

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DA RETICULAÇÃO QUÍMICA NAS GELATINAS DE PELES E OSSOS DE
TILÁPIA E DE CARPA E NA PRODUÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS**

JAQUELINE POZZADA DOS SANTOS

Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Engenharia e Ciência de Alimentos

LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO

Orientador

CATARINA MOTTA DE MOURA

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2017

Ficha catalográfica

S237e Santos, Jaqueline Pozzada dos.
Efeito da reticulação química nas gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa na produção de filmes biopolímeros / Jaqueline Pozzada dos Santos. – 2017.
113 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.
Orientador: Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto.
Coorientadora: Dr^a. Catarina Motta de Moura.

1. Pescado 2. Gelatina 3. Reticulação química 3. Filmes biopoliméricos
4. Tilápia 5. Carpa I. Pinto, Luiz Antonio de Almeida II. Moura, Catarina Mota de III. Título.

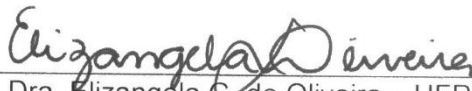
CDU 664.95

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Jaqueline Pozzada dos Santos e aprovada em 24 de fevereiro de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG



Profa. Dra. Elizângela G. de Oliveira – UFRGS



Prof. Dr. Roberto S. Gomes da Silva – FURG.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe (*in memoriam*) que me ensinou a beleza das palavras quando ainda não sabia ler. Obrigada por estar sempre ao meu lado me guiando e abençoando em todos meus atos e decisões. Dedico a você não apenas este trabalho, mas tudo que sou hoje. Vou ser grata para sempre por poder passar maravilhosos 12 anos em sua presença. Saudades eterna.

Ao meu noivo Alex, por todo o incentivo, carinho e companheirismo. Pela luz que irradia em minha vida e pelo amor, a paz e a emoção. Por sempre apresentar uma palavra de conforto, nas tantas vezes que me encontrava desesperada no meio dos cadernos. Por toda ajuda e principalmente por toda a paciência. Essa conquista também é sua. Te amo!

As minhas irmãs, Aline e Jaíny. Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente, embora as vezes sem tanta compreensão eu escutava “Não acredito, outro final de semana que tu não vais vir pra cá”. Obrigada por aguentar meu mau humor dos dias difíceis. Amo vocês para sempre. Agradeço também a toda minha família pai, cunhados, sogros que de alguma forma contribuíram para eu chegar até aqui.

Ao meu professor orientador Luiz Antonio de Almeida Pinto, exemplo de profissional. Obrigada por abrir as portas, acreditar que nossa parceria seria possível. Obrigada por me ajudar e permitir que eu aprendesse com você. Meu eterno respeito e admiração. Ao grupo Engenheiras viajando, minhas amigas Marina, Paola e Geisa. Agradeço pelo apoio mesmo que pelo Whatsapp. Nossos momentos de descontrações são os melhores. Espero continuar a ver o lado bom das coisas e rindo das desgraças junto com vocês.

Aos colegas de laboratório, pela companhia e auxílio na realização deste trabalho, pelas risadas, pelo apoio quando as coisas pareciam dar errado. Em especial as gatas saradas Janaína, Sílvia, Vanessa e Jenifer. Vocês são de mais.

*“Obstáculos são aquelas coisas assustadoras que
você vê quando desvia seus olhos de sua meta.”*

Henry Ford

RESUMO

A tilápia do Nilo e a carpa comum são amplamente cultivadas no mundo, fornecendo uma fonte constante de resíduos de peixes. Estes resíduos são constituídos em grande parte de peles e ossos, ricos em colágeno e que podem ser utilizados na produção de gelatina e filmes biodegradáveis. A reticulação química é uma alternativa promissora a fim de proporcionar melhorias nas propriedades de polímeros. Os objetivos deste estudo foi obter, modificar e comparar gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa, produzir filmes biopoliméricos e analisá-los quanto a ação dos agentes reticulantes. As gelatinas foram caracterizadas quanto aos rendimentos, massa molar, perfil de aminoácido, espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), propriedades de gel, turbidez e cor. A reticulação das gelatinas foi feita com agentes químicos eletrólitos (NaCl e MgSO₄) e não eletrólitos (ácido gálico e ácido cítrico). As gelatinas reticuladas foram analisadas quanto a massa molar, propriedades de gel, turbidez e cor, grau de reticulação, análises térmicas (DSC e TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os filmes foram produzidos a partir de gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa, e analisados antes e após a reticulação das gelatinas. Os filmes foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas e físicas, cor e transparência, FT-IR, DSC/TGA, DRX e MEV. Os géis obtidos apresentaram uma coloração amarelada, característica de gelatina de pescado. O conteúdo de hidroxiprolina e a distribuição de massa molar elucidou as propriedades de gel superiores para a gelatina de tilápia em relação a de carpa. As diferenças nas propriedades entre as gelatinas de peles e ossos estudadas podem ser justificadas pela diferença de processos de extração e das fontes de obtenção. A gelatina de pele de tilápia reticulada com ácido gálico apresentou força de gel, ponto de fusão, temperatura de gelificação e viscosidade (252,8 g, 27,6 °C, 18,0 °C, 4,9 cP, respectivamente) superiores aos das gelatinas reticuladas com ácido cítrico (225,6 g, 27,3 °C, 17,9 °C, 4,2 cP, respectivamente), MgSO₄ (240,4 g, 26,9 °C, 17,86 °C, 3,7 cP, respectivamente) e NaCl (215,3 g, 26,5 °C, 17,7°C, 2,6 cP, respectivamente). Resultados inferiores para estas propriedades foram encontrados para gelatinas reticuladas de peles de carpa. O grau de reticulação das amostras ratificou os resultados reológicos. As análises de FT-IR confirmaram as reticulações entre a proteína e os agentes de reticulação, com os picos mais intensos nos grupos amino. As análises de MEV mostraram superfícies com estruturas mais espessas para gelatina reticulada com maior resistência ao gel, assim como superfícies menos rugosas nos filmes reticulados que apresentaram menores permeabilidades ao vapor de água (PVA). As curvas de DSC e TGA, para as gelatinas e os filmes reticulados, revelaram que a reticulação da proteína tornou o polímero mais termorresistentes. A reticulação aumentou a barreira UV nos filmes. Os agentes não eletrólitos aumentaram a tensão de ruptura e diminuíram a PVA dos filmes. As análises de DRX apresentaram estruturas amorfas e parcialmente cristalinas. Os resultados demonstraram a viabilidade da reticulação química para melhorar as gelatinas e os filmes de gelatina de pescado.

Palavras-chave: Gelatina de pescado. reticulação química. filmes de gelatina modificada.

ABSTRACT

EFFECT OF CHEMICAL RETICULATION IN GELATINS OF TILAP AND CARP SKINS AND BONES AND IN THE PRODUCTION OF BIOPOLIMÉRIC FILMS

Nile tilapia and common carp are widely cultivated in the world, providing a constant source of fish waste. These residues consist largely of skins and bones, rich in collagen and can be used in the production of gelatin and biodegradable films. Chemical crosslinking is a promising alternative in order to provide improvements in the properties of polymers. The aims of this study was to obtain, modify and compare gelatins from tilapia and carp skins and bones, to produce biopolymer films and to analyze them on the action of crosslinking agents. The obtained gelatins were characterized in terms of yield, molar mass, amino acid profile, infrared spectroscopy (FT-IR), gel properties, turbidity and color. The gelatins were crosslinked with chemical electrolytes (NaCl and MgSO₄) and non-electrolytes (gallic acid and citric acid). The crosslinked gelatins were analyzed for molar mass, gel properties, turbidity and color, degree of crosslinking, thermal analysis (DSC and TGA) and scanning electron microscopy (SEM). Gelatin films were produced from skins and tilapia and carp bones and analyzed before and after gelatin cross-linking. The films were characterized in terms of mechanical and physical properties, color and transparency, FT-IR, DSC/TGA, XRD and SEM. The gels obtained showed a yellowish coloration, characteristic of fish gelatine. The hydroxyproline content and the molar mass distribution elucidated the superior gel properties for tilapia gelatin relative to carp gelatin. The differences in the properties between the skin and bone gelatins studied can be justified by the difference in the extraction processes and of the sources of production. Gallic acid crosslinked tilapia skin gelatin showed gel strength, melting point, gelling temperature and viscosity (252.8 g, 27.6 °C, 18.0 °C, 4.9 cP) higher than the crosslinked gelatins with citric acid (225.6 g, 27.3 °C, 17.9 °C, 4.2 cP), MgSO₄ (240.4 g, 26.9 °C, 17.86 °C, 3.7 cP) and NaCl (215.3 g, 26.5 °C, 17.7 °C, 2.6 cP). Lower results were found for crosslinked gelatins from carp skin. The degree of crosslinking of the samples confirmed the rheological results. FT-IR confirmed the cross-linking between the protein and the crosslinking agents, with the most intense peaks at the amino groups. MEV showed thicker structures for crosslinked gelatin, which had higher gel resistance, as well as less rough surfaces on the crosslinked films, which presented lower water vapor permeability (PVA). DSC and TGA, for the crosslinked gelatins and its films, revealed that protein crosslinking led to a polymer more heat resistant. The crosslinking increased the UV barrier in the films. The non-electrolyte agents increased the tensile strength and decreased the PVA of the films. The XRD presented amorphous and partially crystalline structures. The results demonstrated the feasibility of chemical crosslinking to improve gelatin and fish gelatin films.

Keywords: Fish gelatin. chemical cross-linking. modified gelatin films.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cadeias laterais de aminoácidos utilizados para modificações químicas em proteínas	33
Tabela 2 - Composição química das amostras de peles in natura, ossos moídos e gelatinas obtidas de carpa comum e tilápia do Nilo	52
Tabela 3 - Rendimentos das gelatinas de peles e ossos tilápia e carpa	54
Tabela 4 - Composição de aminoácidos das gelatinas de peles de tilápia e carpa	57
Tabela 5 - Caracterizações das gelatinas de peles e ossos tilápia do Nilo e de carpa comum.	60
Tabela 6 - Força de gel (FG), viscosidade (Visc), ponto de fusão (PF) e temperatura de gelificação (TG) para gelatinas de peles de bovino e gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa	66
Tabela 7 - Força de gel (FG), viscosidade (Visc), ponto de fusão (PF) e temperatura de gelificação (TG) para gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa..	66
Tabela 8 - Turbidez (Turb), croma L*, ângulo Hue, diferença de cor (ΔE) para gelatinas de peles de bovino, gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa	69
Tabela 9 - Turbidez (Turb), croma L*, ângulo Hue, diferença de cor (ΔE) para gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa	69
Tabela 10 - Resistência à tração (RT), alongamento (A), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura dos filmes de gelatinas de peles de bovino e gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa	76
Tabela 11 - Resistência à tração (RT), alongamento (A), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura dos filmes gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa.....	78
Tabela 12 - Parâmetros de cor (ângulo Hue (H°) e diferença total de cor (ΔE^*)), transmitância UV e luz visível dos filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia e carpa.	80
Tabela 13 - Croma a* e croma b* para gelatinas de peles de bovino, gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa	109
Tabela 14 - Croma a* e croma b* para gelatinas de peles de bovino, gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado dos principais produtos, resíduos e subprodutos obtidos no processamento de pescado.....	24
Figura 2- Ilustração dos pescados carpa comum (a) e tilápia do Nilo (b).....	26
Figura 3 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.....	28
Figura 4- Representação esquemática da estrutura da hélice tripla do colágeno	28
Figura 5- Fluxograma resumido da obtenção de gelatina de pele	40
Figura 6 - Fluxograma resumido da obtenção de gelatina de ossos	41
Figura 7- Fluxograma resumido da obtenção de filmes biopoliméricos	42
Figura 8- Ilustração das matérias-primas utilizadas	52
Figura 9- Soluções de gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa, e gelatina controle de pele bovina.....	53
Figura 10- Gelatinas clarificadas de peles e ossos de tilápia e de carpa	53
Figura 11- Gelatinas liofilizadas de peles e ossos de tilápia e de carpa.	53
Figura 12- Distribuição molar das gelatinas de peles de tilápia e carpa	56
Figura 13- Espectros de absorção na região do infravermelho das gelatinas de tilápia, carpa e bovino	59
Figura 14- Distribuição molar das gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B).	64
Figura 15- Espectros Infravermelhos de Transformada de Fourier (FT-IR) de gelatinas de peles pura e reticulada: (A) gelatina de tilápia do Nilo e (B) gelatina carpa comum.....	65
Figura 16- Grau de reticulação das gelatinas em função dos agentes químicos de reticulação	71
Figura 17- Termogramas de DSC para gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B).....	72
Figura 18- Termogramas de TGA para gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B).....	73
Figura 19- Termogramas de DTA para gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B).....	73
Figura 20- Micrografias MEV para gelatinas de peles de tilápia.....	75
Figura 21- Micrografias MEV para gelatinas de peles de carpa	75
Figura 22- Ilustração dos filmes de gelatina obtidos.....	79

Figura 23- Espectros de FT-IR dos filmes de gelatinas puras e reticuladas de peles: (A) filmes de tilápia do Nilo e (B) filmes de carpa comum	81
Figura 24 - Termogramas DSC de filmes de gelatina puras e reticuladas de peles: (A) filmes de tilápia do Nilo e (B) filmes carpa comum	83
Figura 25- Termogramas de TGA para filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)	83
Figura 26- Termogramas de DTA para filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)	84
Figura 27- Padrões de difração de raios-X de filmes de gelatinas pura e reticuladas de peles de tilápia do Nilo.....	85
Figura 28- Padrões de difração de raios-X de filmes de gelatina pura e reticuladas de peles de carpa comum	86
Figura 29- Micrografias MEV de filmes de gelatina pura e reticuladas de peles de tilápia do Nilo.....	87
Figura 30- Micrografias MEV de filmes de gelatina pura e reticuladas de peles de carpa comum.....	87
Figura 31- Curva padrão da hidroxiprolina	108
Figura 32- Aminoácidos comumente presentes em gelatinas	110
Figura 33- Agentes químicos de reticulação.....	112

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 RESÍDUOS DA PISCICULTURA	23
3.1.1 Carpa comum	24
3.1.2 Tilápia do Nilo	25
3.2 PROTEÍNAS	26
3.3 COLÁGENO	27
3.4 GELATINA	29
3.4.1 Gelatina de pescado.....	31
3.4.2 Gelatina modificada	32
3.4.3 Agentes de reticulação	34
3.5 FILMES BIOPOLIMÉRICOS	35
3.5.1 Filmes de gelatina	37
3.5.2 Filmes biopoliméricos modificados.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS	39
4.2 OBTENÇÃO DAS SOLUÇÕES DE GELATINA	39
4.2.1 Gelatina de peles.....	39
4.2.2 Gelatina de ossos.....	40
4.2.3 Clarificação das gelatinas	41
4.3 RETICULAÇÃO DAS GELATINAS	41
4.4 PRODUÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS	42
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	42
Composição química dos resíduos e das gelatinas de pescados	42
4.5.2 Caracterizações das gelatinas e dos filmes biopoliméricos.....	43
4.6 METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PELES E OSSOS E DAS GELATINAS	51
5.2 RENDIMENTOS E CARACTERIZAÇÃO DAS GELATINAS OBTIDAS	54

5.2.1	Rendimentos de extração e em hidroxiprolina das gelatinas.....	54
5.2.2	Distribuição de massa molar das gelatinas.....	55
5.2.3	Perfil de aminoácido das gelatinas	57
5.2.4	Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) das gelatinas.....	58
5.2.5	Determinação das propriedades das gelatinas	60
5.3	GELATINAS MODIFICADAS.....	63
5.3.1	Distribuição de massa molar das gelatinas modificadas.....	63
5.3.2	Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)	64
5.3.3	Propriedades de gel das gelatinas controle e modificadas	65
5.4	FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE GELATINAS MODIFICADAS.....	76
5.4.1	Propriedades mecânicas e físicas dos filmes.....	76
5.4.3	Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) dos filmes.....	81
5.4.4	Análises térmicas dos filmes.....	82
5.4.5	Análise de difração de raio-X dos filmes.....	85
5.4.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes.....	86
6.	CONCLUSÕES	89
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	APÊNDICES.....	107
	APÊNDICE 1 - Curva padrão da hidroxiprolina	108
	APÊNDICE 2 - Valores dos parâmetros relacionados à cor (croma a* e b*) das gelatinas.	109
	APÊNDICE 3 - Ilustração dos aminoácidos da gelatina.....	110
	APÊNDICE 4 – Ilustração dos agentes de reticulação	112
	APÊNDICE 5 - Produção bibliográfica	113

1. INTRODUÇÃO

O aumento da poluição ambiental e os graves problemas ecológicos causados pelas embalagens derivadas do petróleo levaram ao interesse na utilização de polímeros naturais para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis (VEJDAN et al., 2016). A gelatina é considerada uma opção promissora como matéria-prima para a embalagem de alimentos, proporcionando baixo custo, capacidade de formação de filme, alta disponibilidade e biodegradabilidade (FARRIS et al., 2011). A gelatina é obtida por hidrólise controlada do colágeno insolúvel presente em peles e ossos de bovinos, suínos e peixes. Em alimentos, a gelatina atua como agente emulsionante e espumante, clarificador, material de embalagem biodegradável e agente de encapsulação (BANDEIRA; PINTO, 2014; GOMÉZ-GUILLEN et al., 2011; NIU et al., 2013; SILVA; SUN-WATERHOUSE; ZHAO; WATERHOUSE, 2014); em aplicações biomédicas, inclui tratamento de hipertensão e inibição de doenças angiogênicas (VEERURAJ et al., 2012). De acordo com Shakila et al. (2012), 41,0% da gelatina produzida no mundo é derivada de pele de porco, 28,5% de pele de bovino e 29,5% de ossos de bovino.

Fontes de gelatina marinha, especialmente peles de peixe, aumentaram como alternativa as fontes de mamíferos, devido ao desenvolvimento do vegetarianismo, mercados halal e kosher, e a preocupação com a transmissão de agentes patogênicos, como a encefalopatia espongiforme bovina (ARFAT et al., 2017). Em todo o mundo, a carpa é o peixe mais explorado da aquicultura, seguido pela tilápia, com uma produção anual de 3,1 milhões de toneladas. A quantidade de resíduos orgânicos gerados nas fábricas de processamento de pescado pode atingir 70% do peso do peixe (COURTS, 1977; FAO, 2012; WARDS). A produção de gelatina de peixe é considerada uma alternativa promissora ao uso de resíduos gerados, mas sua produção comercial é muito baixa, cerca de 1% da produção mundial anual. O baixo número pode ser atribuído às propriedades reológicas inferiores comparadas com a gelatina de mamífero, que limitam seu uso em aplicações alimentares (HEMAR, et al., 2014; MOHTAR; PERERA; SHAKILA et al., 2012). Para expandir o uso de gelatina de peixe, o estudo das propriedades e modificações que pode levar a impactos benéficos sobre suas características se torna necessário.

As películas à base de proteínas, tais como a gelatina, têm uma permeabilidade relativamente alta ao vapor de água e baixas forças mecânicas, sendo as principais desvantagens da aplicação de filmes de gelatina em materiais de embalagem (HOSSEINI; JAVIDI; REZAEI, 2016). Vários estudos têm sido conduzidos para reparar esta deficiência, incluindo o desenvolvimento de filmes de misturas e bicamadas (RHIM; WANG, 2013), adição de

nanopartículas (KANMANI; RHIM, 2014) e modificação química com reticulantes (URANGA et al., 2016). A reticulação química proporciona ligações covalentes entre grupos reativos presentes na gelatina, resultando em melhorias nas propriedades mecânicas, resistência térmica e permeabilidade ao vapor de água (CATALINA et al., 2011). No entanto, um método de reticulação de baixo custo, eficiente e não-tóxico ainda é um desafio para o uso de gelatina na indústria alimentar e farmacêutica (DEL GAUDIO et al., 2013; HE et al., 2015).

Eletrólitos, como cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio (MgSO₄) podem afetar a gelatina por meio de forças eletrostáticas e a formação de pontes salinas (KAEWRUANG et al., 2014). Não-eletrólitos, como ácido gálico (AG) e ácido cítrico (AC) podem afetar as propriedades do gel de gelatina, devido ao efeito plastificante melhorar a estabilidade do gel (XU et al., 2015). No entanto, as alterações causadas pelos reticulados no filme produzido por gelatinas de peles e ossos de peixe não foram elucidadas. Neste contexto, avaliar o efeito da adição de eletrólitos (NaCl e MgSO₄) e não-eletrólitos (AG e AC) na matriz proteica sobre as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor de água de filmes de gelatina obtidos de peles e ossos de peixe é um estudo relevante. Este estudo busca compreender as mudanças causadas pela reticulação na matriz de gelatina de peixe. A melhoria da qualidade dos filmes biopoliméricos facilita a sua concorrência com embalagens não biodegradáveis, podendo gerar valor para um resíduo industrial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo foi obter gelatina a partir de peles e ossos de tilápia do Nilo e de carpa comum, modificar quimicamente as gelatinas e produzir filmes biopoliméricos a partir de gelatinas modificadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter gelatinas de peles e de ossos de tilápia do Nilo e carpa comum;
- Caracterizar gelatinas de peles e de ossos de tilápia e carpa quanto às propriedades químicas, estruturais e funcionais;
 - Modificar quimicamente as gelatinas com agentes eletrólitos (NaCl, MgSO₄) e não eletrólitos (ácido gálico e ácido cítrico);
 - Caracterizar as gelatinas reticuladas quanto as suas propriedades funcionais e compará-las a gelatina bovina;
 - Produzir e caracterizar filmes biopoliméricos de gelatinas obtidas de peles e de ossos de tilápia e carpa;
 - Avaliar o efeito dos agentes reticulantes nas principais propriedades dos filmes biopoliméricos de gelatinas modificadas de peles e de ossos de tilápia e carpa;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESÍDUOS DA PISCICULTURA

Os interesses envolvendo o pescado movimentam cerca de US\$ 600 bilhões anuais e esse volume torna o ramo de pescado sete vezes maior que o de carne bovina e nove vezes maior que o de carne de frango em nível mundial. O Brasil é considerado um dos grandes produtores em aquicultura, apresentando melhores condições para avançar no ranking na participação mundial (PDA, 2015). Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção brasileira de pescado cultivado em 2013 foi de 392,5 mil toneladas. Das quais, de acordo com o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura de 2014, a maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental, onde se destaca a piscicultura continental representando 86,6% da produção total nacional (ACEB, 2014).

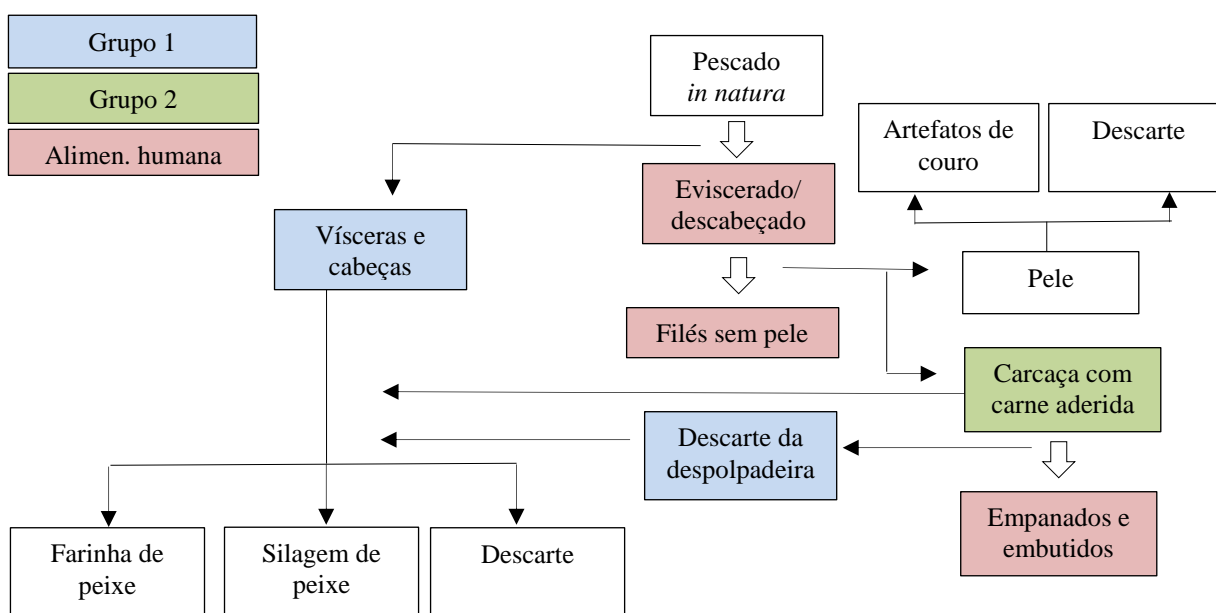
A quantidade de resíduos orgânicos gerada nas plantas de processamento de pescado pode alcançar 70% em massa dos pescados, dependendo do tipo de pescado, do produto desejado e da técnica empregada (AMIRKOLAIE, 2011). A utilização e eliminação destes resíduos é difícil devido à sua instabilidade biológica, natureza potencial para crescimento de patógenos, elevada atividade de água e elevados níveis de atividade enzimática, que favorecem sua deterioração e oxidação. Em geral os resíduos geralmente são constituídos por peles (2-6%), ossos (30-35%), cabeças (12-25%), vísceras (8-16%) e aparas (2-4%), que são ricos em proteínas (WARD; COURTS, 1977). Ainda pode-se afirmar que, embora no mesmo tipo de pescado, o teor proteico pode variar dependendo do tipo de tecido, idade, espécie, sexo, etc (JAYASINGHE; HAWBOLDT, 2012).

De acordo com a norma Brasileira (NBR) 10.004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004), os resíduos da indústria da pesca podem ser classificados em duas categorias: Classe I – Perigosos (apresentam propriedades físicas, químicas ou infectocontagiosas, que oferecem risco a saúde pública e ao meio ambiente, como resíduos de pescado contaminados); Classe IIA – Não Inertes (apresentam propriedades como combustibilidade, biodegradabilidade ou solubilidade em água, como resíduos de pescado não contaminados). Os resíduos da Classe IIA das indústrias pesqueiras são aqueles com maior potencial para reciclagem.

Para fins didáticos é possível reunir estes resíduos em dois grupos: Grupo 1 – os resíduos não adequados para a elaboração de produtos de valor agregado destinados à alimentação humana (vísceras, escamas e o esqueleto, incluindo a cabeça). Estes resíduos geralmente são descartados ou utilizados na produção de farinhas e silagens de peixes,

destinados a alimentação animal e/ou como fertilizantes. Grupo 2 – os resíduos que podem ser submetidos a processos destinados a obtenção de matéria-prima para a elaboração de produtos de valor agregado (empanados, embutidos, entre outros) para uso na alimentação humana. No fluxograma (Figura 1) é apresentado de forma simplificada os produtos e subprodutos geralmente possíveis de serem obtidos em um frigorífico de pescado (KUBITZA, 2015).

Figura 1- Esquema simplificado dos principais produtos, resíduos e subprodutos obtidos no processamento de pescado



Fonte: KUBITZA (2015)

Uma estratégia interessante para a indústria pesqueira no aproveitamento de resíduos é a recuperação de determinados nutrientes, comercializáveis na forma de subprodutos a partir destes resíduos, sendo possível agregar um maior valor ao se utilizar os resíduos de pescados para extração de gelatina (SILVA et al., 2011), colágeno (NALINANON et al., 2011), produção de gelatina modificada (YAN et al., 2011), isolados proteicos e filmes biodegradáveis de gelatina (AMIRKOLAIE, 2011; BANDEIRA et al., 2015). Neste contexto, a carpa comum e a tilápia do Nilo são duas espécies que merecem destaque especial por apresentarem elevado potencial para geração de resíduos.

3.1.1 Carpa comum

A carpa comum (*Cyprinus carpio*) ilustrada na Figura 2a é de origem asiática, pode ser considerada domesticada e é a espécie mais antiga cultivada. Possui qualidades como rusticidade, facilidade de criação, de proliferação e adaptação aos diferentes tipos de alimentos.

A carpa é cultivada em toda a Ásia, em alguns países da África e da América Latina, na América do Norte e na Austrália (MELO; STIPP 2001). Existem diferentes tipos de carpas, embora todas façam parte de um grande grupo de peixes chamados ciprinídeos. O policultivo de carpas é um dos sistemas de cultivo mais utilizados no mundo. Neste cultivo todas as espécies de carpas têm importante papel para o aproveitamento do alimento natural produzido no viveiro. As carpas-capim consomem as plantas macrófitas e as suas fezes contribuem para a adubação do tanque. A carpa comum (húngara) revolve o fundo, liberando nutrientes para a água, que por sua vez contribuem para o desenvolvimento de plâncton, que também serve de alimento para a carpa cabeça-grande e para a carpa prateada, que tem papel vital no controle das algas. Por isso, todas as espécies são importantes para o maior aproveitamento do viveiro (RITTER et al., 2013).

As carpas, pela sua capacidade de resistir a uma ampla faixa de temperatura, são hoje consideradas animais cosmopolitas, sendo que para que seu crescimento seja otimizado, a temperatura média deve ser de 28 °C. O crescimento da espécie, bem como sua alimentação serão sensivelmente afetados, caso a temperatura apresente-se abaixo de 15 °C. As carpas resistem, também, às baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (MELO; STIPP, 2001). Os ciprinídeos são todos planctófagos, porém aceitam também a alimentação artificial. Dentre todas as carpas usadas em aquicultura, somente a carpa comum desova naturalmente nos tanques. Nos demais tipos, a reprodução só é possível de forma induzida (SEBRAE-MG, 2006).

3.1.2 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), ilustrada na Figura 2b, pertence à família dos ciclídeos, é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais (NERVIS, 2016). O Brasil já é um dos sete maiores produtores de tilápia do mundo, com um volume de mais de 250 mil toneladas. A produção comercial de tilápias ocorre em praticamente todo o país, com volumes mais expressivos de produção nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul (ACEB, 2014; KUBITZA, 2015).

A maioria das espécies de tilápias reúnem grande parte das características desejáveis em peixes destinados à exploração comercial, ou seja, apresentam boa adaptabilidade às condições ambientais variáveis; apresentam boa conversão alimentar e ganho de peso; alta rusticidade; adaptam-se facilmente ao confinamento; apresentam boa resistência

quanto aos níveis de oxigênio na água; sua carne é de boa aceitação no mercado e são relativamente resistentes às doenças (MELO; STIPP, 2001).

As tilápias tem algumas características que devem ser respeitadas para seu uso comercial. A temperatura fria da água é letal para esta espécie (abaixo de 10 °C). A temperatura ideal da água para o desenvolvimento das tilápias varia de 20 a 30 °C. Em ambientes de engorda as tilápias maturam sexualmente a partir de 30 g o que causa problemas de manejo (superpopulação), sendo necessário a criação unicamente de machos (tamanho corporal maior que as fêmeas). O resultado final são animais com aproximadamente 450 g e produção global de 100 kg por metro cubico cultivado (BORDIGNON, 2010).

Figura 2- Ilustração dos pescados carpa comum (a) e tilápia do Nilo (b)



Fonte: FISHBASE (2016)

3.2 PROTEÍNAS

As proteínas são macromoléculas biológicas compostas por monômeros denominados aminoácidos. Estes contêm na sua estrutura molecular pelo menos um grupo amino primário (-NH₂) e um grupo carboxílico (-COOH). Além disso, cada aminoácido tem uma cadeia lateral (R) característica que influi nas suas propriedades físico-químicas e, portanto, nas propriedades das proteínas da qual toma parte (BOBBIO, F.; BOBBIO, P., 2003).

Proteínas são polímeros altamente complexos constituídos de mais de 20 aminoácidos diferentes. Uma vez que os aminoácidos contêm tanto um grupo carboxílico (ácido) quanto um grupo amino (básico), as proteínas se comportam como ácidos e bases e são chamadas de anfóteras ou anfifílicas (PEREDA et al., 2005). Dentre as propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas destacam-se: a solubilidade, a absorção e a capacidade de se ligar à água, as modificações reológicas que conferem aos produtos (viscosidade, textura, entre outros), a atividade emulsificante e a estabilização de emulsões, a capacidade de formação de

gel, a formação e estabilização de espuma e a absorção de gordura (VINETSKY; MAGDASSI, 1997).

As características do meio podem influenciar as propriedades funcionais das proteínas, destacando-se: natureza do solvente, pH, força iônica, temperatura e presença de interfaces (MAGDASSI; VINETSKY; BENITA, 1996). No entanto, o tamanho, formato, composição e sequência de aminoácidos são as características principais que governam a funcionalidade de uma proteína. Dentro de certos limites, é possível mudar algumas destas propriedades usando modificações químicas, hidrólise enzimática ou desnaturação proteica (ALVES et al., 2011).

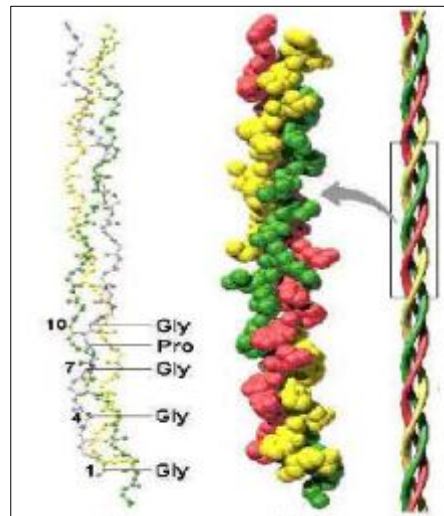
3.3 COLÁGENO

O colágeno é a maior proteína estrutural, e constitui aproximadamente 30% das proteínas totais de organismos multicelulares, sendo insolúvel em água, com elevada resistência à tração e grande estabilidade (NALINANON et al., 2011; ZENG et al., 2012). O colágeno é um filamento de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formado fundamentalmente por uma unidade denominada tropocolágeno. Este, por sua vez, é constituído por três cadeias polipeptídicas denominadas α , que possuem forma helicoidal. Como mostrado na Figura 3, estas cadeias enrolam-se umas nas outras formando a hélice tripla, através da formação de ligações de hidrogênio, que estabilizam esta estrutura (SIONKOWSKA, 2006).

Há um crescente interesse pelo processo de extração do colágeno e seus derivados devido a utilização desta proteína permitir maior valorização de subprodutos. A partir do colágeno são comumente obtidos o colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e o colágeno hidrolisado (DAMORADAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Esta proteína é capaz de intumescer e armazenar grandes quantidades de água. O inchaço reduz a adesão interna das fibrilas sem quebrar, no entanto, a estrutura em tripla-hélice, torna a molécula viscosa e passível de utilização (WOLF, 2003). Em um mesmo animal é possível encontrar colágenos geneticamente distintos. Muitos deles têm sido caracterizados bioquimicamente, observando que cada tipo de tecido contém uma composição específica de colágeno (SILVA, 2013).

Há pelo menos 29 tipos de colágeno identificados, cada um diferindo consideravelmente na sua sequência, estrutura e função (SÖDERHÄLL et al., 2007). O mais comumente encontrado e conhecido química e estruturalmente é o colágeno tipo I, o qual é formado por duas cadeias idênticas chamadas α_1 , possuindo cerca de 1055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente α_2 , possuindo cerca de 1029 resíduos (PEDROSO, 2009).

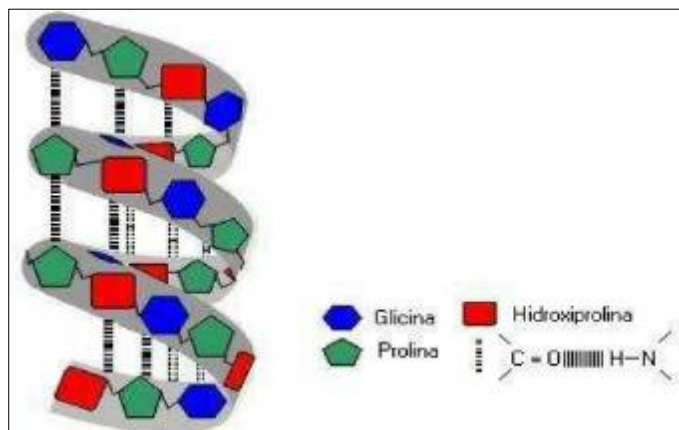
Figura 3 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.



Fonte: SIONKOWSKA (2006)

Para a formação da hélice tripla (Figura 4) é necessário a ocorrência de resíduo de glicina (Gly) a cada terceira posição ao longo da cadeia e uma unidade repetitiva do triplete Gly-X-Y na sequência de aminoácidos, onde X é geralmente prolina (Pro) e Y é hidroxiprolina (Hyp). No restante das cadeias, X e Y correspondem a outros aminoácidos essenciais para a organização do colágeno em fibras. (BRODSKY; RAMSHAW, 1997; NALINANON et al., 2011).

Figura 4- Representação esquemática da estrutura da hélice tripla do colágeno



Fonte: BRODSKY; RAMSHAW (1997)

A hélice de colágeno pode-se desdobrar e torna-se facilmente solúvel, isso depende da temperatura de desnaturação e da quantidade de prolina e hidroxiprolina presentes. A

hidroxiprolina é o aminoácido mais importante, pois ele possui a capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio através de seus grupamentos OH, ajudando a estabilizar a conformação ordenada da rede formada pela gelatina (GOMÉZ-GUILLEN et al., 2002; HAUG; DRAGET; SMIDSROD, 2004).

A hidroxiprolina é usada para indicar o teor de colágeno uma vez que não é encontrada comumente entre as proteínas não colagenosas (SWAN; TORLEY, 1991). De acordo com França e Waszczynskyj (2002), a hidroxiprolina se apresenta em quantidades constantes no colágeno, representando 13 a 14% do seu conteúdo total. A hidroxiprolina é determinada quantitativamente como uma medida de material colagenoso em carnes e produtos cárneos. A quantidade de hidroxiprolina no colágeno das peles e ossos de peixes difere entre as espécies, interferindo na temperatura de retração ou encolhimento destas de forma a ocorrer a ruptura dos enlaces de hidrogênio da cadeia de colágeno de forma irreversível (POPPE, 1997).

A extração do colágeno está diretamente relacionada com a rigurosidade do processo de extração e do pré-tratamento, em que o colágeno é parcialmente hidrolisado sem alterar a configuração original de tripla hélice, que depois é desestabilizada por um tratamento térmico subsequente por provocar o rompimento de ligações covalentes e de hidrogênio, o que leva à conversão do colágeno em gelatina (MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2000).

3.4 GELATINA

A gelatina é uma proteína de origem animal, solúvel em água, cujas propriedades dependem do processo de obtenção e da matéria-prima utilizada (SHAKILA et al., 2012). Anualmente são produzidas cerca de 296 toneladas de gelatina, o que dá mundialmente um faturamento superior a 1 bilhão de euros. Desse total de gelatina produzido, 68 % são gelatinas comestíveis, 24 % são destinadas a fotos ou aplicações especiais e 8 % para microcápsulas (GELITA, 2015). Segundo o RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal) entende-se por “gelatina comestível” o produto da hidrólise em água fervente de tecidos ricos em substâncias colagênicas (cartilagens, tendões, ossos, aparas de couro) concentrado e seco.

A gelatina comercial é obtida tradicionalmente de peles e ossos de bovino e suíno. A preparação industrial da gelatina envolve a hidrólise controlada para obter a gelatina solúvel através de um dos métodos de tratamento alcalino ou ácido da matéria-prima, seguido de desnaturação térmica em que se obtém os diferentes tipos de gelatina, com diferentes aplicabilidades em função da necessidade do mercado consumidor e das espécies de matéria-

prima e métodos aplicados para a extração (BANDEIRA et al., 2015; BORDIGNON, 2010). Quando ocorre a desnaturação do colágeno com o controle de temperatura, vai havendo a quebra em pequenos fragmentos e as triplas hélices são separadas umas das outras, onde as massas molares variam em função do tipo de preparação e fonte da matéria-prima. Os filamentos moleculares flexíveis entre as ligações cruzadas são longos e isso faz com que o gel seja muito extensível. Estas ligações são razoavelmente permanentes à baixas temperaturas, o que torna a gelatina predominantemente elástica (DAMODARAN et al., 2010). A composição de aminoácidos é similar à do colágeno do qual foi obtida, e são responsáveis pelas propriedades da gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

No intuito de obter a gelatina, o pré-tratamento ácido e/ou alcalino da matéria-prima é utilizado para remover os componentes não colagenosos e intumescimento do colágeno, desnaturando assim a molécula, seguida da extração com elevação da temperatura da água (KARIM; BHAT, 2009). Quando se alcança a temperatura crítica, ou seja, a temperatura de encolhimento ou retração, as fibrilas do colágeno encolhem pelo menos um terço do seu comprimento original, sendo esta temperatura característica da espécie da qual se deriva o colágeno. Este encolhimento desorganiza as fibras e ocorre o colapso da arquitetura helicoidal das subunidades polipeptídicas da molécula de colágeno (DAMODARAN et al., 2010). Sendo assim, a desnaturação é caracterizada pelo desenrolamento da estrutura em tripla-hélice em cadeias individuais solúveis, ou pequenos polímeros ou fragmentos (WOLF, 2003). O tratamento térmico cliva as pontes de hidrogênio e ligações covalentes, desestabilizando a tripla-hélice, resultando na conversão em gelatina solúvel (CATALINA et al., 2011; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

No resfriamento as cadeias podem retroceder a novas estruturas de tripla-hélice, mas não necessariamente na mesma conformação que a estrutura do colágeno nativo, limitando a reorganização da molécula helicoidal. Esta reorganização dos segmentos de tripla-hélice leva a zonas de junção que são necessárias para que ocorra a gelificação (WOLF, 2003). Provavelmente àquelas partes do colágeno que são ricas em resíduos de prolina e hidroxiprolina recuperam parte de sua estrutura e capacidade para interagir. O mecanismo de cinética da gelificação é complexo, mas independentemente da maneira que se desenvolve, as tripla-hélices tendem a se agrupar alinhando-se paralelamente para formar regiões microcristalinas (DAMODARAN et al., 2010).

A cor, a transparência e a facilidade de dissolução são fatores importantes para determinar a qualidade da gelatina usada nos alimentos e constitui uma sobremesa popular, que é facilmente assimilável e até auxilia a digestão de outros alimentos, formando emulsão com

gorduras e proteínas (BORDIGNON, 2010). A gelatina pode contribuir para enriquecimento do conteúdo proteico dos alimentos, além de funcionar como filme externo (cápsulas).

3.4.1 Gelatina de pescado

A procura por gelatina de pescado tem aumentado tanto pelo desenvolvimento dos mercados halal e kosher, quanto por preocupações sanitárias envolvendo bovinos (NIU et al., 2013). A elaboração da gelatina proporciona melhores condições de processamento às indústrias de beneficiamento, agregando valor à cadeia produtiva do pescado, utilizando-se de resíduos do processamento do peixe (pele e ossos), convertendo-os em subprodutos de valor agregado (ARNESEN; GILDBERG, 2006). Para tanto, é importante que a gelatina apresente boas propriedades reológicas (viscosidade), força de gel e ponto de fusão, sendo estas afetadas em função da concentração da solução de gelatina, tempo e temperatura de maturação do gel, pH e conteúdo de sal (CHOI; REGENSTEIN, 2000).

O método de extração do colágeno para elaboração da gelatina a partir de pescado é diferente dos métodos de extração do colágeno de mamíferos, em virtude de suas diferenças nas propriedades físicas e químicas, necessitando utilizar temperaturas moderadas (KOLODZIEJSKA et al., 2008). Depende ainda, do tipo de matéria-prima (espécie de peixe de águas tropicais ou frias), do pré-tratamento aplicado e das condições de extração. Segundo Gudmundsson (2002), as gelatinas extraídas a partir de bovinos apresentam maiores temperaturas de fusão e de gelificação. Ainda segundo o mesmo autor, essas diferenças estruturais ocorrem de acordo com o conteúdo elevado de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) presente na estrutura do tecido animal, embora a gelatina de peixe de águas tropicais tenha sua composição de aminoácidos bastante semelhante à de bovinos e suínos, por apresentar uma quantidade alta de glicina, prolina e hidroxiprolina.

A busca por novas alternativas de matéria-prima para a produção de gelificantes e melhoria em métodos de extração de gelatina, levou a criação de diversas patentes sobre métodos de produção da gelatina de pescado, bem como na publicação de vários métodos para a produção de gelatina de pescado (HOLZER, 1996). Os procedimentos utilizados para o preparo de gelatina de pescado envolvem, tipicamente, um pré-tratamento químico suave da matéria-prima e as condições de temperatura durante o processo de extração são mais brandas que as utilizadas na extração de gelatina de mamíferos (KARIM; BHAT, 2009).

Silva (2011) avaliou o efeito do tamanho das partículas de ossos de carpa comum (*Cyprinus carpio*). Foram realizadas diferentes extrações de gelatina para tamanhos de

partículas de ossos de 1 e 2 mm, onde o pH e a temperatura foram analisados para cada extração sendo, respectivamente, 5,3 / 60 °C; 4,4 / 70 °C; 3,8 / 80 °C e 3,6 / 85 °C. O rendimento em massa mais elevado de gelatina (4,86%) foi encontrada com tamanho de partícula de 1 mm e não houve diferença significativa entre a primeira e terceira extração, sendo que com o aumento da temperatura foi observado uma redução na força de gel.

A comparação da obtenção de gelatina a partir de ossos e peles de corvina (*Micropogonias furnieri*) foi estudado por Bandeira et al. (2015), sendo realizado para peles pré-tratamentos alcalino (pH 11) e ácido (pH 2) e a extração de gelatina realizada a 52 °C em pH 4 por 120 min. Para gelatina de ossos o material foi moído e suspenso em solução de ácido clorídrico, após a extração realizada a 60 °C em pH 4 por 120 min. A gelatina obtida a partir de peles apresentou rendimentos, propriedades físico-químicas e reológicas superiores quando comparada a gelatina obtida de ossos.

3.4.2 Gelatina modificada

Com o propósito de tentar aproximar ainda mais as propriedades da gelatina de pescado da gelatina de mamífero, ou mesmo tentar promover propriedades funcionais ao produto, diversos estudos têm direcionado o foco para o desenvolvimento de gelatinas modificadas (ALFARO; FONSECA; PRENTICE-HÉRNANDEZ, 2013a). A estabilidade de uma rede de gel frente às forças térmicas e mecânicas é dependente do número e dos tipos de ligações cruzadas formadas por cadeia de monômero (DAMODARAN et al., 2010).

As propriedades funcionais das proteínas podem ser modificadas através de tratamentos físicos, químicos ou biológicos levando à alterações de conformação e estrutura. A modificação química de proteínas é o principal método utilizado para produzir ingredientes com melhores propriedades funcionais para as indústrias de alimentos e farmacêutica (BOANINI et al., 2010). O mecanismo de ligação cruzada da maioria das proteínas envolve grupos amino, embora os grupos sulfidrílicos sejam envolvidos em ligações dissulfureto (BALAGUER et al., 2013; HERNANDEZ-MUÑOZ et al., 2005). Um resumo de grupos e possíveis reações disponíveis para modificação em proteínas estão apresentados na Tabela 1.

A reticulação se caracteriza pela incorporação de ligações covalentes cruzadas inter e intramoleculares, que atuam na estabilização da rede de gel, dificultando a transição molecular (YAN et al., 2011). O mecanismo intra-helicoidal inclui as ligações formadas entre duas cadeias polipeptídicas na mesma hélice e influencia a temperatura de desnaturação. Estas ligações

podem estabilizar as regiões em tripla-hélice, mas não aumenta a resistência mecânica. O mecanismo inter-helicoidal é formado entre duas cadeias polipeptídicas de hélices adjacentes, aumentando a massa molar, influenciando diretamente nas propriedades de intumescimento e flexibilidade da gelatina (CATALINA et al., 2011).

Tabela 1 - Cadeias laterais de aminoácidos utilizados para modificações químicas em proteínas

Grupo	Reação
Amino (lisina)	Acilação; Alquilação
Carbonila (asparagina, glutamina)	Esterificação; Formação de amida
Dissulfeto (cistina)	Redução
Sulfidril (cistina)	Redução
Tioéter (metionina)	Alquilação; Oxidação
Imidazol (histidina)	Alquilação; Oxidação
Fenólico (fenilalanina)	Acilação
Guanidino (arginina)	Condensação via dicarbonila

Fonte: KINSELLA; WHITEHEAD, 1988

Os estudos iniciais sobre métodos químicos de reticulação apontam o uso de compostos tóxicos, tais como formaldeído e glutaraldeído, que em função das suas toxicidades, acabaram limitando a utilização destes compostos (SILVA, 2013). Com isso os estudos têm sido focados para o uso de compostos naturais atóxicos, como sais (ALFARO; FONSECA; PRENTICE-HÉRNANDEZ, 2013a), composto fenólicos (YAN et al., 2011), além de componentes com atividade antioxidante (BONILLA et al., 2013).

Alfaro et al. (2013a) estudaram vários agentes de reticulação na gelatina a partir de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) em duas diferentes concentrações (sacarose 4% e 8%, glicerol 5% e 10%, NaCl 0,3 e 0,8 mol L⁻¹, MgCl₂ 0,3 e 0,8 mol L⁻¹, MgSO₄ 0,3 e 0,8 mol L⁻¹, KCl 0,3 e 0,8 mol L⁻¹ e transglutaminase 10 e 15 mg mL⁻¹). Os autores concluíram que houve aumento na viscosidade em qualquer das concentrações utilizadas, e que melhorias das propriedades reológicas ocorreram dependendo da concentração utilizada para cada sal, com a maior força do gel tendo sido encontrada após adição de MgSO₄ 0,8 mol L⁻¹.

No estudo de Yan et al. (2010), géis de gelatina a partir de Escamudo-do-Alasca (*Theragra chalcogramma*) foram reticulados com ácido gálico (10, 20, 30 e 40 mg g⁻¹ gelatina

seca) e rutina (2, 4, 6 e 8 mg g⁻¹ gelatina seca). As moléculas reticulantes interagiram principalmente com a estrutura C-N-C e grupos carboxílicos da molécula de gelatina, reforçando a interação intermolecular. A resistência do gel aumentou utilizando concentração de ácido gálico até 20 mg g⁻¹ de gelatina seca. O mecanismo de cinética de reticulação com ácido cítrico e proteína em condição aquosa sob baixa temperatura foram relatados por Xu et al. (2015), onde mais do que dois grupos carboxílicos na molécula central de ácido cítrico possivelmente participaram na reação da proteína sob temperatura de 50 °C, além disso também pôde ser comprovado um aumento de massa molar após a reticulação.

3.4.3 Agentes de reticulação

As substâncias modificadoras de gelatina, tais como eletrólitos e não eletrólitos podem ser aplicado para melhorar as propriedades reológicas de gelatina (AEWSIRI et al., 2011). Os eletrólitos, em geral, influenciam as propriedades biofísicas das proteínas (inchaço, solubilidade, gelificação, viscosidade e capacidade de retenção de água) (BIGI et al., 2001). Não-eletrólitos, como ácido cítrico e ácido gálico geralmente aumentam força de géis de gelatina (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2001).

Há dois pontos de vista quanto à possibilidade de interação entre moléculas de colágeno (ou gelatina) e íons salinos. Alguns pesquisadores acreditam na possibilidade de ligação direta ao núcleo peptídico do colágeno, enquanto outros acreditam que íons podem participar indiretamente no dobramento da estrutura por interagir com água estruturalmente ligada (ASGHAR; HENRICKSON, 1982; CHOI; REGENSTEIN, 2000). Já para os compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos, foram relatados dois tipos de reticulação. O primeiro com interações não covalentes entre a gelatina, tais como ligações de hidrogénio entre grupos hidroxilas do composto e grupos carbonila polares da gelatina, e interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos e a cadeia lateral hidrofóbica da gelatina (AEWSIRI et al., 2010; OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). O segundo com ligações covalentes entre a gelatina, provavelmente entre a parte eletrofílica (forma oxidada do composto) e grupos amino nucleofílicos da gelatina (AZEREDO et al., 2016).

O ácido gálico é um ácido fenólico natural. Compostos com menor massa molar e amplamente disponíveis entre os vegetais, apresentado propriedades farmacológicas. Possui forte atividade antimutagênicas, anticarcinogênicas e antioxidantes (MÉNDEZ et al., 2003). Os compostos fenólicos naturais derivados de plantas têm sido utilizados como reticuladores para modificação de polímeros proteicos, ricos em prolina como a gelatina, sendo especialmente

susceptíveis (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). Várias interações potenciais podem ser envolvidas, incluindo ligações covalentes e não covalentes (ZHANG; CONRAD; CONRAD, 2011). Os ácidos fenólicos estão presentes em vários produtos alimentícios sendo considerados não tóxicos (AEWSIRI et al., 2010).

O ácido cítrico é um ácido orgânico com três grupos carboxílico, e é classificado como um alimento seguro. Assim, pode ser usado em materiais de contato com alimentos. Foi demonstrado que a adição de ácido cítrico diminui a adsorção de umidade e reduz a permeabilidade ao vapor de água em filmes (GHANBARZADEH; ALMASIA; ENTEZAMI, 2011). Estudos sobre as características mecânicas e propriedades dos filmes mostraram que adição do ácido cítrico melhora a resistência à tração e a estabilidade térmica (OLIVATO et al., 2012). Os ácidos orgânicos também atuam como plastificante nos filmes (REDDY; YANG, 2010). O mecanismo de reticulação proposto é atribuído à formação de ligações di-éster intermolecular entre grupos hidroxilo do polissacarídeo e de grupos carboxílicos do reticulador (HASHEM et al., 2013).

O sulfato de magnésio é um composto químico que contém magnésio. O magnésio é o oitavo elemento natural mais abundante, é comumente encontrado em minerais como magnesite, dolomita, olivina, serpentina e amianto (MANSOUR; SALAMA; Al-MUTANA, 2003). O magnésio é o mais importante cátion bivalente intracelular, responsável por diversas funções (CARDOSO et al., 2012). O cloreto de sódio, principal constituinte do sal de cozinha, é um sólido iônico constituído por íons positivos e negativos. Quando diluído em água, os íons separam-se na solução, onde se encontram rodeados pelas moléculas do solvente. Esta substância é capaz de aumentar a viscosidade do produto através da interação com agentes tensoativos empregados (IGNÁCIO et al., 2013).

3.5 FILMES BIOPOLIMÉRICOS

A conservação de alimentos exige, normalmente, tratamentos físicos, químicos ou a associação deles. Além disso, a utilização de embalagem, rígida ou flexível, é imprescindível (SOUSA, 2012). A popularização dos plásticos para esta finalidade se deve, basicamente, ao seu baixo custo de produção, peso reduzido, elevada resistência e a possibilidade de seu uso na fabricação de peças nas mais variadas formas, cores e tamanhos (ROSA; FRANCO; CALIL, 2001). Apesar de os plásticos possuírem excelentes propriedades funcionais, são considerados não biodegradáveis e estão envolvidos em problemas ambientais, pois levam muito tempo para se degradarem, permanecendo praticamente intactos ao longo dos anos (BONA, 2007). Os

polímeros sintéticos são derivados de fonte de petróleo (não renováveis), tais como poliolefinas, poliésteres e poliamidas, sendo inertes ao ataque imediato de micro-organismos. Essa propriedade implica tempos de degradação da ordem de, no mínimo, 100 anos, ocasionando sérios problemas ambientais (ZULLO; IANNACE, 2009).

A biodegradação consiste na degradação dos materiais poliméricos através da ação de organismos vivos. Segundo a American Standard for Testing and Methods (ASTM-D-883), polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis, nos quais a degradação resulta primariamente da ação de micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Em geral, deriva desse processo dióxido de carbono, gás metano, componentes celulares microbianos e outros produtos (ASTM, 1999).

Os filmes biopoliméricos têm sido bastante pesquisados com o intuito de melhorar a qualidade e estender a vida útil dos alimentos, funcionando como barreira à umidade, favorecendo o controle de mudanças fisiológicas, microbiológicas e físico-químicas (RHIM; NG, 2007). A formulação dos filmes biodegradáveis implica a utilização de pelo menos um componente capaz de formar uma matriz, tendo coesão e continuidade suficiente. De acordo com a literatura, esses filmes são comumente elaborados a partir de polissacarídeos, proteínas e lipídios (BERTAN, 2003; KARBOWIAK; DEBEAUFORT; VOILLEY, 2007)

A adição de plastificantes em polímeros, na produção de filmes biodegradáveis, é bastante vantajosa, pois aumenta a sua elasticidade, devido ao enfraquecimento das interações intermoleculares entre as cadeias destes polímeros, que confere maior flexibilidade a estes materiais (CHANG; KARIM; SEOW, 2006). Existem três hipóteses importantes para explicar o fenômeno da plastificação. A primeira relata que o plastificante atua como um lubrificante interno, que reduz o atrito intermolecular existente entre as cadeias, permitindo maior mobilidade das mesmas. Uma segunda hipótese baseia-se no efeito de solvatação dos sítios polares das cadeias poliméricas, reduzindo a atração intermolecular. A terceira hipótese considera que o movimento das moléculas plastificantes, com baixa massa molar, aumenta o volume livre do polímero, permitindo maior espaço para o movimento das cadeias (STEVENS, 1993).

Dentre os plastificantes, o mais utilizado em filmes biodegradáveis é o glicerol. Quimicamente, o glicerol é um tri-álcool com três carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se à purificação de compostos comerciais que contém, normalmente, quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol. É um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais

ou petroquímicas. A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica, possuindo uma molécula altamente flexível que forma ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

3.5.1 Filmes de gelatina

A gelatina é particularmente atrativa para a formação de filmes poliméricos, porque apresenta disponibilidade comercial a um custo relativamente baixo, é biodegradável, biocompatível, e a sua estrutura permite múltiplas combinações de interações moleculares, proporcionando razoável estabilidade (CATALINA et al., 2011; FARRIS et al., 2009). Os filmes à base de gelatina são formados quando as ligações das cadeias peptídicas parcialmente desnaturadas complementam ligações hidrofílicas e de hidrogênio, resultando na formação da matriz polimérica (RHIM; NG, 2007) que, incorporados com plastificantes, demonstram suficiente estabilidade, resistência e flexibilidade, permitindo sua utilização como materiais de embalagens (HANANI et al., 2012).

Nos filmes biodegradáveis, as proteínas interagem não mais intra, mas intermolecularmente, através da formação de ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto e ligações hidrofóbicas formando uma rede. Esta rede, pouco hidratada, constitui então o filme, cujas propriedades são, sobretudo, em função do tipo, das atribuições e da intensidade das ligações estabelecidas (GONTARD, GUILBERT; CUQ, 1991).

A técnica *casting* é amplamente utilizada na elaboração deste tipo de filmes, e se baseia na secagem ou dispersão da solução filme-formadora. Nesta técnica há a solubilização da macromolécula em um solvente, ao qual podem ser incorporados aditivos, tais como plastificantes e agentes reticulantes, após a solução filme formadora é vertida em um suporte (placas de *petri*) e levada a estufa para evaporação do solvente (DENAVI et al., 2009).

3.5.2 Filmes biopoliméricos modificados

Os filmes obtidos de fontes naturais são materiais biodegradáveis úteis na engenharia de alimentos, embalagens, recuperação de drogas e outras aplicações (BOANINI et al., 2010). As pobres propriedades mecânicas dos filmes de gelatina, que limitam as suas possíveis aplicações, constituem a principal deficiência da gelatina como matéria-prima. As

propriedades mecânicas de filmes de gelatina estão relacionadas com o nível de renaturação da proteína (BIGI; PANZAVOLTA; RUBINI, 2004). A estabilidade mecânica, bem como térmica, da gelatina pode ser melhorado através de reticulação (*crosslinking*).

A reticulação química é frequentemente utilizada para agregar uma maior resistência em filmes biopoliméricos, e é favorecida pelo grande número de grupos funcionais da gelatina (BAE et al., 2009). No entanto, os agentes de reticulação mais frequentemente utilizados (aldeídos de cadeia curta) têm sido relatados como potencialmente tóxicos. Uma vez que os biopolímeros são utilizados para aplicações que requerem baixa toxicidade (como embalagens, incluindo filmes comestíveis e revestimentos), muitos estudos estão sendo concentrados em agentes de reticulação não tóxicos (BANDEIRA et al., 2015; CHIOU et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas utilizadas como fonte de colágeno para a obtenção de gelatina foram peles e ossos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e peles e ossos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os resíduos descartados no processamento dos pescados (abatidos com massa entre 1,5 e 2,5 kg) foram obtidos de piscicultores da cidade de Ajuricaba-RS e Teutônia-RS. Os resíduos foram acondicionados em caixas com gelo e transportados até o Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI), da Escola de Química e Alimentos (EQA), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde permaneceram armazenados em freezer dentro de embalagens plásticas a temperatura de -18°C . O tempo máximo de armazenamento foi de 90 dias.

A gelatina de mamífero de pele bovina (tipo B - 225 Bloom) foi adquirida na Sigma Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, EUA) e utilizada como comparação no estudo. Para a modificação das gelatinas, os agentes de reticulação considerados no estudo foram os eletrólitos NaCl e MgSO_4 (Synth, Brasil) e os compostos orgânicos ácido gálico (Vetec, Brasil) e ácido cítrico (Merck, Brasil).

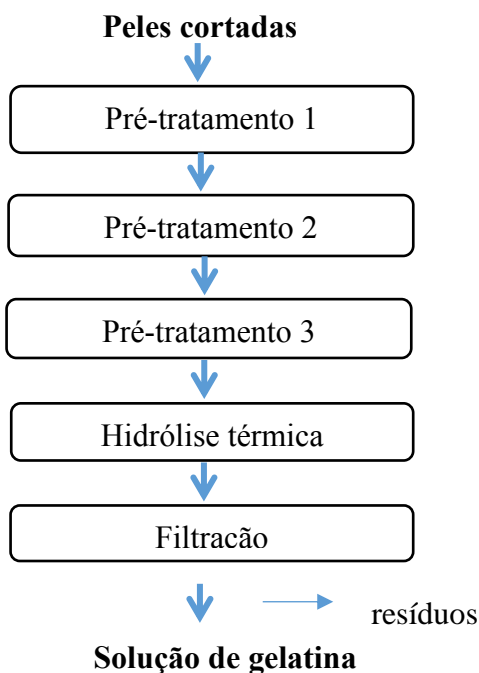
4.2 OBTENÇÃO DAS SOLUÇÕES DE GELATINA

4.2.1 Gelatina de peles

A Figura 5 mostra o fluxograma do processo representando a obtenção de gelatina a partir das peles de peixe, realizado segundo a metodologia descrita por Bandeira et al. (2015). As peles cortadas nas dimensões de 1 cm^2 foram submetidas ao intumescimento com pré-tratamentos alcalino/alcalino/ácido. No primeiro pré-tratamento alcalino (pré-tratamento 1) as amostras foram avolumadas com água destilada ($1:1\text{ m v}^{-1}$), o pH ajustado em 11 com solução de NaOH 3 mol L^{-1} e a solução permaneceu por 15 min sob agitação constante em agitador magnético. O material foi drenado com peneira, para em seguida realizar o segundo pré-tratamento alcalino (pré-tratamento 2), no qual as peles foram tratadas com uma nova solução em água destilada ($1:1\text{ m v}^{-1}$), ajustando novamente o pH em 11, com solução de NaOH 3 mol L^{-1} , onde sob agitação constante em agitador magnético, o material permaneceu em solução por 60 min. As peles foram retiradas da solução alcalina e drenadas em peneira com posterior lavagem com água corrente, até atingir pH próximo a neutralidade. O tratamento ácido (pré-tratamento 3) foi realizado com a suspensão das peles em água destilada ($1:1\text{ m v}^{-1}$), ajustando

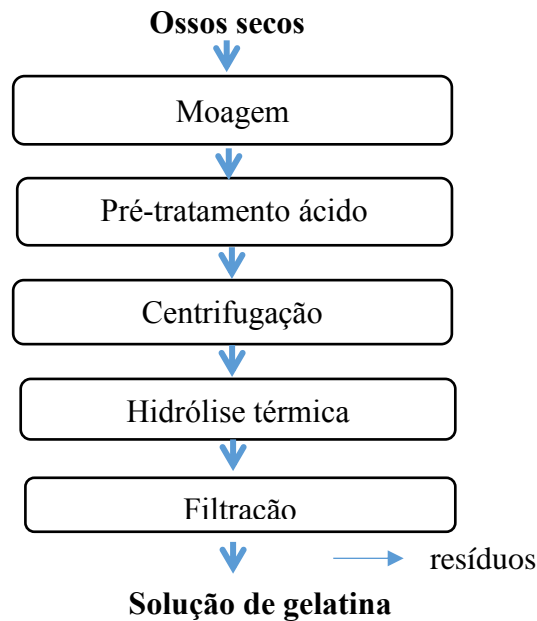
o pH em 2 com HCl 3 mol L⁻¹ com agitação por 15 min. Após a amostra foi drenada e houve uma lavagem final com água destilada (1:1 m v⁻¹). A obtenção de gelatina das peles pré-tratadas foi realizada em banho termostático à 52 °C por 2 h a pH 4. Após a solução de gelatina foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro Whatman nº 4 a vácuo.

Figura 5- Fluxograma resumido da obtenção de gelatina de pele



4.2.2 Gelatina de ossos

A Figura 6 apresenta o fluxograma resumido do processo envolvido na obtenção de gelatina a partir de ossos de pescado, realizado segundo Silva et al. (2011). Os ossos, secos com circulação de ar à temperatura ambiente (20 °C) por 24 h, foram moídos em moinho de faca na granulometria de 1 mm. Após submetidos a tratamento ácido, onde foram suspensos em solução de HCl 0,6 mol L⁻¹ por 20 h a 10 °C e, posteriormente, centrifugados a 4000 × g por 15 min para remoção do excesso de ácido. Após a retirada do sobrenadante, a amostra foi suspensa com água destilada (1:1 m v⁻¹), seu pH ajustado para 4 e a solução levada a um banho termostático onde, sob agitação de 2 h e temperatura de 60°C, foi obtida a solução de gelatina de ossos. Posteriormente, a solução foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro Whatman nº 4 a vácuo.

Figura 6 - Fluxograma resumido da obtenção de gelatina de ossos

4.2.3 Clarificação das gelatinas

O processo de clarificação para a remoção de impurezas presentes na solução foi realizado segundo Silva (2013). As gelatinas obtidas foram clarificadas com carvão ativado na proporção de 1 g de carvão por kg de solução de gelatina. O agente clarificante (carvão ativado) foi adicionado na solução de gelatina, onde permaneceu por 120 min à 35 °C sob agitação constante. A mistura foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel filtro Whatman nº 4. Para a remoção do agente clarificante presente na solução, foi realizada uma segunda filtração, na qual se utilizou uma pré-capa de auxiliar de filtração (terra diatomácea). A terra diatomácea foi adicionada (500 g m⁻² de área de filtração) para formar uma suspensão de pré-capa baseado na proporção de 0,4 g 100 mL⁻¹ de solução.

As gelatinas clarificadas foram colocadas em ultra freezer (Indrel, IULT 90-D, Brasil) por 48 h à -80 °C, e após foram submetidas a liofilização (Liotop, L108, Brasil) onde permaneceram por 48 h à -54 °C e vácuo de 44 mmHg até a evaporação completa dos solventes. As gelatinas em pó foram armazenadas em dessecadores, até posteriores análises.

4.3 RETICULAÇÃO DAS GELATINAS

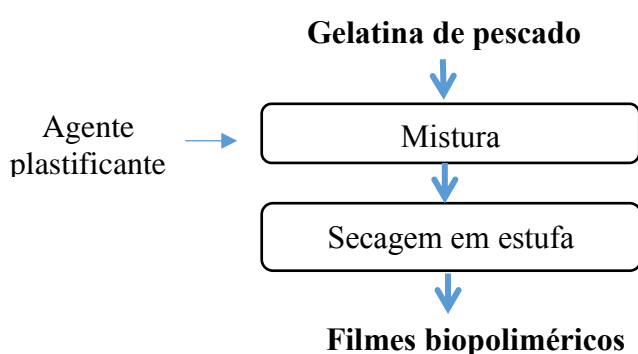
As gelatinas de peles e ossos de carpa e de tilápia foram dissolvidas em água destilada na temperatura de 45 °C, em banho termostático, na concentração de 66,7 g L⁻¹, com agitação constante (240 rpm) em agitador mecânico (Fisatom, 710, Brasil) até completa

dissolução. As gelatinas foram reticuladas utilizando as seguintes concentrações químicas: MgSO_4 em $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ (Mg) e NaCl em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Na) (ALFARO; FONSECA; PRENTICE-HÉRNANDEZ, 2013a), ácido gálico em $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (AG) (YAN et al., 2011) e ácido cítrico em $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ (AC) (testes preliminares). As soluções de gelatinas reticuladas de carpa comum e tilápia do Nilo foram mantidas sob constante agitação em banho termostático ($45 \text{ }^\circ\text{C}$ e 30 min), até completa homogeneização. Após foram submetidas a liofilização e armazenadas em dessecadores, até posteriores análises. Para cada condição testada foram preparadas pelo menos três amostras independentes.

4.4 PRODUÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS

A Figura 7 apresenta o fluxograma resumido da obtenção de filmes de gelatina reticulada elaborados seguindo a técnica *casting*. Nas soluções de gelatina (50 mL) com concentração de 2% (m v^{-1}) foi adicionado 0,20 g de glicerol, e permaneceu sob constante agitação por 30 min (BANDEIRA et al., 2015). As soluções de gelatinas reticuladas foram vertidas em placas de *petri* e levadas à estufa com circulação forçada de ar, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, onde ocorreu a completa evaporação do solvente. Os filmes foram removidos das placas e acondicionados em dessecadores mantidos à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 75% de umidade relativa, durante pelo menos 48 h antes das análises.

Figura 7- Fluxograma resumido da obtenção de filmes biopoliméricos



4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.5.1 Composição química dos resíduos e das gelatinas de pescados

As composições centesimais das peles *in natura*, ossos moídos e das gelatinas obtidas foram determinadas segundo metodologias AOAC (1995), em triplicata. A umidade foi determinada de acordo com o método gravimétrico ($n^\circ 950.46$) em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$. O teor de

nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (n° 928.08), tendo o teor de proteína bruta obtido através da multiplicação pelo fator 6,25 para ossos e peles, e 5,55 para as gelatinas obtidas. O conteúdo de lipídios foi determinado pelo método de Bligh-Dyer (1959) utilizando uma mistura binária de clorofórmio e metanol e as cinzas foi determinada por método gravimétrico (n° 920.153) em mufla a 500-600 °C.

4.5.2 Caracterizações das gelatinas e dos filmes biopoliméricos

As gelatinas extraídas das peles e ossos dos pescados foram caracterizadas quanto ao rendimento em massa, rendimento em hidroxiprolina, força de gel, viscosidade, ponto de fusão, temperatura de gelificação, grau de reticulação, turbidez e atributos de cor, distribuição de massa molar, perfil de aminoácidos, espectroscopia de infravermelho (FT-IR), análises térmicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os filmes biopoliméricos de gelatina modificada foram analisados quanto as propriedades mecânicas (tensão de ruptura e alongamento), espessura, permeabilidade ao vapor de água, transmitância UV e luz visível, difração de raio-X (DRX) e, assim como nas soluções de gelatina, análises de cor, FT-IR, análises térmicas e MEV.

4.5.2.1 Rendimentos de extração e em hidroxiprolina das gelatinas

Os rendimentos da extração de gelatina em solução foram calculados de acordo com a Equação 1.

$$RG = \frac{C_{gelatina} \times V_{solução}}{m_{amostra}} \quad (1)$$

onde RG é o rendimento em gelatina (g 100 g⁻¹), C_{gelatina} é a concentração de gelatina (g mL⁻¹), V_{solução} é o volume da solução de gelatina extraída (mL) e m_{amostra} é a massa da amostra (g).

O teor de hidroxiprolina das amostras foi determinado pela AOAC - método oficial 990.26 (AOAC, 1995) utilizando L-hidroxiprolina (Sigma-Aldrich, EUA) como padrão. As amostras foram hidrolisadas em ácido sulfúrico à 105 °C por 16 h. Após foram filtradas e diluídas, para em seguida realizar a oxidação com Cloramina-T (Sigma-Aldrich, EUA) reagente para Pirrole. A adição de 4-dimetilaminobenzaldeído (Sigma-Aldrich, EUA) proporcionou uma coloração púrpura, a qual foi mensurada em espectrofotômetro a 560 nm. O rendimento em hidroxiprolina foi calculado conforme a Equação 2.

$$H = \frac{2,5 \times h}{m \times V} \quad (2)$$

sendo H o teor de hidroxiprolina (g 100 g⁻¹), h a leitura no espectrofotômetro da curva padrão, m a massa da amostra (g) e V o volume do filtrado para diluição em balão de 100 mL.

4.5.2.2 Força de gel das gelatinas

A consistência de gel foi determinada de acordo com a AOAC - método oficial 948.21 (AOAC,1995), onde 105 mL das soluções de gelatina (66,7g L⁻¹) foram transferidas para frascos (150 mL de capacidade) e mantidas a 7 °C por 18 h. A força de gel foi medida com um analisador de textura (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Reino Unido), utilizando uma sonda teflon com 12,5 mm de diâmetro e velocidade 1 mm s⁻¹, pressionando a gelatina em 4 mm.

4.5.2.3 Viscosidade das soluções de gelatinas

A determinação da viscosidade das soluções de gelatinas foi baseada na metodologia descrita por Silva et al., (2014). As soluções de gelatina (66,7 g L⁻¹) foram transferidas para um viscosímetro Cannon-Fenske (Cannon Instrument Co., nº 100, EUA), em banho termostático a 25 °C. Após 10 min, tempo para ambientação da solução, foi registrado os tempos de escoamento das soluções e a viscosidade das amostras foi calculada através da Equação 3.

$$\mu = t \times K \times \rho \quad (3)$$

sendo μ a viscosidade (Poise), K a constante do viscosímetro determinada experimentalmente com um fluido de viscosidade cinemática conhecida (St s⁻¹), t o tempo (s), e ρ a massa específica da solução na temperatura do teste (g cm⁻³) determinada por picnometria.

4.5.2.4 Ponto de fusão e temperatura de gelificação das gelatinas

O ponto de fusão das gelatinas foi determinado pelo método BS 755 (BSI, 1975). Alíquotas de 10 mL das soluções de gelatinas (66,7 g L⁻¹) foram transferidas para tubos de ensaio, onde permaneceram por 17 h a 7 °C. Um volume de cinco gotas de solução de clorofórmio e corante azul de metileno (3:1, mL:mL) foi adicionado ao gel como indicador do

ponto de fusão. A medição foi realizada a uma taxa de aquecimento de $0,1 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$. A média entre a temperatura em que foi possível visualizar o momento da penetração das gotas do indicador nos géis, e a temperatura em que as soluções se encontraram completamente coradas foi registado, sendo a temperatura referente ao ponto de fusão.

A determinação da temperatura de gelificação foi realizada seguindo a metodologia descrita por Muyonga et al. (2004). Frascos contendo 100 mL das amostras de gelatinas ($66,7 \text{ g L}^{-1}$) foram acondicionados em banho termostático a $40 \text{ } ^\circ\text{C}$, após foi adicionado em cada frasco um capilar, o qual foi mantido manualmente na vertical e o banho então resfriado lentamente de $0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ a cada 2 min. A temperatura de gelificação foi definida quando o capilar permanecer na vertical sem o apoio manual.

4.5.2.5 Grau de reticulação das gelatinas

O grau de reticulação das gelatinas foi determinado pelo ensaio com ninidrina (2,2-di-hidroxi-1,3-indanodiona) (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013). Em um tubo de ensaio foi adicionado 5 mg da amostra de gelatina e 1,0 mL de uma solução de ninidrina ($1,5\% \text{ etanol m v}^{-1}$), seguido de aquecimento da mistura durante 25 min a $80 \text{ } ^\circ\text{C}$. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente durante 1 h. Após diluição (10:1) com água destilada, a absorvância óptica foi medida utilizando UV-VIS (Shimadzu, Quioto, Japão) a 570 nm. O grau de reticulação (GR) foi calculado através da Equação 4.

$$\text{GR (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Absorbância da gelatina reticulada}}{\text{Absorbância da gelatina não reticulada}} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

4.5.2.6 Turbidez e atributos de cor das gelatinas

A turbidez da solução de gelatina ($66,7 \text{ g L}^{-1}$) foi determinada de acordo com o método proposto por Kittiphattanabawon et al. (2016). A turbidez foi medida por absorvância a 600 nm utilizando um espectrofotómetro UV-visível (Shimadzu UV-2550, Japão). Foram realizadas cinco medições para cada amostra. A cor das soluções de gelatina e da superfície dos filmes foi mensurada utilizando o colorímetro Minolta (CR 300, Minolta Corporation, EUA) por diagrama tridimensional de cores (L-a-b) e expressa L^* (luminosidade), a^* (coordenada vermelho/verde) e b^* (coordenada amarelo/azul). O valor total da diferença de cor (ΔE) das amostras foi calculado utilizando a Equação 5 e o ângulo de Hue pela Equação 6 (NÚÑEZ-FLORES et al., 2013).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad (5)$$

$$H_{ab} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (6)$$

4.5.2.7 Distribuição de massa molar das gelatinas

A Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Sulfato de Dodecilo de Sódio (SDS-PAGE) foi realizada pelo método de Laemmli (1970) com algumas modificações. A amostra de gelatina (2 mg) foi dissolvida em 1 mL de SDS a 10% (v v⁻¹) e, em seguida, aquecida a 85 °C durante 1 h. A solução foi centrifugada a 3500 × g durante 20 min. O sobrenadante foi misturado com 1 mL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,15 mole L⁻¹, pH 6,8, contendo SDS a 10% (v v⁻¹), bromofenol a 0,02% e glicerol, 2-mercaptoetanol a 20% (v v⁻¹). As amostras e o marcador de proteína padrão foram carregados em gel de poliacrilamida feito de gel de separação a 7,5% (v v⁻¹) e gel de empilhamento a 3,8% (v v⁻¹) e submetidos a eletroforese a uma corrente constante de 25 mA e 150 V por cerca de 3 h. Após, os géis foram corados durante 15 min com uma mistura de 0,27% (v v⁻¹) de Coomassie Brilliant Blue G-250 em metanol a 15% (v v⁻¹) e ácido acético a 5% (v v⁻¹). Logo, descorados por 1 h numa mistura de metanol a 54% (v v⁻¹) e ácido acético a 13% (v v⁻¹). As massas molares das gelatinas foram estimadas utilizando padrão de alta massa molar da GE Healthcare Life Sciences (EUA), que apresenta proteínas na faixa de 53 a 220 kDa (Glutâmico desidrogenase 53 kDa, Transferrina 76 kDa, β-galactosidase 116 kDa, α₂-macroglobulina 170 kDa e Miosina 220 kDa).

4.5.2.8 Perfil de aminoácidos das gelatinas

As amostras de gelatina (10 mg) foram hidrolisadas em 600 µL de solução HCl 6 N a 110 °C durante 24 h. Após, as amostras foram dissolvidas em água mili-Q (± 7 mL), filtradas e liofilizadas. A determinação dos aminoácidos presentes na amostra foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (UFLC Shimadzu, Japão), conforme descrito por Silva et al., 2014).

4.5.2.9 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) das gelatinas e dos filmes

A análise das amostras de gelatinas e dos filmes de gelatina foram determinados em espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) utilizando um espectrômetro modelo (Shimadzu, Prestige 21, modelo 210045, Japão), sendo os

interferogramas obtidos na faixa de 4000-400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 45 varreduras (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). As amostras de gelatina em pó foram analisadas utilizando a técnica da refletância difusa utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) na proporção 1:10. Para as amostras de filmes, utilizou-se a técnica refletância total atenuada horizontal (HATR) para a obtenção dos espectros de infravermelho.

4.5.2.10 Análises térmicas das gelatinas e dos filmes

As propriedades térmicas das gelatinas modificadas e dos filmes biopoliméricos foram realizadas utilizando calorimetria de varrimento diferencial (DSC-60 Shimadzu, Japão) e analisador termogravimétrico (modelo DTG 60, Shimadzu, Japão). No DSC, as amostras (3,5 mg) foram pesadas com precisão numa panela de alumínio, seladas hermeticamente e digitalizadas na gama de temperatura entre 0 °C e 220 °C. Utilizou-se uma taxa de base de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera com taxa de fluxo de gás nitrogênio de 50 mL min^{-1} . As análises foram realizadas com uma placa de alumínio vazia como referência (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010). Para a análise termogravimétrica (TGA) e a análise térmica diferencial (DTA) das gelatinas e dos filmes, cada amostra (5 mg) foi aquecida em cápsulas de alumínio até 450 °C à uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera de nitrogênio com fluxo constante de 50 mL min^{-1} .

4.5.2.11 Análise de difração de raio-X dos filmes

A análise de difração de raios-X dos filmes de gelatina reticulados foi realizada utilizando um difratômetro Bruker D8 Advance (Bruker AXS, Alemanha) com uma fonte de radiação Cu-K α monocromada ($k = 1,54060 \text{ \AA}$) a 40 kV e 40 mA. Todas as amostras foram analisadas em modo de transmissão através do ângulo de difração 2θ entre 10 e 90° (CHENG et al., 2003).

4.5.2.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das gelatinas e dos filmes

A morfologia superficial das gelatinas e das amostras de filme foi visualizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6010LV, Japão) com uma tensão de aceleração de 10 kV (GOLDSTEIN et al., 1992). Antes da visualização, as amostras de filmes foram metalizadas com ouro numa câmara de vácuo (Denton Vacuum Desk Sputtering

V, EUA) afim de fazer a condutividade. As micrografias foram feitas com ampliação de 2000 vezes.

4.5.2.13 Propriedades mecânicas e espessura dos filmes

A resistência à tração (RT) e o alongamento (A) dos filmes de gelatina reticulada foram determinados de acordo com o método oficial D00882-00 (ASTM, 2000a), utilizando texturômetro (Stable Microsystems, SMD TA.XP2i, Reino Unido) com uma célula de carga de 50 N. A distância inicial entre as garras e a velocidade mecânica foi de 50 mm e 50 mm min⁻¹, respectivamente. As amostras foram cortadas em 100 mm de comprimento e 25 mm de largura e a sua espessura foi medida utilizando um micrômetro (Mitutoyo Manufacturing Co. Ltd., Japão) com 1 µm de resolução. Foram determinadas dez posições aleatórias em torno da película. A RT das amostras foi calculada pela Equação 7 e o A (%) pela Equação 8.

$$RT = \left(\frac{F_{\max}}{A} \right) \quad (7)$$

$$A (\%) = \left(\frac{E}{50} \right) \times 100 \quad (8)$$

onde F_{\max} representa a carga máxima (N) necessária para puxar a amostra, A é a área da secção transversal (m²) da película, E é o alongamento do filme (mm) no momento da ruptura e 50 é o comprimento inicial das películas (mm).

4.5.2.14 Permeabilidade ao vapor de água dos filmes

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente pelo método E96 / E96M-05 (ASTM, 2000b). As películas foram seladas numa célula de permeação (diâmetro de 50 mm) contendo cloreto de cálcio anidro. As células foram colocadas em dessecadores a 25 °C e 75% de umidade relativa. As amostras foram pesadas em intervalos de 24 h durante 7 dias. A PVA (g Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹) foi calculada de acordo com a Equação 9.

$$PVA = \frac{m_{ab} \times L}{t \times A \times \Delta P} \quad (9)$$

onde m_{ab} é a massa de umidade absorvida (g), t é o tempo total de ensaio, L é a espessura do filme (m), A é a área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor através do filme (Pa).

4.5.2.15 Transmitância UV e luz visível dos filmes

As propriedades de barreira à luz ultravioleta e visível dos filmes de gelatina foram medidas a um comprimento de onda entre 200 a 800 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu UV-2550, Japão), de acordo com o método utilizado por Arfat et al. (2017). O valor de transparência dos filmes (VT) foi calculado pela Equação 10 (HAN; FLOROS, 1997).

$$VT = \frac{-\log T_{600}}{L} \quad (10)$$

onde T_{600} é a transmitância fracionada a 600 nm e L é a espessura da película (mm). O valor de transparência mais elevado significa um filme menos transparente.

4.6 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A análise estatística foi baseada na análise de variância (ANOVA) para determinar variáveis significativas ($p \leq 0,05$) no processo, e o teste de Tukey para comparação de médias para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) (BOX; HUNTER, J; HUNTER, W., 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando quatro lotes diferentes de amostras, e foram analisados com o uso do *software Statistica 5.0* (Statsoft, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PELES E OSSOS E DAS GELATINAS

A composição centesimal das peles *in natura*, dos ossos moídos e das gelatinas obtidas de peles e ossos de carpa e de tilápia estão apresentados na Tabela 2. Os teores de proteína para as peles de tilápia foram superiores significativamente ($p \leq 0,05$), quando comparados com as peles de carpa. A diferença nos teores de proteína seguiu para os ossos entre os pescados estudados. Os valores de lipídios e cinzas para as peles encontrados no estudo foram superiores aos encontrados por Balti et al. (2011) quando analisaram peles de bagre-gigante, 1,7% e 0,7% respectivamente, e similares aos encontrados por Roslan et al. (2014) para peles de tilápia vermelha 5,5% e 2,8%, respectivamente.

A diferença estatística ($p \leq 0,05$) nos teores de proteínas, entre as gelatinas obtidas de peles de tilápia e as obtidas de pele de carpa, pode ser justificada pela diferença dos teores de proteínas de suas matérias-primas. Ainda, segundo Roslan et al. (2014), a porcentagem de proteína solubilizada encontrada depende da quantidade de lipídios na matéria-prima, de tal modo que a matéria-prima contendo a maior quantidade de lipídeos produzirá um menor percentual de proteína solubilizada. Para as gelatinas de ossos de pescado não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos teores de proteína entre os resultados.

As gelatinas a partir de peles dos pescados mostraram elevados teores de proteínas e baixos teores de lipídios e cinzas, sugerindo que houve uma eficiente remoção de lipídios e material mineral das peles. Resultados semelhantes para proteínas foram obtidos por Bandeira et al. (2015) para gelatina de peles e ossos de corvina, 86,5% e 81,7%, respectivamente. As variações na composição química entre as gelatinas obtidas ocorrem devido às diferenças no método utilizado para obtenção de gelatina de peles e ossos, e no conteúdo protéico das respectivas matérias-primas utilizadas como fonte de colágeno (BORDIGNON et al, 2012).

Em relação à composição das gelatinas obtidas, os teores de proteína para gelatinas de peles foram superiores aos de ossos. Pode-se destacar ainda, que para as gelatinas de tilápia esses valores foram superiores quando comparados aos de carpa. Os valores obtidos para as gelatinas foram similares aos alcançados por Weng et al. (2014) para gelatinas de peles tilápia, cujo o teor de proteína variou de 78-91% e por Mohtar et al. (2010) para gelatinas de peles de merluza, onde o valor ficou em torno de 82%. A Figura 8 ilustra as matérias-primas utilizadas.

Tabela 2- Composição química das amostras de peles *in natura*, ossos moídos e gelatinas obtidas de pele e ossos de carpa e de tilápia

	Peles <i>in natura</i>		Ossos moídos		Gelatinas de pele		Gelatinas de ossos	
	Tilápia	Carpa	Tilápia	Carpa	Tilápia	Carpa	Tilápia	Carpa
Umidade (%)*	70,41 ± 1,4 ^a	71,94 ± 1,8 ^a	26,28 ± 0,8 ⁱ	26,71 ± 1,2 ⁱ	9,13 ± 0,5 ^A	10,23 ± 0,7 ^A	11,32 ± 0,8 ^A	12,41 ± 0,9 ^A
Proteínas (%)*	25,77 ± 0,8 ^a	23,86 ± 0,6 ^b	21,22 ± 0,5 ⁱ	20,27 ± 0,6 ⁱ	91,20 ± 1,7 ^A	87,50 ± 1,3 ^B	86,45 ± 1,8 ^C	82,13 ± 2,3 ^C
Lipídios (%)*	3,75 ± 0,3 ^a	4,53 ± 0,4 ^b	4,55 ± 0,2 ⁱ	4,38 ± 0,1 ⁱ	0,67 ± 0,1 ^A	0,89 ± 0,2 ^A	1,28 ± 0,3 ^A	1,49 ± 0,3 ^A
Cinzas (%)*	1,53 ± 0,2 ^a	1,81 ± 0,4 ^a	49,12 ± 1,4 ⁱ	48,33 ± 1,1 ⁱ	0,22 ± 0,1 ^B	0,35 ± 0,1 ^B	0,92 ± 0,1 ^A	1,04 ± 0,2 ^A

Médias ± desvio padrão (para cinco repetições).

^{a-b} Médias na mesma linha com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) (peles *in natura*).

ⁱ⁻ⁱⁱ Médias na mesma linha com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) (ossos moídos).

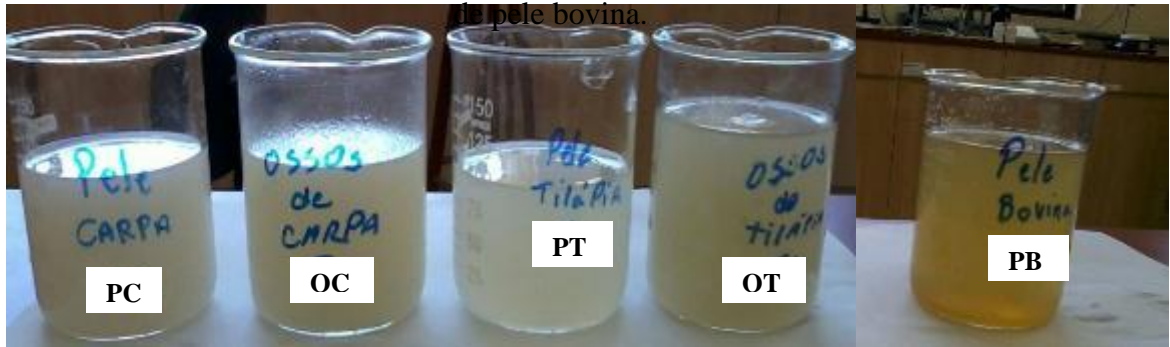
^{A-B} Médias na mesma linha com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) (gelatinas)

Figura 8- Ilustração das matérias-primas utilizadas

Legenda: Ossos secos (A); Moinho de facas em funcionamento (B), Ossos moídos (C), pele de tilápia inteira (D), pele de carpa cortada (E)

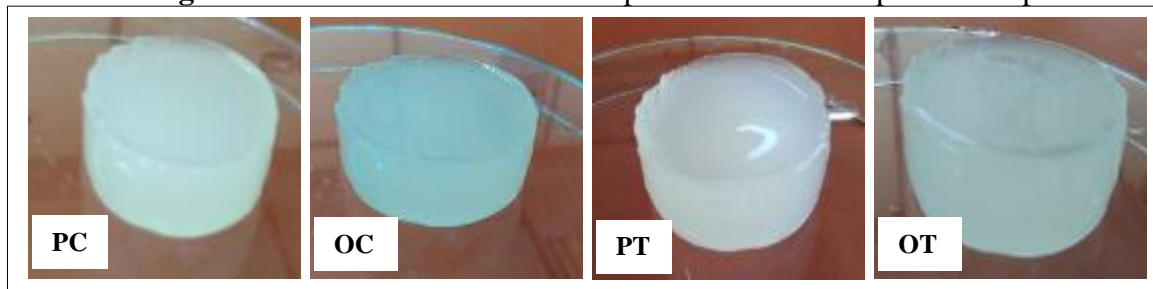
A Figura 9 ilustra as gelatinas obtidas de peles e ossos de tilápia e de carpa e gelatina de pele bovina. As Figuras 10 e 11 mostram as gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa após a clarificação e a liofilização, respectivamente.

Figura 9- Soluções de gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa, e gelatina controle



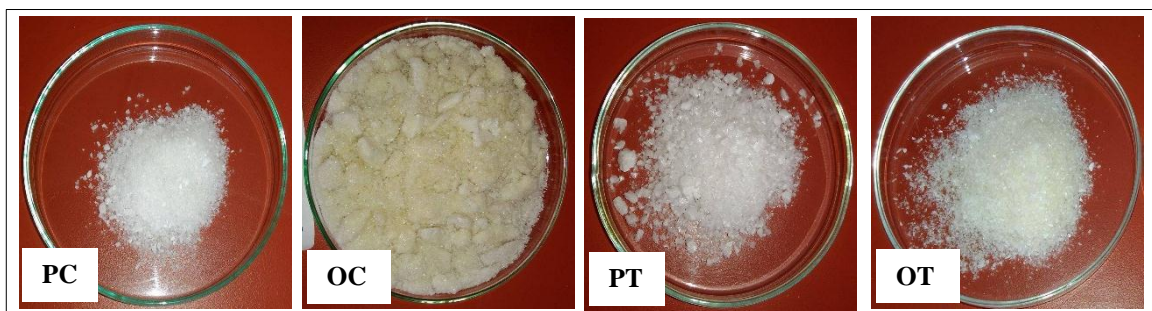
Legenda: Soluções de gelatinas de pele de carpa (PC), de ossos de carpa (OC), de pele de tilápia (PT), de ossos de tilápia (OT) e de peles bovina (PB)

Figura 10- Gelatinas clarificadas de peles e ossos de tilápia e de carpa



Legenda: Gelatinas de pele de carpa (PC), de ossos de carpa (OC), de pele de tilápia (PT) e de ossos de tilápia (OT)

Figura 11- Gelatinas liofilizadas de peles e ossos de tilápia e de carpa.



Legenda: Gelatinas de pele de carpa (PC), de ossos de carpa (OC), de pele de tilápia (PT) e de ossos de tilápia (OT)

5.2 RENDIMENTOS E CARACTERIZAÇÃO DAS GELATINAS OBTIDAS

5.2.1 Rendimentos de extração e em hidroxiprolina das gelatinas

A Tabela 3 apresenta os valores médios dos resultados obtidos quanto aos rendimentos em massa e com base no teor de hidroxiprolina de gelatinas obtidas a partir de peles e ossos de tilápia e de carpa.

Tabela 3- Rendimentos das gelatinas de peles e ossos tilápia e carpa

	Gelatina de tilápia		Gelatina de carpa	
	Peles	Ossos	Peles	Ossos
Rendimento em massa (g 100g ⁻¹)*	9,2 ± 0,6 ^a	5,8 ± 1,8 ^b	8,9 ± 0,5 ^a	4,9 ± 1,2 ^b
Rendimento em hidroxiprolina (g 100g ⁻¹)*	8,5 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,2 ^b	8,1 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,1 ^b

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma linha com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

O rendimento da solução de gelatina em base úmida para peles de tilápia e carpa não foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$), assim como os valores encontrados para gelatina de ossos de tilápia e carpa. Para a solução de gelatina a partir de ossos, embora o volume desta solução tenha sido maior que o volume da solução de gelatina de peles, o rendimento foi menor quando comparado as gelatinas de peles. Segundo Muyonga et al. (2004), a diferença no rendimento entre gelatina de peles e ossos pode ser atribuída à elevada proporção de carne ligada aos ossos, em comparação com as peles e a maior perda de colágeno devido ao longo processo de lixiviação. Ainda, embora utilizada maior temperatura de extração, a desnaturação de colágeno solúvel presente nos ossos pode ter sido insuficiente, resultando em rendimentos mais baixos.

O rendimento de extração é dependente do processo de obtenção utilizado (temperatura, tempo e pH) do teor de proteínas colagênicas presente no material, podendo variar entre diferentes espécies (CHANDRA; SHAMASUNDAR, 2015). Contudo, os resultados encontrados para peles foram superiores do que aqueles encontrados por Abdelmalek et al. (2016) para gelatina de pele de calamar (6,82 g 100g⁻¹) e semelhante aos de Silva et al. (2014), cujo valor foi de 8,8 g 100g⁻¹ quando estudado gelatina de pele de bijupirá.

O teor de hidroxiprolina desempenha um papel na estabilização da estrutura da tripla hélice, devido a sua capacidade de ligações entre hidrogênio e grupos hidroxilos (CHANDRA; SHAMASUNDAR, 2015). Altos níveis deste aminoácido na gelatina tende a resultar em géis com alta força de gel, viscosidade e ponto de fusão (RAWDKUEN; THITIPRAMOTE; BENJAKUL, 2013). A hidroxiprolina é o aminoácido encontrado unicamente no colágeno, assim, o teor de hidroxiprolina no material determina o rendimento de gelatina (INTARASIRISAWAT et al., 2007). O teor de hidroxiprolina na gelatina de peles de tilápia foi em torno de 5% superior a gelatina de pele de carpa. Contudo, os valores encontrados neste estudo foram similares aos encontrados por Abdelmalek et al. (2016) para gelatina de peles de lula cerca de $9 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e superiores aos encontrados por Huang et al. (2016) quando estudou gelatina de peles de tilápia, onde os valores foram em torno de $5\text{-}6 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. Essas diferenças podem ser justificadas pelo processo de extração do colágeno que provoca a solubilização de proteínas e maior fragmentação da estrutura do colágeno (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

Comparando os resultados de hidroxiprolina das gelatinas obtidas de peles com os encontrados para gelatina obtida de ossos, se observa um acentuado aumento de aproximadamente 49% do teor de hidroxiprolina para gelatina de peles em relação a de ossos. Essa variação pode ser decorrente do processo de extração de gelatinas de ossos o qual se utiliza tratamento ácido mais prolongado, que pode ocasionar hidrólise de aminoácidos e, por conseguinte, menor proporção de hidroxiprolina presente neste tipo de gelatina (PRESTES et al., 2013). Os conteúdos de hidroxiprolina encontrados para gelatina de ossos de tilápia e carpa foram inferiores aos encontrados por Koli et al. (2012) quando estudou ossos de Tigre dentado, cujo o valor foi de 7,5%.

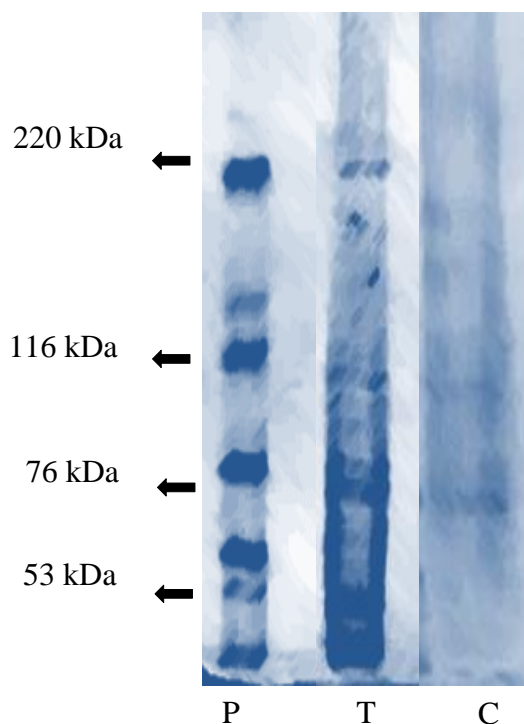
5.2.2 Distribuição de massa molar das gelatinas

A distribuição das massas molares dos componentes protéicos presentes nas amostras de gelatinas foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS 10%. A Figura 12 mostra a imagem digital dos resultados para as gelatinas das peles de tilápia e carpa.

Durante a conversão do colágeno em gelatina, as ligações inter e intramoleculares das cadeias do colágeno assim como os peptídeos são hidrolisados (MOHTAR; PERERA; QUEK, 2010). Na Figura 12 pode ser observado que ambas gelatinas são caracterizadas pela presença de bandas relacionadas as cadeias α , com massas molares próximas a 100 kDa, típicas de colágeno tipo I. A ação desnaturante do laurel sulfato de sódio (SDS) não permite afirmar

que a forma de hélice tripla do colágeno encontra-se intacta apesar dos resultados mostrarem frações de proteínas típicas para o mesmo (PEDROSO, 2009). No entanto, os resultados estão de acordo com a literatura, a qual afirma que a gelatina consiste de uma mistura de diferentes frações de polipeptídios tendo uma massa molar média estimada em cerca de 100 kDa (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Figura 12- Distribuição molar das gelatinas de peles de tilápia e carpa



Legenda: Padrão de alta massa molar (P), gelatina de pele de tilápia (T) e gelatina de pele de carpa (C)

As propriedades funcionais das gelatinas são influenciadas pela composição de aminoácidos e distribuição de massa molar. Diferenças no perfil de distribuição de massa molar afetam diretamente a funcionalidade da gelatina. Em termos gerais, uma maior proporção de frações de baixa massa molar aumenta o tempo necessário para a formação de gel. Além disso, a força de gel da gelatina está relacionada à soma das cadeias α e β juntamente com os peptídeos de maior cadeia, já a viscosidade, pode ser correlacionada diretamente com a massa molar média (WARD; COURTS, 1977; ZARAI et al., 2012).

Na Figura 12 se pode perceber a presença de uma banda próxima a 220 kDa para gelatina de peles de tilápia. Esta condição sugere que o processo de obtenção de gelatina foi menos severo para as peles de tilápia que para as peles de carpa, logo, o colágeno das peles de tilápia mostra maior estabilidade térmica e, conseqüentemente, géis mais resistentes.

5.2.3 Perfil de aminoácido das gelatinas

A Tabela 4 apresenta o perfil de aminoácido das gelatinas obtidas a partir de peles de tilápia e carpa. A sequência de aminoácidos predominante na gelatina de pescado é Glicina-Prolina-Hidroxiprolina. A gelatina contém níveis relativamente elevados destes aminoácidos: glicina 26-34%; prolina 10-18%; e hidroxiprolina 7-15%; Alanina 8-11%; arginina 8-9% (HUDSON, 1994; POPPE, 1997). Os teores mais elevados de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) em gelatinas de peles contribuiu para as suas propriedades reológicas mais elevadas devido a formação e estabilização da tripla hélice na molécula de gelatina. Além disso, a composição de aminoácidos em ambas as gelatinas apresentou baixo teor de resíduos de tirosina e cisteína. A cisteína não está tipicamente presente na estrutura do colágeno tipo I. A presença de cisteína na composição de aminoácidos pode indicar que a gelatina contém uma pequena quantidade de estroma (BOUGATEF et al., 2012, DUAN et al., 2011).

Tabela 4 - Composição de aminoácidos das gelatinas de peles de tilápia e carpa

Aminoácidos	Gelatina de peles de tilápia (g 100g⁻¹)	Gelatina de peles de carpa (g 100g⁻¹)
Treonina	< LOQ	< LOQ
Serina	< LOQ	< LOQ
Prolina	12,8	11,2
Glicina	28,0	26,2
Alanina	1,9	1,6
Cisteína	0,9	0,7
Valina	0,1	0,2
Metionina	0,6	0,8
Isoleucina	2,9	2,3
Leucina	1,3	1,2
Tirosina	1,3	1,2
Fenilalanina	1,1	1,3
Lisina	1,1	2,0
Arginina	3,9	5,0

(Valores expressos em g de aminoácidos por 100 g de proteína)

Embora sua composição seja rica em aminoácidos, a gelatina não pode ser considerada uma proteína nutricionalmente completa, pois não contém o triptofano e é deficiente em treonina, metionina e cisteína (POTTER; HOTCHKISS, 1998). Em relação à composição de aminoácidos entre as gelatinas elaboradas com diferentes espécies de pescado, não existem grandes variações, embora possa ser observado diferenças no conteúdo de iminoácidos. Segundo Eastoe e Leach (1997), o efeito da conversão de colágeno em gelatina de peixe aumenta ainda mais a proporção dos aminoácidos presentes em grandes quantidades, isso já havia sido observado em colágenos de mamíferos.

O conteúdo de glicina nas gelatinas de peles de tilápia e carpa estudadas foi superior aos de gelatina de peles de catla catla (18,9 g 100g⁻¹), mas inferior ao de gelatina de bovino (34,1 g 100g⁻¹) (BALTI et al., 2011; CHANDRA; SHAMASUNDAR, 2015). A quantidade de prolina foi semelhante à da gelatina bovina (12,3 g 100g⁻¹), mas superior à da gelatina de pele de barbeiro (83 g 100g⁻¹) (SILA et al., 2015). Os teores de glicina e prolina para gelatinas de peles de tilápia foram superiores a gelatina de pele de carpa, sugerindo melhores propriedades reológicas.

5.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) das gelatinas

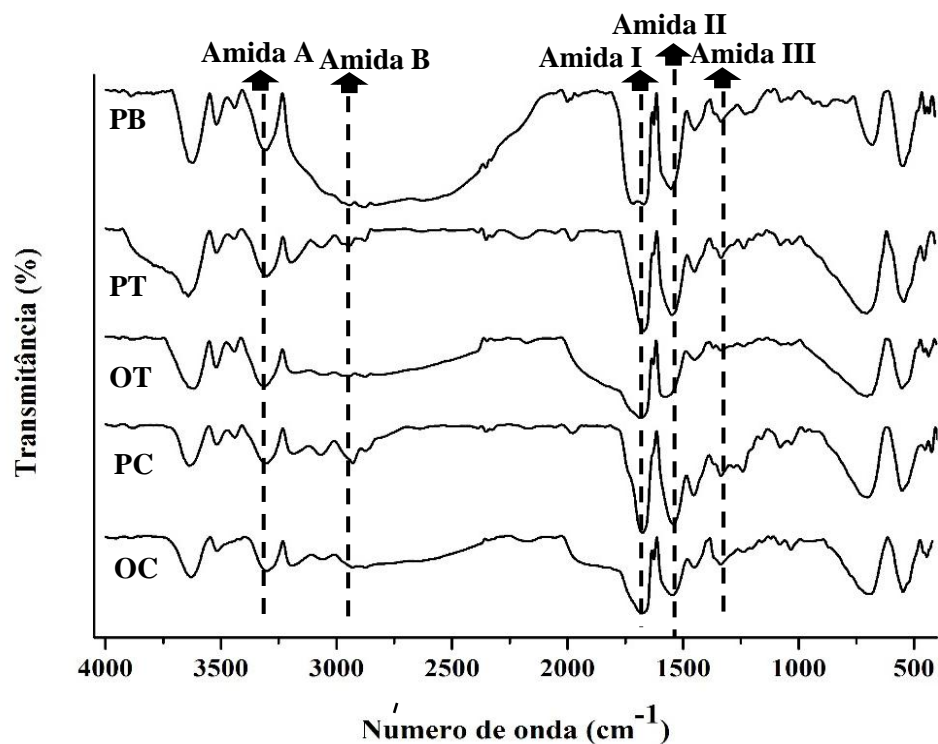
A Figura 13 apresenta os espectros de infravermelho para as gelatinas obtidas de pele bovina, peles e ossos de tilápia e peles e ossos de carpa. Nos espectros estão destacadas as regiões em que aparecem as principais bandas que caracterizam as amostras de gelatina.

Os espectros de todas as gelatinas mostraram similaridade de bandas características ao redor de 1630 cm⁻¹ (amida-I, alongamento C = O / ligação de hidrogênio com COO), 1545 cm⁻¹ (amida II que dobra N-H e alongamento C-N), 1280 cm⁻¹ (vibração de estiramento de amida III, C-N e C-H e CH₂ de grupo glicina) e 1450 cm⁻¹ (corresponde a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos) (ARFAT et al., 2016; HE et al., 2015; HOSSEINI; JAVIDI; REZAEI, 2016). A banda que se refere a amida-A nas gelatinas foi observada em torno de 3275 cm⁻¹, representando o alongamento de N-H juntamente com ligações de hidrogênio. Enquanto a banda em 2940 cm⁻¹ se refere a amida-B e corresponde ao estiramento da ligação C-H em cadeias alifáticas, ambas presentes na constituição dos aminoácidos (SIONKOWSKA et al., 2004; SOW; YANG, 2015).

Através da relação da absorvância das bandas em 1280 e 1450cm⁻¹ que se referem a banda da amida III e estereoquímica dos anéis pirrolidínicos, pode-se verificar a integridade da hélice tripla do colágeno. A primeira é sensível a presença de estrutura secundária do

tropocolágeno, já a segunda independe dessa estrutura. Sendo assim, por meio da determinação da razão entre as absorbâncias nas bandas de números 1280 e 1450 cm^{-1} podemos avaliar a integridade da hélice tripla. Quando a estrutura helicoidal do tropocolágeno permanecer íntegra a razão é próximo de 1,0, quando esta estrutura se encontra desnaturada esses valores serão cerca de 0,5 (SILVESTER, YANNAS, FORRE 1989). Todos os valores encontrados nesse estudo foram próximos a 1,0.

Figura 13-Espectros de absorção na região do infravermelho das gelatinas de tilápia,



Legenda das gelatinas: PB= pele bovina; PT= pele de tilápia; OT= ossos de tilápia; PC= pele de carpa e OC= ossos de carpa

A partir dos espectros foi possível observar que os picos de absorção foram preservados para todas as amostras, e que não ocorreu o aparecimento de novos picos. Nota-se um deslocamento entre as curvas, que pode ter ocorrido devido à diferença na quantidade de amostra utilizada ou também devido a diferenças na granulometria final das gelatinas. Sendo assim, se pode afirmar que não existe diferença visível entre as amostras de gelatinas, não importando a origem ou o tratamento que se obteve a mesma.

5.2.5 Determinação das propriedades das gelatinas

A Tabela 5 apresenta os valores médios dos resultados obtidos para a caracterização das soluções de gelatinas obtidas a partir de peles e ossos de tilápia e de carpa e de peles de bovino (comercial) quanto a força de gel, ponto de fusão, temperatura de gelificação, viscosidade, turbidez e ângulo Hue.

Tabela 5- Caracterizações das gelatinas de peles e ossos tilápia do Nilo e de carpa comum.

	Gelatina de	Gelatina de tilápia		Gelatina de carpa	
	Bovino	Pele	Ossos	Pele	Ossos
Força de gel (g)*	227,20±2,10 ^a	219,22±2,31 ^b	147,55±2,14 ^c	217,51±2,12 ^b	122,57±2,51 ^d
Viscosidade (cP)*	7,86±0,32 ^a	3,86±0,23 ^b	1,26±0,17 ^d	3,43±0,18 ^c	1,14±0,12 ^d
Ponto de fusão (°C)*	25,60±0,22 ^b	26,65±0,31 ^a	20,50±0,28 ^c	25,64±0,30 ^b	19,53±0,31 ^d
Temp. de gelificação (°C)*	22,40±0,84 ^a	17,65±0,70 ^b	7,21±0,63 ^d	16,17±0,53 ^c	6,84±0,55 ^d
Turbidez (A₆₀₀)*	0,07±0,02 ^b	0,05±0,01 ^b	0,21±0,04 ^a	0,07±0,02 ^b	0,24±0,06 ^a
Cor					
L*	35,05±0,29 ^d	57,83±0,52 ^a	51,40±0,43 ^c	53,98±0,31 ^b	50,80±0,26 ^c
a*	1,72±0,08 ^a	0,34±0,03 ^c	0,54±0,03 ^b	0,28±0,02 ^d	0,37±0,02 ^e
b*	4,03±0,32 ^b	4,02±0,56 ^b	9,86±0,77 ^a	2,85±0,24 ^c	9,34±0,81 ^a
Ângulo Hue (°)*	66,89±0,62 ^d	85,17±0,31 ^b	86,86±0,22 ^a	84,39±0,25 ^c	87,77±0,67 ^a

Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). L: luminosidade, a*: coordenada vermelho/verde, b*: coordenada amarelo/azul. Médias na mesma linha com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Como mostrado na Tabela 5, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as propriedades das gelatinas extraídas de ossos quando comparadas as de peles. As gelatinas de peles apresentaram propriedades de gel superiores estatisticamente ($p \leq 0,05$) quando comparadas às de ossos. As diferenças observadas nas propriedades foram devido aos diferentes pré-tratamentos e condições de extração das gelatinas de peles e de ossos. As principais razões pelas quais as condições de extração mais severas são necessárias, para obter uma alta recuperação de gelatina a partir de ossos, são as ligações cruzadas mais estáveis entre as cadeias de colágeno nos ossos, e que as estruturas minerais dão proteção física as estruturas de colágeno dos ossos (ARNESEN; GILDBERG, 2007). Segundo Gómez-Guillén et al. (2011), o baixo teor de hidroxiprolina é a razão principal para as baixas propriedades reológicas e funcionais. Acredita-se que a hidroxiprolina desempenha um papel importante na estabilidade do gel, devido à sua capacidade de ligação de hidrogênio através do grupo hidroxilo, embora a prolina também seja importante (CHANDRA et al., 2015).

A força de gel (ou Bloom) é uma das propriedades funcionais mais importantes da gelatina, pois está diretamente relacionada com a resistência a degradação, sendo através dela possível determinar sua aplicabilidade (CHOI; REGENSTEIN, 2000; LIU; HAN; GUO, 2008). Os valores de força de gel para gelatinas de peles de tilápia e de carpa não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Tabela 5). No entanto, ambas foram superiores aos encontrados por Mohtar et al. (2014) quando estudaram gelatina de peles de Nova Zelândia Hoki e similares aos de Alfaro et al. (2013b) quando analisaram gelatinas de peles de tilápia do Nilo, cujos valores médios foram 171,1 e 223,0 g, respectivamente. As gelatinas de ossos apresentaram menor força de gel quando comparada à gelatina de peles (Tabela 5), o que se justifica pela menor concentração de hidroxiprolina existente na gelatina de ossos.

Alguns autores relatam variações no valor de Bloom entre diferentes espécies de peixes, isto ocorre possivelmente em razão das diferenças na composição de aminoácidos, no tamanho das redes de proteína, bem como o habitat ou da degradação de proteínas que pode ocorrer durante a extração da gelatina (JONGJAREONRAK et al., 2010; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004).

A viscosidade da solução de gelatina varia com a distribuição de massa molar e o tamanho molecular das proteínas (ZHANG et al., 2016). Houve um ligeiro aumento na viscosidade obtida de gelatinas de tilápia em comparação com a carpa (Tabela 5). Esta diferença é diretamente proporcional aos valores de Bloom, e ocorre devido a degradação da cadeia polipeptídica, responsável por uma rede ordenada, que pode aumentar a viscosidade. Os resultados para as gelatinas de peles de tilápia e carpa estão de acordo com os valores de viscosidade na literatura (2,0 a 7,0 cP) (NORZIAH; KEE; NORITA, 2014), porém as gelatinas de ossos ficaram abaixo desta faixa. Os valores de viscosidade das gelatinas de peles de tilápia e carpa foram inferiores as gelatinas de peles bovina encontrados neste estudo, e similares aos encontrados por Uriarte-Montoya et al. (2011) quando estudou gelatinas de peles de lula, onde o valor médio ficou em torno de 4,0 cP.

De acordo com a Tabela 5, os valores dos pontos de fusão, pontos de gelificação e viscosidade de gelatina de pele de tilápia foram superiores aos encontrados para gelatina de pele de carpa, comprovando a maior estabilidade térmica do colágeno das peles de tilápia. Como pode ser observado, estas propriedades relacionadas a gelatina de tilápia foram significativamente superiores ($p \leq 0,05$) a gelatina de carpa.

Os valores de ponto de fusão para as gelatinas de peles de tilápia e de carpa ficaram acima dos determinados por Zeng et al. (2010) para gelatinas de peles de tilápia, que obtiveram máxima temperatura de fusão de 22,4 °C, e mantiveram-se dentro da faixa encontrada por Duan

et al. (2011) para gelatinas de peles de carpa capturadas em diferentes épocas do ano, cujos valores variaram entre 23,2-27,2 °C. Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas de ponto de fusão da gelatina bovina e de gelatinas de peles de tilápia e de carpa. Quanto menor o ponto de fusão, maior será a liberação de *flavor*, o que pode ser considerado importante para a indústria de alimentos (BORAN LAWLESS; REGENSTEIN, 2010).

As temperaturas de gelificação das gelatinas de ossos apresentadas na Tabela 5 foram cerca de 10 °C inferiores as de gelatinas de peles, tanto para tilápia quanto para carpa. A diferença pode ser atribuída à composição de iminoácidos presentes na gelatina de pescado. Os iminoácidos são responsáveis por estabilizar a conformação ordenada quando a gelatina forma a rede de gel durante a gelificação. O menor teor de iminoácidos reduz a propensão para formação de hélices intermoleculares (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004; SHAKILA et al., 2012). A gelatina bovina apresentou uma temperatura de gelificação, cerca de 5 °C, superior às gelatinas de peles de pescado. No entanto, os resultados encontrados no estudo foram semelhantes aos de Ninan et al. (2011) e superiores aos de Shakila et al. (2012), quando analisaram respectivamente gelatinas de carpa comum e anchova vermelha, cujas temperatura encontradas foram cerca de 17,9 °C e 16,0 °C, respectivamente.

5.2.5.1 Turbidez e atributos de cor das gelatinas

As soluções de gelatinas de peles de tilápia e de carpa não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) para turbidez quando comparadas a gelatina bovina. No entanto, foi observado um acentuado aumento na turbidez para gelatinas de ossos quando comparadas às de peles. O aumento da turbidez foi coincidente com a diminuição da força de gel (Tabela 5). Uma maior agregação aleatória das moléculas de gelatina de ossos pode ter ocorrido, evidenciado pelo aumento da turbidez. A agregação aleatória é geralmente induzida quando a proteína passa por um processo mais drástico para a obtenção da gelatina (KITTIHATTANABAWON et al., 2010). Para as gelatinas de peles ocorre um alinhamento mais uniforme no qual resulta em géis mais translúcidos. Esses agregados mal alinhados formam coágulos e, com isso, menos água interage com a moléculas de proteína. Os coágulos interferem no desenvolvimento de um gel ordenado, resultando na formação de gel macio e turvo (NHARI; ISMAIL; MAN, 2012; POMERANZ, 1991).

Com relação aos atributos de cor (Tabela 5), todos os parâmetros foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$). Apesar dos valores do ângulo Hue para as gelatinas serem

diferentes, tanto as gelatinas de tilápia quanto as de carpa apresentaram cores características de gelatinas de pescados com coloração tendendo ao amarelo (ângulo Hue próximo de 90°). Os resultados indicaram um aumento expressivo no croma b^* para gelatinas de ossos, quando comparado ao de peles. O pré-tratamento mais severo utilizado na obtenção das gelatinas de ossos, provavelmente induziu a reação de escurecimento não-enzimático. Os grupos amino desta gelatina podem causar uma reação de escurecimento juntamente com os compostos carbonila (JAMILAH et al., 2011; NAGARAJAN et al., 2012).

Os valores do atributo L^* (luminosidade) foram superiores para as gelatinas de pescado do que para gelatina bovina, confirmando a obtenção de gelatina de tilápia e carpa com coloração mais clara. A diferença de coloração de diferentes gelatinas pode ocorrer devido a presença de pigmentação inerente ao material, sendo dependente da matéria-prima (JONGJAREONRAK et al., 2010).

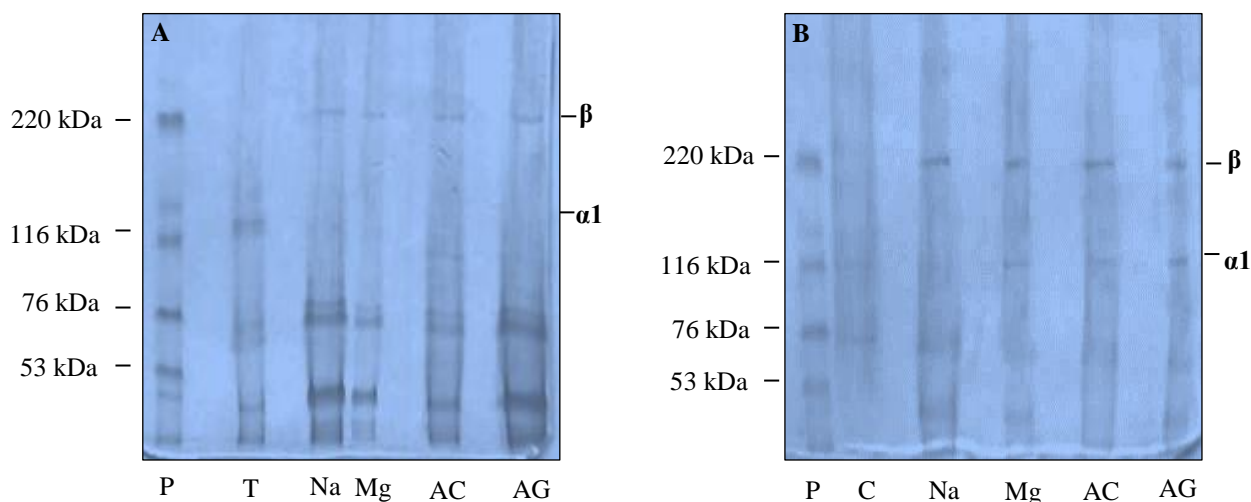
5.3 GELATINAS MODIFICADAS

5.3.1 Distribuição de massa molar das gelatinas modificadas

Os padrões de SDS-PAGE das gelatinas de peles de tilápia e de carpa reticuladas quimicamente estão ilustrados na Figura 14. Todas as gelatinas obtidas mostraram cadeias $\alpha 1$ e as reticuladas apresentaram cadeias β . Contudo, a intensidade de $\alpha 1$ na gelatina de tilápia foi maior do que na gelatina de carpa, indicando diferentes massas molares. Como pode ser visto na Figura 14, a intensidade da banda em torno de 100 kDa diminuiu com a adição de agentes reticulantes, e aumentou para cerca de 220 kDa. Estes resultados indicaram que, os agentes conduziram a uma ligação cruzada da matriz de gelatina para ambas as espécies, levando a um aumento da massa molar.

Resultados semelhantes foram relatados por Bae et al. (2009), onde houve uma diminuição na intensidade da banda a cerca de 100 kDa e aumento da intensidade da banda na posição de topo do gel quando tratados com MTGase. Gómez-Guillen et al. (2011) relataram que a reticulação pode causar um aumento da massa molar na gelatina de pescados, assim como, um aumento na viscosidade e na força do gel. As características moleculares dos géis contribuíram para elucidar as melhores propriedades funcionais obtidas a partir de gelatina reticulada de tilápia com agentes não eletrolíticos.

Figura 14-Distribuição molar das gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B).



Legenda: Padrão de alta massa molar (P), gelatina de pele de tilápia (T), gelatina de pele de carpa (C), Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

5.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

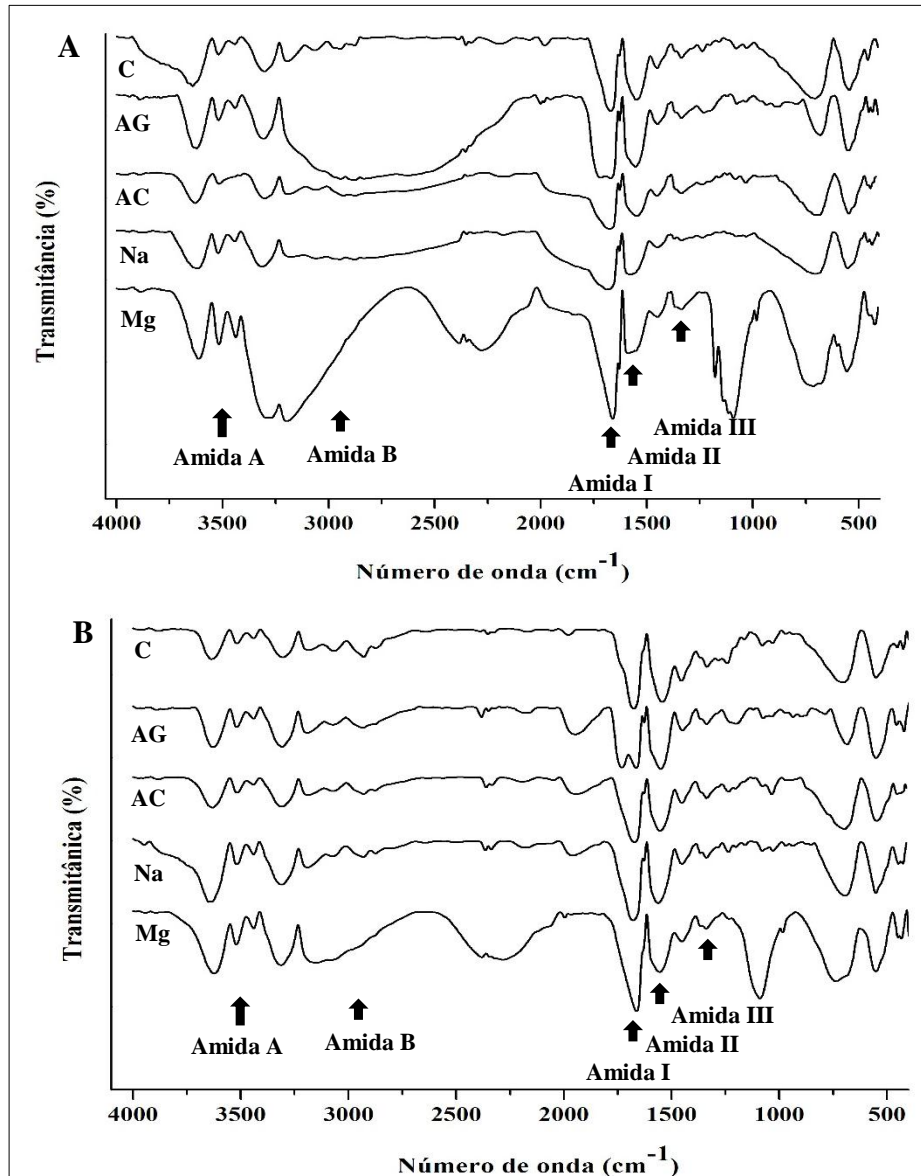
A fim de investigar como os agentes de reticulação afetaram as propriedades da gelatina, os espectros de FT-IR foram analisados. A comparação qualitativa dos espectros FT-IR são mostrados na Figura 15, para gelatinas de peles de tilápia e peles de carpa.

Pode-se observar nos espectros da Figura 15, os cinco maiores grupos de amidas que representam as características dos aminoácidos em grande proporção, incluindo bandas na amida-A (3500 cm⁻¹), amida-B (2900 cm⁻¹), amida I (1640 cm⁻¹), amida II (1500 cm⁻¹) e amida III (1260 cm⁻¹). Resultados semelhantes foram encontrados por Sai-Ut et al. (2012) quando analisaram gelatina de peles de peixe gigante, cujas as bandas eram em torno de 1653, 1553 e 1242 cm⁻¹, para as amidas I, II e II. Os picos da amida I, II e III são características do colágeno, que é rico em amina de resíduos de glicina e prolina, e estão diretamente relacionados com a conformação peptídica (MANDAL et al., 2012).

A reação de reticulação ocorre entre aldeído, éteres, halogêneos e tióis nos agentes e os grupos amino livres de glicina, prolina e hidroxiprolina presentes na gelatina. A banda observada na região de 2000 cm⁻¹ nas gelatinas reticuladas pode ter sido causada por uma combinação de deformação nos grupos NH₃⁺ que se apresenta na forma de aminoácido livre. Isto sugere a ligação entre os reticuladores e o esqueleto C-N-C da molécula de gelatina. As gelatinas reticuladas com MgSO₄ apresentaram vibrações em torno de 1050 cm⁻¹. De acordo com Barbosa (2007), o espectro de compostos que apresenta uma ligação S = O, como os

sulfatos e os sulfitos, exibe em espectros uma banda que se refere ao alongamento da ligação, cerca de 1220 e 990 cm^{-1} .

Figura 15-Espectros Infravermelhos de Transformada de Fourier (FT-IR) de gelatinas de peles pura e reticulada: (A) gelatina de tilápia do Nilo e (B) gelatina carpa comum



Legenda: C = gelatinas controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

5.3.3 Propriedades de gel das gelatinas controle e modificadas

A Tabela 6 mostra o comportamento das propriedades de força de gel, viscosidade, ponto de fusão e temperatura de gelificação para gelatinas de peles de bovino, gelatinas de peles de tilápia e carpa antes (controle) e após a modificação pela ação dos agentes de reticulação.

Em seguida, a Tabela 7 apresenta os resultados das mesmas propriedades, porém, para gelatinas de ossos de tilápia e de carpa antes (controle) e modificadas com os agentes de reticulação.

Tabela 6- Força de gel (FG), viscosidade (Visc), ponto de fusão (PF) e temperatura de gelificação (TG) para gelatinas de peles de bovino e gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa

		FG (g)*	Visc (cP)*	PF (°C)*	TG (°C)*
Bovino		227,20 ± 2,10 ^c	7,86 ± 0,32 ^a	28,05 ± 0,92 ^a	22,40 ± 0,84 ^a
	Controle	219,22 ± 2,31 ^d	3,86 ± 0,23 ^c	26,65 ± 0,61 ^{ab}	17,65 ± 0,90 ^b
	Na	215,30 ± 2,14 ^d	3,63 ± 0,15 ^{cd}	26,54 ± 0,55 ^b	17,70 ± 0,52 ^b
Tilápia do Nilo	Mg	240,42 ± 3,26 ^b	3,74 ± 0,10 ^c	26,92 ± 0,42 ^a	17,86 ± 0,65 ^b
	AG	252,78 ± 4,15 ^a	4,86 ± 0,31 ^b	27,68 ± 0,52 ^a	18,05 ± 0,43 ^b
	AC	225,66 ± 3,21 ^c	4,22 ± 0,24 ^b	27,36 ± 0,35 ^a	17,95 ± 0,55 ^b
	Controle	217,51 ± 2,12 ^d	3,43 ± 0,18 ^d	25,64 ± 0,82 ^{bc}	16,17 ± 0,53 ^c
	Na	214,53 ± 2,34 ^e	3,36 ± 0,14 ^d	25,68 ± 0,33 ^c	16,55 ± 0,62 ^c
Carpa comum	Mg	231,80 ± 4,05 ^c	3,74 ± 0,09 ^c	26,33 ± 0,55 ^b	17,01 ± 0,54 ^c
	AG	241,75 ± 5,20 ^b	4,53 ± 0,34 ^b	27,34 ± 0,42 ^a	17,68 ± 0,50 ^b
	AC	221,27 ± 3,35 ^d	4,06 ± 0,21 ^{bc}	26,85 ± 0,63 ^a	17,35 ± 0,45 ^{bc}

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Legenda: Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico e AG = ácido gálico.

Tabela 7- Força de gel (FG), viscosidade (Visc), ponto de fusão (PF) e temperatura de gelificação (TG) para gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa

		FG (g)*	Visc (cP)*	PF (°C)*	TG (°C)*
Tilápia do Nilo	Controle	147,55 ± 2,14 ^e	1,26 ± 0,17 ^c	20,50 ± 0,60 ^b	7,21 ± 0,63 ^b
	Na	155,30 ± 2,55 ^d	1,35 ± 0,12 ^c	20,85 ± 0,54 ^a	7,35 ± 0,40 ^b
	Mg	160,42 ± 2,33 ^c	1,74 ± 0,16 ^a	20,90 ± 0,35 ^a	7,86 ± 0,35 ^a
Carpa comum	AG	185,78 ± 3,87 ^a	1,96 ± 0,17 ^a	21,45 ± 0,30 ^a	8,25 ± 0,32 ^a
	AC	173,57 ± 3,45 ^b	1,82 ± 0,15 ^a	20,55 ± 0,25 ^b	7,95 ± 0,30 ^a
	Controle	122,57 ± 2,51 ^h	1,14 ± 0,12 ^c	19,53 ± 0,31 ^b	6,84 ± 0,55 ^c
	Na	131,46 ± 2,16 ^g	1,26 ± 0,13 ^c	19,85 ± 0,24 ^b	6,90 ± 0,53 ^c
	Mg	139,76 ± 3,10 ^f	1,53 ± 0,11 ^b	20,10 ± 0,30 ^b	6,98 ± 0,47 ^{bc}
Carpa comum	AG	155,75 ± 4,25 ^d	1,73 ± 0,15 ^a	21,35 ± 0,35 ^a	7,80 ± 0,35 ^a
	AC	146,25 ± 2,95 ^e	1,69 ± 0,10 ^{ab}	20,75 ± 0,43 ^a	7,45 ± 0,30 ^b

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Legenda: Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico e AG = ácido gálico.

Os efeitos de reticulação sobre a força de gel nas gelatinas a partir de peles e ossos de tilápia e de carpa são mostrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. As resistências de gel apresentaram maiores valores para as gelatinas de peles e de ossos de tilápia reticulada com ácido gálico (AG), seguida pela reticulação com $MgSO_4$ para as gelatinas de peles de ambos pescados. Os resultados encontrados para gelatinas de peles modificadas com ácido gálico e $MgSO_4$ atingiram valores superiores a gelatina de bovino e significativamente mais elevadas ($p \leq 0,05$) que as gelatinas controle, tanto para tilápia quanto para a carpa.

Alfaro et al. (2013b) observaram um aumento na resistência do gel quando os eletrólitos foram adicionados à gelatina, possivelmente promovendo um desdobramento adequado da estrutura da gelatina, o que proporciona um maior número de interações eletrostáticas. O gel mais forte quando o ácido gálico foi adicionado, pode ser justificado devido à formação de ligação de hidrogênio entre os múltiplos grupos hidroxila e da carboxila das proteínas. A modificação pode também ter ocorrido pela estabilização causada por interações hidrofóbicas entre o anel aromático do agente reticulante e das regiões hidrofóbicas da proteína (YAN et al., 2011).

O acréscimo de NaCl, em gelatinas de peles de tilápia de carpa, resultou numa redução da resistência do gel quando comparado com as amostras controle. Esta diminuição na resistência do gel através da adição de NaCl pode ter ocorrido pelo rompimento das ligações de hidrogênio ou pelo aumento da força iônica da solução, interferindo nas interações eletrostáticas (CHOI; REGENSTEIN 2000, HAUG; DRAGET; SMIDSROD, 2004). No entanto, o mesmo não ocorreu para gelatinas de ossos de tilápia e de carpa, as quais resultaram num aumento de força de gel em todas as reticulações realizadas.

A viscosimetria é conhecida por ser um método útil para investigar as alterações conformacionais de macromoléculas em solução (ZHANG et al., 2016), conseqüentemente, as viscosidades referentes à reticulação das gelatinas de peles e ossos foram medidas e comparadas com as gelatinas controle (sem reticulação) e gelatina de bovino, de acordo com o mostrado nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. A viscosidade da solução de gelatina varia com a distribuição de massa molar e o tamanho molecular das proteínas. Houve um ligeiro aumento na viscosidade obtida de gelatinas de tilápia em comparação com a carpa, tanto para gelatinas de peles quanto de ossos. Esta diferença é diretamente proporcional aos valores de força de gel, e ocorre devido à degradação da cadeia polipeptídica, responsável por uma rede ordenada, que pode aumentar a viscosidade.

As viscosidades para as gelatinas modificadas com ácido gálico obtiveram um aumento considerável, cerca de 30% para gelatinas de peles e 50% para de ossos, quando

comparado as gelatinas controle. Os resultados estão de acordo com os valores de viscosidade na literatura (2,0 a 7,0 cP para a maioria das gelatinas). A solução de gelatina com baixa viscosidade geralmente produz um gel de textura curta e quebradiço, enquanto a solução de gelatina com alta viscosidade produz um gel durável e alongável (NORZIAH; KEE; NORITA, 2014).

Os pontos de fusões das amostras de gelatinas de pescado antes e após modificação com os agentes de reticulação são mostrados nas Tabelas 6 e 7, para gelatinas de peles e ossos respectivamente. A reticulação da gelatina de peles de carpa conduziu a um ligeiro aumento na temperatura de fusão com ácido gálico, seguido do ácido cítrico e do $MgSO_4$ quando comparado com o controle. Tendências semelhantes foram observadas para gelatinas de peles de tilápia, onde a reticulação com ácido gálico apresentou a temperatura de fusão mais alta, sendo próxima à temperatura de fusão da gelatina bovina e maior que as gelatinas de controle.

As temperaturas de gelificação para as gelatinas de peles, reticuladas quimicamente, ficou na gama de 16,5-18,0 °C e para as de ossos entre 6,9 e 8,2 °C. As mudanças de temperatura obtidas indicaram uma rápida transição na formação de zonas de junção na rede tridimensional com desenvolvimento subsequente da matriz forte do gel (SINTHUSAMRAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2014). Segundo Gómez-Guillén et al. (2011), o teor de prolina e hidroxiprolina é particularmente importante para o efeito gelificante. Contudo, embora a prolina seja importante, acredita-se que conteúdo de hidroxiprolina desempenhe um papel de estabilização da tripla hélice na cadeia do colágeno (LEDWARD, 1986). As temperaturas de gelificação encontrados para as gelatinas de pele de pescado modificadas foram inferiores à gelatina de bovino, e semelhantes aos analisados por Boran et al. (2010) quando analisou gelatinas de peles de carpa prata (18 °C).

5.3.3.1 Turbidez e atributos de cor das gelatinas

As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores dos parâmetros relacionados à cor e turbidez das gelatinas. A Tabela 8 mostra as gelatinas de peles de bovino, gelatinas de peles de tilápia e de carpa antes (controle) e após a modificação pela ação dos agentes de reticulação e, a Tabela 9, as gelatinas de ossos de tilápia e de carpa antes (controle) e após modificação com os agentes de reticulação.

Tabela 8- Turbidez (Turb), croma L*, ângulo Hue, diferença de cor (ΔE) para gelatinas de peles de bovino, gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa

		Turb (A_{600})*	L*	Hue ($^{\circ}$)*	ΔE*
Bovino		0,06 \pm 0,02 ^a	35,05 \pm 0,29 ^g	67,14 \pm 0,62 ^c	--
	Controle	0,05 \pm 0,01 ^a	57,83 \pm 0,52 ^b	85,16 \pm 0,29 ^b	--
Tilápia do Nilo	Na	0,08 \pm 0,03 ^a	59,10 \pm 0,45 ^a	86,05 \pm 0,41 ^a	1,30 \pm 0,05 ^e
	Mg	0,07 \pm 0,02 ^a	55,78 \pm 0,61 ^c	85,12 \pm 0,39 ^b	2,15 \pm 0,07 ^a
	AG	0,06 \pm 0,02 ^a	58,90 \pm 0,47 ^a	86,40 \pm 0,55 ^a	1,20 \pm 0,03 ^e
	AC	0,05 \pm 0,02 ^a	56,10 \pm 0,35 ^c	84,96 \pm 0,51 ^b	1,97 \pm 0,02 ^b
	Controle	0,07 \pm 0,02 ^a	50,80 \pm 0,31 ^f	84,43 \pm 0,48 ^b	--
Carpa comum	Na	0,09 \pm 0,03 ^a	51,90 \pm 0,45 ^d	85,24 \pm 0,37 ^b	1,13 \pm 0,02 ^g
	Mg	0,08 \pm 0,02 ^a	52,30 \pm 0,51 ^d	84,91 \pm 0,35 ^b	1,83 \pm 0,04 ^c
	AG	0,08 \pm 0,02 ^a	51,56 \pm 0,37 ^e	84,46 \pm 0,41 ^b	1,64 \pm 0,05 ^d
	AC	0,07 \pm 0,01 ^a	52,60 \pm 0,40 ^d	85,44 \pm 0,45 ^a	2,19 \pm 0,07 ^a

*Médias \pm desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabela 9- Turbidez (Turb), croma L*, ângulo Hue, diferença de cor (ΔE) para gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa

		Turb (A_{600})*	L*	Hue ($^{\circ}$)*	ΔE*
	Controle	0,21 \pm 0,04 ^b	45,15 \pm 0,41 ^c	86,90 \pm 0,51 ^a	--
	Na	0,29 \pm 0,04 ^a	47,24 \pm 0,36 ^b	87,18 \pm 0,40 ^a	2,09 \pm 0,06 ^d
Tilápia do Nilo	Mg	0,28 \pm 0,05 ^a	48,18 \pm 0,52 ^a	87,19 \pm 0,55 ^a	3,05 \pm 0,07 ^a
	AG	0,25 \pm 0,02 ^a	46,74 \pm 0,35 ^b	86,74 \pm 0,62 ^a	2,55 \pm 0,05 ^c
	AC	0,23 \pm 0,03 ^a	47,32 \pm 0,44 ^a	86,60 \pm 0,53 ^b	2,76 \pm 0,07 ^b
	Controle	0,24 \pm 0,04 ^a	39,56 \pm 0,55 ^f	87,77 \pm 0,49 ^a	--
Carpa comum	Na	0,31 \pm 0,06 ^a	41,67 \pm 0,43 ^{de}	87,78 \pm 0,55 ^a	2,18 \pm 0,05 ^d
	Mg	0,28 \pm 0,05 ^a	42,60 \pm 0,49 ^d	87,45 \pm 0,46 ^a	3,07 \pm 0,07 ^a
	AG	0,26 \pm 0,03 ^a	41,35 \pm 0,33 ^e	86,63 \pm 0,58 ^b	2,53 \pm 0,04 ^c
	AC	0,25 \pm 0,07 ^a	42,44 \pm 0,39 ^d	86,81 \pm 0,41 ^b	3,05 \pm 0,05 ^a

*Médias \pm desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Através da Tabelas 8, foi possível perceber que a presença dos agentes de reticulação não foi capaz de causar diferença significativa ($p > 0,05$) na turbidez das gelatinas de peles de tilápia e carpa. Porém na Tabela 9, para as gelatinas de ossos de ambos os pescados os eletrólitos utilizados foram os agentes que tiveram maior influência ao aumentar levemente a turbidez, enquanto que o efeito do aumento causado pelo ácido cítrico e ácido gálico foi menos pronunciado. No entanto comparando as Tabelas 8 e 9, foi possível constatar uma diferença

considerável na turbidez entre as gelatinas controle de peles e ossos, o que seguiu com as modificações. A agregação aleatória das moléculas de gelatina pode ter ocorrido, como evidenciado pelo aumento da turvação (KITTIHATTANABAWON et al. 2010).

A cor dos géis das soluções de gelatinas modificadas com agentes de reticulação foi expresso como L*, ângulo Hue e diferença de cor (Tabelas 8 e 9). A luminosidade das gelatinas aumentou ligeiramente quando tratadas com agentes de reticulação ($p \leq 0,05$). Um aumento na coordenada b* tendendo ao amarelo também foi observado para todas as gelatinas reticuladas. Ocorrência de reação não-enzimática durante a modificação com uso de temperatura (45 °C) pode ter contribuído para a maior tonalidade amarela. Ao comparar a cor da gelatina de pele bovina com as gelatinas de peles de pescados houve diferença na luminosidade, o qual demonstrou um gel mais escuro, e no ângulo Hue que resultou em 66° tendendo ao vermelho, enquanto que as gelatinas de pescado apresentaram ângulos característicos de 90°, tendendo ao amarelo. No entanto, o maior amarelamento foi observado em gelatina obtida de ossos. Devido a estrutura mais complexa dos ossos do que das peles, o processo de extração da gelatina foi mais drástico o que pode ocorrer a formação de componentes colorantes mediados por várias reações. O maior teor de lipídeos pode também ter influenciado na coloração amarela (KITTIHATTANABAWON et al., 2016).

A diferença total de cor (ΔE) entre as gelatinas reticuladas pode ocorrer devido a presença de pigmentos inerente à matéria-prima em solução. No entanto, a diferença de cor foi muito baixa (Tabelas 8 e 9), confirmando que as diferentes reticulações não alteram o ângulo Hue das gelatinas. Apesar de não alterar as propriedades funcionais das gelatinas, a cor é um importante atributo que deve ser considerado, dependendo da aplicação a qual se destina o produto final (AHMAD et al., 2011; JONGJAREONRAK et al., 2010).

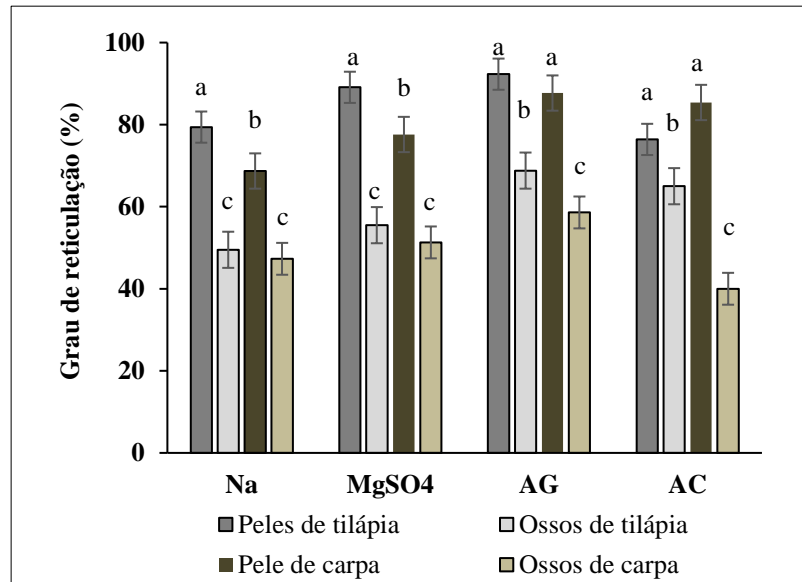
5.3.3.2 Grau de reticulação das gelatinas

A Figura 16 apresenta os valores de grau de reticulação para gelatina de peles e ossos de tilápia e de carpa.

Para determinar a eficiência da reação entre a gelatina e os agentes de reticulação, que é a quantidade de aminos livres não reagidas nas amostras quimicamente reticuladas, foram realizados ensaios com ninidrina medida por espectrometria (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013). Os resultados indicaram que a adição de AG e $MgSO_4$ foram suficientes para reticular aproximadamente 92% e 88% dos grupos amino das gelatinas de peles de tilápia e de carpa, respectivamente. Enquanto para gelatinas de ossos os mesmos agentes foram

capazes de reticular números inferiores, cerca de 69 e 58% para gelatinas de ossos de tilápia e carpa, respectivamente. A adição de NaCl apresentou menor grau de reticulação, cerca de 40% para a gelatina de ossos de carpa.

Figura 16- Grau de reticulação das gelatinas em função dos agentes químicos de reticulação



*Diferentes letras nas barras dentro do mesmo dos agentes químicos de reticulação indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão. Legenda: Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

Para baixos graus de reticulação se observou gelatinas com menor força de gel, sem interações entre as cadeias inter e intramoleculares. Resultados semelhantes foram encontrados por Bigi et al. (2001), quando estudaram gelatina reticulada com glutaraldeído e por GONÇALVES et al. (2017), quando analisaram quitosana reticulada com glutaraldeído.

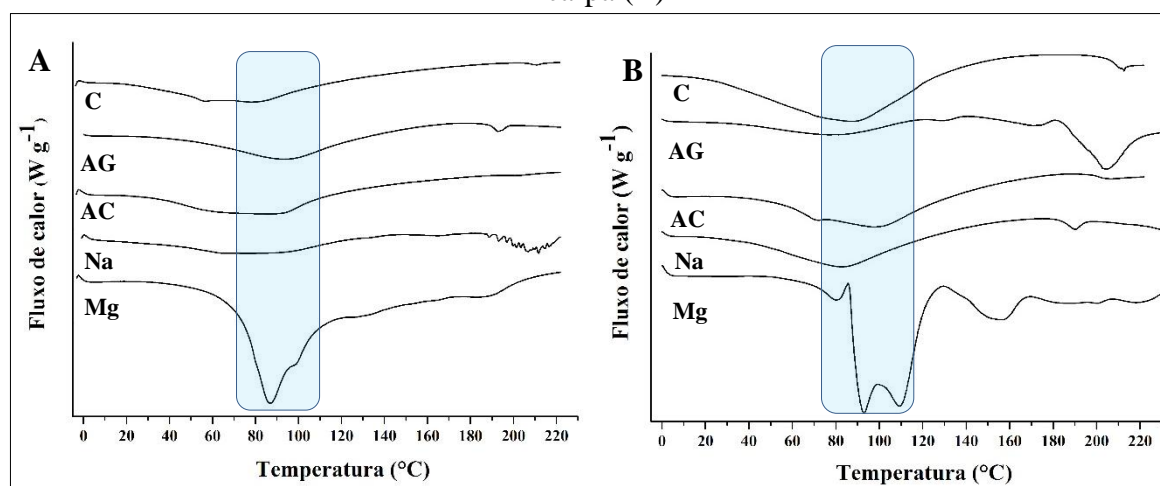
5.3.3.3 Análises térmicas das gelatinas reticuladas

Os picos endotérmicos para as gelatinas reticuladas são representados nos termogramas DSC na Figura 17, para gelatinas de peles de tilápia e de carpa.

Os termogramas mostram picos endotérmicos amplos, centrados em cerca de 88 °C para as gelatinas de tilápia e cerca de 92 °C para as gelatinas de tilápia. Este pico, que corresponde a temperatura de fusão (T_f), é usualmente utilizado para descrever a estabilidade térmica dos géis e é definido como a temperatura correspondente a ruptura de ligações intercadeias, resultando na fusão de cadeias peptídicas (FLORY; GARRETT, 1958). Pode ser observado na Figura 17 que as gelatinas reticuladas com ácido gálico e ácido cítrico tiveram um aumento de T_f em comparação com as gelatinas controle. Um aumento de T_f reflete um

aumento do número de junções de reticulação por molécula (YAN et al., 2011), sugerindo que as gelatinas tratadas com compostos não-eletrólitos melhoraram a rede de reticulação quando comparada com compostos eletrolíticos. Para as gelatinas de tilápia, T_f foi maior em todas as amostras reticuladas. Isto sugere que os agentes de reticulação estavam entrelaçados formando uma estrutura compacta densa com massa elevada, que requeria uma energia mais elevada para quebrar ligações intermoleculares. De acordo com Tongnuanchan et al. (2015), estas transições são influenciadas pela quantidade de água presente. A água em grandes quantidades pode provocar a fusão em várias fases, como aconteceu com as gelatinas tratadas com $MgSO_4$. As duas transições térmicas observadas próximas de T_f para gelatinas reticuladas com $MgSO_4$ podem ser atribuídas a diferentes componentes presentes na gelatina (TANG et al., 2007).

Figura 17- Termogramas de DSC para gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)



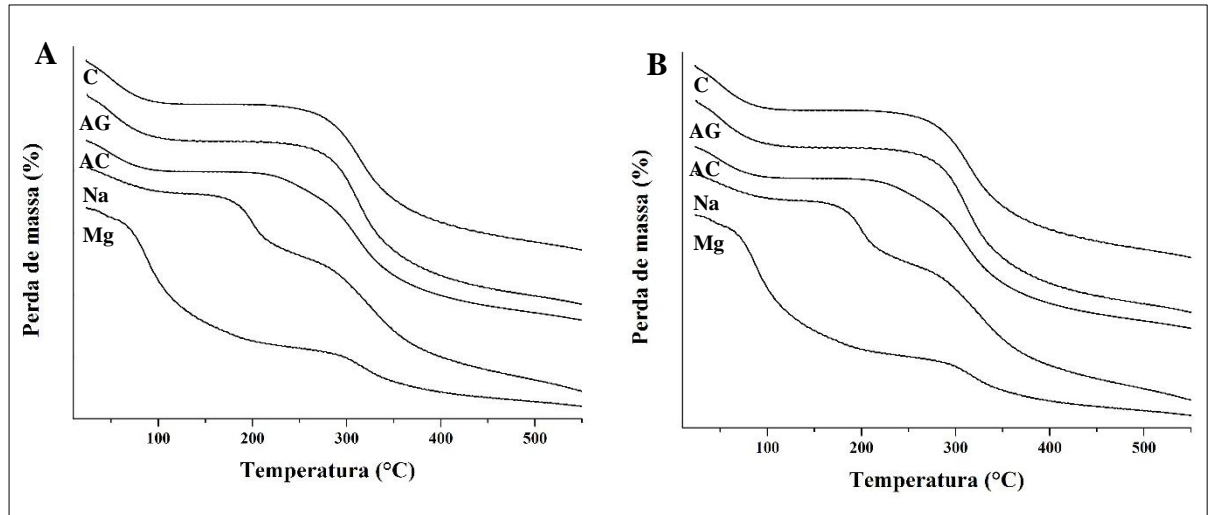
Legenda: C = gelatinas controle; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico; Na = NaCl; Mg = $MgSO_4$

O pico endotérmico que ocorre acima de T_f (mais nítido nas amostras de gelatinas de carpa) foi inicialmente discutido por Levine e Slade (1986), e representa uma transição térmica intramolecular de isomerização cis-trans em regiões de poliprolina no esqueleto das gelatinas, chamado T_i . Rahman et al. (2010) relataram os estados endotérmicos da gelatina bovina, onde a T_f foi identificada como a temperatura de desdobramento térmico da proteína e T_i foi descrito como a temperatura de fusão do sólido. A T_i para todas as gelatinas reticuladas foi ligeiramente inferior a controle.

As temperaturas de degradação térmica inicial (T_0) e degradação final (T_d) foram determinadas a partir da primeira derivada das curvas TGA mostradas na Figura 18 para gelatinas de peles de tilápia e de carpa. A perda de massa foi calculada pela diferença de massa

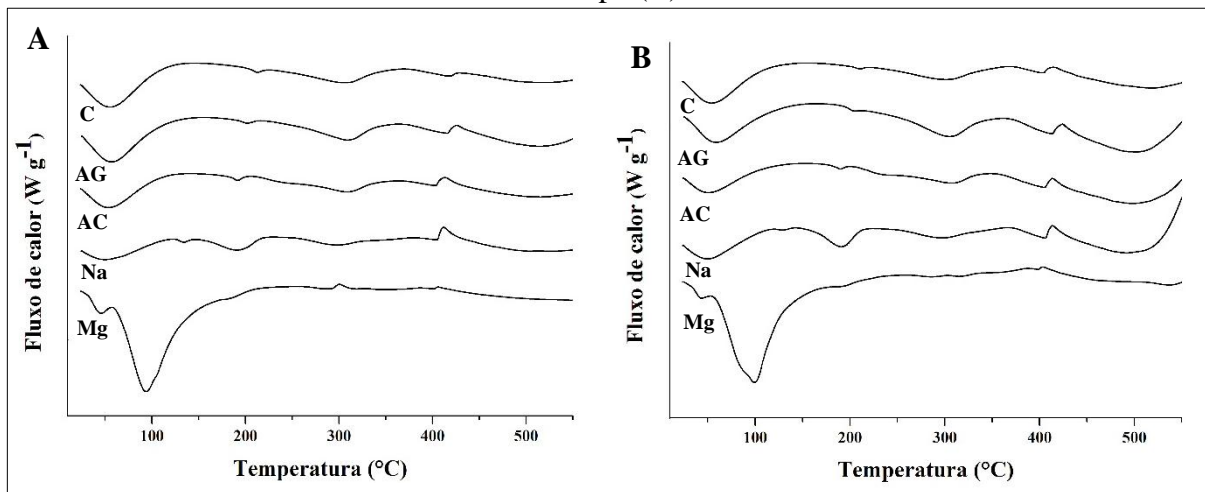
entre T_0 e T_d . As temperaturas de fusão foram determinadas a partir das curvas DTA como mostrado na Figuras 19 para gelatinas de tilápia e de carpa.

Figura 18-Termogramas de TGA para gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)



Legenda: C = gelatinas controle; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico; Na = NaCl; Mg = MgSO₄

Figura 19-Termogramas de DTA para gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)



Legenda: C = gelatinas controle; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico; Na = NaCl ; Mg = MgSO₄

A análise termogravimétrica das amostras de gelatinas reticuladas de peles de tilápia e de carpa (Figura 18) mostraram resultados muito semelhantes. As reticulações com ácido gálico e ácido cítrico mostraram uma temperatura de degradação inicial (T_0) próxima das gelatinas controle que variou entre 289,2 e 285,0 °C. No entanto, observou-se uma redução na

T_0 na gelatina reticulada com eletrólitos. As gelatinas reticuladas com $MgSO_4$ e $NaCl$ tiveram uma considerada redução na T_0 , cujos foram cerca de 98,1 e 199,3 °C, respectivamente.

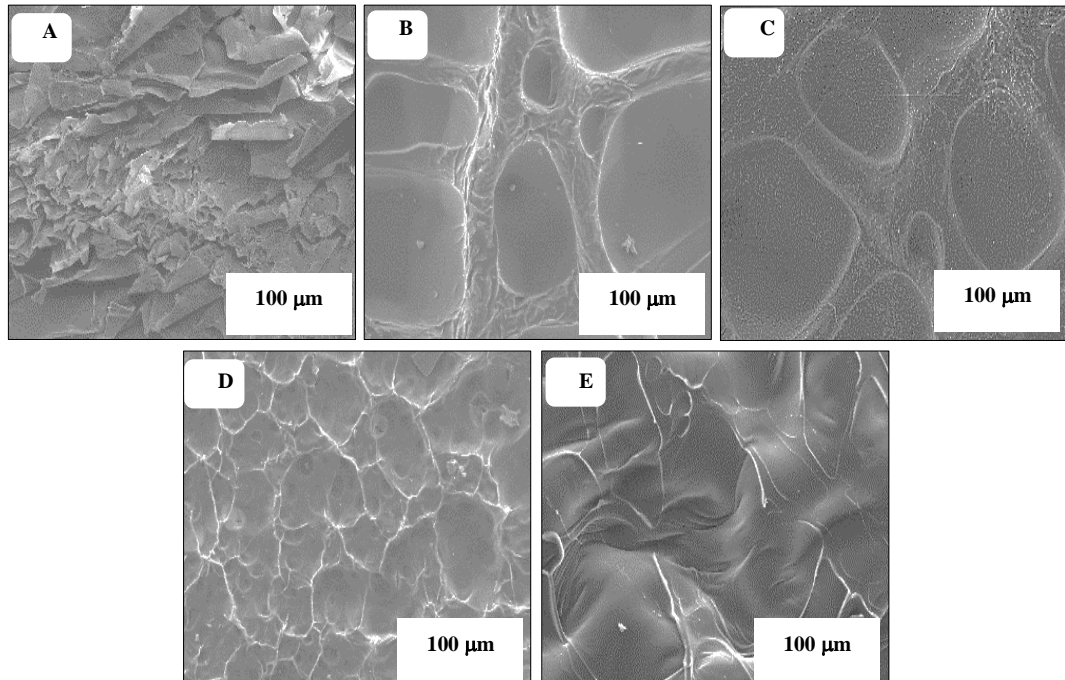
As curvas DTA (Figura 19) mostraram que o processo de perda de massa ocorreu em três principais picos. A primeira, com temperatura entre 50-60 ° C, houve uma perda de peso de cerca de 8 a 17%. Esta primeira fase é atribuída à perda de água residual presente nas amostras. A gelatina tem afinidade com a água e, dependendo de suas interações estruturais, podem ser estabelecidas diferentes relações entre a água e as cadeias de proteínas. Os picos seguintes, entre 200-400 ° C e 400-550 ° C, mostraram perdas de massa em torno de 30 a 42% e 60 a 71%, respectivamente. A gelatina reticulada com ácido gálico teve uma perda de massa menor, sugerindo uma maior estabilidade térmica. O segundo e o terceiro picos mais intensos podem ser devidos à quebra das cadeias protéicas e ruptura de ligações peptídicas (JALAJA et al., 2016).

5.3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das gelatinas reticuladas

As Figuras 20 e 21 mostram as imagens das superfícies de gelatinas de peles de tilápia e de carpa, respectivamente. Em geral, a disposição e associação de moléculas de proteína na matriz de gel contribuíram diretamente para a resistência do gel de gelatina (KITTIHATTANABAWON et al., 2010). As gelatinas controle mostraram uma estrutura de rede não uniforme na forma de flocos finos conforme mostra as Figuras 20 (A) e 21 (A).

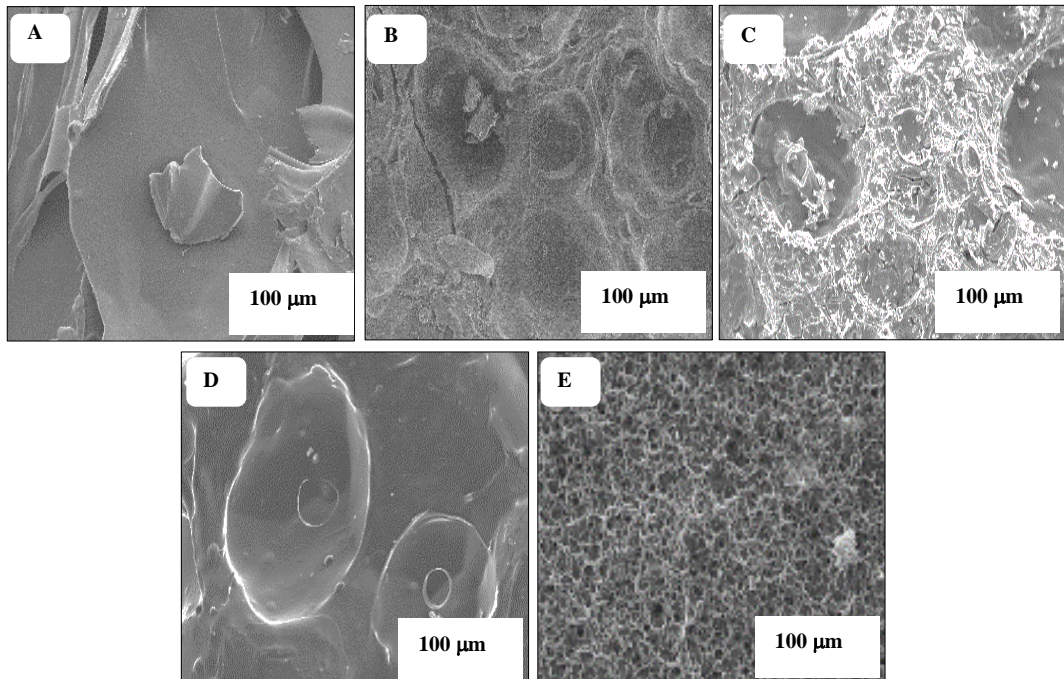
A reticulação com os agentes [Figuras 20(B-E) e 21(B-E)] mostrou amostras com estruturas maiores e formas mais regulares do que as amostras de gelatinas controle. As redes com as cadeias mais espessas estão relacionadas com o aumento da resistência do gel de gelatina. Para gelatinas reticuladas com $NaCl$ e $MgSO_4$ [Figuras 20(D), 20(E), 21(D) e 21(E)], verificou-se que as redes não eram homogêneas, como indicado pela presença de estruturas finas nas redes. Estas redes podem ser mais facilmente quebradas pela força aplicada, confirmando as menores resistências de gel determinadas previamente. Observou-se ainda que o aumento da dimensão dos poros dos géis reticulados foi atribuído ao efeito do aumento do grau de reticulação. Resultados semelhantes foram relatados por DASH et al. (2013) e YAN et al. (2011), onde a reticulação intermolecular levou a mais associações que produziram um maior número de pontos de junção afetando a estrutura, tamanho dos poros e distribuição.

Figura 20-Micrografias MEV para gelatinas de peles de tilápia



Legenda: Gelatina controle de tilápia (A), gelatina de tilápia reticulada com: ácido gálico (B), ácido cítrico (C), NaCl (D) e $MgSO_4$ (E)

Figura 21-Micrografias MEV para gelatinas de peles de carpa



Legenda: Gelatina controle de carpa (A), gelatina de carpa reticulada com: ácido gálico (B), ácido cítrico (C), NaCl (D) e $MgSO_4$ (E)

5.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE GELATINAS MODIFICADAS

5.4.1 Propriedades mecânicas e físicas dos filmes

A Tabela 10 mostra os valores de resistência à tração (RT), alongamento (A), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura para filmes de gelatina de peles de bovino, gelatinas de peles de tilápia e de carpa antes (controle) e após a modificação pela ação dos agentes de reticulação. Em seguida, a Tabela 11 apresenta os resultados das mesmas propriedades, porém, para gelatinas de ossos de tilápia e de carpa antes (controle) e após modificadas com os agentes de reticulação.

Tabela 10- Resistência à tração (RT), alongamento (A), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura dos filmes de gelatinas de peles de bovino e gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa

	RT (MPa)*	A (%)*	PVA (g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹) × 10 ⁻¹¹ *	Espessura (mm)*
Bovino	48,77 ± 0,43 ^a	3,96 ± 0,32 ^b	0,17 ± 0,02 ^f	0,058 ± 0,003 ^b
Gelatina controle	19,52 ± 0,43 ^s	9,45 ± 0,32 ^b	2,12 ± 0,04 ^c	0,052 ± 0,002 ^f
Na	23,63 ± 0,85 ^{de}	5,36 ± 0,53 ^e	2,10 ± 0,10 ^c	0,101 ± 0,003 ^b
Tilápia do Nilo				
Mg	24,72 ± 0,33 ^d	4,60 ± 0,43 ^e	2,19 ± 0,08 ^b	0,110 ± 0,004 ^a
AG	28,85 ± 0,74 ^b	3,62 ± 0,26 ^f	1,78 ± 0,02 ^d	0,063 ± 0,003 ^d
AC	26,35 ± 0,64 ^c	4,92 ± 0,44 ^e	1,32 ± 0,06 ^e	0,072 ± 0,003 ^c
Gelatina controle	17,73 ± 0,75 ^h	10,52 ± 0,53 ^a	2,70 ± 0,17 ^a	0,054 ± 0,002 ^f
Na	21,43 ± 0,52 ^f	7,21 ± 0,42 ^c	2,52 ± 0,08 ^a	0,095 ± 0,003 ^b
Carpa comum				
Mg	19,62 ± 0,45 ^s	8,55 ± 0,62 ^b	2,64 ± 0,18 ^a	0,113 ± 0,003 ^a
AG	25,42 ± 0,63 ^c	5,41 ± 0,30 ^e	2,17 ± 0,09 ^b	0,058 ± 0,002 ^d
AC	23,73 ± 0,55 ^e	6,32 ± 0,42 ^d	2,31 ± 0,08 ^b	0,067 ± 0,002 ^c

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobreescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Legenda: Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico e AG = ácido gálico.

Os valores de resistência à tração dos filmes de peles de gelatinas reticuladas com ácido gálico foram maiores tanto para gelatina de pele de tilápia quanto para gelatina de pele de carpa (Tabela 10). A ação deste agente reticulante nos filmes foi capaz de aumentar a resistência à tração cerca de 55%, comparado aos filmes controle. Resultados inferiores foram encontrados por Rouhi et al. (2013) quando estudaram o incremento de ZnO nos filmes de gelatina de pescado e similares aos de URANGA et al. (2016) quando analisaram filmes de

gelatina de peixe incorporados com ácido cítrico, cujos valores foram 21 MPa e em torno de 28 MPa, respectivamente. Para filmes de gelatina reticulada com eletrólitos foi observado um pequeno aumento quando comparado ao controle. O aumento da RT indicou que as novas interações induzidas pelas reações entre os agentes reticulados e a gelatina eram mais fortes do que as interações da gelatina pura. Os valores obtidos foram inferiores aos obtidos para gelatinas de pele bovina.

O alongamento foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) para os filmes de peles de carpa que os filmes de peles de tilápia (Tabela 10). Para todos os filmes de gelatinas reticuladas houve um aumento no alongamento, indicado pela maior flexibilidade e extensibilidade. O incremento de reticulantes entre as moléculas da matriz proteica resultou num aumento de interações intermoleculares, reduzindo o volume livre entre moléculas. Assim, a mobilidade da cadeia proteica e a flexibilidade da película foram diminuídas. Resultados semelhantes foram relatados na literatura para filmes de proteínas modificadas, onde a resistência mecânica da película foi aumentada pela diminuição da extensibilidade (ARFAT et al., 2017; BANDEIRA et al., 2015; ROUHI et al., 2013).

Em relação à permeabilidade ao vapor de água (PVA), os filmes de gelatina de peles de tilápia apresentaram melhores resultados, em geral, os valores mais baixos (Tabela 10). A PVA dos filmes de gelatina de pele de tilápia foi diminuída com a adição dos agentes não eletrolíticos para a reticulação e obtiveram-se resultados semelhantes para as películas de gelatina de pele de carpa. Isto sugere que, o volume livre da matriz de gelatina pode ser reduzido pela adição destes agentes na estrutura da proteína.

As espessuras das películas de controle de gelatinas de peles de carpa e peles de tilápia não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$), estando na faixa de 0,052 a 0,054 mm (Tabela 10). No entanto, as espessuras das películas reticuladas aumentaram quando os agentes químicos foram incorporados, em particular os eletrólitos. O espessamento ocorreu devido ao aumento do teor de sólidos nas películas reticuladas. Além disso, a incorporação dos produtos químicos pode afetar a estrutura ordenada das proteínas, produzindo assim uma rede grossa. Resultados semelhantes foram relatados por Arfat et al. (2017) para proteínas baseadas em filmes bionanocompósitos.

Na Tabela 11, quanto à tensão de ruptura e alongamento, os filmes obtidos de ossos mostraram-se menos resistentes e com menor flexibilidade que os filmes de peles ($p \leq 0,05$). A reticulação que mais favoreceu os filmes de ossos foi a tratada com ácido gálico. Não está claro como a diferença no conteúdo de cinzas entre gelatinas de peles e ossos pode ter impacto nas propriedades de formação do filme, mas os filmes de gelatina de ossos apresentam resistência

à tração consideravelmente mais baixa (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004). A integridade molecular das cadeias proteicas podem contribuir para a estrutura de rede dos filmes de gelatina. O processo mais severo para extração da gelatina de ossos de tilápia e de carpa poderia ter favorecido a formação de massa, reduzindo assim a ligação de hidrogénio durante a formação do filme (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2010).

Tabela 11- Resistência à tração (RT), alongamento (A), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura dos filmes gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa

	RT (MPa)*	A (%)*	PVA (g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹) × 10 ⁻¹¹ *	Espessura (mm)*
Gelatina controle	3,46 ± 0,22 ^d	2,37 ± 0,18 ^a	4,87 ± 0,23 ^b	0,052 ± 0,002 ^d
Tilápia do Nilo				
Na	3,58 ± 0,28 ^d	2,06 ± 0,09 ^b	3,72 ± 0,14 ^d	0,098 ± 0,004 ^b
Mg	4,92 ± 0,32 ^c	2,15 ± 0,12 ^a	3,81 ± 0,10 ^d	0,101 ± 0,004 ^b
AG	7,55 ± 0,45 ^a	2,02 ± 0,17 ^a	4,53 ± 0,18 ^b	0,052 ± 0,002 ^d
AC	6,44 ± 0,24 ^b	2,11 ± 0,20 ^a	4,31 ± 0,22 ^c	0,061 ± 0,003 ^c
Gelatina controle	2,32 ± 0,25 ^e	2,18 ± 0,13 ^a	5,77 ± 0,26 ^a	0,054 ± 0,001 ^d
Carpa comum				
Na	2,43 ± 0,20 ^e	2,11 ± 0,42 ^a	4,40 ± 0,17 ^{bc}	0,093 ± 0,004 ^b
Mg	4,52 ± 0,35 ^c	2,09 ± 0,62 ^a	4,49 ± 0,21 ^b	0,112 ± 0,002 ^a
AG	6,78 ± 0,38 ^b	2,05 ± 0,30 ^a	5,50 ± 0,23 ^a	0,059 ± 0,003 ^c
AC	5,91 ± 0,29 ^b	2,21 ± 0,42 ^a	5,63 ± 0,19 ^a	0,057 ± 0,002 ^c

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Legenda: Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico e AG = ácido gálico.

Os filmes de gelatina de pele apresentaram menor permeabilidade ao vapor de água do que filmes de gelatina de ossos ($p \leq 0,05$) (Tabelas 10 e 11) devido ao maior teor de prolina e hidroxiprolina. A composição de aminoácidos também pode influenciar as propriedades físicas e estruturais da gelatina e desempenham um papel chave nas propriedades físicas dos filmes (CHIOU et al., 2008; KARIM; BHAT, 2009). Resultados semelhantes foram encontrado no estudo de Bodini et al. (2013), quando analisou filmes reticulados com própolis. Em relação à espessura, os filmes de ossos seguiram o mesmo comportamento dos filmes de peles, em que o incremento dos agentes reticulantes aumentou ($p \leq 0,05$) a espessura dos filmes. Para os diferentes pescados, em relação às propriedades mecânicas e físicas, os filmes de peles de e ossos de tilápia apresentaram maior resistência e menor permeabilidade ao vapor de água

quando comparados aos de carpa. A Figura 22 ilustra os filmes obtidos e mostra a preparação para algumas análises.

Figura 22- Ilustração dos filmes de gelatina obtidos



5.4.2 Atributos de cor, transmitância UV e a luz visível dos filmes

Os valores de cor instrumental dos filmes de gelatina reticulada de peles de ambos os pescados são mostrados na Tabela 12. A incorporação de reticuladores mostrou uma influência significativa nos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) ($p \leq 0,05$). O valor de luminosidade (L^*) diminuiu com a adição de agentes químicos ($p \leq 0,05$). Os valores de ângulo de Hue mostraram resultados típicos de filmes de pescado, com um intervalo de 71,2 a 78,2°, que representam uma tonalidade amarelada. Para os quatro filmes de gelatina reticulada, os parâmetros ΔL^* e Δa^* foram menores quando comparados com o parâmetro Δb^* . Os valores da diferença de cor total (ΔE^*) está associado ao valor do parâmetro Δb^* e isto corrobora com os valores de Hue. Os valores mais baixos de diferença de cor total foram para películas de gelatina com agentes reticulados não-eletrolíticos (AC e AG).

A transmitância UV e a luz visível para as amostras são apresentadas na Tabela 12. As películas de controle de carpa e tilápia eram transparentes com elevado valor de transmitância a 600 nm (78,87% e 86,36% respectivamente), e possuíam boa propriedade de barreira UV mostrando baixo valor de transmitância em 200 nm. Os filmes a base de proteínas têm geralmente excelentes propriedades de barreira aos UV, devido a presença de elevado teor de aminoácidos aromáticos que podem absorver a luz UV (ARFAT et al., 2017). Nos filmes reticulados foi observado diminuição da transmissão da luz em todos os comprimentos de onda. Estes resultados indicam que o produto químico reticulado nos filmes de gelatina proporcionou papel importante no bloqueio da luz UV. A diminuição da transmitância da luz pode ser causada pela opacidade da película, impedindo a passagem da luz, ou pela dispersão da luz na matriz da película. Nagarajan et al. (2014) encontraram resultados semelhantes para filmes de gelatina incorporados com nano-argilas hidrofílicas e hidrofóbicas.

Tabela 12- Parâmetros de cor (ângulo Hue (H°) e diferença total de cor (ΔE^*)), transmitância UV e luz visível dos filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia e carpa.

Amostras de filmes		Parâmetros de cor				
		L*	a*	b*	H°	ΔE^*
Tilápia	Controle	95,2 ± 0,6 ^b	-1,01 ± 0,06 ^f	3,73 ± 0,23 ^h	74,84 ± 0,5 ^{cd}	-
	Na	93,2 ± 0,5 ^d	-2,03 ± 0,08 ^e	7,80 ± 0,45 ^b	75,41 ± 0,5 ^b	4,07 ± 0,32 ^b
	Mg	91,4 ± 0,2 ^f	-2,29 ± 0,06 ^b	8,71 ± 0,39 ^a	75,27 ± 0,5 ^b	6,39 ± 0,70 ^a
	AG	94,3 ± 0,3 ^c	-1,81 ± 0,03 ^d	6,25 ± 0,20 ^c	73,85 ± 0,3 ^e	2,79 ± 0,13 ^c
	AC	94,1 ± 0,4 ^c	-1,05 ± 0,07 ^f	4,17 ± 0,14 ^f	75,86 ± 0,2 ^b	1,21 ± 0,15 ^d
Carpa	Controle	97,2 ± 0,6 ^a	-1,28 ± 0,05 ^e	4,05 ± 0,13 ^g	72,46 ± 0,4 ^f	-
	Na	96,2 ± 0,3 ^b	-1,80 ± 0,07 ^d	8,63 ± 0,33 ^a	78,22 ± 0,4 ^a	4,72 ± 0,66 ^b
	Mg	92,6 ± 0,6 ^e	-2,75 ± 0,08 ^a	8,79 ± 0,39 ^a	72,63 ± 0,6 ^f	6,77 ± 0,83 ^a
	AG	94,8 ± 0,4 ^c	-1,88 ± 0,04 ^c	5,51 ± 0,28 ^d	71,16 ± 0,3 ^g	2,88 ± 0,27 ^c
	AC	94,3 ± 0,4 ^c	-1,29 ± 0,02 ^e	4,52 ± 0,18 ^d	74,07 ± 0,4 ^d	1,08 ± 0,11 ^d

Amostras de filmes	Transmitância UV (%)								Valor de transparência	
	200 nm	280 nm	350 nm	400 nm	500 nm	600 nm	700 nm	800 nm		
Tilápia	Controle	1,36±0,32	55,76±0,91	61,20±1,14	64,19±0,95	76,60±0,67	78,87±1,03	89,08±0,98	91,77±1,31	1,98±0,29 ^d
	Na	1,05±0,43	35,76±0,64	51,20±0,91	61,18±1,05	66,60±0,94	68,17±1,14	79,08±1,13	79,77±0,89	1,65±0,11 ^e
	Mg	0,00±0,00	0,13±0,02	1,09±0,26	3,15±0,27	9,66±0,37	17,42±0,57	25,06±0,66	32,43±0,67	6,90±0,82 ^b
	AG	0,35±0,27	24,76±0,73	53,20±1,05	58,18±1,18	63,61±1,03	66,37±0,32	71,05±1,23	84,56±1,10	2,82±0,23 ^c
	AC	0,67±0,31	35,47±0,88	55,19±1,17	54,69±0,93	64,80±0,95	60,17±0,94	75,08±0,88	89,77±1,03	3,06±0,21 ^c
Carpa	Controle	1,68±0,28	21,11±0,64	64,41±0,78	70,95±0,85	78,16±1,12	86,36±1,11	85,11±1,09	86,89±0,86	1,18±0,14 ^f
	Na	1,18±0,45	16,80±0,55	41,23±0,54	45,78±0,77	50,24±0,47	53,90±0,76	57,58±0,83	59,77±0,78	2,82±0,52 ^c
	Mg	0,00±0,00	0,25±0,07	0,60±0,15	7,30±0,33	9,70±0,24	11,40±0,28	13,50±0,37	15,34±0,25	8,34±0,91 ^a
	AG	0,00±0,00	0,00±0,00	36,03±1,21	39,49±1,31	64,11±1,12	76,22±0,91	81,17±1,11	79,54±0,91	2,03±0,17 ^d
	AC	0,40±0,18	19,08±0,78	25,31±0,93	30,62±1,15	62,60±0,85	76,50±1,23	77,78±1,34	81,32±1,27	1,73±0,18 ^e

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

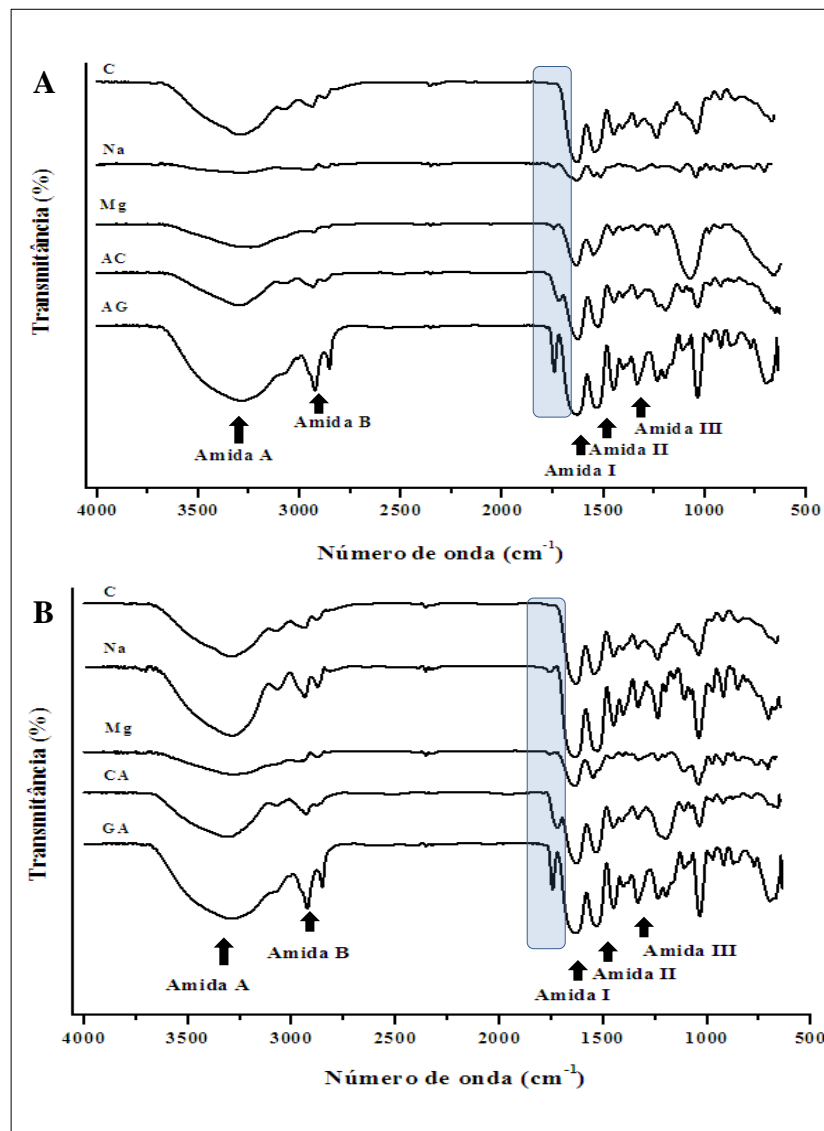
Legenda: Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico e AG = ácido gálico

Os resultados indicaram que os filmes de gelatina reticulada são capazes de impedir a transmissão de luz através da película. Os filmes reticulados com Mg mostraram os maiores valores de transparência em comparação com outros agentes ($p \leq 0,05$). Um valor de transparência mais elevado indica que o filme era menos transparente e, em geral, filmes com menor transparência apresentaram espessura mais elevada.

5.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) dos filmes

A Figura 23 ilustra os espectros de FT-IR obtidos na avaliação dos filmes de gelatinas modificadas de peles de tilápia e de carpa.

Figura 23-Espectros de FT-IR dos filmes de gelatinas puras e reticuladas de peles: (A) filmes de tilápia do Nilo e (B) filmes de carpa comum



Legenda: C = gelatinas controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

A análise FT-IR de filmes de gelatina foi realizada para caracterizar as alterações induzidas pela incorporação de reticuladores, a fim de distinguir as alterações vibracionais relacionadas às interações químicas na matriz para filme de gelatina de peles de tilápia (Figura 23 (A)) e para filme de gelatina de carpa (Figura 23 (B)). Os espectros de todos os filmes mostraram similaridade de bandas características ao redor de 1630 cm^{-1} (amida-I, alongamento C = O / ligação de hidrogênio com COO), 1545 cm^{-1} (amida II que dobra N-H e alongamento C-N) e 1235 cm^{-1} (vibração de estiramento de amida III, C-N e C-H e CH₂ de grupo glicina) (ARFAT et al., 2016; HE et al., 2015; HOSSEINI; JAVIDI; REZAEI, 2016;).

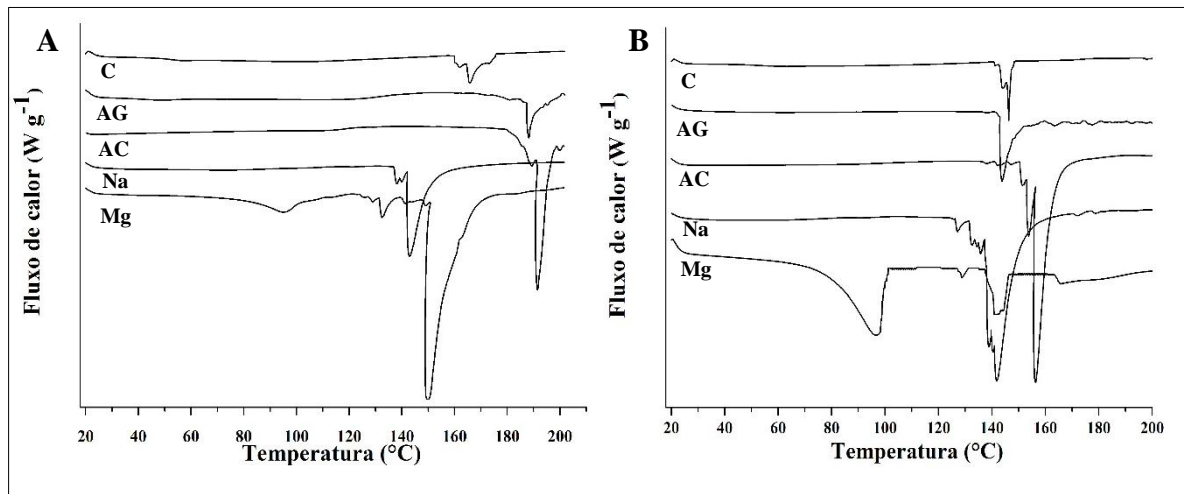
A banda que se refere à amida-A em filmes de gelatinas foi observada em torno de 3275 cm^{-1} , representando o alongamento N-H juntamente com ligações de hidrogênio. As bandas formadas pela amida-B observadas em torno de 2940 cm^{-1} , representam o alongamento das ligações C-H (BANDEIRA et al., 2015; SOW; YANG, 2015;). A reticulação entre os grupos reativos dos agentes químicos ocorre entre os grupos amino livres de glicina, prolina e hidroxiprolina presentes na gelatina. Para filmes de gelatina reticulada foram observados picos nas bandas entre 1745 e 1755 cm^{-1} , destacados na Figura 23, que podem ser causados por uma combinação de deformações nos grupos NH_3^+ apresentados como aminoácidos livres.

5.4.4. Análises térmicas dos filmes

Os picos endotérmicos para os filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia e de peles de carpa são representados nos termogramas DSC na Figura 24.

Os eventos endotérmicos observados nos termogramas da Figura 24 são devidos à fusão de resíduos de cristais na matriz de polímeros. Podem ser considerados como resíduos, porque eles apareceram a temperaturas superiores a $90\text{ }^\circ\text{C}$ (ALVES et al., 2011). As temperaturas de fusão (T_f) foram fortemente dependentes do grau de ligação cruzada da estrutura dos polímeros. Os resultados mostraram temperaturas de fusão diferentes nas gelatinas reticuladas, em comparação com as gelatinas controles, $158\text{ }^\circ\text{C}$ e $149\text{ }^\circ\text{C}$ para os filmes de peles de tilápia e de carpa, respectivamente. Os resultados sugerem que os eletrólitos aumentaram a mobilidade molecular da gelatina, como evidenciado pela diminuição de T_f . Por outro lado, a gelatina reticulada com compostos orgânicos não eletrólitos levou a um aumento da T_f .

Figura 24 -Termogramas DSC de filmes de gelatina puras e reticuladas de peles: (A) filmes de tilápia do Nilo e (B) filmes carpa comum

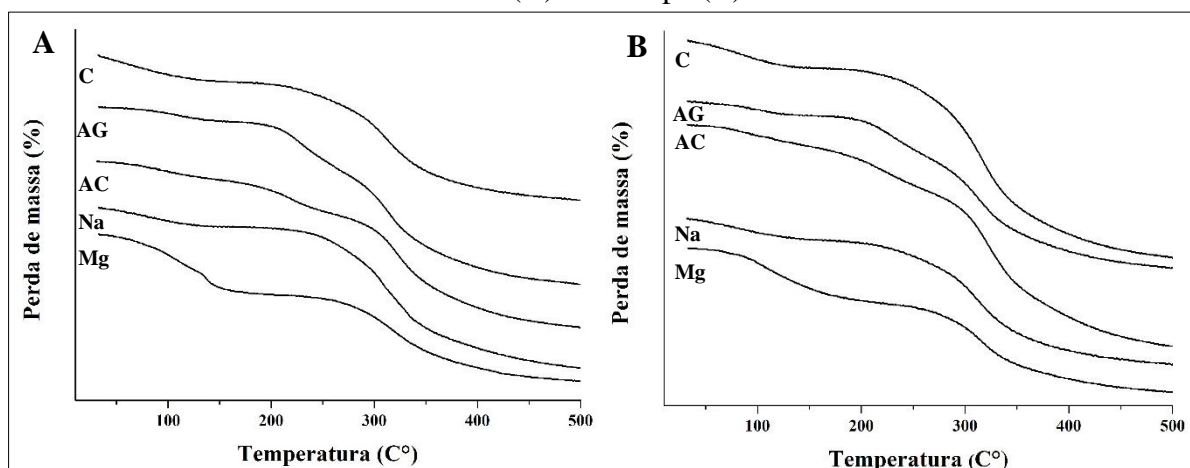


Legenda: C = gelatinas controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

O ácido gálico e o ácido cítrico dentro da matriz de gelatina podem aumentar a forte interação através de ligações de aminas livres, contribuindo para elevar a rigidez da matriz de película de gelatina. Os resultados dos termogramas da Figura 24 estão de acordo com os resultados das propriedades mecânicas, onde os agentes não eletrolíticos promoveram um aumento da rigidez, analisados neste estudo.

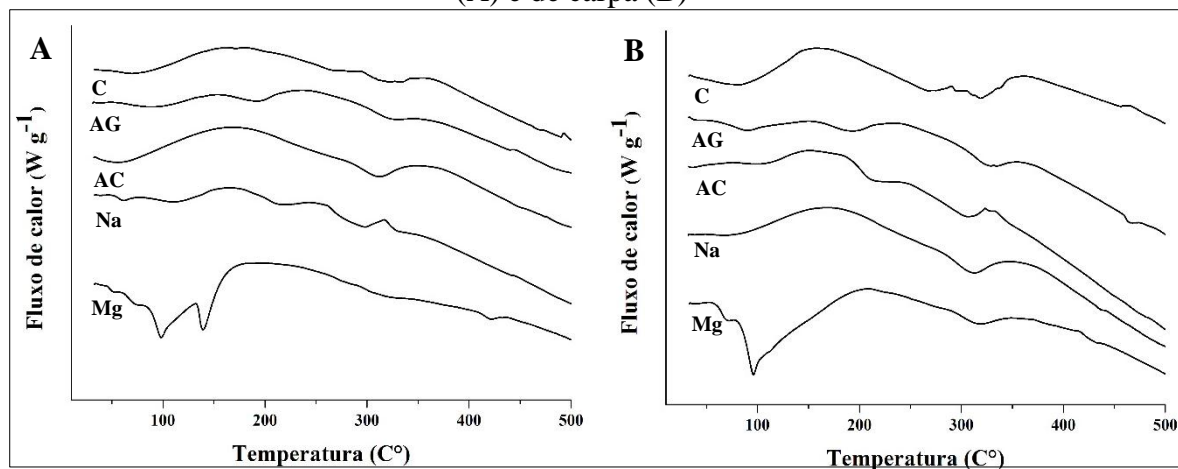
Os termogramas TGA e as curvas de DTG dos filmes de gelatinas reticuladas são ilustrados na Figura 25 e 26, respectivamente, para filmes de gelatinas de peles de tilápia e de carpa.

Figura 25- Termogramas de TGA para filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)



Legenda: C = gelatinas controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

Figura 26- Termogramas de DTA para filmes de gelatinas reticuladas de peles de tilápia (A) e de carpa (B)



Legenda: C = gelatinas controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

Nas Figuras 25 e 26 foram observadas as fases de perda de massa em três picos principais para todos os filmes. A perda de massa no primeiro estágio, denominada temperatura de início (T_0), para as gelatinas controle de peles de tilápia e de carpa foi observada a 91,0 e 92,8 °C, respectivamente; a qual está associada principalmente as perdas de água livre e água ligada adsorvidas no filme (ARFAT et al., 2014a; HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011). Contudo, para filmes reticulados com Mg as temperaturas observadas foram menores, sendo para as gelatinas de peles de tilápia e de carpa, respectivamente, de 75,3 °C e 73,1 °C. A maior T_0 foi da gelatina de peles de carpa reticulada com AG (96,2 °C), atribuído a mais baixa dessorção de água na matriz do filme.

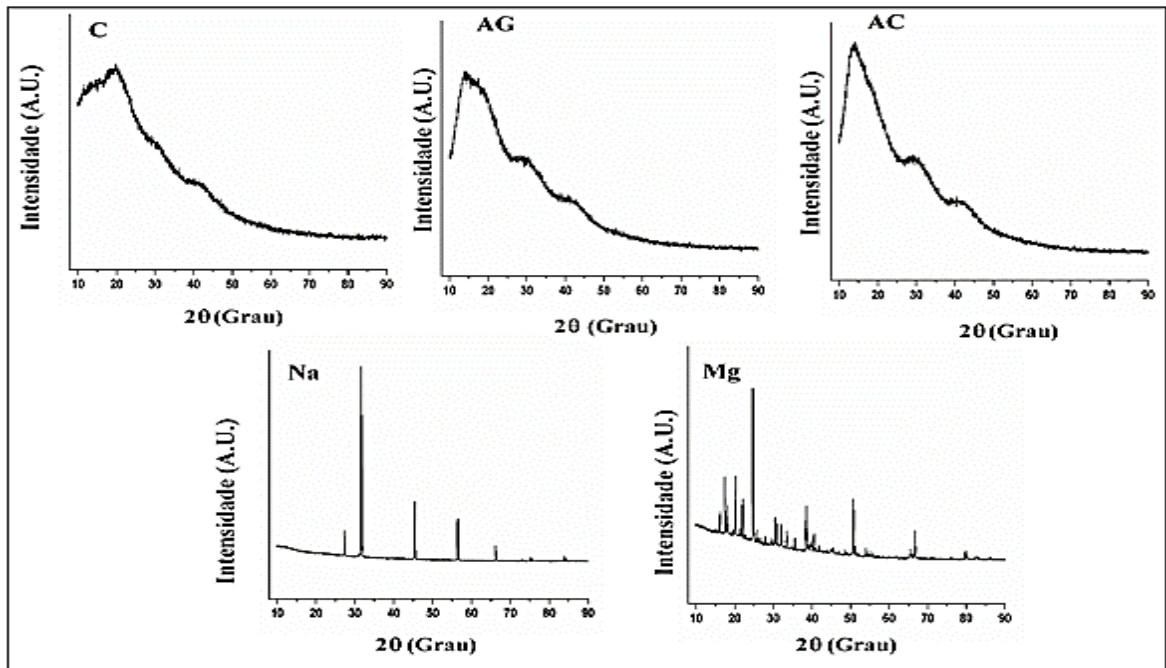
A segunda etapa de perda de massa, denominada temperatura de degradação térmica (T_d), apareceu em 201,6 °C para gelatina controle de peles de tilápia e 261,7 °C para gelatina controle de peles de carpa. Esta transição revelou a degradação ou decomposição de frações de proteína de baixa massa molar e compostos de glicerol na matriz de filme de gelatina (AHMAD et al., 2012). A terceira etapa da perda de massa foi observada para ambos os filmes, mas variou com as amostras de filmes reticulados. As amostras de filmes reticulados com AG apresentaram temperaturas maiores para perda de massa, em especial para o filme de gelatina de peles de carpa, cujo valor foi de 334,2 °C. Isto foi possivelmente causado pela perda ou decomposição de partículas de maior tamanho ou proteínas e componentes estáveis à alta temperatura na matriz do filme. Os resultados sugeriram que a reticulação com compostos orgânicos melhorou a estabilidade térmica dos filmes em comparação com filmes controle. Os compostos químicos poderiam atuar como isolador ou barreira de transporte de massa para

produtos voláteis gerados durante a decomposição. Isso resultou em atraso da degradação e melhor estabilidade térmica dos filmes.

5.4.5 Análise de difração de raio-X dos filmes

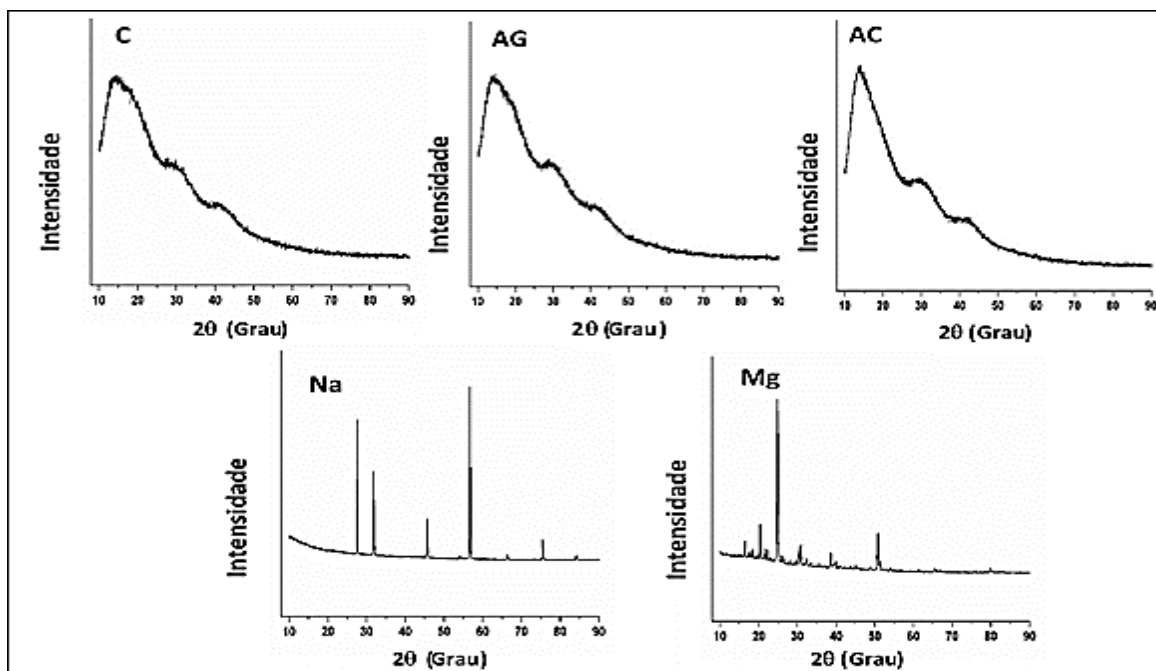
As Figuras 27 e 28 ilustram os difratogramas dos filmes de gelatina modificada de peles de tilápia e de carpa, respectivamente. A dispersão dos agentes reticulados nos filmes de gelatina foi realizada utilizando XRD. Através das figuras foi possível observar que para as gelatinas reticuladas com ácido gálico e ácido cítrico, os filmes permaneceram amorfos, semelhantes às películas de gelatina controle. Estes mostraram uma baixa cristalinidade, com picos de difração principais em torno de $2\theta = 15$ atribuídos à estrutura cristalina tripla helicoidal do colágeno desnaturado durante a extração da gelatina. O pico em torno de $2\theta = 25,5$ pode ser atribuído a proteína de halo amorfo (BENBETTAIEB et al., 2016; BIGI et al., 2001). A posição e a intensidade dos picos de difração sofreram mudanças pouco perceptível após a reticulação com os agentes não-eletrólitos. Estes resultados sugerem que a estrutura foi alterada apenas na fase amorfa da matriz de gelatina.

Figura 27- Padrões de difração de raios-X de filmes de gelatinas pura e reticuladas de peles de tilápia do Nilo



Legenda: C = gelatina controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

Figura 28- Padrões de difração de raios-X de filmes de gelatina pura e reticuladas de peles de carpa comum



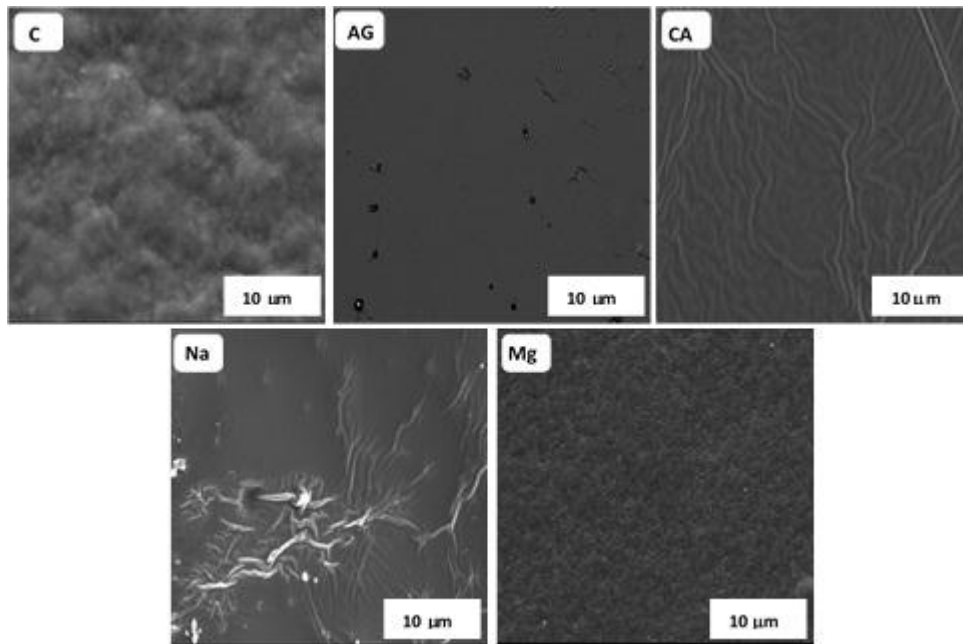
Legenda: C = gelatina controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

Por outro lado, observou-se uma mudança estrutural de amorfo para semicristalino para filmes de gelatina reticulados com eletrólitos. A reticulação com NaCl e MgSO₄ parece modificar a conformação das cadeias proteicas, proporcionando uma estrutura mais ordenada. Os difratogramas para esses filmes mostraram um pico acentuado localizado em torno de $2\theta = 26,5$, indicando uma estrutura de película de gelatina parcialmente cristalina (ARFAT et al., 2017; TONGDEESOONTORN et al., 2012).

5.4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes

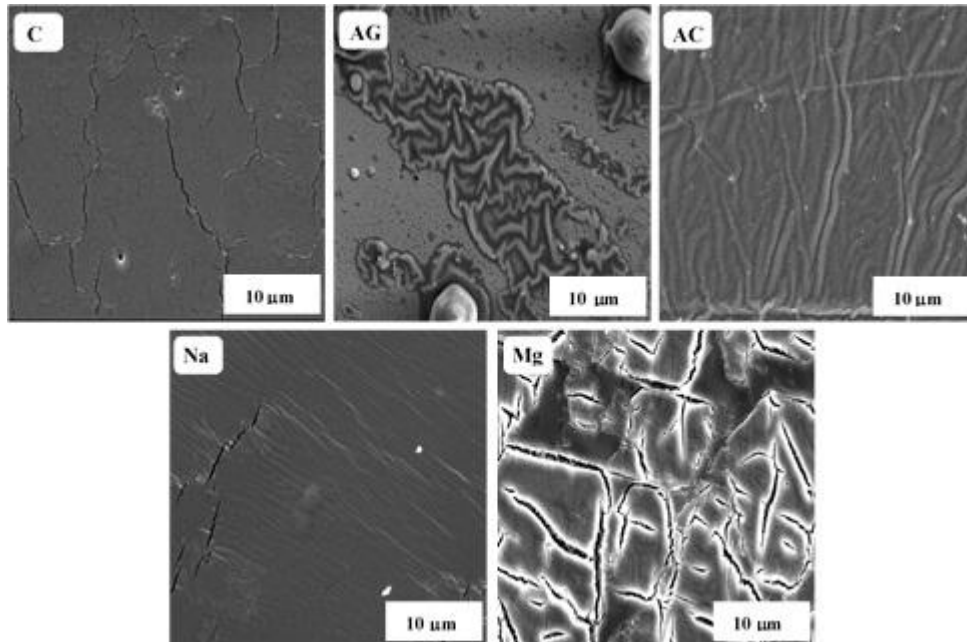
As Figuras 29 e 30 mostram imagens de MEV dos filmes de gelatina modificada de peles de tilápia e de carpa, respectivamente. O filme de gelatina pura de peles de tilápia mostrou uma distribuição homogênea e compacta em sua superfície, enquanto no filme de gelatina pura de peles de carpa podem ser observadas pequenas fissuras. Este resultado confirma a maior permeabilidade do filme de carpa comparado com o filme de tilápia (Tabela 10).

Figura 29- Micrografias MEV de filmes de gelatina pura e reticuladas de peles de tilápia do Nilo



Legenda: C = gelatina controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

Figura 30- Micrografias MEV de filmes de gelatina pura e reticuladas de peles de carpa comum



Legenda: C = gelatina controle; Na = NaCl; Mg = MgSO₄; AC = ácido cítrico; AG = ácido gálico

A adição de NaCl e MgSO₄ na matriz proteica manteve uma distribuição homogênea para os filmes de tilápia, bem como uma estrutura frangível para as películas de carpa. No entanto, filmes reticulados com ácido gálico e ácido cítrico, mostraram uma rede de microestrutura formando uma rede de fios torcidos. Esta formação de correntes também foi observada no estudo de Jiang et al. (2010). Esses autores relataram que estas cadeias eram compostas de β -folhas de moléculas de proteína. As redes com fios mais espessos e superfícies compactas e lisas estão relacionadas com o aumento da força de gel na gelatina e, conseqüentemente, aumentam as propriedades mecânicas e melhoram a permeabilidade ao vapor de água nos filmes.

6. CONCLUSÕES

As gelatinas de pescados obtidas no estudo apresentaram boa qualidade, com características inferiores às da gelatina bovina, porém este fato já era esperado devido à diferenças das fontes de obtenção e no processo de extração. As gelatinas de peles e ossos de tilápia apresentaram melhores propriedades reológicas que as gelatinas de peles e ossos de carpa. O maior conteúdo de aminoácido hidroxiprolina favoreceu os maiores valores das propriedades de gel das gelatinas de peles em relação as gelatinas de ossos de pescados.

Quanto a modificação das gelatinas, o ácido gálico (AG) melhorou as propriedades do gel sem alterar significativamente a cor do produto final, enquanto que o ácido cítrico (AC) contemplou parcialmente os objetivos. As gelatinas de peles de tilápia modificadas com AG apresentaram força de gel, ponto de fusão, temperatura de gelificação e viscosidade superiores as gelatinas puras (controle), gelatinas modificadas de carpa (peles e ossos), e valores compatíveis com os da gelatina de peles de bovino.

Os filmes produzidos à base de gelatina puras de peles e ossos de tilápia e de carpa apresentaram valores adequados de tensão de ruptura (TR), alongamento (A) e permeabilidade ao vapor de água (PVA). No entanto, para os filmes de gelatinas reticuladas foram encontrados valores maiores para TR e menores para PVA. Os filmes reticulados com AG aumentaram a TR cerca de 48% para gelatinas de peles de tilápia e 43% para as de carpa. A menor PVA foi encontrada nos filmes reticulados com AC, uma diminuição em torno de 38% para gelatinas de peles de tilápia e 19% para as de carpa. Para as gelatinas de ossos, a reticulação com AG surtiu maior efeito na TR, onde foram encontrados aumentos de 118% para gelatina de tilápia e 192% para gelatinas de carpa.

A adição de agentes reticulantes na matriz de gelatina de pescado melhorou as principais propriedades reológicas dos géis, e foram diretamente proporcionais nas melhorias funcionais do filme biopolimérico produzido a partir de peles e ossos de tilápia e de carpa. Os resultados revelaram que a incorporação de agentes não eletrolíticos em filmes de gelatina de tilápia, especialmente AG, influencia significativamente as propriedades mecânicas. Portanto, é possível utilizar os resíduos de pescado para produzir produtos com alto valor agregado, como, por exemplo, filmes de biopolímeros reticulados, sendo uma alternativa para a substituição de materiais sintéticos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar dos grandes avanços que tem se conseguido, na tentativa de produzir gelatinas com características próximas às gelatinas de mamíferos, ainda se faz necessário estudo mais aprofundado, no que diz respeito à modificação da estrutura da molécula e das possíveis interações com agentes de reticulação. Com base nos conhecimentos adquiridos, segue a lista de sugestões para futuras pesquisas:

- Modificar gelatinas de pescados através do uso de métodos que não necessite temperatura elevada, como métodos físico-químicos (Radiação UV);
- Analisar o efeito de reticulação na matriz de gelatina com ácidos dicarboxílicos;
- No processo de obtenção dos filmes reticulados deve ser investigado o tempo de solubilização da gelatina e homogeneização da solução filmogênica, para verificar sua influência na presença de partículas nos filmes;
- Estudar a purificação da gelatina de pescados utilizando coluna de troca iônica para remoção de partículas coloidais não-filtráveis;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMALEK, B. E.; GOMÉZ-ESTACA, J.; MARTINEZ-ALVAREZ, A. S. O.; GOMÉZ-GUILLEN, M. C.; CHAABOUNI-ELLOUZ, S.; AYADI, M. A.; BOUGATEF, A. Characteristics and functional properties of gelatin extracted from squid (*Loligo vulgaris*) skin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 924-931, 2016.
- AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Improvement of foaming properties of cuttlefish skin gelatin by modification with N-hydroxysuccinimide esters of fatty acid. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1277-1284, 2011.
- AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; OVISSIPOUR, M.; PRODPRAN, T. Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. **Food Chemistry**, v. 27, p. 508-515, 2011.
- ALFARO, A. T.; FONSECA, G. G.; BALBINOT, E.; MACHADO, A.; PRENTICE, C. Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. **Food Science and Technology**, v.33(3), p. 592-595, 2013b.
- ALFARO, A. T.; FONSECA, G. G.; PRENTICE-HÉRNANDEZ, C. Enhancement of functional properties of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin at different pH values. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2118-2127, 2013a.
- ALVES, P. M. A.; CARVALHO, R. A.; MORAES, I. C. F.; LUCIANO, C. G.; BITTANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A. Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, v.25, n. 7, p. 1751-1757, 2011.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS -ASTM. **Standard methods of water vapor transmission of materials**. Método: E00996-00, Philadelphia, p.907-914, 2000b
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS-ASTM. **Standard terminology relating to plastics**. Método- D 883, Philadelphia, 1999.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS-ASTM. **Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting**. Método: D00882-00, Philadelphia, p.160-168, 2000a.
- AMIRKOLAIE, A. K. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, p. 19-26, 2011.
- ARFAT, A. Y.; AHMED, J.; HIREMATH, N.; AURAS, R.; JOSEPH, A. Properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 191-202, 2017.
- ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; OSAKO, K. Development and characterization of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 58-67, 2014a.

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SUMPAVAPOL, P.; SONGTIPYA, P. Physico-mechanical characterization and antimicrobial properties of fish protein isolate/fish skin gelatin-zinc oxide (ZnO) nanocomposite films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 101-112, 2016.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG, A. Extraction of muscle proteins and gelatin from cod head. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 697-700, 2006.

ASGHAR, A.; HENRICKSON, R. L. Functional properties of food-grade bovine hide collagen in coarse bologna- effect on different protein fractions. **Journal of Food Quality**, v. 5, p. 271-284, 1982.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 10004:2004, Resíduos sólidos – Classificação. p.71. Disponível em <http://www.aslaa.com.br/legislacoes/NBR%20n%2010004-2004.pdf>. Acessada em 05/01/2017.

ASSOCIAÇÃO CULTURAL E EDUCACIONAL BRASIL - ACEB. 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura - 2014. Disponível em http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf. Acessado em 03/02/2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th ed., v.1, 1995

AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K.W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - **A Review. Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 109-122, 2016.

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1179-1186, 2009.

BALAGUER, M. P; CERISUELO, J. P.; GAVARA R.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P. Mass transport properties of gliadin films: effect of cross-linking degree, relative humidity, and temperature. **Journal of Membrane Science**, v. 428, p. 380-392, 2013.

BALTI, R.; JRIDI, M.; SILA, A.; SOUISSI, N.; NEDJAR-ARROUME, N.; GUILLOCHON, D. Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 943-950, 2011.

BANDEIRA, S. F.; SILVA, R. S. G.; MOURA, J. M.; PINTO, L. A. A. Modified gelatin films from croaker skins: effects of pH, and addition of glycerol and chitosan. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 6, p. 613-620, 2015.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1º edição. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereossletivas. **International of Chemistry**, v.3 4, p. 306-319, 2011.

BENBETTAÏEB, N.; CHAMBIN, O.; KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F. Release behavior of quercetin from chitosan–fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation. **Food Control**, v. 66, p. 315–319, 2016.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos à base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763-768, 2001.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, p. 5675-5680, 2004.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid: Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v.37, p. 911-917, 1959.

BOANINI, E.; RUBINI, K.; PANZAVOLTA, S.; BIGI, A. Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. **Acta Biomaterialia** v. 6, p. 383-388, 2010.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed., São Paulo, SP: Livraria Varela, 2003. 228p.

BODINI, R. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CARVALHO, R. A. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.

BONA, J. C. **Filmes biodegradáveis a partir de blendas de amido com polietileno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

BONILLA, J.; TALÓN, E.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 118, p.271-278, 2013.

BORAN, G., LAWLESS, H. T., & REGENSTEIN, J. M. Effect of extraction conditions on the sensory and instrumental characteristics of fish gelatin gels. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 469-476, 2010.

BORDIGNON, A. C. **Caracterização da pele e da gelatina extraída de peles congeladas e salgadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2010.

- BORDIGNON, A. C.; FRANCO, M. R. L. S.; GASPARINO, E.; YAJIMA, E. M.; VESCO, A. P. D.; VISENTAINER, J. V. V.; MIKCHA, J. M. G. Aproveitamento de peles de tilápia-do-nilo congeladas e salgadas para extração de gelatina em processo batelada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 473-478, 2012.
- BOUGATEF, A.; BALTI, R.; SILA, A.; NASRI, R.; GRAIAA, G.; NASRI, M. Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*Mustelus mustelus*) skin gelatin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 248-254, 2012.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experiments: design, innovation, and discovery**. (2 ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.
- BRITISH STANDARD INSTITUTION- BSI. **Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)**, London, UK, 1975.
- BRODSKY, B.; RAMSHAW, J. A. M. The Collagen triple-helix structure. **Matrix Biology**, v. 15, p. 545-554, 1997.
- CARDOSO, M. J. B.; BARBOSA, R. C.; RIES, A.; FIDELIS, T.; FOOK, M. V. L. Ensaio físico-químico e mecânicos de membranas de quitosana com cobre, zinco e magnésio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 1, p. 1- 6, 2012.
- CATALINA, M.; ATTENBURROW, G. E.; COT, J., COVINGTON, A. D., ANTUNES, A. P. M. Influence of crosslinkers and crosslinking method on the properties of gelatin films extracted from leather solid waste. **Journal Applied Polymer Science**, v. 119, p. 2105-2111, 2011.
- CHANDRA, M. V.; SHAMASUNDAR, B. A. Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of freshwater fish (*Catla catla*). **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 47-54, 2015.
- CHANG, Y. P.; KARIM, A. A.; SEOW, C. C. Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties on tapioca starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p.1-8, 2006.
- CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, p. 2871-2880, 2003.
- CHIOU, B. S.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BECHTEL, P. J.; JAFRI, H.; NARAYAN, R.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Cold water fish gelatin films: effects of cross-linking on thermal mechanical, barrier and biodegradation properties. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 3748-3753, 2008.
- CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 194-199, 2000.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de alimento**. 4° ed. Porto Alegre, RS: Artmed,, 2010. 900p

DASH, R.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 638-645, 2013.

DEL GAUDIO, C.; BAIGUERA, S.; BOIERI, M.; MAZZANTI, B.; RIBATTI, D.; BIANCO, A.; MACCHIARINI, P. Induction of angiogenesis using VEGF releasing genipin-crosslinked electrospun gelatin mats. **Biomaterials**, v. 34, n. 31, p. 7754-7765, 2013.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; AÑÓN, M. C.; SOBRAI, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 341-349. 2009.

DUAN, R.; ZHANG, J.; XING, F.; KONNO, K.; XU, B. Study on the properties of gelatins from skin of carp (*Cyprinus carpio*) caught in winter and summer season. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 368-373, 2011.

EASTOE, J. E.; LEACH, A. A., **Chemical and constitution of gelatin - The Science and Technology of Gelatin**. New York: Academic Press, p. 73-107, 1997.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; COOKE, P. H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 61-70, 2011.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Development of polyioncomplex hydrogels as na alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 316-332, 2009.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by the coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. **Food Chemistry**, v.74, n. 2, p.161-167, 2001.

FISHBASE, 2016. Disponível em <http://www.fishbase.org>. Acessado em 15/04/16.

FLORY, P. J.; R. R. GARRETT. Phase transition in collagen and gelatin systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 4836-4845, 1958.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Estatísticas de produção de peixes e pesca**. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/>. Acesso em: 14/11/2016.

FRANÇA, J. M.; WASZCZYNSKYJ, N. Teor de hidroxiprolina em peles de frango submetidas à tratamento térmico. **Boletim Ceppa**, v. 20, n. 1, p. 19-28, 2002.

GELITA. **A produção de gelatina: a mais moderna tecnologia para produtos**. Disponível em: <http://www.gelita.com/DGF-portuguese/index.html>. Acessado em: 03/11/2016.

GHANBARZADEH, B.; ALMASIA, H.; ENTEZAMI, A. A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 229-235, 2011.

- GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; ROMIG JR, A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**, 2nd ed., New York: Plenum Press, p.21, 1992.
- GOMÉZ-GUILLEN, M. C.; GIMENEZ, B.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.
- GOMÉZ-GUILLEN, 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.
- GONÇALVES, J. O.; SANTOS, J. P.; RIOS, E. C.; CRISPIM, M. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Development of chitosan based hybrid hydrogels for dyes removal from aqueous binary system. **Journal of Molecular Liquids**, v. 225, p. 265-270, 2017.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.
- GUDMUNDSSON, M. Rheological properties of fish gelatins. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2172-2176, 2002.
- HAN, J. H.; FLOROS, J. D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. **Journal Plastic Film Sheet**, v. 13, p. 287-298, 1997.
- HANANI, Z. A.; BEATTY, E.; ROOS, Y. H.; MORRIS, M. A.; KERRY, J. P. Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 606-614, 2012.
- HASHEM, M. S.; SHARAF, M. M.; EL-HADY, A.B.D.; HEBEISH, A. Synthesis and haracterization of novel carboxymethylcellulose hydrogels and carboxymethyl cellulose hydrogel ZnO nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 421-27, 2013.
- HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 2, p. 203-213, 2004.
- HE, S.; YIN, T.; ZHEN, J.; XU, X. Cross-linking of gelatin by chlorine dioxide steam. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 63-71, 2015.
- HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; KANAVOURAS, A.; LAGARON, J. M.; GAVARA, R. Development and characterization of films based on chemically cross-linked gliadins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 8216-8223, 2005.
- HOLZER, D. **Gelatin Production**. US Patent: 5,484,888, 1996.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 82-90, 2011.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 66-73, 2010.

HOSSEINI, S. F.; JAVIDI, Z.; REZAEI, M. Efficient gas barrier properties of multi-layer films based on poly(lactic acid) and fish gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1205-1214, 2016.

HUANG, C. Y.; KUO, J. M.; WU, S. J.; TSAI, H. T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 997-1006, 2016.

HUDSON, C. B. Gelatine - relating structure and chemistry to functionality. **Food hydrocolloids: Structures, properties, and functions**, New York: Plenum Press, p. 347-354, 1994.

IGNÁCIO, A. K. F.; RODRIGUES, J. T. D.; NIIZU, P. Y.; CHANG, Y. K. Efeito da substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio em pão francês. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2013.

INTARASIRISAWAT, R.; BENJAKUL, S.; VISESSAGUAN, W.; PRODPRAN, T.; TANAKA, M.; HOWELL, N. Autolysis study of big eye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin and its effect on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 537-544, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Disponível em (http://www.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/). Acessado em 10/04/16.

JALAJA, K.; SREEHARI, V. S.; KUMAR, P. R. A.; NIRMALA, R. J. Graphene oxide decorated electrospun gelatin nanofibers: Fabrication, properties and applications. **Materials Science and Engineering**, v. 64, p. 11-19, 2016.

JAMILAH, B.; TAN, K. W.; UMI HARTINA, M. R.; AZIZAH, A. Gelatins from three culture freshwater fish skins obtained by liming process. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1256-1260, 2011.

JAYASINGHE, P.; HAWBOLDT, K. A review of bio-oils from waste biomass: focus on fish processing waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 798-821, 2012.

JIANG, Y.; LI, Y.; CHAI, Z.; LENG, X. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n. 8, p. 5100-5108, 2010.

JONGJAREONRAK, A.; RAWDKUEN, S.; CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S.; OSAKO, K.; TANAKA, M. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant

catfish (*Pangasianodon gigas*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 161-165, 2010.

KAERUANG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; ENCARNACION, A. B.; NALINANON, S. Impact of divalent salts and bovine gelatin on gel properties of phosphorylated gelatin from the skin of unicorn leatherjacket. **LWT – Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 477-482, 2014.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 644-652, 2014.

KARBOWIAKA, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 879-888, 2007.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 563-576, 2009.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; SINTHUSAMRAN, S.; KISHIMURA, H. Gelatin from clown featherback skin: Extraction conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, n. 1, p. 186-192, 2016.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blaktip shark as affected by extraction conditions. **Food Hydrocolloid**, v. 24, p. 164-171, 2010.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Developments in dairy chemistry, Fox, P.F. 5th ed., London: Elsevier Applied Science, 55p., 1988a.

KOLI, J. M.; BASU, S.; NAYAK, B. B.; PATANGE, S. B.; PAGARKAR, A. U.; GUDIPATI, V. Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger-toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 555-562, 2012.

KOŁODZIEJSKA, I.; SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; KOŁODZIEJSKI, W.; NIECIKOWSKA, C. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. **Food Chemistry**, v. 107, p. 700-706, 2008.

KUBITZA, F. **Aquicultura no Brasil: Conquistas e desafios**. Panorama da aquicultura, v. 25, n. 150, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEDWARD, D. A. **Gelation of gelatin. Functional properties of food macromolecules**. London: Elsevier Applied Science Publishers, p. 171-201, 1986.

LEVINE, H.; SLADE, L. A polymer physico-chemical approach to the study of commercial

starch hydrolysis products (SHPs). **Carbohydrate Polymer**, v. 6, p. 213- 244, 1986.

LIU, H. Y.; HAN, J.; GUO, S. D. Characteristics of the gelatin extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) head bones. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 540-544, 2008.

MAGDASSI, S.; VINETSKY, Y.; BENITA, S. Microencapsulation. **Methods and industrial applications**, New York: Marcel Dekker, p. 21-33, 1996.

MANDAL, A.; MEDA, V.; ZHANG, W. J.; DALAI, A. K. Spectroscopic investigation of collagen scaffolds impregnated with AgNPs coated by PEG/TX-100 mixed systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 603-612, 2012.

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A.; AL-MUTANA, M. M. Transport protein and salt tolerance in plants. **Plant Science**, Limerik, v. 146, n. 6, p.891-900, 2003.

MELO, A. R.; STIPP, N.A.F. A Piscicultura em cativeiro como alternativa econômica para as áreas rurais. **Geografia**, v. 10, n. 2, p. 175-193, 2001.

MÉNDEZ, C. M. V.; FORSTER, M. P.; RODRIGUÉZ-DELGADO, M. A.; RODRIGUÉZ-RODRIGUÉZ, E. M.; ROMERO, C. D. Contento of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (*canary Islands*) and Ecuador. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 217, p. 287-290, 2003.

MOHTAR, N. F.; PERERA, C. O.; HEMAR, Y. Chemical modification of New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skin gelatin and its properties. **Food Chemistry**, v. 155, p. 64-73, 2014.

MOHTAR, N. F.; PERERA, C.; QUEK, S,Y. Optimisation of gelatine extraction from hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skin sand measurement of gel strength and SDS– PAGE. **Food Chemistry**, v. 122, p. 307-313, 2010.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for Megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 434-438, 2000.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Hydrocolloid**, v. 18, p. 581-592, 2004.

NAGARAJAN, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, H. K. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperature. **Food Hydrocolloid**, v. 29, p. 389-397, 2012.

NAGARAJAN, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Characteristics of bio–nanocomposite films from tilapia skin gelatin incorporated with hydrophilic and hydrophobic nanoclays. **Journal of Food Engineering**, v. 143, p. 195-204, 2014.

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

NERVIS, J. A. L. **Núcleo homeopático homeopatia 100® no cultivo de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede**. 72p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2016.

NHARI, R. M. H. R.; ISMAIL, A.; MAN, Y. B. C. Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 42-46, 2012.

NINAN, G.; JOSE, J.; ABUBACKER, Z. Preparation and characterization of gelatin extracted from the skins of rohu (*Labeo rohita*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, p. 143-162, 2011.

NIU, L.; ZHOU, X.; YUAN, C.; BAI, Y.; LAI, K.; YANG, F.; HUANG, Y. Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 336-341, 2013.

NORZIAH, M. H.; KEE, H. Y.; NORITA, M. Response surface optimization of bromelain-assisted gelatin extraction from surimi processing wastes. **Food Bioscience**, v. 5, p. 9-18, 2014.

NÚÑEZ-FLORES, R.; GIMÉNEZ, B.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 163-172, 2013.

OLIVATO, J. B.; GROSSMANN, M. V. E.; BILCK, A.P. YAMASHITA, F. Effect of organic acids as additives on the performance of thermoplastic starch/polyester blown films. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 159-164, 2012.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954-970, 2013.

PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. 71p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo- Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP, 2009.

PEREDA, J. A. C. O.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F; PERALES, L. D. H; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos- componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre, RS: Ed. Artmed, v.1, 2005. 294p

PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA - 2015/2020. BRASÍLIA/DF 2015. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/plano-de-desenvolvimento-da-aquicultura>. Acessado em 25/10/2016.

POMERANZ, Y. **Functional properties of food components**. 2nd ed., San Diego: Academic Press Inc., 1991.

POPPE, J. **Gelatin. In thickening and gelling agents for food**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, p. 144-168, 1997.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Food science**. 5th ed. Gaithersburg: Aspen, 1998. 608p.

PRESTES, R. C.; GRABOSKI, A.; ROMAN, S. S.; KEMPKA, A. P.; TONIAZZO, G.; DEMIATE, I. M.; DI LUCCIO, M. Effects of the addition of collagen and degree of comminution in the quality of chicken ham. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 4, p. 885-903, 2013.

RAHMAN, M. S.; AL-SAIDI, G.; GUIZANI, N.; ABDULLAH, A. Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. **Thermochimica Acta**, v. 509, n. 1-2, p. 111-119, 2010.

RAWDKUEN, S.; THITIPRAMOTE, N.; BENJAKUL, S. Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1093-1102, 2013.

REDDY, N.; YANG, Y. Citric acid cross-linking of starch films. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 702-711, 2010.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 411-433, 2007.

RHIM, J. W.; WANG, L. F. Mechanical and water barrier properties of agar/k-carrageenan/konjac glucomannan ternary blend biohydrogel films. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 71-81, 2013.

RITTER, F.; PANDOLFO, A.; BARCELLOS, L.J.G.; QUEVEDO, R.M.; SANTOS-RITTER, V.R.S.; GOMES, A.P.; MARCONDES-PANDOLFO, L. Análise da viabilidade econômica do policultivo de carpas, jundiás e tilápias-do-nylo como uma alternativa de modelo de cultivo de peixes para pequenas propriedades. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. v.17(2), p. 27-35, 2013.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, p. 369-375, 2010.

ROSA, D. S.; FRANCO, L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 82-88, 2001.

ROSLAN, J.; YUNOS, K. F. M.; ABDULLAH, N.; KAMAL, S. M. M. Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by-product. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. v. 2, p. 312-319, 2014.

- ROUHI, J.; MAHMUD, S.; NADERI, N.; OOI, C. R.; MAHMOOD, M. R. Physical properties of fish gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with ZnO nanorods. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 364-371, 2013.
- SAI-UT, S.; JONGJAREONRAK, A.; RAWDKUEN, S. Re-extraction, recovery, and characteristics of skin gelatin from farmed giant catfish. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p.1197-1205, 2012.
- SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine handbook- theory and industrial practice**. Wiley-Weinheim: VCH, 2007. 347p.
- SHAKILA, R. J.; JEEVITHAN, E.; VARATHARAJAKUMAR, A.; JEYASEKARAN, G.; SUKUMAR, D. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 30-36, 2012.
- SILA, A.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; HADDAR, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; NASRI, M.; MONTERO, M.P.; BOUGATEF, A. Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatine: Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatine polypeptides. **Food Chemistry**, v. 168, n. 1, p. 478-486, 2015.
- SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PINTO, L. A. A. Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 580-585, 2014.
- SILVA, R. S. G. **Obtenção de gelatina de peles de bijupirá (*Rachycentron canadum*), modificação e produção de filmes**. 150p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 2013.
- SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PETRY, F. C.; PINTO, L. A. A. Extração de gelatina a partir das peles de cabeça de carpa comum. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 904-909, 2011.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 2007.
- SILVESTER, M. F.; YANNAS, I. V.; FORBES, M. J. Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. **Thrombosis Research**, v. 55, p. 135-148, 1989.
- SINTHUSAMRAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 152, n. 2, p. 276-284, 2014.
- SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly (ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 2, p. 305-312, 2006.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C. J.; WESS, T. J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 795-801, 2004.

SÖDERHÄLL, C.; MARENHOLZ, I.; KERSCHER, T.; RUSCHENDORF, F.; ESPARZAGORDILLO, J.; WORM, M.; GRUBER, C.; MAYR, G.; ALBRECHT, M.; ROHDE, K.; SCHULZ, H.; WAHN, U.; HUMBNER, N.; LEE, Y. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with Atopic Dermatitis. **Plos Biology**, v. 5, n. 9, p. 1952-1961, 2007.

SOUSA, G. M. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

SOW, L. C.; YANG, H. Effects of salt and sugar addition on the physicochemical properties and nanostructure of fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 72-82, 2015.

STEVENS, M. Polymer additives- Mechanical property modifiers. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 70, n. 6, p. 444-447, 1993.

SUN-WATERHOUSE, D.; ZHAO, M.; WATERHOUSE, G. I. N. Protein modification during ingredient preparation and food processing: approaches to improve food processability and nutrition. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 7, p.1853-1893, 2014.

SWAN, J. E.; TORLEY, P. J. **Collagen: structure, functions and uses**. New Zealand: Mirinz Meat Industry Research, 1991. 49p.

TANG, Z.; GLOVER, I. A.; EVANS, A. N.; HE, J. An energy-efficient adaptive DSC scheme for wireless sensor networks. **Signal Processing**, v.87, n. 12, p. 2896-2910, 2007.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L. J.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHTANAPUN, P. Mechanical and physical properties of cassava starch–gelatin composite films. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 61, p. 778-792, 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; NILSUWAN, K. Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 248-259, 2015.

URANGA, J.; LECETA, I.; ETXABIDE, A.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Cross-linking of fish gelatins to develop sustainable films with enhanced properties. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 82-90, 2016.

URIARTE-MONTOYA, M. H.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; CINCO-MOROYOQUI, F. J.; ROUZAUD- SÁNDEZ, O.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; EZQUERRA-BRAUER, J. M. Giant squid skin gelatin: chemical composition and biophysical characterization. **Food Research International**, v. 44, p. 3243-3249, 2011.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; AJITHKUMAR, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of drug delivering potential of type-I collagen from eel fish *Evenchelys macrura*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.23, n. 7, p.1729-1738, 2012.

VEJDAN, A.; OJAGH, S. M.; ADELI, A.; ABDOLLAHI, M. Effect of TiO₂ nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. **LWT – Food Science and Technology**, v. 71, p. 88-95, 2016.

VINETSKY, Y.; MAGDASSI, S. Microencapsulation by Surfactant–Gelatin Insoluble Complex: Effect of pH and Surfactant Concentration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 189, p. 83-91, 1997.

WARDS, A. G.; COURTS, A. **The science and technology of gelatin**. New York: Academic Press Inc., 1977. 564p.

WENG, W.; ZHENG, H.; SU, W. Characterization of edible films based on tilapia (*Tilapia zillii*) scale gelatin with different extraction pH. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 19-26, 2014.

WOLF, F. A. Collagen and gelatina. **Progress in Biotechnology**, v. 23, p. 133-218, 2003.

XU, H.; SHEN, L.; XU, L.; YANG, Y. Low-temperature crosslinking of proteins using non-toxic citric acid in neutral aqueous medium: Mechanism and kinetic study. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 234-240, 2015.

YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; YI, J. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 907-914, 2011.

ZARAI, Z.; BALTI, R.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Process for extracting gelatin from marine snail (*Hexaplex trunculus*): Chemical composition and functional properties. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1779-1784, 2012.

ZENG, S.; YAN, X.; CAO, W.; HONG, P.; ZHANG, C.; e LI, L. Optimisation of extraction conditions and characteristics of skin gelatin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Sci. Technol.**, v. 45, p. 1807-1813, 2010.

ZENG, S.; YIN, J.; YANG, S.; ZHANG, C.; YANG, P.; WU, W. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized colagens from skin of cobia (*Rachycentron canadum*). **Food Chemistry**, v. 29, p. 100-105, 2012.

ZHANG, Q.; WANG, Q; SHUN, L.; LU, J.; JIANG, S.; REGENSTEIN, J. M.; LIN, L. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**, v. 13, p. 41-48, 2016.

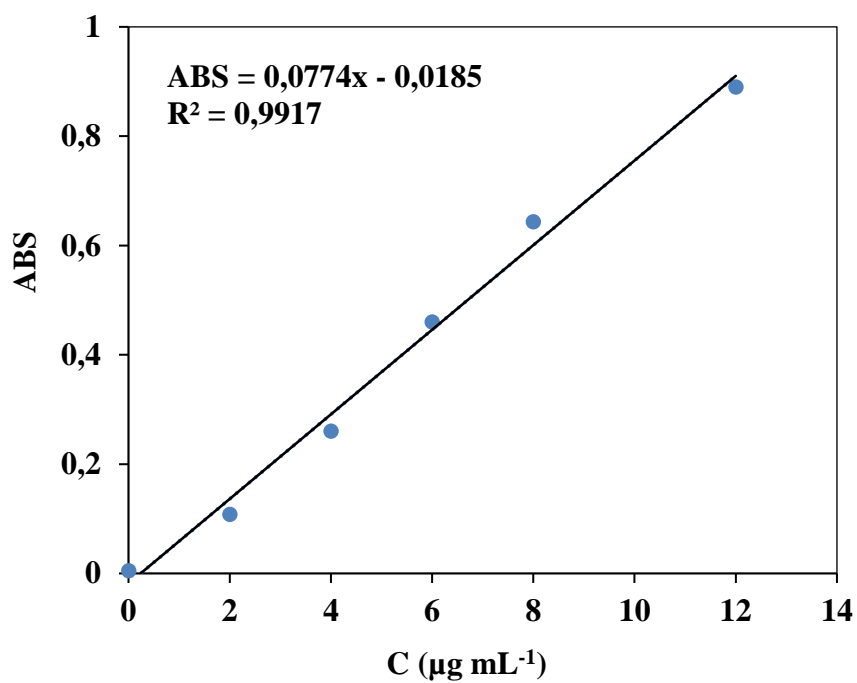
ZHANG, Y.; CONRAD, A. H.; CONRAD, G. W. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13011-13022, 2011.

ZULLO, R.; IANNACE, S. The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: correlation among process, elongational properties and macromolecular structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 376-383, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curva padrão da hidroxiprolina

Figura 31- Curva padrão da hidroxiprolina



APÊNDICE 2 - Valores dos parâmetros relacionados à cor (croma a* e b*) das gelatinas.

Tabela 13 - Croma a* e croma b* para gelatinas de peles de bovino, gelatinas puras (controle) e reticuladas de peles de tilápia e de carpa

		a*	b*
Bovino		5,10 ± 0,18 ^a	12,10 ± 0,89 ^g
	Controle	0,34 ± 0,04 ^b	4,02 ± 0,32 ^a
Tilápia do Nilo	Na	0,30 ± 0,05 ^b	4,30 ± 0,36 ^a
	Mg	0,40 ± 0,07 ^a	4,65 ± 0,41 ^a
	AG	0,29 ± 0,06 ^b	4,56 ± 0,39 ^a
	AC	0,44 ± 0,08 ^a	4,95 ± 0,35 ^a
Carpa comum	Controle	0,28 ± 0,05 ^b	2,85 ± 0,31 ^b
	Na	0,26 ± 0,06 ^b	3,10 ± 0,28 ^b
	Mg	0,35 ± 0,07 ^b	3,90 ± 0,31 ^a
	AG	0,42 ± 0,06 ^a	4,30 ± 0,33 ^a
	AC	0,33 ± 0,04 ^b	4,10 ± 0,39 ^a

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabela 14- Croma a* e croma b* para gelatinas de peles de bovino, gelatinas puras (controle) e reticuladas de ossos de tilápia e de carpa

		a*	b*
Tilápia do Nilo	Controle	0,54 ± 0,03 ^a	9,86 ± 0,69 ^a
	Na	0,50 ± 0,04 ^a	10,01 ± 0,87 ^a
	Mg	0,47 ± 0,05 ^a	9,46 ± 0,91 ^a
	AG	0,55 ± 0,07 ^a	7,86 ± 0,63 ^b
	AC	0,49 ± 0,06 ^a	8,15 ± 0,53 ^b
Carpa comum	Controle	0,37 ± 0,04 ^b	9,34 ± 0,49 ^a
	Na	0,39 ± 0,05 ^b	9,89 ± 0,45 ^a
	Mg	0,40 ± 0,06 ^b	8,86 ± 0,55 ^b
	AG	0,45 ± 0,07 ^a	7,55 ± 0,61 ^b
	AC	0,47 ± 0,04 ^a	8,34 ± 0,62 ^b

*Médias ± desvio padrão (para cinco repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

APÊNDICE 3 - Ilustração dos aminoácidos da gelatina

Figura 32- Aminoácidos comumente presentes em gelatinas

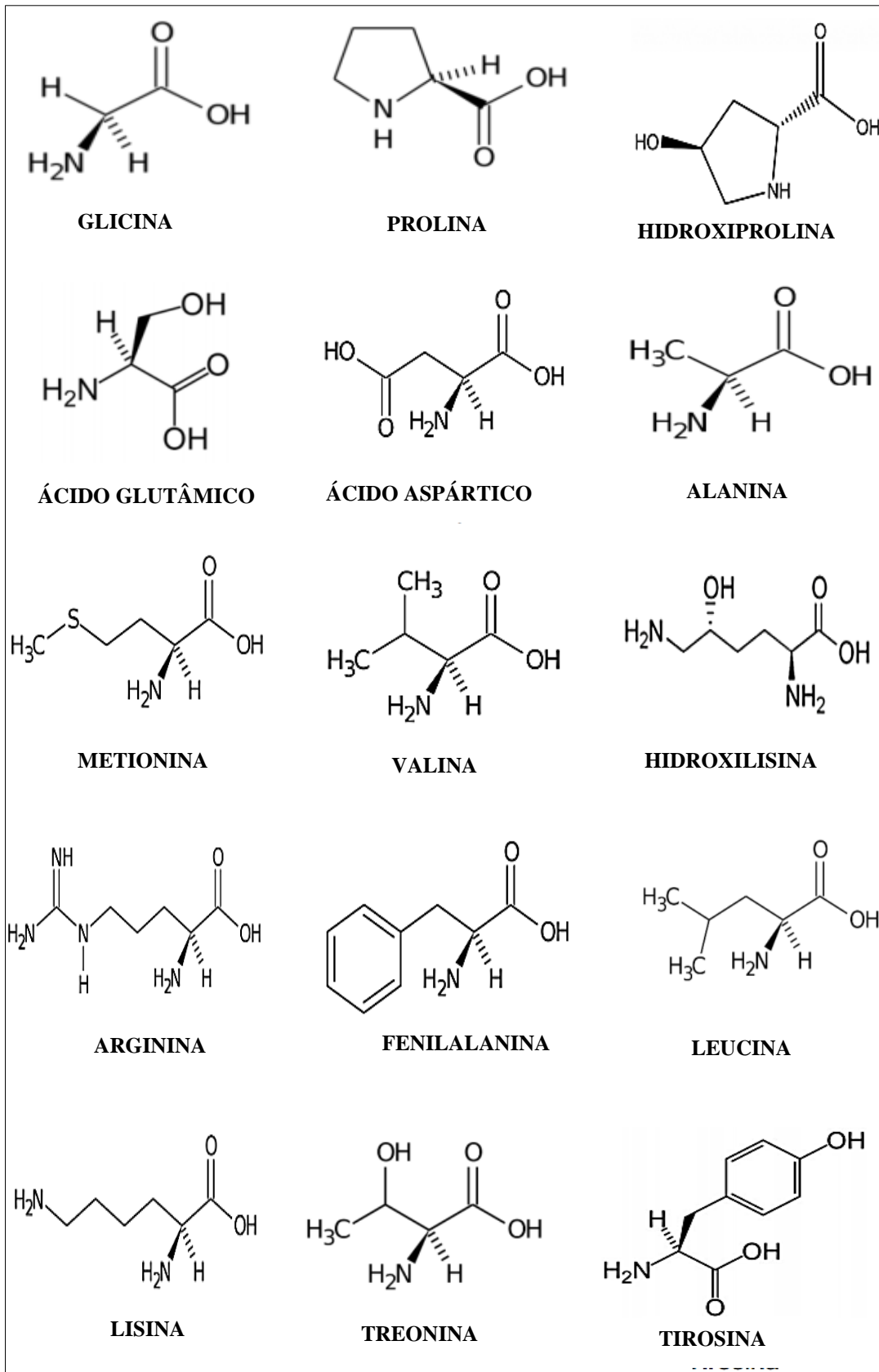
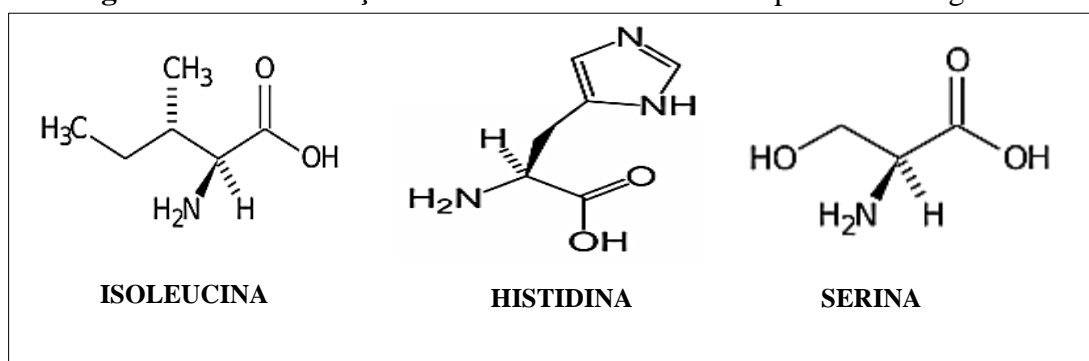
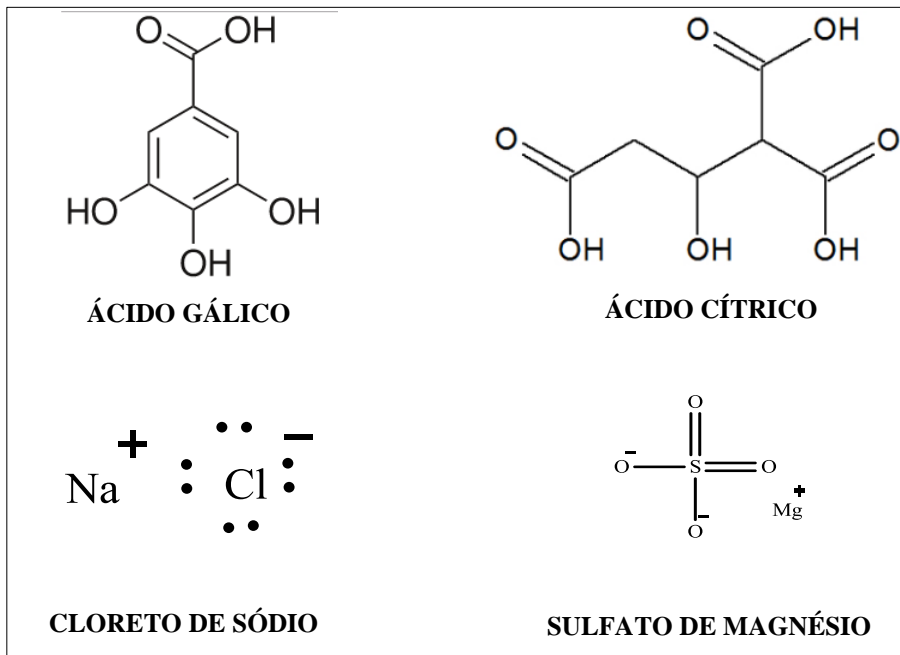


Figura 32 “Continuação”- Aminoácidos comumente presentes em gelatinas



APÊNDICE 4 – Ilustração dos agentes de reticulação**Figura 33-** Agentes químicos de reticulação

APÊNDICE 5 - Produção bibliográfica

BOTELHO, D.L.; PERUZZI, T.C.; OLIVEIRA, M.G.; SANTOS, J.P.; MOURA, C.M.; PINTO, L.A.A. **Propriedades físico-químicas e ópticas de gelatina modificada obtida a partir de carpa comum**. 15^a Mostra da produção universitária -MPU, Rio Grande, 2016.

SANTOS, J.P.; PERLEBERG, H.E.; STRUITZKI, R.R.; BOTELHO, D.L.; MOURA, C.M.; PINTO, L.A.A. Propriedades térmicas de gelatina obtida de pescado e reticulada com agentes químicos. 2º Congresso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos. Punta del Este, 2016.

SANTOS, J.P.; PERLEBERG, H.E.; STRUITZKI, R.R.; BOTELHO, D.L.; MOURA, C.M.; PINTO, L.A.A. Propriedades funcionais de gelatina reticulada obtida de pescado e produção de filmes biopoliméricos. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA. Gramado, 2016.

SANTOS, J.P., BOTELHO, D.L.; MENDES, R.C.; PERLEBERG, H.E.; MOURA, C.M.; PINTO, L.A.A. Extração e caracterização de gelatinas obtidas a partir de peles e ossos de carpa comum e tilápia do Nilo. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química- COBEQ. Fortaleza, 2016.