (Table 4), in which X_6 was used at the lowest level (0.05% pepsin) with X_5 (0.7 mol L⁻¹ acetic acid) and X_7 (24 h of hydrolysis) at the central points, the response function Y_2 was reduced (48.04 ± 0.001 g of collagen per 100 g of IC). These results show the real positive effect of the variable X_6 (pepsin percentage). The pepsin digestion in an acidic medium increased the tissue collagen

extraction yield because this enzyme removes the non-helical ends of the collagen molecule and the intermolecular crosslinks (Skierka & Sadowska, 2007).

With respect to the variable X_7 (h of pepsin hydrolysis), assays 13 and 14 (Table 4), in which higher (36 h) or lower levels (12 h) and X_5 (mol L⁻¹ acetic acid) and X_6 (pepsin percentage) at the central points were used, showed similar response functions Y_2 (72.70 ± 0.026 and 74.63 ± 0.005 g of collagen per 100 g of IC). An extended in the hydrolysis time increases the yield of collagen extraction, as observed by Wang et al. (2008) and Shon, Eo, Hwang and Eun (2011), but in this study, it was observed a low effect of pepsin hydrolysis time on the response function Y_2 .

The effect of the $X_5 \cdot X_6$ interaction (mol L⁻¹ acetic acid and pepsin percentage) was significant and positive, whereas the interactions $X_5 \cdot X_7$ (mol L⁻¹ acetic acid and h of hydrolysis with pepsin) and $X_6 \cdot X_7$ (pepsin percentage and h of pepsin hydrolysis) were significant and negative (Table 5).

Analysis of variance indicated that the proposed model was significant (Table 6). The high coefficient of determination ($R^2 = 0.98$) showed that the response function adequately fit the experimental data and that the model can be used to predict the extraction and hydrolysis of collagen of the tunica albuginea to obtain IC. Thus, considering the significant variables and interactions, the proposed model (Equation 2) can be expressed as follows:

$$Y_2 = 74,874 + 3,242x_5 - 7,277x_5^2 + 7,466x_6 - 2,547x_6^2 + 0,203x_7 - 0,346x_7^2 + 3,729x_5 \cdot x_6 - 0,459 x_5 \cdot x_7 - 0,296 x_6 \cdot x_7$$

(Equation 2)

where Y_2 = g of collagen per 100 g of IC; X_5 = mol L⁻¹ acetic acid; X_6 = pepsin percentage and X_7 = h of pepsin hydrolysis

The surface response was constructed based on the Y_2 response function and the desirability parameters were estimated (Figures 4 and 5). The surface response (Figure 4) shows a favorable region to obtain IC with collagen content above 80% ($Y_2 > 80$ g of collagen per 100 g of IC). This area was observed where X_5 is between 0.7 and 0.9 mol L⁻¹ acetic acid and X_6 is greater than 0.20% pepsin. The

estimated desirability parameters (Figure 5) indicated that the optimal response function was 81.71 g of collagen per 100 g of isolated collagen and that this response was obtained with $X_5 = 0.86 \text{ mol L}^{-1}$ acetic acid, $X_6 = 0.25\%$ pepsin and $X_7 = 36 \text{ h}$ of pepsin hydrolysis. However, there was a smaller effect of variable X_7 (h of hydrolysis). According to the estimated desirability parameter (Figure 5), 24 h of hydrolysis may be sufficient to obtain an isolated with 81.71 g of collagen per 100 g.

The desirability parameters (Figure 5) indicate that increasing the pepsin percentage (variable X_6) results in an IC with higher collagen content. However, when increasing the pepsin percentage from 0.30% to 0.40% and 0.50% while maintaining the other variables at 0.86 mol L^{-1} acetic acid and 24 h of pepsin hydrolysis, there was no significant change ($p > 0.05$) in the collagen content of the IC. Therefore, a level of 0.25% pepsin was considered to be sufficient to obtain IC with high collagen content.

Collagen extraction from different animal sources has been evaluated in recent years, but these experiments used different methods of extraction and obtained different yields in relation to the present study. Wang et al. (2008) found that the best conditions for extracting acid-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) applying the Box-Behnken design, were using 0.54 mol L^{-1} acetic acid, at 24.7°C for 32.1 h, but it was only produced a concentrate containing 19.3 g of collagen per 100 g. Muralidharan, Shakila, Sukumar and Jeyasekaran (2013) found that pepsin extraction in an acidic medium resulted in a higher yield than extraction with only acetic acid in the red-toothed triggerfish (*Odonus Niger*), but this experiment obtained a concentrate of 70.94 g of collagen per 100 g when using pepsin. The optimum conditions for the extraction of a concentrate with 26.7 g of collagen per 100 g from the dorsal skin of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) were observed by Woo et al. (2008) using the central composite rotatable design and 0.92 mol L^{-1} NaOH, 24 h of NaOH treatment, 0.98% pepsin and 23.5 h of pepsin hydrolysis.

3.4 Model validation

Based on the response function (Y_2) and the model proposed in the optimization process it was estimated that the values of $X_5 = 0.83 \text{ mol L}^{-1}$ acetic acid,

$X_6 = 0.24\%$ pepsin and $X_7 = 28$ h of pepsin hydrolysis should be used to obtain an IC with 82.54 g of collagen per 100 g.

Thus, the optimal points were experimentally reproduced in triplicate, and the response obtained was 81.9 ± 0.40 g of collagen per 100 g of IC. The means of the experimental results and the results estimated by the model were not significantly different when compared using the Student's t test ($p < 0.05$), thereby confirming the validity of the proposed model.

3.5 Yield and degree of purification of the collagen isolate

Applying the optimal conditions for the acetic acid extraction and pepsin hydrolysis, it was obtained 3 g of IC from 10 g of tunica albuginea. Thus, the yield of IC production was $30.00 \pm 1.33\%$, whereas the tunica albuginea presented 23.24 ± 0.11 g of collagen per 100 g and the IC presented 81.9 ± 0.40 g of collagen per 100 g; the degree of purification of IC was 3.5. The yield of the collagen production depends on the raw material, the extraction method and the hydrolysis. The extraction yield of collagen from different raw materials varied from 30.0% to 70.0% (Yamaguchi, Lavéty and Love 1976; Montero, Borderias, Turnay and Leyzarbet 1990; Liu, Lin and Chen, 2001; Muralidharan, Shakila, Sukumar and Jeyasekaran 2013).

3.6 Amino acid profile of isolated collagen

The amino acid profile of the tunica IC (Table 7) indicates the presence of 69.60% hydrophobic amino acids and 30.40% hydrophilic amino acids. Bailey & Light (1989) reported that collagen molecules consist of approximately 60% hydrophobic amino acids and 40% hydrophilic amino acids. The high content of hydrophobic amino acids provides the suitable collagen properties of an emulsifier in emulsified products capacity (Baley & Light, 1989; Montero & Borderías, 1991).

Glycine was the most abundant amino acid, followed by proline, hydroxyproline and glutamic acid (Table 7). These results were similar to those observed in collagen extracted from various raw materials, such as pig skin (Lin & Liu, 2006), fish skin (Yan et al. 2008; Benjakul et al. 2010), yak bones (*Bos*

grunniens) (Li, Jia and Yao, 2009) and skin streak (Shon, Eo, Hwang and Eun, 2011).

It was observed that 21.3% of the total amino acids were the imino acids proline and hydroxyproline (Table 7). These imino acids are crucial in the formation of the triple helix of the molecule and are related to thermal stability (Matsumura, 1972). Lin & Liu (2006) found that the proportion of hydroxyproline and proline in collagen from pig skin ranged from 17.00 to 18.50%, which is lower than the content in collagen isolated from the tunica albuginea; however, Li, Jia and Yao (2009) observed these imino acids constituted 20.19% of yak bone collagen (*Bos grunniens*), which is similar to the content in collagen isolated from the tunica albuginea. The content of imino acids in collagen influences its functional properties; collagen with 15% imino acids showed reduced emulsifying capacity and gel formation (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, Montero, 2011). Therefore, the amino acid profile indicates that the tunica albuginea IC could have properties suitable for gelling and emulsification. The amino acids present in lower amounts were methionine, tyrosine, isoleucine, and histidine. The low content of these amino acids was also observed in collagen extracted from different raw materials, such as pig skin (Lin & Liu, 2006) fish skin (Yan et al. 2008; Benjakul et al. 2010), yak bones (*Bos grunniens*) (Li, Jia and Yao, 2009) and skin streak (Shon, Eo, Hwang and Eun, 2011).

3.7 Chemical characterization and functional properties

The IC produced under optimal conditions (0.83 mol L⁻¹ acetic acid, 0.24% pepsin and 28 h of pepsin hydrolysis) was characterized according to its chemical composition and functional properties. The IC presented 11.16 ± 1.10 g of moisture, 82.17 ± 2.08 g of protein, 3.24 ± 1.20 g of lipids and 3.43 ± 0.07 g of ashes (values expressed in g per 100 g of IC). Olivo and Shimokomaki (2002) obtained an isolated collagen from bovine tendons with chemical characteristics similar to those of tunica albuginea IC, however, the IC obtained from chicken feet by Alves & Prudêncio-Ferreira (2002) contained high lipid content.

Because of the recent increase in the economic value of collagen for industrial byproducts, several studies have investigated alternative sources that have

various applications (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, Montero, 2011). Collagen may confer stability to the fat globules in emulsifications and improve the texture of meat products (Gordon & Barbut, 1992; Olivo & Shimokomaki, 2002), demonstrating that its role in the meat products fundamentally depends on its functional properties. Thus, the functional properties of tunica albuginea IC were determined and compared with those of bovine skin collagen (Table 8).

The IC presented a higher ($p < 0.05$) value of water solubility at 70°C than bovine skin collagen (Table 8) and collagen solubility is influenced by its molecular structure, the presence of ionizable polar groups formed during extraction by the hydrolysis conditions (Shon, Eo, Hwang and Eun, 2011; Li et al., 2013). Montero, Borderias, Turnay and Leyzarbet (1990) observed that the solubility of fish skin collagen (*Merluccius merluccius L.*) was $90.60 \pm 1.9\%$, while the solubility of fish muscle collagen (*Merluccius merluccius L.*) was $69.6 \pm 2.1\%$. Alves & Prudêncio-Ferreira (2002) extracted collagen from chicken feet with a solubility of 66.09%. The IC showed a higher ($p < 0.05$) WHC at 25°C and 60°C than bovine skin collagen (Table 8). Ranganayaki, Asghar and Henrigkson (1982) observed that the WHC of bovine hide collagen ranged from 5.0 to 6.0 g of water per gram of collagen, and heating to 60°C increased the WHC. The effect of heating at 60°C was observed in the IC and bovine skin collagen (Table 8). Olivo & Shimokomaki (2002) reported that the isolated collagen with a WHC at 25°C of 5.91 ± 0.31 improved the performance of emulsified meat products with low fat content. Finally, the IC presented a higher ($p < 0.05$) emulsifying capacity and emulsion stability than bovine skin collagen (Table 8). In emulsified meat products, the main function of collagen is to improve the stability of the product during processing (Baley & Light, 1989). Olivo & Shimokomaki (2002) observed that bovine tendon IC with an emulsifying capacity of 24.47 ± 0.90 mL of oil emulsified per g of collagen improved the texture of emulsified meat products.

In the present study, the extraction conditions with acetic acid and pepsin hydrolysis were optimized, and we obtained an IC with functional properties suitable for use in processed meat products. The results demonstrate that the tunica albuginea of the pigs testes is an excellent source of collagen.

4. Conclusions

Optimum collagen isolation from immunologically castrated pigs testes was observed under the following conditions: 0.83 mol L⁻¹ acetic acid, 0.24% pepsin and 28 h of pepsin hydrolysis at 4°C. These conditions resulted in the isolation of 82.54 g of collagen per 100 g with a yield of 30.00 ± 1.33%. The isolated collagen presented an amino acid profile, chemical properties and functional properties suitable for producing emulsified meat products.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the partial financial support of Pfizer Animal Health Brazil. Thanks also go to CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for a graduate scholarship to GSS. MS and EII are CNPq Research Fellows.

References

- AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland, United States.
- Alves, S. G. T., Prudêncio-Ferreira, S. H. (2002). Functional properties of collagenous material chicken feet. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52, 289-293.
- Atherton, D. (1989). Successful PTC amino acid analysis at the picomol level. In: Hugly, T. E (Eds.) *Techniques in Protein Chemistry* (273-283). San Diego: Academic Press, Inc.
- Bailey, A. J., & Light, N. D. (1989). *Connective tissue in meat and meat products*. New York: Elsevier Applied Science.
- Balian, G., & Bowes, J. H. (1977). The structure and properties of collagen. In A. G. Ward, & A. Courts (Eds.), *The science and technology of gelatin* (1–30). London: Academic Press.

- Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran, T., Meesane, J. (2010). Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food Agriculture*, 90, 132-138. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3795>
- Bidlingmeyer, B.A.; Cohen, S.A.; Tarvin, T.L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*, 336, 93-104. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)85133-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85133-6)
- Cheng, F.Y., Hsu, F.W., Chang, H.S., Lin L.C., Sakata, R. (2009). Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. *Food Chemistry*, 113, 563–567. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.043>
- Claus, R., Weiler, U., Herzog, A. (1994). Physiological aspects of androstenedione and skatole formation in the boar: a review with experimental data. *Meat Science*, 38, 289 – 305. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90118-X](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(94)90118-X)
- Copenhaver, W. M., Kelly, D. E., Wood, R. L. (1978). The Male Reproductive System. In Copenhaver, W. M., Kelly, D. E., Wood, R. L. (eds.), *Bailey's Textbook of Histology*. 17th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Coró, F. A. G., Youssef, E. Y., Shimokomaki, M. (2002). Age Related Changes in Poultry Breast Meat Collagen Pyridinoline and Texture. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 533-541. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00771.x>
- Encyclopedia Britannica Online. Epididyme: human testes, epididymis, and ductus deferens. Retrieved in 22 July, 2013, from <http://global.britannica.com/EBchecked/media/119207/Human-male-testes-epididymis-and-ductus-deferens>
- 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, 1813-1827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gordon, A., Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization – a review. *Critical Review in Food Science Nutrition*, 32, 299-332. <http://dx.doi.org/10.1080/10408399209527602>

- Kolar, K. (1990). Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMK collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73, 54-57.
- Li, F. Jia, D., Yao, K. (2009). Amino acid composition and functional properties of collagen polypeptide from Yak (*Bos grunniens*) bone. *Food Science and Technology*, 42, 945-949. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.005>
- Li, Z., Wang, B. Chi, C., Gong, Y., Luo, H. Ding, G. (2013). Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. *Food Research International*, 51, 283-293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.031>
- Lin, Y. K.; Liu, D. C. (2006). Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 99, 244–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.053>
- Liu, D. C., Lin, Y., K., Chen, M. T. (2001). Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its Characteristics. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 14(11), 1638-1644.
- Matsumura, T. (1972). Relationship between amino-acid composition and differentiation of collagen. *International Journal of Biochemistry*, 3, 265-274. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-711X\(72\)90038-9](http://dx.doi.org/10.1016/0020-711X(72)90038-9)
- Montero P., Borderias, J., Turnay, J., Leyzarbet, M. A. (1990). Characterization of Hake (*Merluccius merluccius* L.) and Trout (*Salmo irideus* Gibb) Collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 694-699. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00093a004>
- Montero P., Borderias, J. (1991). Emulsifying Capacity of Collagenous Material from the Muscle and Skin of Hake (*Merluccius merluccius* L.) and Trout (*Salmo irideus* Gibb): Effect of pH and NaCl Concentration. *Food Chemistry*, 41, 251-267. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00168-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00168-X)
- Montero, P., Alvarez, C., Martí, M. A., Borderías, A. J. (1995). Plaice Skin Collagen Extraction and Functional Properties. *Journal of Food Science*, 60, 1–3. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05593.x>
- Muralidharan, N., Shakila, R. J., Sukumar, D., Jeyasekaran, G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0440-y>

- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K. (2011). Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*, 125, 500–507. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.040>
- Olivo, R., Shimokomaki, M. (2002). *Meat: the search path*. 2th ed., Cocal do Sul: Imprint, 2002.
- Ranganayaki, M. D., Asghar, A. Henrigkson, R. L. (1982). Influence of anion and cation on the water holding capacity of bovine hide collagen at different pH values. Effect of sodium chloride and polyphosphates on hydration. *Journal of Food Science*, 7, 705-710. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12695.x>
- Ribeiro, H. J. S. de S., Prudencio, S. H., Myagui, D. T., Ribeiro, E. L. de A. (2009) Characterization of protein concentrates from new and aged dry black common beans, Iapar 44 cultivar. *Food Science and Technology*, 29, 571-580. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300019>
- Ricard-Blum, S. The Collagen family (2011). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. January, 3:a004978, 1-19. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- Robins, S. P., Shimokomaki M., Bailey, A. J. (1973). The Chemistry of the collagen cross-links. Age related changes in the reducible components of intact collagen fibres. *Biochemical Journal*, 131, 771-780.
- Sadowska, M., Koodziejaska, L., Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 83, 257–262. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00420-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00420-X)
- Shimokomaki, M., Duance, V. C., Bailey, A. J.(1980). Identification of a new disulfide bonded collagen from cartilage. *Febs Letters*, 121, 51–54.
- Shimokomaki, M., Wright, D. W., Irwin, M. H., Van Der Rest, M., Mayne, R. (1990). The Structure and Macromolecular Organization of Type IX Collagen in Cartilage. *Annals New York Academy of Sciences*, 580, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb17912.x>
- Shon, J., Eo, J-H., Hwang, S. J., Eun, J-B. (2011). Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja Kenojei*) skins. *Food Science Biotechnology*, 20, 99-106. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-011-0014-9>
- Silveira, E. T. F., Poleze, E. Oliveira, F. T. T., Tonietti, A. P., Andrade, J. C., Hagiwara, M. M. H., Miyagusku, L., Hennessy, D. (2008). Vaccination of boars with

- a GnRF vaccine (Improvac) and its effects on meat quality. Proceedings 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, 590, 2008.
- Skierka E., Sadowska M. (2007). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105, 1302-1306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.030>
- Statsoft Inc Corporate, 2004. STATISTICA (data analysis software), version 7. Tulsa, Oklahoma, USA.
- Tanaka M. C. Y., Shimokomaki, M. (1996). Collagen Types in Mechanically Deboned Chicken Meat. *Journal of Food Biochemistry*, 20, 215-225. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.1996.tb00552.x>
- Timpl R., Glanville R. W., Nowack H., Wiedemann H., Fietzek P. P., Kühn K. (1975). Isolation, chemical and electron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen and procollagen from fetal bovine skin. *Hoppe Seylers Z. Physiology Chemistry*, 356, 1783-1792. <http://dx.doi.org/10.1515/bchm2.1975.356.2.1783>
- 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 of Food Science and Emerging Technologies*, 9, 604–607. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.03.001>
- Woessner Jr., J. F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440-447.
- Woo, J. W., Yua, S. J., Chob, S. M., Leea, Y. B., Kima, S. B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*, 22, 879–887. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.015>
- Yan, M., Bafang Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L., Fan, Y. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 107, 1581–1586. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.027>
- Yamaguchi, K., Lavéty, J., Love, R. M. (1976). The connective tissues of fish. Comparative studies on hake, cod and catfish collagens. *Journal of Food Technology*, 11, 389-399. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00737.x>

Figures Captions

Figure 1: Location of tunica albuginea in the testes. Source: *Encyclopedia Britannica Online*, 2013.

Figure 2: Fluxogram showing the step-by-step the extracting of collagen from the tunica albuginea of pig testes. FD: factorial design; CCRD: central composite rotatable design.

Figure 3: Contour curves for conditions of pepsin hydrolysis to obtain the IC as a function of the X_1 (mol L⁻¹ acetic acid) and X_3 (pepsin percentage), setting the variable X_4 (h of pepsin hydrolysis) to 24 h.

Figure 4: Surface response model for extraction and hydrolysis to obtain the IC as a function of the X_5 (mol L⁻¹ acetic acid) and X_6 (pepsin percentage), setting the variable X_7 (h of pepsin hydrolysis) to 24 h.

Figure 5: Parameters of estimated desirability for the variables X_5 (mol L⁻¹ acetic acid), X_6 (pepsin percentage) and X_7 (h of pepsin hydrolysis) for extraction and hydrolysis to obtain the IC.

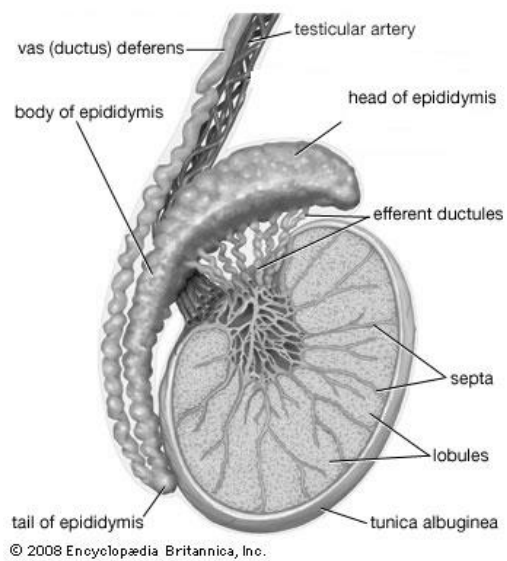


Fig. 1

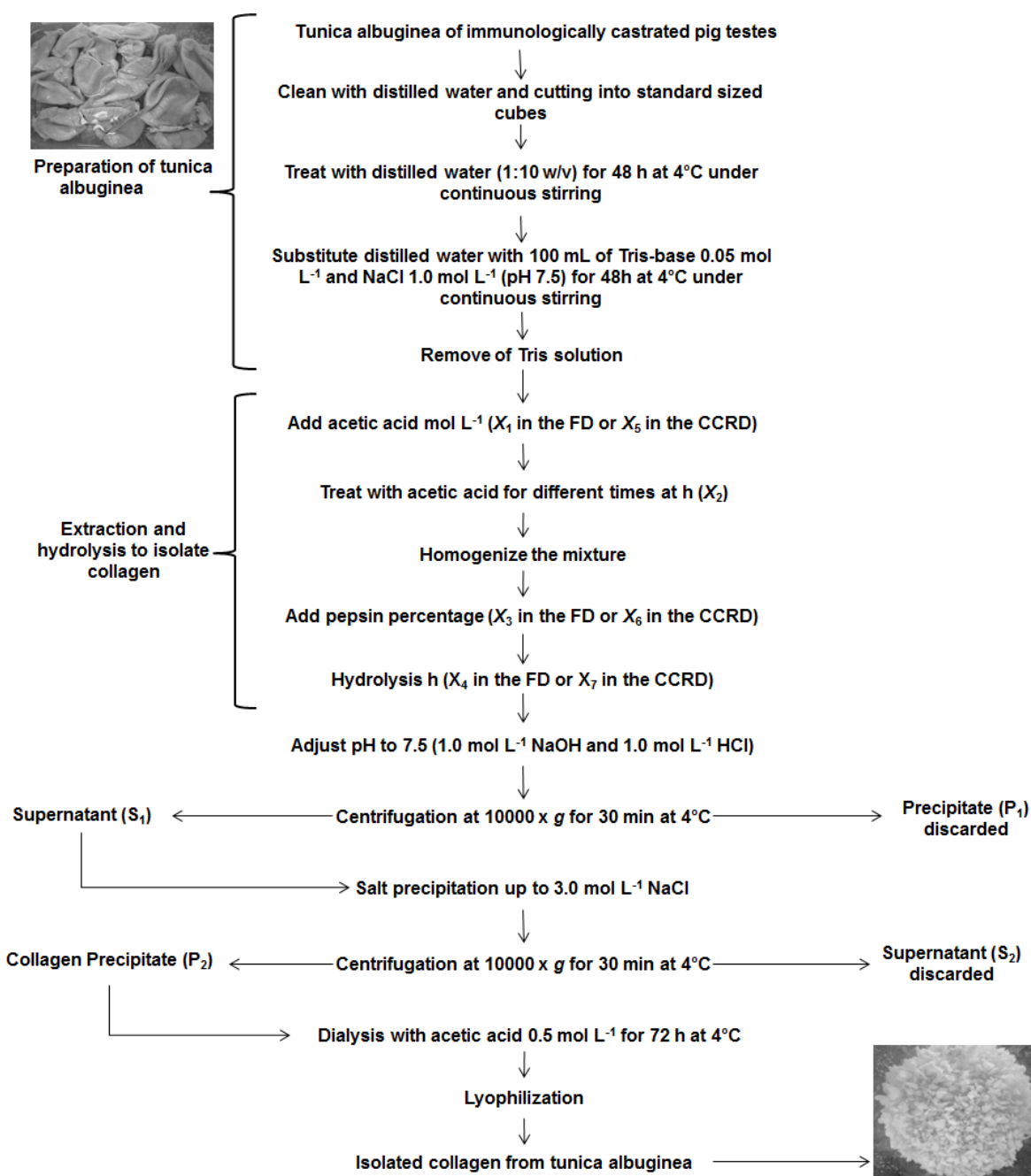


Fig. 2

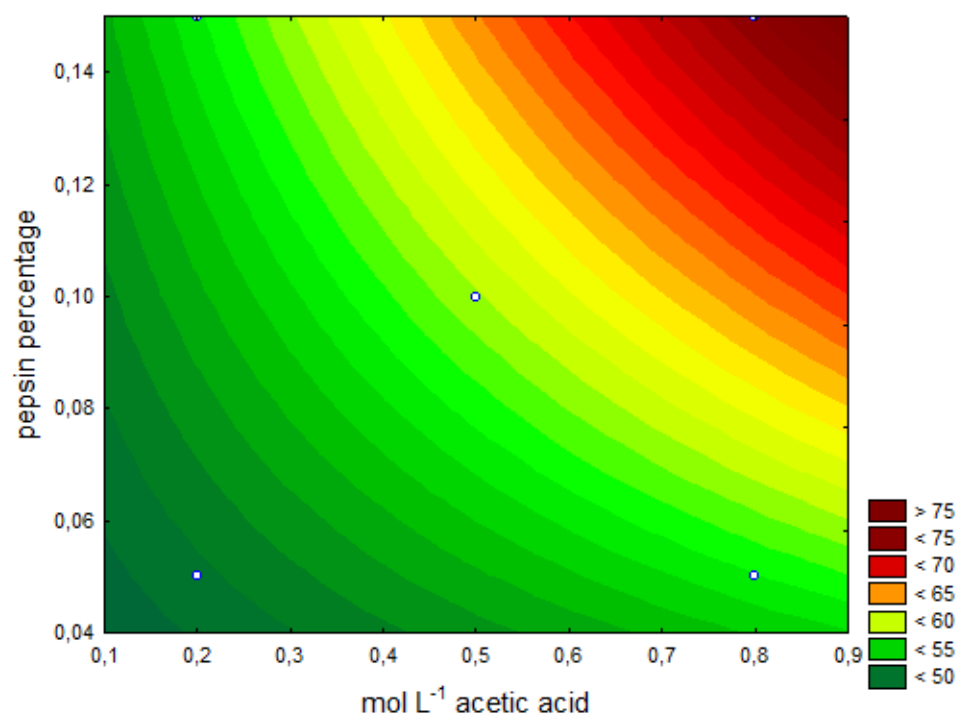


Fig. 3

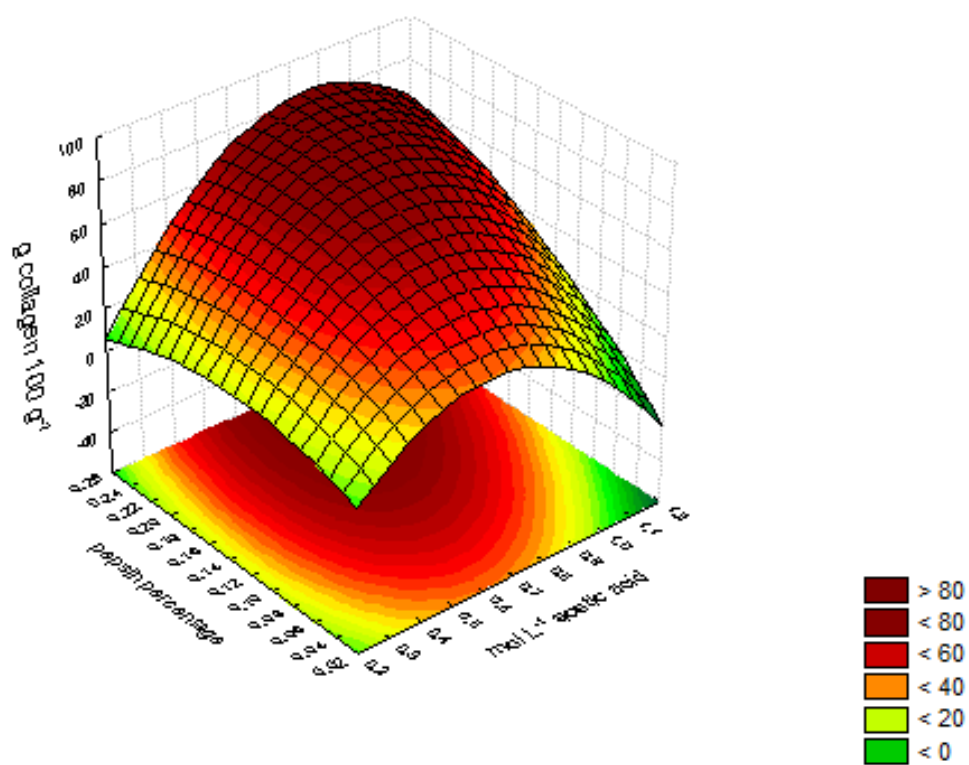


Fig. 4

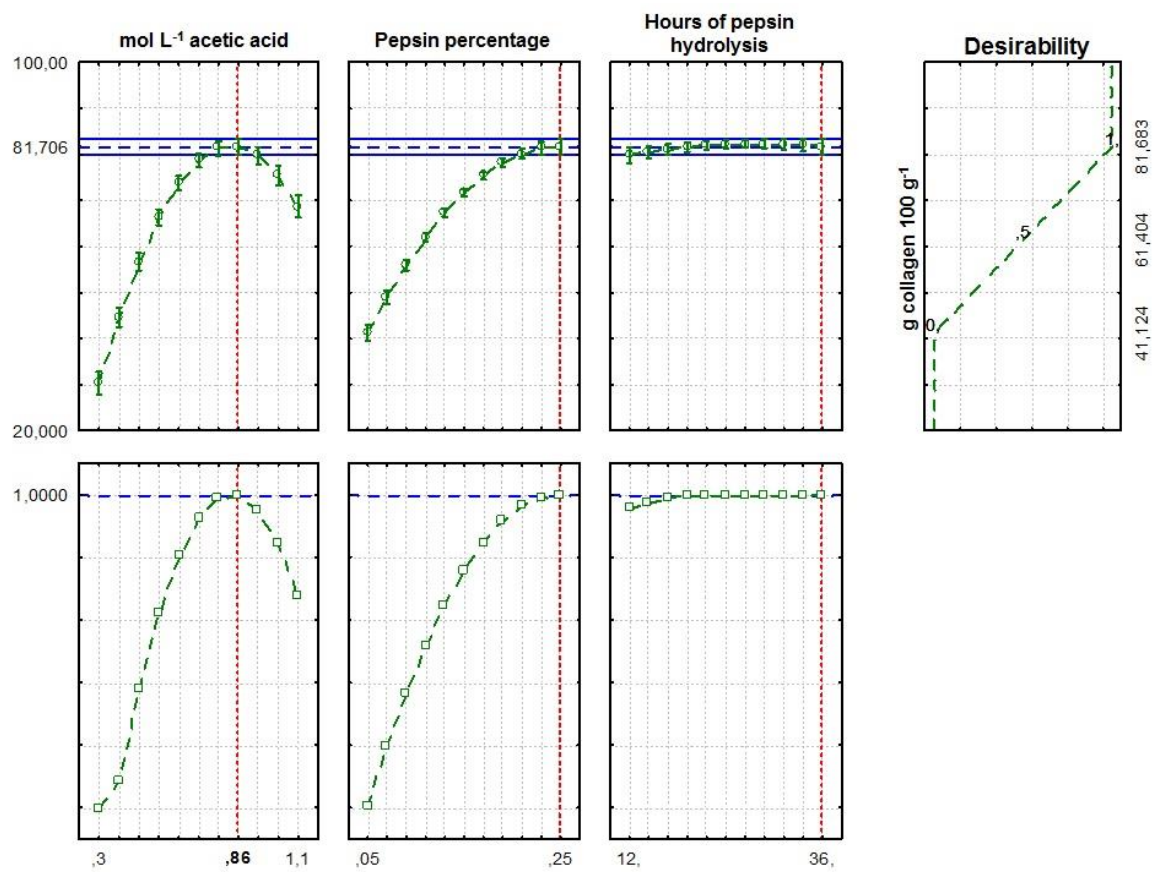


Fig. 5

Table 1: Proximate chemical composition and collagen content of testis and tunica albuginea (g per 100 g)

Sample	Moisture*	Protein*	Lipids*	Ashes*	Collagen content*
Testis	82.47 ^a (± 0.62)	14.40 ^b (± 0.07)	5.78 ^a (± 0.57)	0.93 ^a (± 0.02)	10.90 ^b (± 0.91)
Tunica albuginea	76.15 ^b (± 0.52)	23.92 ^a (± 0.64)	6.19 ^a (± 0.53)	0.99 ^a (± 0.35)	23.24 ^a (± 0.11)

^{a,b} Means followed by different letters in the same column differ in test Student's t test at the 5% significance level ($p < 0.05$); *g per 100 g of sample.

Table 2: Factorial design (2^{4-1}) with the independent variables and response function (Y_1) of the conditions of pepsin hydrolysis

Assays	Independent variables and variation levels				Response function
	X_1 (level) mol L ⁻¹ acetic acid	X_2 (level) h of acetic acid treatment	X_3 (level) pepsin percentage	X_4 (level) h of pepsin hydrolysis	Y_1 g of collagen per 100 g
1	0.20 (-1)	12 (-1)	0.05 (-1)	12 (-1)	48.31 ± 0.005
2	0.80 (+1)	12 (-1)	0.05 (-1)	36 (+1)	55.62 ± 0.010
3	0.20 (-1)	36 (+1)	0.05 (-1)	36 (+1)	49.01 ± 0.004
4	0.80 (+1)	36 (+1)	0.05 (-1)	12 (-1)	54.04 ± 0.090
5	0.20 (-1)	12 (-1)	0.15 (+1)	36 (+1)	54.92 ± 0.005
6	0.80 (+1)	12 (-1)	0.15 (+1)	12 (-1)	69.94 ± 0.006
7	0.20 (-1)	36 (+1)	0.15 (+1)	12 (-1)	54.55 ± 0.002
8	0.80 (+1)	36 (+1)	0.15 (+1)	36 (+1)	75.84 ± 0.012
9 (C)	0.50 (0)	24 (0)	0.10 (0)	24 (0)	61.91 ± 0.007
10 (C)	0.50 (0)	24 (0)	0.10 (0)	24 (0)	60.93 ± 0.002
11 (C)	0.50 (0)	24 (0)	0.10 (0)	24 (0)	62.10 ± 0.004

*Means and standard deviation (n=3). (C)= Central Point.

Table 3: Effect estimates for the response function* from the results in the factorial design (2^{4-1}) of the conditions of pepsin hydrolysis

Independent variable	Regression coefficient	Standard Error	t(2)	p-value
Mean	58.834	0.189	310.774	0.000**
X_1 (mol L ⁻¹ acetic acid)	6.081	0.444	27.394	0.001**
X_2 (h of acetic acid treatment)	0.581	0.444	2.618	0.120
X_3 (pepsin percentage)	6.034	0.444	27.180	0.001**
X_4 (h of pepsin hydrolysis)	1.069	0.444	4.814	0.040**
$X_1 \cdot X_2$	0.499	0.444	2.246	0.153
$X_1 \cdot X_3$	2.996	0.444	13.497	0.005**
$X_1 \cdot X_4$	0.801	0.444	3.609	0.068

* Y_1 = g of collagen per 100 g; **significant factors ($p < 0.05$)

Table 4: Central composite rotatable design (2^3) with the independent variables, levels and experimental responses (Y_2 = g of collagen per 100 g) of the extraction and hydrolysis to obtain the IC

Assay	Independent Variables			Response function
	X_5 (level) mol L ⁻¹ acetic acid	X_6 (level) pepsin percentage	X_7 (level) h of pepsin hydrolysis	Y_2 g of collagen per 100 g
1	0.5 (-1)	0.10 (-1)	18 (-1)	57.26 ± 0.003
2	0.5 (-1)	0.10 (-1)	30 (+1)	58.07 ± 0.001
3	0.5 (-1)	0.20 (+1)	18 (-1)	62.89 ± 0.010
4	0.5 (-1)	0.20 (+1)	30 (+1)	63.61 ± 0.005
5	0.9 (+1)	0.10 (-1)	18 (-1)	58.32 ± 0.021
6	0.9 (+1)	0.10 (-1)	30 (+1)	58.39 ± 0.002
7	0.9 (+1)	0.20 (+1)	18 (-1)	76.96 ± 0.020
8	0.9 (+1)	0.20 (+1)	30 (+1)	77.75 ± 0.006
9	0.3 (-1.68)	0.15 (0)	24 (0)	41.12 ± 0.013
10	1.1 (+1.68)	0.15 (0)	24 (0)	50.76 ± 0.007
11	0.7 (0)	0.05 (-1.68)	24 (0)	48.04 ± 0.001
12	0.7 (0)	0.25 (+1.68)	24 (0)	81.68 ± 0.056
13	0.7 (0)	0.15 (0)	12 (-1.68)	72.70 ± 0.026
14	0.7 (0)	0.15 (0)	36 (+1.68)	74.63 ± 0.005
15	0.7 (0)	0.15 (0)	24 (0)	75.17 ± 0.037
16	0.7 (0)	0.15 (0)	24 (0)	74.80 ± 0.011
17	0.7 (0)	0.15 (0)	24 (0)	75.00 ± 0.016

*Means and standard deviation (n=3).

Table 5: Effect estimates for the response function* from the results in the central composite rotatable design (2^3) of the extraction and hydrolysis to obtain the IC

Independent variable	Regression coefficient	Standard Error	t(2)	p-value
Mean	74.874	0.102	732.826	0.000**
(X ₅) mol·L ⁻¹ acetic acid (L)	3.242	0.093	70.018	0.000**
(X ₅) mol·L ⁻¹ acetic acid (Q)	-7.277	0.084	-172.922	0.000**
(X ₆) pepsin percentage (L)	7.466	0.093	161.242	0.000**
(X ₆) pepsin percentage (Q)	-2.547	0.084	-60.523	0.000**
(X ₇) h of pepsin hydrolysis (L)	0.203	0.093	4.387	0.048**
(X ₇) h of pepsin hydrolysis (Q)	-0.346	0.084	-8.215	0.014**
X ₅ .X ₆	3.729	0.131	56.946	0.000**
X ₅ .X ₇	-0.459	0.131	-7.006	0.019**
X ₆ .X ₇	-0.296	0.131	-4.524	0.045**

*Response function $Y_2 = g$ of collagen per 100 g; **significant factors ($p < 0.05$)

Table 6: ANOVA of the quadratic model for the extraction and hydrolysis to obtain the IC

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	$F_{\text{calculated}}$
Regression	2327.795	9	258.644	65.314*
Residual	27.720	7	3.96	
Total	2355.515	16		

$F_{\text{tabulated}}(0.05; 9; 2) = 19.38$; $*F_{\text{calculated}} > F_{\text{tabulated}} = \text{significant regression}$
 Coefficient of determination (R^2) = 0,98

Table 7: Amino acid profile of the isolated collagen from the tunica albuginea (results are expressed as residues per 1000 total amino acid residues)

Amino acids	Residues 1000 total residues ⁻¹
Aspartic acid *	60
Glutamic acid *	118
Alanine **	72
Arginine *	87
Cysteine ***	nd
Phenylalanine **	26
Glycine **	223
Hydroxyproline **	101
Histidine *	11
Isoleucine **	13
Leucine **	34
Lysine *	29
Methionine **	12
Proline **	112
Serine **	43
Tyrosine **	13
Threonine **	25
Valine **	22
Total	1000

* Hydrophilic amino acids

** Hydrophobic amino acids

*** nd = not detected

Table 8: Mean and standard deviation of the water solubility at 70°C, the hot and cold water absorption capacity, the emulsifying capacity and the emulsion stability of the isolated collagen from the tunica albuginea and bovine skin collagen

	Isolated collagen from the tunica albuginea	Bovine skin collagen
Water solubility at 70°C*	70.02 ± 0.96 ^a	60.00 ± 0.96 ^b
Cold water-holding capacity**	5.98 ± 0.06 ^a	3.82 ± 0.10 ^b
Water-holding capacity at 60°C**	35.63 ± 0.42 ^a	24.00 ± 1.80 ^b
Emulsifying capacity ***	31.56 ± 1.40 ^a	23.63 ± 0.80 ^b
Emulsion stability****	84.50 ± 0.55 ^a	65.2 ± 0.76 ^b

^{a,b} Means followed by different letters in the same row differ in Student's t test at the 5% significance level ($p < 0.05$).

*percentage soluble collagen relative to the total collagen content of the sample.

** g water·g⁻¹ dry residue⁻¹.

*** mL emulsified oil.mg⁻¹ soluble collagen.

**** percentage remaining in the emulsion relative to the initial emulsion quantity.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: PARTIAL BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERISATION OF COLLAGEN FROM THE TUNICA ALBUGINEA OF PIG TESTES

O artigo apresentado a seguir foi preparado de acordo com as normas do periódico científico *Animal Science Journal*, ao qual foi submetido.

PARTIAL BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERISATION OF COLLAGEN FROM THE TUNICA ALBUGINEA OF PIG TESTES

Gislaine Silveira Simões¹, Ana Paula, F. R. L. Bracarense²; Simone Raymundo de Oliveira³, Evandro Poleze⁴, Jim R. D. Allison⁵, Elza Iouko Ida^{1,*}, Massami Shimokomaki^{1,6}

¹Universidade Estadual de Londrina, Department of Food Science and Technology, Londrina, Paraná, Brazil, CEP: 86.057-970

*Corresponding author. Postal address: Universidade Estadual de Londrina, Department of Food Science and Technology, P.O Box, 6001, CEP 86051-900, Londrina, PR, Brazil. Tel: +55-43-91017787. Email address: elida@uel.br

²Universidade Estadual de Londrina, Laboratory of Animal Pathology, Londrina, Paraná, Brazil, CEP: 86.057-970

³Meat Technology Center, Institute of Food Technology, Campinas, Sao Paulo, Brazil, CEP: 13.070-178

⁴Pfizer Animal Health, Brazil

⁵Pfizer Animal Health, Florham Park, New Jersey, U.S.A

⁶Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brazil, CEP: 86.036-370

ABSTRACT

Pig testes are surrounded by a capsule of dense connective tissue that constitutes the tunica albuginea. Our previous studies have established in detail a methodology of extracting collagen from this tissue by pepsin digestion. In the present work, we report the collagen type distribution and morphological structure as determined using histological and immunohistochemical assays. After pepsin treatment, the salt precipitates obtained at acidic and neutral pH were evaluated by SDS-PAGE, and the electrophoretic patterns revealed the omnipresence of type I as well as types III and V. Other reducible collagenous fragments were also observed. Additionally, the images obtained by histological and immunohistochemical assays revealed positive staining for collagen types I and III. Type I positive staining was observed along the entire length of the tissue, while type III positive staining was particularly observed around blood vessels. The collagen bundles were arranged parallel to the testicular surface. This arrangement appears to effectively provide the testis with rigidity, whereas the undulating structural conformation would allow tissue contraction.

Key Words: pepsin-solubilised collagen, salt fractionation, immunohistochemistry.

INTRODUCTION

The term collagen is used to designate a family of protein isoforms found in connective tissues, bones, tendons, cartilage, veins, skin, teeth and muscle (Shoulders & Raines, 2009; Ricard-Blum, 2011). Collagen is the dominant and ubiquitous protein in the body and accounts for approximately 30% of total vertebrate protein. The basic unit of collagen is tropocollagen, which has a molecular weight of 300 kDa and consists of three polypeptide chains that are interwoven in a helical pattern. Each chain has a sequence of (Gly - X - Y)_n, where X is generally a proline residue and Y is hydroxyproline or hydroxylysine (Bailey & Light, 1989; Shoulders & Raines, 2009). Thus far, twenty-eight genetically distinct types of collagen (I-XXVIII) have been reported (Gordon & Ahn, 2010). Additionally, a growing interest has developed regarding evaluating industrial meat by-products, and several reports have addressed the extraction of collagen from different animal sources (Alves & Prudêncio-Ferreira, 2002; Sadowska et al., 2003; Nalinanon et al., 2011; Wang et al., 2008; Woo et al., 2008; Yan et al., 2008; Benjakul et al., 2010; Shon et al., 2011). Animals' testes are surrounded by a capsule of dense connective tissue called the tunica albuginea, and although the collagen content of the whole testis was calculated to be 10.9%, the collagen content of the tunica albuginea was found to be 23.2% (Simões et al., 2013). The optimum technique for collagen extraction from the tunica albuginea of immunocastrated pigs has recently been described in detail; a total of over 80% dry weight was obtained from the tissue (Simões et al., 2013). This tissue also contains typical smooth muscle cells and fibroblasts immersed in a fibrous matrix (Johnson et al., 1970; Chacon-Arellano & Woolley, 1980). Smooth muscle cells and collagen fibres are necessary for contraction during the transport of sperm in mammals' testes (Davis et al., 1970). Collagen is by far the component of the

tunica albuginea that is primarily responsible for the tissue's firmness, as observed in human and rat testes (Johnson et al., 1970). Thus, the objective of this work was to characterise the collagen types obtained via solubilisation by pepsin digestion from the tunica albuginea of immunocastrated pigs' testes and to evaluate the distribution of collagen types I and III within the tissue.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

The immunologically castrated crosses Landrace and Large White pigs of approximately 110 kg were slaughtered in a commercial pig slaughterhouse, and their testicles were removed and frozen. Only the tunica albuginea was used for histological assessment and collagen extraction. All reagents were of analytical-grade purity.

Extraction and pepsin hydrolysis of collagen from the tunica albuginea

The pepsin hydrolysis and collagen extraction procedures were based on Shimokomaki et al. (1980) and were recently described in detail by Simões et al. (2013). Following the hydrolysis, the material was centrifuged (Eppendorf centrifuge, Hamburg, Germany) at 10000 x g for 30 min at 4°C. The precipitate (P) was discarded, and the supernatant (S) containing the solubilised collagen was subjected to sequential salt fractionation with crystalline NaCl at pH 2.5 or 7.5 (Fig 1).

Sequential salt fractionation with NaCl at acidic and neutral pH values

The method was described by Shimokomaki et al. (1980) with some modifications, as shown in Fig 1. Essentially, the pH of the supernatant (S) was

adjusted to 2.5 with HCl 1.0 mol L⁻¹, and NaCl was added to a concentration of 0.7 mol L⁻¹ with continuous stirring at 4°C after pepsin treatment. Subsequently, the material was centrifuged at 10000 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant S_{0.7} and precipitate P_{0.7} were collected. Crystalline NaCl was added to a concentration of 1.2 mol L⁻¹ with continuous stirring at 4°C, and the supernatant S_{1.2} and precipitate P_{1.2} were collected. The sequential salt fractionation was performed to obtain the supernatants S_{1.8} and S_{2.0} and the precipitates P_{1.8} and P_{2.0}. The precipitate P_{0.7} was homogenised with 0.05 mol L⁻¹ Tris-base and 1.0 mol L⁻¹ NaCl, and the pH was adjusted to 7.5 with 1.0 mol L⁻¹ NaOH or 1.0 mol L⁻¹ HCl. After neutralising the pH, NaCl was added to a concentration of 1.5 mol L⁻¹ with continuous stirring at 4°C. This mixture was then centrifuged at 10000 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant S_{1.5} and the precipitate P_{1.5} were collected. NaCl was added to S_{1.5} to a concentration of 2.0 mol L⁻¹ with continuous stirring at 4°C, followed by centrifugation under the same conditions as those described above. The supernatant S_{2.0} and the precipitate P_{2.0} were collected. The sequential salt fractionation was performed to obtain the supernatant S_{3.5} and the precipitate P_{3.5}. All the precipitates collected at pH 2.5 (P_{0.7}, P_{1.2}, P_{1.8} and P_{2.0}) and pH 7.5 (P_{1.5}, P_{2.0}, and P_{3.5}) were dialysed and subsequently lyophilised (Christ Alpha lyophilizer, Osterode Harz, Germany), weighed to estimate the mass percentage and subjected to SDS-PAGE.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The precipitates were analysed by SDS-PAGE as described in Shimokomaki et al. (1980). Essentially, 5 mg of each lyophilised sample was dissolved in 1.0 mL of 2% SDS solution and 1.0 mL of sample buffer (Tris-HCl pH 6.8, glycerol, bromophenol blue, SDS 5% and β-mercaptoethanol – ME for the

reducing conditions) and then heated at 60°C for 30 min. Thus, 10 µl of each was loaded onto a 5% polyacrylamide gel. Molecular weight (MW) markers (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and type I collagen from rat tail tendon (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) were used as standards. The run was carried out at 25 mA and 100 V using an electrophoresis power supply (LPS 300V, Loccus Biotechnology, Sao Paulo, Brazil). The gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 dissolved in water, methanol and acetic acid (9:9:2, v/v/v) for 12 h and then destained using a solution of water, methanol and acetic acid (8:1:1, v/v/v).

Morphological characterisation

Histological assessment

The pig testes were collected immediately after slaughter, and the tunica albuginea was manually removed, washed in distilled water and fixed in 10% buffered formalin solution. Subsequently, the samples were dehydrated using a graded alcohols series and embedded in paraffin wax. Three micron sections were subjected to classical staining by haematoxylin/eosin and Masson staining to characterise the collagen fibres and then visualised under optical microscopy (Leica).

Immunohistochemical assessment

The collagen expression in the tunica albuginea was analysed on formalin-fixed tissue sections according to Bracarense et al. (2012). Tissue sections were deparaffinised with xylene and dehydrated through a graded ethanol series. Heat-mediated antigen retrieval was conducted by heating the sections (immersed in citrate buffer, pH 6.0) in a microwave oven (750 W) for 15 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in methanol-H₂O₂ solution. The

sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (diluted 1:100, anti-Col1 α I and anti-Col3 α I, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), which is suitable for the detection of collagen types I and III by immunochemistry. The secondary antibody was applied, and then, a chromogen (3,3-diaminobenzidine) was added. Finally, the tissue sections were counterstained with haematoxylin and mounted on coverslips using a permanent-mounting medium.

RESULTS

Biochemical characterisation of collagen types in the tunica albuginea

The enzymatically extracted collagen from the tunica albuginea was subjected to sequential salt fractionation at a pH of 2.5 or 7.5 using different concentrations of NaCl. Table 1 shows the amount by dry weight (mg) and percentage (%) of each precipitate obtained after sequential salt fractionation. The P_{0.7} corresponded to 54% of the total collagen extracted. By increasing the NaCl concentration, the P_{1.2} was obtained, which corresponded to 22.6% of the total collagen extracted. Then, by adding additional NaCl, two new precipitates, P_{1.8} and P_{2.0}, were obtained that corresponded to 3.5 and 3.8%, respectively, of the total collagen extracted from the tunica albuginea. Furthermore, by solubilising the pellet collected from P_{0.7} with 1.0 mol L⁻¹ NaCl at neutral pH, three new precipitates, P_{1.5}, P_{2.0} and P_{3.5}, were obtained that corresponded to 4.3, 9.3 and 2.5%, respectively, of the total collagen extracted from the tunica albuginea. All of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation were sequentially analysed by electrophoresis, and the electrophoresis pattern is shown in Figs 2 and 3. Fig 2 shows the omnipresence of type I collagen composed of $\alpha_1(I)$ and $\alpha_2(I)$ in all of the precipitates obtained at acidic pH values. Under the conditions used for this experiment, despite several

attempts, it was not possible to isolate type I collagen solely in one pellet. In $P_{0.7}$, bands with a molecular weight of 95 kDa were observed after the addition of mercaptoethanol (ME) (Fig 2, tracks 3 and 5). The high-molecular weight bands observed above the $\alpha_1(I)$ chain should be type V collagen [$\alpha_1(V)$, $\alpha_2(V)$ and $\alpha_3(V)$] obtained from the pellet of the fraction collected using 1.8 mol L^{-1} NaCl (Fig 2, tracks 7 and 8). An unreducible band with a molecular weight of 95 kDa was observed in $P_{1.8}$ after treatment with ME (Fig 2, tracks 7 and 8). Further treatment with ME allowed for the observation of other reduced bands with lower molecular weights of approximately 50 kDa in $P_{2.0}$ (Fig 2, track 9). Fig 3 shows the electrophoretic pattern of the precipitates obtained at pH 7.5. Again, type I collagen composed of $\alpha_1(I)$ and $\alpha_2(I)$ seems to be omnipresent and appears in every precipitate. Reducible bands were detected in all precipitates below the $\alpha_2(I)$ chain and had a molecular weight of 95 kDa (Fig 3, tracks 4 to 9). Other bands with a molecular weight of 80 kDa were observed in $P_{1.5}$ after the addition of ME (Fig 3, track 4). In both $P_{1.5}$ and $P_{2.0}$, other bands were observed above the $\alpha_2(I)$ chain after ME treatment (Fig 3, tracks 4 and 6); these bands suggest the presence of type III collagen composed of $\alpha_1(III)_3$. Some fragments with molecular weights of 95 kDa, 80 kDa and 50 kDa (Figs 2 and 3) were observed in the precipitates obtained by salt fractionation at acidic and neutral pH values.

Histological and immunohistochemical assessments

The application of classical staining using haematoxylin/eosin and Masson trichrome provided evidence for the presence of a high collagen fibre content within the tunica albuginea, as well as numerous fibroblasts (Fig 4a,b). The immunohistochemical assay was performed to locate the fibres of collagen type I and

III in the tunica albuginea. The images obtained revealed positive staining for collagen types I and III (Fig 5a,b). Type I positive staining was observed along the entire length of the tissue (Fig 5a), whereas type III was localised in the walls of blood vessels (Fig 5b). These results corroborate the earlier work by Davis et al. (1970), who reported numerous blood vessels, arteries and arterioles throughout the length of this tissue and used immunohistochemistry to reveal that type III collagen was particularly localised in the walls of these blood vessels.

DISCUSSION

Earlier reports indicated that in the tunica albuginea of prepubertal rat testes, total collagen increases with age while its solubility decreases at adulthood (Denduchis & Mancini, 1967). As we know today, these trends are caused by the increasing stability of collagen molecules resulting from the maturation of lysyl oxidase crosslinking that occurs as animals age (Robins et al. 1973; Coro et al. 2002). In this work, the collagen-forming fibrils were recovered, i.e., types I, III and V. However, type I collagen constituted the majority of the precipitates obtained after sequential salt fractionation. Bone, skin and muscle contain type I collagen as their major fibrillar component, whereas types III and V constitute minor components (Bailey 1984; Burgeson & Nimni, 1992). Collagen type III [$\alpha_1(\text{III})$] is widely co-distributed in tissues containing type I collagen; is detected in the walls of arteries, blood vessels, skin and the uterus; and is responsible for elastic properties of these tissues (Gelsea et al., 2003; Ricard-Blum, 2011). Collagen type V form fibrils with collagen types I and III and has been observed in the corneal tissue and placenta (Fessler et al., 1986; Birk et al., 1988). Chiang et al. (1992) identified small amount of collagen type V fibres in the tunica albuginea of human testes. The tunica albuginea

is described as a dense membrane composed of collagen fibres that are interwoven in all directions and with, as well as numerous fibroblasts and typical smooth muscle cells (Johson et al. 1970; Chacon-Arellano & Woolley, 1980). The application of classical staining using haematoxylin/eosin and Masson trichrome provided evidence for the presence of a high content of collagen fibres within the tunica albuginea as well as numerous fibroblasts. This result was also observed by other authors who histologically analysed the testicular tunica albuginea of mammals such as boars (Ohanian et al., 1979) and humans (Middendorff et al., 2002). The high collagen content of the tunica albuginea is associated with the shrinkage and elasticity of the testes, whereas the fibrillar collagen types I, III and V may give this tissue its tensile strength (Darewicz et al., 2001; Middendorff et al., 2002). Other collagen fragments have been identified in mammalian tunica albuginea. For example, Sawada and Yazama (1994) used immunofluorescence microscopy to observe type VI collagen distributed in the tunica albuginea of rat testes and concluded that this collagen type was important for the organisation of the extracellular matrix that forms this tissue. Recently, a new collagen, type XXVI, was reported to exist exclusively in the testes and ovaries (Sato et al., 2002). Although the biochemical characteristics of this collagen have not been completely reported, it seems to resemble the FACIT-LIKE collagen structure (Ricard-Blum & Ruggiero, 2005), which is not fibrillar and contains disulphide bonds. As reported, its MW in reducible conditions is 70 kDa, and among the several reduced components observed in our experiment, we did indeed observe this MW band (Figs 2 and 3). Although these results should be interpreted with caution, it is nevertheless very tempting to speculate that the tunica albuginea structure might adhere to the standard model, which is composed of fibrils constituted by at least types I, III and V. Somehow, the reducible fragments should

be linked to this structure and play not only a protective role but also other functions, possibly regarding the contraction/relaxation movements of the tissue (Nakano, 1994, Middendorff et al., 2002). The nature of these fragments is currently being investigated, and their presence suggests that a complex mesh of collagen fibrils is needed for this tissue to perform its biological role.

In conclusion, the tunica albuginea of pig testes is composed of collagen fibres, as determined by biochemical and microscopic techniques. Types I, III, V and other reducible components are present and constitute the collagen bundles, suggesting that these components do not play simple structural roles and may in fact be responsible for a significant physiological function in the tunica albuginea.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially financed by Pfizer. The authors acknowledge and are grateful for the graduate scholarship from CNPq to GSS. MS, EII and APFRLB are CNPq Research Fellows. MS is also a PVNS (Brazilian Senior Visiting Professor) from CAPES.

REFERENCES

- Alves, SGT, Prudêncio-Ferreira, SH. 2002. Functional properties of collagenous material chicken feet. *Archivos Latinoamericano de Nutrición* **52**, 289-293.
- Bailey, AJ. 1984. *Recent advances in the chemistry of meat* In: Bailey, AJ (ed). Royal Society of Chemistry, London.
- Bailey, AJ, Light, ND. 1989. *Connective tissue in meat and meat products*, 19nd edn. Elsevier Science Publishers.
- Birk, DE, Fitch, JM, Babiarez, JP, Linsenmayer, TF. 1988. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *The Journal of Cell Biology* **106**, 999-1008.
- Bracarense, APFL, Luciola, J, Grenier, B, Pacheco, GD, Moll, WD, Schatzmayr, G, Oswald, IP. 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition* **107**, 1776–1786.
- Benjakul, S, Thiansilakul, Y, Visessanguan, W, Roytrakul, S, Kishimura, H, Prodpran, T, Meesane, J. 2010. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food Agriculture* **90**, 132-138.
- Burgeson, RE, Nimni, ME. 1992. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **282**, 250-272.
- Chacon-Arellano, JT, Woolley, DM. 1980. Smooth muscle cells in the testicular capsule of the horse, pig and sheep. *Journal of Anatomy* **131**, 263-273.
- Chiang PH, Chiang CP, Shen MR, Huang CH, Wang CJ, Huang IY, Shieh TY. 1992. Study of the changes in collagen of the tunica albuginea in venogenic impotence and Peyronie's disease. *European Urology* **21**, 48-51.

- Coró, FAG, Youssef, EY, Shimokomaki, M. 2002. Age related changes in poultry breast meat collagen pyridinoline and texture. *Journal of Food Biochemistry* **26**, 533-541.
- Darewicz, B, Kudelski, J, Szynaka, B, Nowak, HF, Darewicz, J (2001) Ultrastructure of the tunica albuginea in congenital penile curvature. *Journal of Urology* **166**, 1766-1768.
- Davis, JR, Langford GA, Kirby PJ. 1970. The testicular capsule. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark WL. (eds), *The testis, Advances in Physiology Biochemistry and Functions* **4**, 281–337, Academic Press, New York.
- Denduchis, B, Mancini, RB. 1967. Quantitative variations in total and soluble collagen in testes of prepubertal and adult rats. *Endocrinology* **80**, 1163-1167.
- Fessler, LI, Brosh, S, Chapin, S, Fessler, JH. 1986. Tyrosine sulfation in precursors of collagen V. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 5034– 5040.
- Gelsea, K, Poschl E, Algnera T. 2003. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1531–1546.
- Gordon, MK, Hahn, RA. 2010. Collagens. *Cell and Tissue Research* **339**, 247–257.
- Johnson AD, Gomes WR, Vandemark WL. 1970. *The testis, Advances in physiology biochemistry and functions*. Vol. 4, Academic Press, New York.
- Middendorff, R, Muller, D, Mewe, M, Mukhopadhyay, AK, Holstein, AF, Davidoff, MF. 2002. The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**, 3486–3499.
- Nalinanon, S, Benjakul, S, Kishimura, H, Osako, K. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry* **125**, 500–507.

- Nakano, T. 1994. Three-dimensional architecture of collagen fibrils in the mouse testicular capsule. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* **71**, 203-209.
- Ohanian, C, Rodrigues, H, Piriz, H, Martino, I, Rieppi, G, Garófalo, EG, Roca, RA. 1979. Studies on the contractile activity and ultrastructure of the boar testicular capsule. *Journal of Reproduction and Fertility* **57**, 79-85.
- Ricard-Blum, S. 2011. The Collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* **3:a004978**, 1-19.
- Ricard-Blum, S, Ruggiero, F. 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie* **53**, 430–442.
- Robins, SP, Shimokomaki M, Bailey, AJ. 1973. The chemistry of the collagen cross-links. Age related changes in the reducible components of intact collagen fibres. *Biochemical Journal* **131**, 771-780.
- Sadowska, M, Koodziejaska, L, Niecikowska, C. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry* **83**, 257–262.
- Sawada, H, Yazama, F. 1994. Type VI collagen in the rat testis: monoclonal antibody, isolation, and localization during development. *Biology of Reproduction* **50**, 702-710.
- Sato, K, Yomogida, K, Wada, T, Yoriuzzi, T, Nishimune, Y, Hosokawa, N, Nagata, K. 2002. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 37678–37684.
- Shimokomaki, M, Duance, VC, Bailey, AJ. 1980. Identification of a new disulfide bonded collagen from cartilage. *Febs Letters* **121**, 51–54.

- Shon, J, Eo, J-H, Hwang, SJ, Eun, J-B. 2011. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenojei*) skins. *Food Science Biotechnology* **20**, 99-106.
- Shoulders, MD, Raines, RT. 2009. Collagen Structure and Stability. *Annual Review Biochemistry* **78**, 929-958.
- Simões, GS, Silveira, TEF, Oliveira, SR, Poleze, E, Allison, JRD, Ida, EI, Shimokomaki, M. 2013. Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen. *Meat Science* in press. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.10.038
- 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 of Food Science and Emerging Technologies* **9**, 604–607.
- Woo, J W, Yua, SJ, Chob, SM, Leea, YB, Kima, SB. 2008. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids* **22**, 879–887.
- Yan, M, Bafang Li, B, Zhao, X, Ren, G, Zhuang, Y, Hou, H, Zhang, X, Chen, L, Fan, Y. 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry* **107**, 1581–1586.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Fluxogram showing the step-by-step sequential salt fractionation of the solubilised collagens from the tunica albuginea with NaCl at pH 2.5 (right side) and 7.5 (left side). P: Precipitate; S: Supernatant.

Figure 2: SDS-PAGE pattern of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation with NaCl at pH 2.5. Lines: 1: MW markers; 2: Type I collagen from rat tail (control); 3 and 4: P_{0.7}; 5 and 6: P_{1.2}; 7 and 8: P_{1.8}; 9 and 10: P_{2.0}. (+) with and (-) without β -mercaptoethanol (ME).

Figure 3: SDS-PAGE pattern of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation with NaCl at pH 7.5. Tracks: 1: MW markers; 2 and 3: Type I collagen from rat tail (control); 4 and 5: P_{1.5}; 6 and 7: P_{2.0}; 8 and 9: P_{3.5}. (+) with and (-) without β -mercaptoethanol.

Figure 4: Optical microscopy with haematoxylin/eosin (a) and Masson trichrome (b) staining of the tunica albuginea of the testes from immunologically castrated pigs. 1 - Collagen fibres with a wavy appearance; 2 - Fibroblast cell nucleus; 3 - Blood vessels. Scale bars: 50 μ m (a) and 100 μ m (b).

Figure 5: Immunohistochemistry with staining for collagen type I and type III in the tunica albuginea of the testes of immunologically castrated pigs. (a): positive staining of collagen type I fibres shown in brown on a blue background (scale bar = 20 μ m.); (b): positive staining of type III collagen fibres shown in brown on a blue background (scale bar = 50 μ m).

Table 1: Quantity (mg) and percentage (%) of the precipitates obtained in the sequential salt fractionation at pH 2.5 or pH 7.5 and the collagen types identified by SDS-PAGE

	Precipitates	Amount*	Percentage	Collagen Types
	obtained in the	(mg)	(%)	
	sequential salt			
	fractionation			
	P _{0.7}	2.150	54.0	Type I and fragments with 95 kDa and β -ME
pH 2.5	P _{1.2}	900	22.6	Type I and fragments with 95 kDa and β -ME
	P _{1.8}	140	3.5	Types I, V and irreducible fragments with 95 kDa
	P _{2.0}	150	3.8	Type I and fragments with 50 kDa and β -ME
pH 7.5	P _{1.5}	170	4.3	Type III and irreducible fragments with 95 kDa
	P _{2.0}	370	9.3	Type III and irreducible fragments with 95 kDa
	P _{3.5}	100	2.5	Type I

*Mass after lyophilization

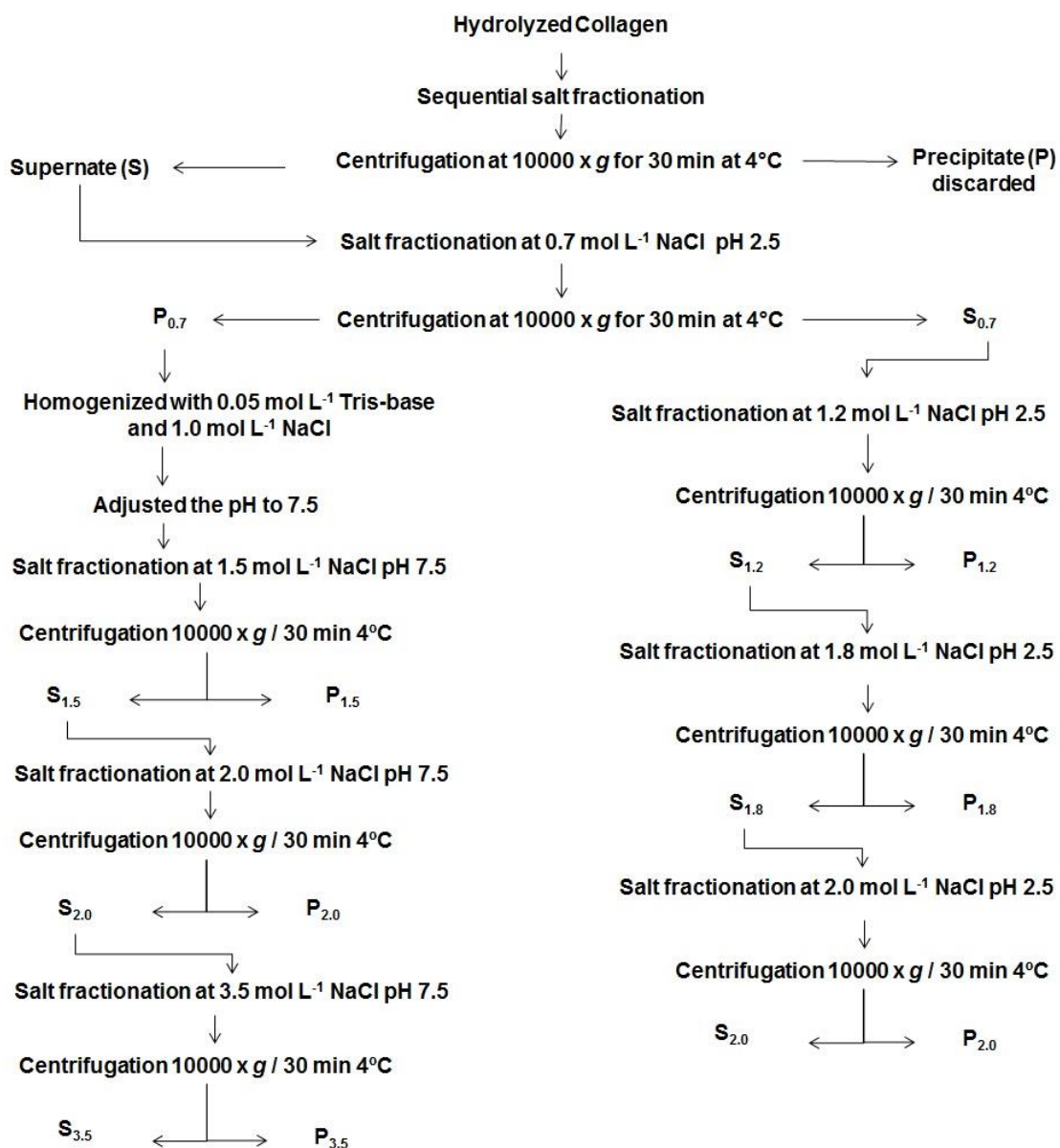
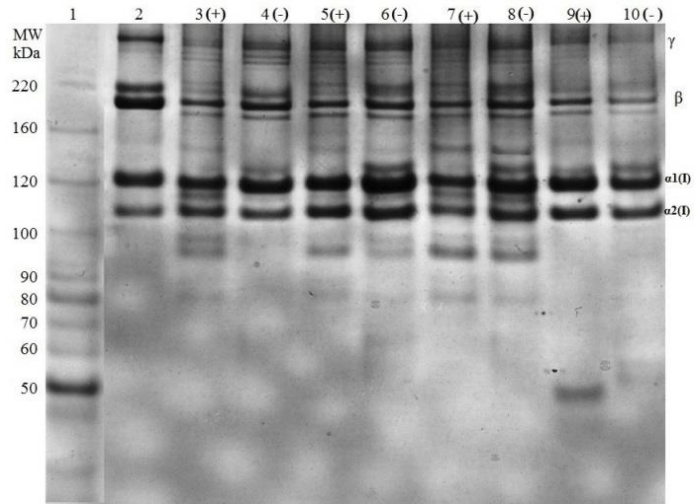
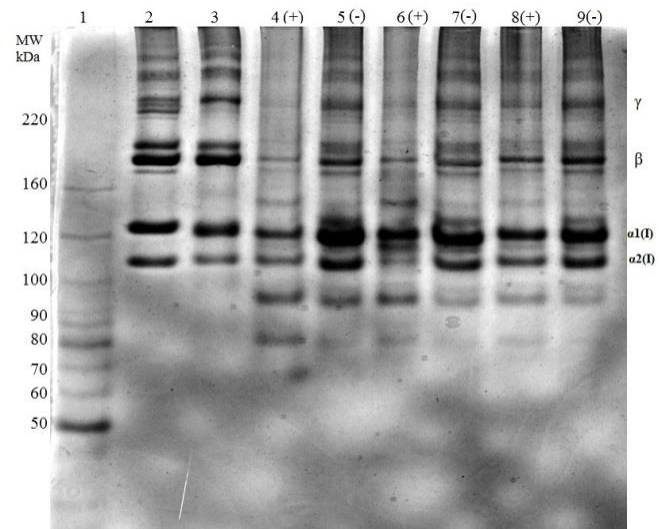


Figure 1

**Figure 2**

**Figure 3**

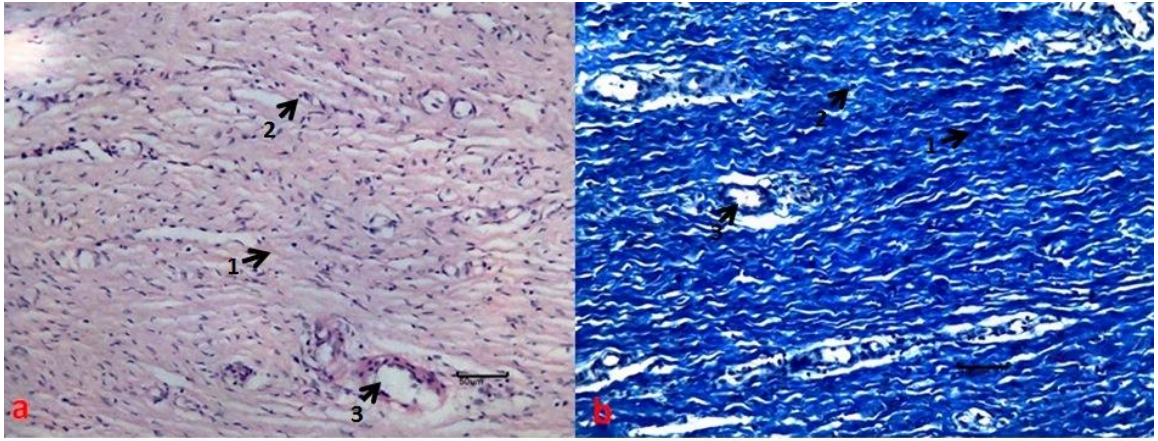


Figure 4

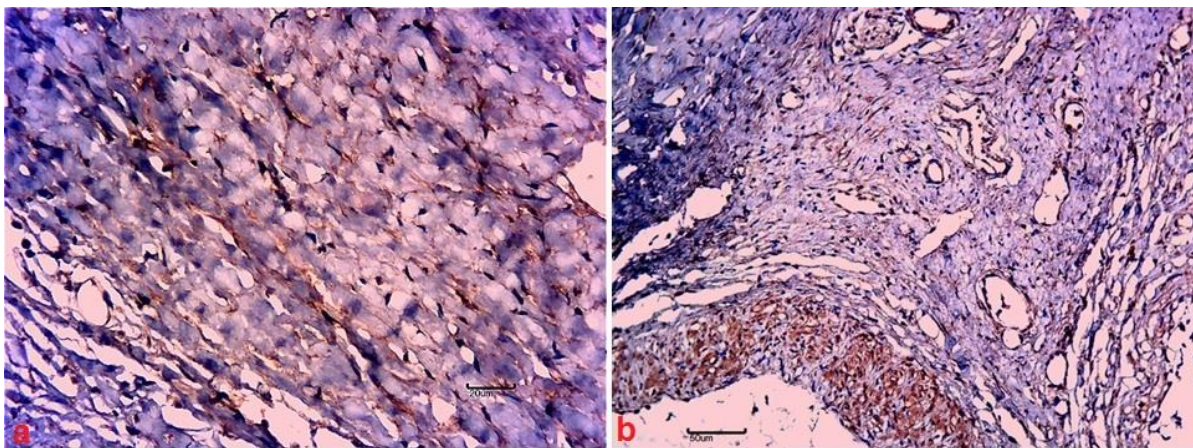


Figure 5

CONCLUSÕES

A túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados apresentou-se como uma importante fonte de colágeno. As condições ótimas para extração de colágeno de túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados foram: tratamento com ácido acético na concentração de $0,83 \text{ mol L}^{-1}$ por 12 h a 4°C com agitação contínua, seguida de hidrólise com 0,24% de pepsina por 28 h a 4°C com agitação contínua. Estas condições proporcionaram a obtenção de um isolado de colágeno com 82,54 g de colágeno por 100 g de amostra que apresentou perfil de aminoácidos, propriedades químicas e funcionais adequadas para aplicação em produtos cárneos emulsionados. As análises histológicas e bioquímicas evidenciaram que a túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados é composta basicamente por fibras de colágeno e foram identificados os colágenos dos tipos I, III e V, além de componentes não caracterizados.

ANEXOS

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Evento: VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, São Pedro, SP, 2011

Título: *Caracterização de colágeno extraído de testículos de suínos imunocastrados*

Autores: Gislaine Silveira Simões, Gleice Rocha dos Santos, Expedito Tadeu Facco Silveira, Elza Ioko Ida, Massami Shimokomaki

Evento: 16th IUFoST World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, 2012

Título: *Extraction of collagen from the connective tissue of immunocastrated pigs testicles using fractional factorial design*

Autores: Gislaine Silveira Simões, Expedito Tadeu Facco Silveira, Elza Ioko Ida, Massami Shimokomaki

Evento: 59th International Congress of Meat Science and Technology, Izmir, Turkey, 2013

Título: *Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from pigs testicles tunica albuginea*

Autores: Gislaine Silveira Simões, Ana Paula F. R. L. Bracarense, Expedito Tadeu Facco Silveira, Elza Ioko Ida, Massami Shimokomaki

Evento: XII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Medianeira, PR, 2013

Título: *Caracterização química e histológica de túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados*

Autores: Gislaine Silveira Simões, Ana Paula F. R. L. Bracarense, Expedito Tadeu Facco Silveira, Elza Ioko Ida, Massami Shimokomaki

Premiação: Prêmio sbCTA-PR de Incentivo à Pesquisa Renato João Sossela de Freitas - 1^o Lugar da área de Química e Bioquímica

Evento: X SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, SP, 2013

Título: *Propriedades químicas e funcionais de isolado de colágeno extraído de túnica albugínea de testículos de suínos imunocastrados*

Autores: Gislaine Silveira Simões, Expedito Tadeu Facco Silveira, Elza Ioko Ida, Massami Shimokomaki