



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA GELATINA DE PELE
DE PEIXES AMAZÔNICOS POR DIFERENTES MÉTODOS.**

BELÉM – PARÁ
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ELEN VANESSA COSTA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA GELATINA DE PELE
DE PEIXES AMAZÔNICOS POR DIFERENTES MÉTODOS.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia,
Universidade Federal do Pará, como um requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Lúcia de Fátima Henriques Lourenço

Co orientador: Prof^º Dr Rosinelson da Silva Pena

BELÉM – PARÁ

2016

ELEN VANESSA COSTA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA GELATINA DE PELE
DE PEIXES AMAZÔNICOS POR DIFERENTES MÉTODOS.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Para, como um requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúcia de Fátima Henriques Lourenço

Co-orientador: Prof^o Dr Rosinelson da Silva Pena

Data de avaliação: _____

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
(FEA/ITEC/UFPA – Orientadora)

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena
(FEA/ITEC/UFPA – Co Orientador)

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
(FEA/ITEC/UFPA – Membro)

Prof^a. Dra. Maria Regina Sarkis Peixoto Joelle
(IFPA – Membro)

Prof. Dr. Eder Augusto Furtado Araujo
(FEA/ITEC/UFPA – Membro)

Prof. Dra. Carmelita de Fátima Amaral Ribeiro
(DETA/UEPA – Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Wanderlei Martins da Silva e Maria Eridan Costa da Silva, a quem eu agradeço minha existência e a forma como eles me ensinaram a ver a vida, apoiando-me e incentivando-me sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força, sabedoria, determinação e acima de tudo pela paciência de saber esperar e entender que tudo acontece no tempo certo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela oportunidade de conclusão do Doutorado;

A Universidade do Estado do Pará (UEPA) pela liberação para cursar Doutorado e pelo suporte financeiro através de bolsa de estudo;

A minha orientadora Prof. Dr^a Lúcia Lourenço pela confiança e por estar sempre disponível para orientar, resolver situação adversas e acima de tudo por ser uma profissional de extrema competência e sensibilidade;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena, pelos seus conhecimentos e pelos momentos de orientação e correção, que foram fundamentais para dar direcionamento ao trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Dr. Antonio Rodrigues, Dr. Eder Araujo, Dra Regina Joele, Dra Camelita Ribeiro.

Aos colegas do LAPOA (Laboratório de Produtos de Origem Animal) pela ajuda, companheirismo, amizade e principalmente pelos momentos de distração;

Aos meus familiares Wanderlei Martins da Silva (Pai), Maria Eridan Costa da Silva (Mãe), Helton Pinheiro da Rocha (esposo) e Heitor Gabriel Silva da Rocha (filho) pelo apoio constante e por terem esperado e acreditado nesse momento de vitória.

RESUMO

Os resíduos das indústrias de pesca apresentam facilidade de serem transformados em diversos produtos e ainda por apresentarem nutrientes de elevado valor biológico, ricos em proteínas (colágeno) e ácidos graxos, diante disso o trabalho teve como objetivo estudar o aproveitamento da pele de peixes Amazônicas para extração de gelatina. Os processos de extração a partir de pele de filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) e dourada (*Brachyplathystoma rousseauxii*) utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio (Ca (OH)₂) foi otimizado e o produto foi caracterizado através das análises de rendimento, força de gel, cor, viscosidade, perfil de aminoácidos, microscopia eletrônica de varredura, ponto de fusão, capacidade de formar espuma e capacidade emulsificante. As condições otimizadas para a gelatina da espécie filhote, extraída com solução de NaOH, foram de 6 horas de extração na temperatura de 58°C e as condições máximas de desejabilidade foram de 0,998, obtendo valor de rendimento e força do gel de 19,7% e 244,3 g, respectivamente. No método de calagem Ca (OH)₂ as condições otimizadas foram definidas em 10 dias de pré-tratamento e temperatura de 50°C. Para esta condição foi observada uma desejabilidade de 0,965 e valores de rendimento e força do gel de 20,24% e 221 g, respectivamente, ambos considerados aceitáveis para alimentos. Na espécie filhote a glicina foi o aminoácido majoritário, tanto na pele do peixe (23,77%), quanto na gelatina obtida com NaOH (23,39%) e Ca(OH)₂ (24,97%). Para obtenção da gelatina da espécie dourada foi utilizado pré-tratamento com NaOH na temperatura de extração de 64°C e tempo de extração de 6 horas. O pré tratamento com Ca (OH)₂ foi por 12 dias e temperatura de extração de 64°C por 6 horas. Ao comparar as características das gelatinas da dourada, a obtida com NaOH apresentou diferença ($p < 0,05$) e maior potencial tecnológico devido maior rendimento, maior quantidade de iminoácidos e melhores propriedades (força do gel, viscosidade, ponto de fusão, poder emulsificante), no entanto, a gelatina extraída com Ca (OH)₂ apresentou géis fracos e menor ponto de fusão características adequadas para produtos refrigerados e que são necessárias baixas temperaturas de gelificação. Conclui-se que todas as gelatinas obtidas podem ser utilizadas em diversos produtos dependendo da característica que se deseja obter.

Palavras chave: resíduo, pré-tratamento, hidroxiprolina, força de gel.

ABSTRACT

Fish industry residues are used due to their easy transformation into several products and because they have nutrients with high biological value, being rich in proteins and fatty acids, the work was to study the use of the skin of Amazonian fish for gelatin extraction. The gelatin extraction process from the skin of kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) and gilthead bream (*Brachyplatystoma rousseauxii*) with sodium hydroxide (NaOH) and calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) was optimized and the product was characterized through analyses of yield, gel strength, color, viscosity, amino acid profile, scanning electron microscopy, melting point, foaming capacity, and emulsifying capacity. The optimized conditions established in the process from the skin of kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) with NaOH were 6 h extraction at 58 °C, with yield and gel strength at 19.7% and 244.3 g, respectively. The method with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ the optimized conditions were defined over ten days of pre-treatment at 50 °C. This condition resulted in desirability of 0.965 and yield and gel strength values of 20.24% and 221 g, respectively. Glycine was the main amino acid both in the fish skin (23.77%) and in the gelatin obtained (NaOH - 23,39% e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - 24,97%). Pre-treatment with sodium hydroxide (NaOH) and calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) was used and the gelatin the skin of gilthead bream (*Brachyplatystoma rousseauxii*) with 64 °C and 6 h extraction. The pretreatment with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was for 12 days and 64 °C extraction for 6 hours. When the characteristics of the gelatins obtained were compared, the one that used NaOH had greater ($p < 0.05$) technological potential due to higher yield, greater amount of imino acids, and better properties (gel strength, viscosity, melting point, emulsifying power). However, the gelatin extracted with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ had weak gels and lower melting point, which is appropriate for refrigerated products that require low gelling temperatures. It is concluded that the two gelatins obtained can be used in several applications in products according with the characteristic desired.

Key words: residue; pretreatment; hydroxyproline; gel strength.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 Superfície de resposta do rendimento em função do tempo (horas) e temperatura de extração (°C) de gelatina pré-tratada com NaOH 43
- Figura 2 Superfície de resposta da força de gel em função do tempo (horas) e temperatura de extração (°C) de gelatina pré-tratada com NaOH 44
- Figura 3 Função de desejabilidade para rendimento e força de gel 45
- Figura 4 Micrografia eletrônica da gelatina de filhote nas dimensões 50 e 200x 52

CAPÍTULO II

- Figura 1 Superfície de resposta para rendimento em função do tempo de pré-tratamento (dias) e da temperatura de extração (°C) pelo método de calagem 68
- Figura 2 Superfície de resposta para força do gel em função do tempo de pré-tratamento (dias) e da temperatura de extração (°C) pelo método de calagem 69
- Figura 3 Gráfico de desejabilidade para a extração de gelatina de pele de filhote 71
- Figura 4 Eletromicrografias da gelatina da pele de filhote: (A) 50x e (B) 200x 77

CAPÍTULO III

- Figura 1 Micrografia eletrônica da gelatina de dourada nas dimensões 50x. (A) pré-tratamento NaOH; (B) pré-tratamento Ca(OH)₂ 99

LISTA DE TABELAS
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1	Comparação entre os métodos de extração de gelatina	23
CAPÍTULO I		
Tabela 1	Matriz do planejamento experimental 2^2 com os resultados obtidos para rendimento (%) e força do gel (g)	41
Tabela 2	Efeitos estimados das variáveis dos polinômios de segunda ordem (eq. 1) associada a significância para cada resposta estudada (erro puro)	41
Tabela 3	Análise de variância (ANOVA) para rendimento e força do gel em função das variáveis independentes, teste F e R^2	42
Tabela 4	Propriedades físico químicas da pele e da gelatina extraída da pele de filhote	46
Tabela 5	Perfil de aminoácidos totais presentes na pele e gelatina de filhote (g/100g de proteína)	47
Tabela 6	Caracterização tecnológica da gelatina de filhote e de uma gelatina comercial	48
CAPITULO II		
Tabela 1	Matriz do planejamento experimental 2^2 com os dados obtidos para rendimento (%) e força do gel (g)	67
Tabela 2	Efeitos estimados das variáveis do polinômio de segunda ordem (Eq. 1), associada a significância para cada resposta estudada (erro puro)	67
Tabela 3	Modelo reduzido para rendimento e força do gel, em função das variáveis independentes, teste F e R^2	69
Tabela 4	Composição e parâmetros físico-químicos da pele e da gelatina extraída da pele de filhote	72
Tabela 5	Perfil de aminoácidos da pele e da gelatina de filhote	73
Tabela 6	Caracterização tecnológica	75
CAPITULO III		
Tabela 1	Composição e parâmetros físico-químicos da pele e da gelatina extraída da pele de dourada	91
Tabela 2	Perfil de aminoácidos totais presentes na pele e gelatina de dourada (g/100g de proteína)	93
Tabela 3	Resultados da caracterização tecnológica da gelatina de dourada utilizando dois pré-tratamento	94

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	07
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Pescado	15
3.2 Aproveitamento dos subprodutos do pescado	15
3.3 O colágeno	16
Tipos e estrutura	17
Aminoácidos	18
Aplicações do colágeno	18
3.4 Gelatina	19
Composição	19
Obtenção da gelatina	20
Qualidade	23
Aplicação da gelatina	25
REFERENCIAS	26
CAPITULO I	34
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO.	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Obtenção da gelatina	38
2.2 Planejamento experimental	38
2.3 Determinações físico-químicas	39
2.4 Determinação das propriedades tecnológicas	40
2.5 Análise estatística	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Otimização do processo de obtenção da gelatina	41
3.2 Caracterização química da pele e da gelatina	45
3.3 Caracterização tecnológica da gelatina	48
3.4 Morfologia da gelatina	51
4 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
CAPITULO II	60
RESUMO	60
ABSTRACT	61
1 INTRODUÇÃO.	62
2 MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 Obtenção da gelatina	63
2.2 Planejamento experimental	63
2.3 Determinações físico-químicas	65
2.4 Determinações das propriedades tecnológicas	65
2.5 Análise estatística	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 Otimização do processo de obtenção da gelatina	66
3.2 Caracterização da pele e da gelatina	71
4 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	78

CAPITULO III	85
RESUMO	85
ABSTRACT	86
1 INTRODUÇÃO	87
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 Obtenção da gelatina método NaOH	89
2.2 Obtenção da gelatina método Ca (OH) ₂ .	89
2.3 Determinações físico-químicas	90
2.4 Determinação das propriedades tecnológicas	90
2.5 Análise Estatística	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.1 Caracterização química da pele e da gelatina	91
3.2 Caracterização tecnológica da gelatina	94
3.3 Morfologia da gelatina	98
4 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de pescado do mundo. No ano de 2013 o Pará totalizou a produção de 728.393,80 toneladas de pescado, sendo 670.961 da pesca artesanal (92,1%); 41.250 da pesca industrial (5,7%) e 16.182 da piscicultura (2,2%). O Estado ultrapassou Santa Catarina, que até 2012 estava no primeiro lugar do ranking da produção de pescado no país (SEPAQ, 2014).

As indústrias de beneficiamento de pescado geram grandes quantidades de resíduos, devido principalmente à falta de reconhecimento deste recurso como matéria prima e fonte para outros produtos. No Brasil, o aproveitamento dos resíduos de pescados é pequeno e estes representam cerca de 2/3 do volume da matéria-prima da indústria (Boscolo e Feiden, 2007), sendo alto seu conteúdo de colágeno (Gómez Guillén et al., 2002).

O interesse pelo aproveitamento dos resíduos das indústrias de pesca reside no fato de serem facilmente transformados em diversos produtos e ainda por apresentarem nutrientes de elevado valor biológico. Esses resíduos podem ser destinados à vários tipos de aproveitamento: fertilizantes, consumo humano e vestuários, no entanto, a maior parte se destina à produção de subprodutos como ingredientes para ração animal (Stori et al., 2002). Uma alternativa viável para o aproveitamento dos resíduos é a fabricação de gelatina (Ocak, 2012; Karim e Bhat, 2009).

As gelatinas são produzidas principalmente a partir das peles, couros e ossos de bovinos, suínos e peixes. A produção de gelatina de peixe correspondeu apenas 1,5% do total produzido em 2007 (GME, 2008), embora cerca de 30% dos resíduos de processamento de peixe, pele, escamas e ossos são muito ricos em colágeno, precursor da gelatina (Kolodziejaska et al 2008). O colágeno é a principal proteína estrutural do tecido conjuntivo de vertebrados e constitui cerca de 30% da proteína total de animais. Ela é a proteína fibrosa que contribui para a fisiologia e funções dos tecidos, peles, tendões, ossos e cartilagens. Pelo menos, 29 tipos de colágenos têm sido identificados e cada um difere consideravelmente na sequência de aminoácidos, estrutura e função, provavelmente relacionado com tipos genéticos específicos (Sinthusamran,

et.al, 2013). O colágeno hidrolisado pode ser utilizado em alimentos funcionais, cosméticos, nutracêuticos e para outros fins da saúde (Liu et al., 2010).

As propriedades do gel da gelatina dependem da fonte de pré-tratamento, da matéria prima e de parâmetros do processo. Essas propriedades são também afetadas pela concentração da gelatina, pH, tempo de maturação do gel e temperatura de extração (Kołodziejska et. al, 2004, Gomez-Guillen et al, 2007). Os pré-tratamentos aplicados podem ser ácido ou básico. O pré tratamento ácido é utilizado para extração de gelatina de pele de suínos, pele de pescado e também ossos, uma vez que a pele de animais mais jovens não possui tantas ligações químicas, não há necessidade de um pré-tratamento alcalino intensivo e longo. O pré-tratamento básico é utilizado para extração de gelatina de pele bovina, ossos e fontes de colágeno de animais relativamente velhos que são tratados durante um período de até três meses.

Muitas espécies amazônicas podem ser utilizadas para tal fim pois por serem espécies de clima e água tropical apresentam características superiores as espécies de clima temperado. As espécie comercializadas na forma de filés, em indústrias, feiras livres e supermercados da região, tem sua pele descartada e são consideradas opções viáveis para produção de gelatina como é o caso do filhote e da dourada.

O filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) conhecido também como piraíba, bagre-branco ou piratinga é o bagre amazônico que atinge maior tamanho, alcançando em torno de 2,5 m e 150 kg (Ribeiro, 2009), já a dourada (*Brachyplathystoma rousseauxii*) possui a cabeça prateada e o corpo claro com reflexos dourados, daí o nome comum. Apresenta longos lobos na nadadeira caudal e barbilhões curtos. É uma espécie de grande porte, que pode chegar a mais de 1,5m de comprimento total e 20kg.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a gelatina extraída da pele de peixes Amazônicos por diferentes processos.

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a composição centesimal e o perfil de aminoácidos da pele de duas (02) espécies de peixe Amazônicas;
- Avaliar e otimizar dois processos de extração de colágeno das peles das espécies de peixe estudadas;
- Determinar a composição centesimal e as propriedades tecnológicas das gelatinas obtidas pelas duas espécies de peixe (filhote e dourada).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pescado

Para vias de definição, o termo pescado abrange, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), por meio do Decreto nº 30.691, de 1952: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios e quelônios, habitantes dos meios aquáticos, de água doce ou salgada, desde que destinados à alimentação humana (BRASIL, 1952).

Os alimentos marinhos se constituem em uma rica fonte de micronutrientes, minerais, ácidos graxos essenciais e em especial proteínas. As proteínas de peixes, crustáceos e moluscos representam cerca de 20% das fontes alimentares de proteína animal consumida no mundo. São proteínas com elevado valor biológico e uma composição balanceada em aminoácidos particularmente aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal como a metionina e a cisteína (FAO, 2007).

O valor nutricional do pescado e a divulgação de estudos que o associam com melhorias na saúde tem gerado, nos últimos anos, um aumento do interesse por esse alimento e seus subprodutos. Dentre os possíveis benefícios da ingestão o pescado, estão a redução do risco de Acidente Vascular Cerebral (AVC), de depressão, do Mal de Alzheimer e de morte por doenças cardíacas (Sartori e Amâncio, 2012).

3.2 Aproveitamento dos subprodutos do pescado

O aproveitamento dos resíduos das indústrias de pescados se devem à facilidade de serem transformados em diversos produtos, e ainda por apresentarem nutrientes de elevado valor biológico. De acordo com a análise dos destinos dos resíduos declarados por empresas do Sul do Brasil, foram relatados que 68% destes são encaminhados às indústrias de farinha de pescado, 23% são encaminhados ao aterro sanitário municipal e 9% são despejados diretamente nos rios, constituindo assim um grave impacto ambiental (Stori et al., 2002, Stevanato, et al., 2007).

O valor nutricional desses resíduos ricos em proteínas e ácidos graxos da série ômega-3 incentiva o desenvolvimento de produtos para alimentação humana. O uso de tecnologias com essa finalidade aumenta a capacidade da indústria da pesca em responder não só a demanda por produtos diferenciados mas a tendência pela busca de alimentos saudáveis e com alto valor nutritivo, suprindo as necessidades nutricionais – em especial de proteínas de origem animal, dos setores mais carentes da população, por um preço acessível (Feltres et al., 2010)

Com o aproveitamento alternativo dos subprodutos, é possível reduzir os custos e aumentar a produtividade das indústrias com a minimização de problemas de poluição ambiental. Assim, a necessidade de se montar sistemas para o aproveitamento de subprodutos industriais é de ordem econômica e de conservação de energia, o que possibilitará o uso mais racional da matéria-prima, ou ainda, o desenvolvimento de novos produtos, que utilizem subprodutos líquidos ou sólidos no preparo (Oetterer, 1994).

3.3 O colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos, constituindo a quarta parte do seu peso total. É o principal elemento fibroso da pele, osso, tendão, cartilagem, vasos sanguíneos e dentes, sendo encontrado em quase todos os órgãos do corpo humano (Stryer, 1996). A indústria da pesca também é uma grande geradora de resíduos ricos em colágeno, pois cerca de 30% do resíduo produzido consiste em pele e ossos com alto conteúdo de colágeno (Gómez-Guillén et al., 2002).

A molécula de colágeno é constituída por três cadeias polipeptídicas (sequência de cerca de mil aminoácidos unidos por ligação peptídica), cuja composição depende do tipo. Em quase todas as moléculas de colágeno, um terço é composto pelo aminoácido glicina e a sequência glicina-prolina-hidroxiprolina é repetida com muita frequência. Além disso, o colágeno contém dois aminoácidos que são encontrados em poucas proteínas: a 4-hidroxiprolina e a 5-hidroxilisina (Ross e Rowrell, 1993).

- Tipos e estrutura

Existem pelo menos 19 variedades de colágeno denominadas de tipos I a XIX, sendo que, pelo menos onze variedades genéticas de colágeno já foram identificadas e caracterizadas. Com base na sua estrutura macromolecular, o colágeno pode ser dividido em três grandes grupos: a) colágeno fibroso estriado, o qual inclui os tipos I, II e III; b) colágeno não fibroso, que contém o tipo IV (ou colágeno da membrana basal); c) colágeno miofibrilar, o qual engloba os tipos VI e VII (matriz miofibrilar), V, IX e X (colágeno pericelular), e VIII e XI os quais ainda não foram classificados (Xiong, 1997). Os outros tipos de colágeno estão presentes apenas em quantidades muito reduzidas, principalmente em órgãos específicos. Lâminas basais, cápsula do cristalino, córnea, membranas da placenta, músculo do coração, pulmão, pele fetal, mucosa intestinal, etc.

A unidade básica do colágeno é o tropocolágeno que é formado por três cadeias de polipeptídeos que se entrelaçam em formato helicoidal formando uma molécula linear com 180nm de comprimento, 1,4 a 1,5nm de largura e massa molar de 360.000Da. As moléculas de tropocolágeno são estabilizadas pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas. O colágeno tipo I é o mais abundante e pode ser encontrados na pele, tendões, ligamentos e ossos. Este colágeno é uma proteína macromolecular constituída de três cadeias polipeptídicas (duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$) que estão sob a forma helicoidal em sua porção central e nas extremidades amínica e carboxílica permanecem na forma globular (Torley et al, 2000). Nas porções globulares localizam-se as pontes cruzadas intermoleculares que estabilizam a estrutura das fibrilas colagenosas o que, como consequência, resulta em alteração da textura (enrijecimento) da carne na medida em que o animal envelhece (Prabhu e Doerscher, 2003)

Segundo Junqueira e Carneiro (2008), nos colágenos I e II as moléculas de tropocolágeno se juntam através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações covalentes para formar as fibrilas. Nos colágenos tipos I e III as fibrilas se associam para formar fibras. Para o colágeno tipo I, a formação de fibras ocorre em pH 7,0, quando ocorre a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja zero (colágeno nativo) (Pedroso, 2009).

No tipo II (presente na cartilagem) há formação de fibrilas. O colágeno IV presente na membrana basal não forma fibras nem fibrilas.

- Aminoácidos

A sequência de aminoácidos do colágeno mostra que a maior parte da cadeia polipeptídica é formada por 44% (Gly-X-X), 20% (Gly-X-I), 27% (Gly-I-X) e 9%(Gly-I-I). Onde Gly é glicina, I é prolina ou hidroxiprolina e X é outro aminoácido que pode estar presente. Em geral o colágeno contém cerca de 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e carregados. A glicina, a prolina e a alanina são aminoácidos alifáticos e a lisina é um aminoácido com características básicas (Damodaran et al., 2010)

A prolina e hidroxiprolina são responsáveis pela estrutura secundária do colágeno e pela estabilidade da tripla hélice. Uma menor quantidade ou a falta de hidroxiprolina faz com que o colágeno perca a conformação de tripla hélice quando submetido a elevação da temperatura (Goméz-Guillén et al, 2002). O teor de hidroxiprolina é importante para a propriedade de gelificação. Também estão presentes no colágeno, hidrocarbonetos como galactose e glicose ligada nos resíduos de hidroxilisina via grupo funcional do aminoácido hidroxil.

- Aplicações do colágeno

O colágeno nativo (tropocolágeno), na forma de fibras ou pó, pode ser submetido à reação de hidrólise e podem ser obtidos: fibra de colágeno, colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e colágeno hidrolisado. Para fins de produção industrial, a gelatina é obtida a partir da matéria-prima por hidrólise parcial via ácida e alcalina e o colágeno hidrolisado é obtido por hidrólise química e enzimática sob condições controladas (Schrieber e Gareis, 2007, Denny et al, 2008 e Walrand et al., 2008).

O colágeno nativo insolúvel é um subproduto do couro de curtume obtido dos resíduos da derme e do tecido subcutâneo, devendo ser pré-tratado antes que possa ser convertido em uma forma adequada para a extração de colágeno (Wolf et al., 2009).

Na indústria de carnes as propriedades funcionais do colágeno podem ser aproveitadas em produtos reestruturados e emulsionados, conferindo-lhes melhores resultados tecnológicos e econômicos (Coelho et al., 2001).

3.4 Gelatina

- Composição

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno, a qual pode resultar em três vias: formar três cadeias α independentes, formar uma cadeia β e uma α , ou apenas uma cadeia γ . A principal diferença entre as formas α , β e γ da gelatina é a massa molar. Para a forma α , a massa varia de 80 a 125 kDa, para a β , de 160 a 250 kDa e a forma γ apresenta a massa molar de 250 a 375 kDa. As maiores massas molares usualmente são características de melhores preparações (Karim e Bhat, 2009).

A gelatina é composta por aproximadamente 19 aminoácidos; e caracterizada pelo alto conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina. A variação do conteúdo desses aminoácidos, principalmente os iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) ocasionará uma menor formação de pontes de hidrogênio da gelatina em soluções aquosas, com a consequente redução da temperatura de geleificação (Norland, 1990).

A gelatina tem sido amplamente aplicada nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. A maior parte de gelatina comercial (95%) é feita a partir de pele de suíno e bovino e a parte restante (5%) vem a partir de ossos de bovino e porcino. Subprodutos de aves e peixes são raramente usados como um recurso de gelatina. A quantidade de gelatina utilizada na indústria de alimentos em todo o mundo vem aumentando anualmente, no entanto, ocorrências frequentes de doença Encefalopatia Espongiforme Bovina - BSE (mau da vaca louca) têm sido problemas para a saúde humana e, portanto, subprodutos de mamíferos são limitados para serem usados em processamento de alimentos funcionais, cosméticos e produtos farmacêuticos. Por conseguinte, o estudo de gelatina de peixe tais como a pele e osso, tem aumentado em substituição de recursos de mamífero (Gudmundsson, 2002).

- Obtenção de gelatina

A conversão do colágeno em gelatina solúvel pode ser obtida através do aquecimento do colágeno, em meio ácido ou alcalino (Schott, 2001). O processo de extração pode influenciar o comprimento das cadeias polipeptídicas e as propriedades funcionais da gelatina. Isso depende, no entanto, dos parâmetros do processo (temperatura, tempo e pH), do pré tratamento e dos métodos de preservação da matéria prima (Karim e Bhat, 2009).

A extração da gelatina a partir do colágeno é realizada em diferentes temperaturas (acima de 40°C) e é diretamente influenciado pelo pH do meio. A seleção do pH é feita visando maximizar a taxa de extração e a manutenção das propriedades físicas. Dependendo do método que o colágeno foi pré-tratado, dois diferentes tipos de gelatina podem ser produzidos, cada uma com diferentes características: gelatina do tipo A (ponto isoelétrico a pH 6-9) é produzida por tratamento ácido do colágeno; e a gelatina do tipo B (ponto isoelétrico a pH 5) é produzida a partir de tratamento alcalino do colágeno (Stainsby, 1987).

Gelatina tipo A - principalmente utilizado para extração de gelatina de pele de suínos, pele de pescado e também ossos (Hinterwaldner, 1977). Uma vez que a pele de animais mais jovens não possui tantas ligações químicas, não há necessidade de um pré-tratamento alcalino intensivo e longo, então, um tratamento ácido em menor tempo é suficiente para que o colágeno possa ser diluído em água quente, condição determinante para o processo de extração subsequente (Cole, 2014). Basicamente, neste processo o material é acidificado, para coagulação de proteínas não-colagenosas e mucoproteínas do tecido, e então o excesso de ácido é parcialmente neutralizado e o sal eliminado através das diversas trocas de água. Posteriormente, é aquecido para desnaturar e solubilizar o colágeno (Johns e Courts, 1977).

Gelatina tipo B – utilizado para extração de gelatina de pele bovina, ossos e fontes de colágeno de animais relativamente velhos (Hinterwaldner, 1977). Neste processo, as matérias-primas são tratadas durante um período de até três meses com hidróxido de cálcio saturado (*liming process*), que é trocado várias vezes durante o período. Ao passar por este processo, as ligações do colágeno vão sendo parcialmente separadas e qualquer proteína não-

colagênica ou outras substâncias são eliminadas (Johns e Courts, 1977). Após este processo, a matéria-prima tratada é lavada novamente e neutralizada através da adição de ácido, e o sal residual eliminado pela intensiva lavagem com água. Hidróxido de sódio pode ser adicionado para acelerar o liming process, reduzindo significativamente o tempo de processo, ou também pode ser utilizado isoladamente, porém dessa forma o processo acontecerá rapidamente, mas poderá ocorrer excessiva degradação (Johns e Courts, 1977).

Normalmente gelatina tipo A ou ácida tem ponto isoelétrico variando entre pH 7 e 9. Durante o pré-tratamento ácido da pele, algumas glutaminas e asparaginas podem ser convertidas em sua forma ácida, isto é, ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente (Jamilah e Havinder, 2002). No entanto, quando ocorre o uso de ácido em baixa concentração (0,02M) durante o pré-tratamento, não ocorre esta hidrólise e nem há o abaixamento do pH obtendo-se gelatina do tipo A com ponto isoelétrico que pode ser superior a 9,0 (Eastoe e Leach, 1977).

No pré-tratamento alcalino, o álcali progressivamente hidrolisa os grupos amida da asparagina e glutamina em ácido aspártico e ácido glutâmico. Como resultado, existe uma carga negativa na molécula de colágeno devido ao número de grupos carboxilas remanescente na molécula de gelatina, resultando assim em ponto isoelétrico baixo em pH 4-5 (Malafaya et al., 2007).

O processo de pré tratamento promove alterações químicas (reações hidrolíticas) no colágeno e o processo térmico tem a função de romper as ligações que mantêm a estrutura fibrilar do colágeno. Depois deste processo, as fibras ficam entumecidas e a coesão interna se reduz, possibilitando a ruptura de certas ligações peptídicas e a introdução de novos grupos iônicos nas moléculas. Alguns grupos específicos se rompem, dando lugar à hidrólise das ligações cruzadas (despolimerização) que mantêm as unidades de tropocolágeno. Assim, as ligações intramoleculares são mantidas nas unidades básicas e o produto solubiliza-se facilmente em água. O processo alcalino pode gerar moléculas ligeiramente ramificadas com massas molares de 10.000 a 60.000Da (Ockerman, 1994).

A estabilidade térmica do colágeno está relacionada com seu conteúdo de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina). Quanto mais elevado o conteúdo de

aminoácidos maior é a estabilidade das hélices. O colágeno se desnatura a temperaturas superiores a 40 °C, gerando uma mescla de espécies com uma, duas ou três cadeias polipeptídicas enroladas ao acaso. O resfriamento controlado (abaixo da temperatura de fusão) conduz a recuperação de uma estrutura helicoidal (Wong, 1994)

Processos de extração de gelatina de peixe ainda são muito limitados. Gómez-Guillén e Montero (2001) relataram um método de extração de gelatina com alta capacidade de gelificação a partir de peles de pescado, no qual o processo foi essencialmente baseado em um tratamento ácido brando prévio para entumecer o colágeno, seguido de extração em água em temperatura moderada (45°C). Todo o processo levou cerca de 24 h. Devido à instabilidade das ligações cruzadas do colágeno encontrado em pele de pescado, um tratamento brando ácido é suficiente para produzir adequado entumecimento, e para alterar ligações intra e intermoleculares não covalentes (Stainsby, 1987; Norland, 1990). Subsequente tratamento térmico acima de 40 °C (acima da temperatura de transição da estrutura helicoidal para gelatinas de pescado) destrói pontes de hidrogênio e clivam ligações covalentes, o que desestabiliza a tripla hélice através da transição da estrutura helicoidal e resulta na conversão em gelatina solúvel (Djabourov et al., 1993).

Outro processo utilizado é o de calagem que é projetado especialmente para a extração de gelatina a partir de peles e ossos de mamíferos, o que normalmente demora de dias a meses, dependendo da concentração e temperatura utilizadas (Schreber e Gareis, 2007). Em 2002, um processo aperfeiçoado para a preparação alcalina de gelatina do tipo B de peixe foi patenteado por Stanley (2002). O processo descrito consistiu na extração inicial, por calagem durante 42 dias, seguido por um processo de extração com ácido. Cal $[Ca(OH)_2]$ é normalmente preferido, devido à sua capacidade de regular a alcalinidade desejada e não fazer com que o colágeno se alongue (Ockermann e Hansen, 1988). Além disso, o rendimento e a força Bloom da gelatina são muitas vezes mais elevados. Jamilah et al. (2011) demonstrou que o processo de calagem é viável para a extração da gelatina a partir de peles de peixe para produzir maior Bloom. As características das gelatinas obtidas neste processo indicam que têm boa aplicação comercial.

Cho et al. (2004) estudaram o processo de otimização e propriedades funcionais de gelatina de cartilagem de tubarão (*Isurus oxyrinchus*). Silva et al. (2014) verificaram as características e composição químicas de gelatina de cobia (*Rachycentron canadum*). Kasankala et al., (2007) estudaram a otimização e extração de gelatina de pele de peixe carpa capim (*Catenopharyngodon idella*) através da metodologia de superfície de resposta. Ratnasari et al., estudaram o processo de extração pelo método de calagem para melhorar as propriedades da gelatina de pele de Pangas catfish (*Pangasius pangasius*). Jamilah et al., (2011) obtiveram gelatinas de pele de três espécies de peixes de água doce obtido pelo processo de calagem. A Tabela 1 mostra a comparação entre os métodos de extração de gelatina.

Tabela 1: Comparação entre os métodos de extração de gelatina

Método de Extração NaOH (Montero e Gómez-Guillén, 2000)	Método de Extração Ca(OH) ₂ (Jamilah et.al, 2011)
Extração com NaOH Tempo de processo menor Pode ocorrer excessiva degradação Menor força de gel	Odor de peixe leve ou indetectável Cor aceitável: amarelada Força do gel: 3x maior do que NaOH aprox 300g PF: 26°C Evita que o colágeno inche demais Rendimento maior do que NaOH e melhor recuperação

- Qualidade

A gelatina é praticamente insípida e inodora, sólida com aspecto vítreo, com densidade relativa de 1,3 a 1,4 kg.L⁻¹. A umidade pode variar de 7 a 15%, de acordo com o grau de secagem e o conteúdo de cinzas deve ser inferior a 2%. A coloração da gelatina é alterada conforme o aumento da temperatura no processo de extração uma vez que ocorre reação de Maillard entre as proteínas e os carboidratos presentes no material (Prestes, 2013).

As propriedades funcionais da gelatina podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo são as propriedades gelificantes (força do gel, viscosidade, espessamento, texturização e ligação de água) e o segundo grupo

referem-se a as propriedades de superfície, ou seja, formação e estabilização da emulsão, formação de espuma, formação de filme, coesão e adesão.

Força do gel: É o mais importante atributo da gelatina, e quando determinado por método padrão, é chamado de força de Bloom. A formação do gel ocorre devido a pontes de hidrogênio que fazem com que as moléculas de gelatina se agrupem em micelas, formando um produto semi-sólido que se liga com a água. As gelatinas comerciais oscilam de 50 a 300g (Bloom). A resistência do gel (Força de Bloom) é definida como uma medida de dureza, consistência, firmeza e compressibilidade de um gel a determinada temperatura, avaliada através da carga em g (gramas) requerida para produzir uma depressão no gel em condições normais. A resistência do gel também depende da concentração e da massa molar. Diferentes tipos de gelatina resultam em diferentes tipos de força de gel. O valor de Bloom está correlacionado com a massa molar do colágeno, portanto alto valor de Bloom resulta em géis mais firmes (Schrieber e Gareis, 2007)

Viscosidade: Sob aspecto de funcionalidade, a viscosidade da solução de gelatina é a sua segunda mais importante propriedade física (Cole, 2006). Gelatinas com baixa viscosidade resultam em géis frágeis, enquanto que as de alta viscosidade produzem géis consistentes e extensíveis.

Ponto de fusão: O processo de gelificação envolve a transição de um enrolamento sem uma forma definida para tripla hélice e ocorre a uma dada temperatura (Montero et al., 2002). A temperatura capaz de provocar uma desnaturação desta estrutura define o ponto de fusão

Umidade: Gelatinas comerciais apresentam umidade entre 9 e 14%, com ocasionais amostras fora desta faixa (Cho, et al., 2004)

Cinzas: De acordo com Muyonga et al., (2004), o teor de cinzas máximo recomendado para gelatina é 2,6%, embora, usualmente a gelatina com teor de cinzas acima de 2% possa ser aceita para aplicações alimentícias (CHO, et al., 2004)

Cor: Gelatinas comerciais possuem coloração que varia de um amarelo pálido para um âmbar escuro. Apesar da cor das gelatinas ser um atributo de grande importância comercial, ainda não existe nenhum método universalmente aceito para sua medida (Cole e Roberts, 1997).

pH e ponto isoelétrico: O pH pode ser usado para controlar a força do gel, que pode ser dependente do ponto isoelétrico. Johnston-Bankes (1990) e Foegeding et al. (1996), relataram que a gelatina do tipo A tem pi em pH 7,0 a 9,0, enquanto que a gelatina do tipo B tem pi em pH 4,8 a 5,2. Independente do pH, a gelatina do tipo A possui cargas positivas em todos os sistemas alimentícios, ao passo que a gelatina do tipo B pode possuir cargas positivas ou negativas.

- Aplicação da gelatina

Na indústria de alimentos a gelatina é utilizada em confeitaria (principalmente para fornecer mastigabilidade, textura e estabilizar espuma), em patês (fornecer cremosidade), laticínios (proporcionar a estabilização e texturização, espessante em iogurte), produtos cozidos (promover emulsificação, gelatinização e estabilização), produtos cárneos (revestimento em presunto), bebidas (clarificador de cerveja, vinho branco e sucos de frutas e legumes) e sobremesas (Johnston-Banks, 1990; Zhou et al., 2006). No entanto, gelatinas com características de baixa temperatura de fusão, como a maioria das gelatinas de peixe, podem ser utilizadas para manufatura de produtos específicos (refrigerados), obtendo maior valor comercial do que gelatina de mamíferos, comumente utilizada como aditivo alimentar (Arnesen e Gildberg, 2002).

No segmento de confeitos e doces é usada devido às suas propriedades de formação de gel, formação e estabilização de espuma, textura, agente emulsificante e agente ligante de água. Na fabricação de caramelos e alguns doces, a gelatina é extremamente importante para a definição da textura desejada, conferindo uma ótima sensação na boca. Na produção de pastilhas, a gelatina é a responsável pela estrutura elástica e as excelentes propriedades de fusão. A substituição de carboidratos por gelatina permite a produção de gomas sem uso de açúcares, ideais para o consumo de diabéticos (FIB, 2011).

Em panificação a gelatina é usada em produtos em suas mais variadas formas, ou seja, em pó, em folhas e instantânea. Sua função é de aglutinação, gelificação e estabilização de recheios e cremes. Além de conferir mais estabilidade a recheios e coberturas, a adição de gelatina também melhora a

sensação do produto na boca. Em produtos cárneos é usada para a produção de produtos embutidos. Alguns tipos de gelatina também encontram aplicação na produção de molhos para aperitivos, uma vez que fornecem a adesão ideal para estes produtos (FIB, 2011).

As gelatinas também contribuem para enriquecer o conteúdo de proteína dos alimentos e podem funcionar como um filme externo para a proteção contra desidratação, luz e oxigênio. Portanto, a qualidade das gelatinas usadas em alimentos depende não somente de suas propriedades reológicas, mas também é determinada por outras características como cor, transparência, fácil dissolução e sabor (Montero e Gómez-Guillén, 2000).

O organismo humano necessita de dez dos chamados aminoácidos essenciais, que são consumidos por meio dos alimentos. A gelatina contém nove desses aminoácidos essenciais (com aproximadamente 80% do total de aminoácidos sendo apolares), sendo uma proteína alimentícia de fácil digestão e utilização (Kim e Mendis, 2006).

REFERENCIAS

Arnesen, J. A.; Gildberg A. 2002 Preparation and characterisation of gelatin from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Bioresource Technology* 82: 191-194.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 7 jul. 1952. Seção 1, p. 10785

Boscolo, W. R.; Feiden, A. 2007. *Industrialização de tilápias*. Toledo: GFM Gráfica & Editora. 272 p.

Cho, S. M.; Kwak, K. S.; Park, D. C.; Gu, Y. S.; Ji, C. I.; Jang, D. H.; Lee, Y. B.; Kim S. B. 2004 Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids* 18: 573– 579,

Coelho, H. S.; Morandini, L. M. B.; Santana, A. M.; Terra, N. N. 2001 Características físico-químicas do salame tipo italiano contendo couro suíno cozido. *Revista Nacional da Carne* 24(278): 84-96,

Cole, C.G.B. 2006. *Gelatin Food Science*. Disponível em: <http://www.gelatin.com>. Acesso em: 23 jul. 2014.

Cole, C. G. B.; Roberts, J. J. 1997 Gelatine colour measurement. *Meat Science* 1: 23-31,

Damodaran S, Parkin K, Fennema OR. *Química de alimentos*. São Paulo: Artmed; 2010.

Dennis A. B., Dessauvages B., Guedji S., Ridoux C., Meffre N. 2008 Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids* 22:989-94.

Djabourov, M.; Lechaire, L.; Gaill, F. 1993 Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*. 30:191-205.

Eastoe, J. E.; Leach, A. A. 1977. Chemical constitution of gelatin. In: WARD, A. G.; COURTS, A. (Eds.). *The science and technology of gelatin*. London: Academic Press, p. 73-108.

FAO – Food and Agriculture Organization. *State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2006. 145 p.

Feltes, M.M.C., Correia, J. F. G., Beirao, H.G Ninow, J. L., Spiller, V. R. 2010 Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 6:.669–677.

Foegeding, E. A., Lanier, T. C. Hultin, H. O. 1996. Collagen In : O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry*, 3rd ed.: Pp 902–906. New York: Marcel Dekker, Inc

Food Ingredients Brasil (FIB) 2001 A gelatina e seus benefícios para a saúde humana 18: 56 -65. Disponível em www.revista-fi.com. Acesso em 29/02/2016.

Gelatin Manufacturers of Europe (GME) (2008) Gelatine. Disponível em <http://www.gelatine.org/en/gelatine/overview/127.htm>. Acesso em 29/02/2016.

Gómez-Guillén, M. C.; Montero, P. 2001 Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boschii*) skins with several organic acids. *Journal of Food Science*. 66: 213-216.

Gómez-Guillén M.C, Fernández-Díaz M.D, Ulmo N., Lizarbe M.A, Montero P. 2002 Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids* 16:25-34.

Gudmundsson, M. 2002 Rheological properties of fish gelatins. *Journal of Food Science*, 67:2172 – 2176.

Hinterwaldner, R. 1977 Raw materials. In: A. G. WARD; A. COURTS (Eds.), *The science and technology of gelatin*. London. Academic Press, 295– 314.

Jamilah, B.; Harvinder, K. G. 2002 Properties of gelatins from skins of fish: black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77: 81–84.

Jamilah, B. K.W. Tan, M.R. Um H., A. Azizah 2011 Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids* 25:1256-1260.

Johns, P; Courts, A. 1977 Relationship between collagen and gelatin. In A. G. WARD; A. COURTS (Eds.), *The science and technology of gelatin*. London. Academic Press 138–177

Johnston-Banks, F. A. 1990 *Gelatin. Food gels*, New York: Elsevier Applied Food Science Series, 233-289

Junqueira LC, Carneiro J. 2008 *Histologia básica*. São Paulo: Guanabara Koogan.

Karim, A.A., Bhat, R 2009 Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23: 563–576.

Kim, S. K.; Mendis E. 2006 Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International* 39:383-393

Liu C, Peng D, Yang J, Li Y, Li J. Anti-oxidative and anti-aging activities of collagen hydrolysate. III International Conference On Biomedical Engineering And Informatics (BMEI); October of 2010; Yantai: Anais. p. 1981-1984.

Kasankala,L.M, Xue,Y. Weilong, Y. Hong, S.D. He, Q. 2007 Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology *Bioresource Technology* 98: 3338–3343.

Kolodziesjska, I., Skierka, E., Sadowska, M., Kolodziejcki, W., Niecikowska, C 2008. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry* 107(2): 700-706.

Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. 2007. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 59(4):207-33.

Montero, P.; Gómez-Guillén, M. C. 2000 Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*. 65: 434-438.

Montero, P.; Fernández-Días, M. D.; Gómez-Guillén, M. C. 2002 Characterization of gelatin gels induced by high pressure. *Food Hydrocolloids*.16:197-205.

Muyonga, J. H.; Cole, C.G.B.; Duodu, K.G. 2004 Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85:81–89.

Norland, R. R. 1090 Fish gelatin. *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability* (pp. 325-333). Lancaster: Technomic Publishing Co.

Ocak, B. 2012 Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management*. 100:22-28,

Ockerman HW, Hansen CL. 1994 *Industrialización de subproductos de origen animal*. Zaragoza: Acribia.

Ockerman H.W, hansen, C.L, 1998. *Glue and gelatin*. In *animal by product processing*. Chichester, England, Ellis Horwood Ltd.

Oetterer M. 1994 *Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado*. *Alimentos e Nutrição*. 5:119-131.

Pedroso M.G.V. 2009 *Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA*. Dissertação [Mestrado em Química Analítica] – Universidade Federal de São Carlos.

Prabhu G., Doerscher, D. 2003 Utilizing pork collagen protein in emulsified and whole muscle meat products. In: *Anais do 49º International Congress of Meat Science and Technology e 2º Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003*. Campinas: CTC-ITAL .413-416.

Prestes, R.C 2013 *Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos*. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*;15(1):65-74

Ratnasari I, Sudarminto SY, Nusyam H, Simon B, Widjanarko E. 2014. Extraction Process Modification to Enhance Properties of Skin Gelatin of Pangas Catfish (*Pangasius pangasius*). *Food and Public Health* 4(3):C140-150

Ribeiro, C. F. A. 2009 Processamento de Piraíba (*Brachyplatystoma Filamentosum*): desidratação osmótica, defumação e secagem / Carmelita de Fátima Amaral Ribeiro. --Campinas, SP: [s.n.].

Ross, M. H.; Rowrell, L. J. *Histologia: texto e atlas*. 2ª ed. São Paulo: Panamericana, 1993.

Sartori, A.G.O., Amancio, R.D. 2012 Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, 19(2): 83-93.

Schott, A. Functions of gelatin in food applications. 2001 American Association of Cereal Chemists, Inc.46: 414-416.

Schrieber, R.; Gareis, H. 2007 *Gelatine handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim, 1st edition. Wiley-VCH GmbH & Co.

SEPAQ. Pará volta a ser o maior produtor de pescado do Brasil. Disponível em <http://www.sepaq.pa.gov.br/?q=node/659>. Acesso em 06/03/2015

Sinthusamran. S, Benjakul. S, Kishimura. H. 2013 Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry* 138: 2435–2441

Silva R, Bandeira, SF, Pinto, LAA. 2014. Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Science and Technology* 57:C580-585.

Stainsby, G. Gelatin gels.1987 In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A. J. Bailey (Eds.), *Collagen as food*. Advances in meat research, New York: Van Nostrand Reinhold Company, Inc. 4:209–222.

Stevanato, F.B., Souza, N. E., Matsushita, M., Visentainer, J.V. 2007 Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação de pescado. Pubvet, 7: 1982-1263.

Stori, F. T., Bonilha, L. E. C., Pessatti, M. L. 2002 Proposta de aproveitamento dos resíduos das indústrias de beneficiamento de pescado de Santa Catarina com base num sistema gerencial de bolsa de resíduos. In: Social, Inst. Ethos de Empresas e Resp. Econômico, Jornal Valor. Responsabilidade social das empresas. São Paulo, 390-397.

Stryer, L. Bioquímica. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996

Torley P.J, D'arcy B.R, Trout G.R 2000 The effect of ionic strenght, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. Meat Sci 55:451-62.

Xiong, Y. L. 1997 Collagen. In: Food Proteins and their applications. Ed. Srinivasan damodaram. p. 356-358.

Walrand S, Chiotelli E, Noirt F, Mwewa S, Lassel T. 2008 Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. J Agric Food Chem. ;56(16):7790–5.

Wong DWS. Química de los alimentos: mecanismos y teoría. Zaragoza: Zaragoza; 1995.

Wolf KL, Sobral PJA, Telis VRN 2009. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. Food Hydrocoll. 23(7):1886- 1894.

Yang, H.; Wang, Y.; Zhou, P.; Regenstein, J. M. 2008. Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids* 22: 1541-1550.

Zhou, P.; Mulvaney, S. J.; Regenstein, J. M. 2006. Properties of Alaska Pollock Skin Gelatin: A Comparison with Tilapia and Pork Skin Gelatins. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology* 71(6): 313-321.

CAPÍTULO I: Extração e caracterização da gelatina da pele de filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer condições ótimas de processo para a obtenção de gelatina da pele de filhote e caracterizar as propriedades da gelatina obtida. O processo de extração de gelatina a partir da pele do peixe filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*), utilizando solução de hidróxido de sódio foi otimizado e o produto foi caracterizado através das análises de rendimento, força de gel, cor, viscosidade, perfil de aminoácidos, microscopia eletrônica de varredura, ponto de fusão, capacidade de formar espuma e capacidade emulsificante. As condições otimizadas foram 6 horas de extração na temperatura de 58°C e as condições máximas de desejabilidade de 0,998, obtendo valor de rendimento e força do gel de 19,7% e 244,3 g, respectivamente, ambos considerados aceitáveis para alimentos. Ao comparar as propriedades tecnológicas da gelatina extraída da pele de peixe com a gelatina comercial foi observada diferença ($p < 0,05$) em todos os parâmetros analisados, mas permanecendo dentro do desejável para gelatina. Assim, a gelatina obtida da pele de filhote pode ser uma alternativa para substituir a gelatina de mamíferos, contribuindo na redução de resíduos na indústria do pescado.

Palavras chaves: gelatina; pescado; hidroxiprolina; força de gel.

ABSTRACT

The gelatin extraction process from the skin of kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) using sodium hydroxide was optimized and the product was characterized through analyses of yield, gel strength, color, viscosity, amino acid profile, scanning electron microscopy, melting point, foaming capacity, and emulsifying capacity. The optimized conditions established in the process were 6 h extraction at 58 °C, with yield and gel strength at 19.7% and 244.3 g, respectively, which is considered acceptable for foods. The maximum desirability conditions was 0.998. When the technological properties of the gelatin extracted from fish skin was compared with commercial gelatin, a difference ($p < 0.05$) was observed for all parameters analyzed, but within the appropriate range for gelatin. It is concluded that the gelatin obtained from kumakuma skin may be a new alternative to replace the gelatin from mammals, besides contributing to less fish residue released into the environment.

Keywords: gelatin, fish, hydroxyproline, gel strength.

1. INTRODUÇÃO

A versatilidade da aplicação de gelatina de peixe como alimento depende de suas propriedades como força de gel, viscosidade, ponto de fusão entre outras, e não deve ser vista como um substituto inferior da gelatina tradicional. O estudo de gelatinas extraída de peles e ossos de peixes tem aumentado em substituição a gelatina de mamíferos, e pode ser utilizada na preparação de alimentos, contribuindo na redução de resíduos de pescado e também devido a ocorrência de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE). Esta doença, com incidência em humanos, tem limitado a utilização de subprodutos de origem bovina no processamento de alimentos funcionais, cosméticos e produtos farmacêuticos (Gudmundsson, 2000; Muyonga et al. 2004; Nagarajan et al., 2012).

O colágeno é um importante componente das estruturas de apoio nos vertebrados e invertebrados e em aves e peixes é um importante componente da parede corporal (Herausgegeben, Ward e Courts, 1977). A molécula de colágeno, composta por três cadeias α entrelaçadas, chamada de tripla hélice, adota uma estrutura tridimensional que fornece uma geometria ideal para pontes de hidrogênio (Te Nijenhuis, 1997). A tripla hélice é estabilizada pela referida ponte de hidrogênio. A intensidade das ligações cruzadas é altamente variável e está diretamente relacionada com o tipo de colágeno, tecido, espécie do animal, idade, entre outros (Gómez-Guillén et al., 2002). Cerca de dezenove diferentes tipos de colágeno foram identificados e eles são geralmente extraído com tratamento ácido e solubilizado sem alterar a sua tripla hélice. Contudo, o tratamento térmico cliva as pontes de hidrogênio que estabiliza a configuração da tripla hélice, e converte a sua conformação helicoidal em conformação espiralada resultando em gelatina (Djabourov et al., 1993). A desnaturação do colágeno provoca a separação total ou parcial das cadeias devido à destruição das pontes de hidrogênio, causando a perda da conformação da tripla hélice. Portanto, o colágeno e a gelatina são diferentes formas da mesma macromolécula, sendo a gelatina a forma parcialmente hidrolisada do colágeno (Kim e Mendis, 2006).

O colágeno contém quantidades elevadas de hidroxiprolina e prolina, quanto mais abundantes esses iminoácidos, mais rígido e resistente se torna (Arnesen e Gildberg, 2007). A composição de aminoácidos da gelatina é similar

ao do colágeno de onde foi obtida e é caracterizada pela sequência de gly-x-y, onde x é na maior parte prolina, e y é hidroxiprolina (Herausgegeben, Ward e Courts, 1977). A gelatina é derivada do colágeno desnaturado e as suas propriedades para uma aplicação particular é fortemente influenciada não só pela espécie da qual é extraída, mas também pela fonte de pré-tratamento, da matéria prima e de parâmetros do processo como pH, tempo de maturação do gel, temperatura, etc (Kołodziejska et al., 2008; Gomez-Guillen et al., 2007).

Muitas espécies de peixes têm sido estudadas como matéria-prima para extração de gelatina e avaliação de suas propriedades. Muyonga et al. (2004) estudaram a extração e caracterização físico-química de gelatina de peles e ossos de perca-do-Nilo (*Lates niloticus*) e Bueno et al., (2011) caracterizaram gelatina extraída de peles de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comparando-a com a gelatina suína comercial. Alfaro (2004), otimizou o processo (pré-tratamento alcalino e ácido) e determinou as propriedades funcionais da gelatina de ossos de pescada (*Macrodon ancylodon*) e Kolodziejska et al. (2008), determinaram as condições ideais para a preparação de gelatina de diferentes tipos de resíduos de peixe. No entanto, os estudos utilizando procedimentos de otimização para a extração são reduzidos, sendo esta uma ferramenta importante para a compreensão das condições de processamento e obtenção do produto final com as características desejadas (Shahiri et al., 2010).

Muitas espécies amazônicas de peixe podem ser utilizadas para a obtenção de gelatina, por serem espécies de clima e água tropical que apresentam características superiores às espécies de clima temperado. Colágeno de peixes de água quente, possuem conteúdo de iminoácidos superior a peixes de água fria (Gudmundsson e Hafsteinsson, 1997), resultando em gelatinas com melhores propriedades funcionais (Leuenberger 1991; Grossman e Bergman 1992; Gilsenan e Rross-Murphy 2000).

As espécies comercializadas na forma de filés, em indústrias, feiras livres e supermercados da região, geram uma quantidade considerável de peles, as quais são descartadas como resíduo e se apresentam como uma alternativa viável para produção de gelatina sendo o filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) uma dessas espécies. O objetivo deste estudo foi estabelecer condições ótimas de processo para a obtenção de gelatina da pele de filhote e caracterizar as propriedades da gelatina otimizada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas peles frescas da espécie de peixe filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*), adquiridas no Mercado de Peixe de Belém (Ver-o-peso) e transportadas refrigeradas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) na Universidade Federal do Pará (UFPA), para posterior utilização.

2.1 Obtenção da gelatina

O colágeno foi obtido seguindo metodologia descrita por Montero e Gómez-Guillén (2000), com adaptações. Após lavagem em água corrente, as peles do peixe foram cortadas tamanhos de 4 cm x 4 cm. Inicialmente foram imersas em solução aquosa de NaCl 0,6M por 15 min, posteriormente em solução de NaOH a 0,3 M por 15 min e finalmente em ácido acético ($C_2H_4O_2$) a 0,02M por 60 minutos. Em todas as etapas a imersão ocorreu sob agitação, com posterior lavagem das peles em água com 3 repetições. O material resultante das etapas anteriores foi adicionado de água e colocado em banho-maria para extração do colágeno. Após o aquecimento, o material sobrenadante foi recolhido e submetido à filtração em papel de filtro Whatman nº4. O colágeno desnaturado obtido foi colocado em bandejas, congelado -50°C e liofilizado por 30 horas. O produto liofilizado (gelatina) foi embalado a vácuo e armazenado -22°C e posteriormente submetido aos ensaios do planejamento experimental.

2.2 Planejamento experimental

No planejamento experimental foram utilizados o delineamento composto central rotacional (DCCR) sendo as variáveis independentes tempo de extração e temperatura de extração. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR) para definir as melhores condições para as respostas rendimento total do processo e força do gel. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Foram realizados onze ensaios (quatro primeiras colunas da Tabela 1), sendo quatro fatoriais (combinação entre os níveis ± 1), três no ponto central (duas variáveis no nível 0) e quatro axiais (uma variável no nível $\pm \alpha$ e a outra

variável no nível 0). Para cada resposta foi verificada a significância das variáveis ou interações, utilizando uma equação polinomial (Equação 1).

$$Y = f(X) = \beta_0 + \beta_1(A) + \beta_{11}(A)^2 + \beta_2(B) + \beta_{22}(B)^2 + \beta_{12}(AB) \quad (1)$$

onde,

Y: variável dependente (rendimento e força do gel);

β_0 : constante;

β_i e β_{ij} : coeficientes de regressão;

X_i e X_j : níveis das variáveis independentes.

Os desvios e desvios relativos entre os valores experimentais e preditos pelos modelos, para as respostas na condição ótima, foram calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente:

$$\text{Desvio} = Y - \bar{Y} \quad (2)$$

$$\text{Desvio Relativo} = \frac{Y - \bar{Y}}{Y} * 100 \quad (3)$$

onde, Y = resposta experimental e \bar{Y} = resposta predita pelo modelo.

Para a determinação do ponto ótimo do planejamento foi aplicada a função desejabilidade.

2.3 Determinações físico-químicas

Foram realizadas análises de umidade (método nº 950.46), proteínas totais fator com de correção 5,55 (método nº 928.08), lipídeos (método nº 960.39) e cinzas (método nº 920.153), segundo AOAC (2002). O pH da pele foi determinado pelo método nº 981.12 da AOAC (2002) e da gelatina pela metodologia proposta por Schrieber e Gareis (2007). Para a determinação do perfil de aminoácidos totais foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta performance Waters-PICO Tag™, Waters Model 712 WISP (Waters, Watford, Herts, UK), segundo o método proposto por White, Hart and Fry (1986). A atividade de água foi determinada em higrômetro eletrônico Aqualab, 3TE - Decagon Devices Inc.USA. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para determinação da cor instrumental foi utilizado um colorímetro (marca Minolta, modelo CR 310, Japan), no espaço CIE (Comission Internacionale de

l'Eclairage) L^* , a^* , b^* , onde: L^* : luminosidade; a^* : intensidade da cor vermelha; b^* : intensidade da cor amarela. Foram calculados o índice de saturação C^* e o ângulo de tonalidade h° (Hunterlab, 2008).

2.4 Determinação das propriedades tecnológicas

Foram determinadas as propriedades tecnológicas da gelatina de peixe e gelatina comercial Royal® sem sabor, sob as mesmas condições experimentais. O rendimento total (%) e o rendimento da gelatina foi calculado pela razão entre o peso da gelatina e o peso úmido da pele (Binsi et al., 2009). A força do gel (Bloom) foi determinada em analisador de textura, usando sonda de teflon cilíndrica, com 12,5 mm de diâmetro, pressionando 4 mm no gel de gelatina com velocidade de 1 mm/s (Choi e Regenstein, 2000).

As análises morfológicas foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo LEO-1430, USA. As amostras foram metalizadas com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 minutos. As condições de análises para as imagens de elétrons secundários foram: corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kV e distância de trabalho = 15 mm. O ponto de fusão foi baseado na metodologia de Choi e Regenstein (2000). A capacidade de formar espuma (CFE), foi determinada em soluções de gelatina, em diferentes concentrações (1, 2 e 3%), homogeneizadas a 1750 rpm por 1 min a temperatura ambiente (24°C). A CFE foi calculada pela razão entre os volumes antes e após a homogeneização (Shahiri et al., 2010).

A capacidade emulsificante (CE) foi determinada segundo Shahiri et al., (2010), com modificações. Foram misturados 20 mL de solução de gelatina a 3,3%, com 20 mL de óleo de soja. A mistura homogeneizada a 1750 rpm por 30 segundos foi posteriormente centrifugada a 2000 xg por 5 minutos. A CE foi calculada como a razão entre o volume da porção emulsificada e o volume inicial. A viscosidade utilizou metodologia descrita por Yang et al., (2008). A amostra colocada em banho a 45°C foi transferida para o viscosímetro de Ostwald-Fensk (n° 100), em seguida para o banho a 60°C durante 10 minutos para a estabilização da temperatura, sendo realizada a leitura e o valor expresso em centipoise (cP).

2.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para determinar as diferenças significativas nas médias das análises realizadas nas gelatinas, com intervalo de 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o software STATISTICA 7 for Windows.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização do processo de obtenção da gelatina

Nas duas últimas colunas da Tabela 1 são apresentados os resultados experimentais obtidos para o rendimento (%) e a força do gel (g) da gelatina.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental 2^2 com os resultados obtidos para rendimento (%) e força do gel (g).

Ensaio	Codificado		Real		Resposta	
	A	B	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	Força do gel (g)
1	-1.00	-1.00	7.0	40.0	12.0	89
2	-1.00	1.00	7.0	60.0	24.7	166
3	1.00	-1.00	11.0	40.0	16.0	97
4	1.00	1.00	11.0	60.0	24.7	86
5	-1.41	0.00	6.0	50.0	10.0	301
6	1.41	0.00	12.0	50.0	19.4	225
7	0.00	-1.41	9.0	35.8	8.0	70
8	0.00	1.41	9.0	64.1	23.0	121
9	0.00	0.00	9.0	50.0	18.2	256
10	0.00	0.00	9.0	50.0	15.7	240
11	0.00	0.00	9.0	50.0	14.7	210

As estimativas dos coeficientes dos fatores para o modelo de cada resposta avaliada estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos estimados das variáveis dos polinômios de segunda ordem (eq. 1) associada a significância para cada resposta estudada (erro puro).

Fatores	Rendimento (%)		Força do gel (g)	
	Efeitos	p-valor	Efeitos	p-valor
Constante	16,3635	0,0040	232,6420	0,0033
A	4,2588	0,0749	-43,7650	0,1119

AA	0,2499	0,8733	-1,4590	0,9425
B	10,6625	0,0139	33,5680	0,1790
BB	1,3472	0,4711	-172,287	0,0128
AB	-2,0000	0,3772	-44,0000	0,2002

A = Tempo de extração (h); B = Temperatura de extração (°C)

Os efeitos destacados em negrito indicam que a variável apresentou efeito significativo ($p < 0,05$).

Com relação ao rendimento total, os efeitos foram significativos ($p < 0,05$) para temperatura de extração linear (B), onde o aumento da temperatura provocou uma elevação no rendimento da gelatina. O emprego de temperaturas elevadas provoca maior hidrólise do colágeno propiciando maiores rendimentos (Holzer, 1996). A temperatura de extração quadrática (BB) apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) negativo sobre a força do gel, ou seja, um aumento deste fator pode acarretar redução da força do gel.

Na Tabela 3 pode ser observado que o valor F calculado para a falta de ajuste foi inferior ao F tabelado, tanto para o rendimento como para a força do gel. O valor de R^2 foi de 0,83 para os dois parâmetros estudados, indicando que o modelo definiu o comportamento do processo de forma adequada, explicando 83% da variação dos dados experimentais. Adicionalmente, a falta de ajuste, para as equações das respostas rendimento e força do gel não foram significativas ($p \geq 0,05$), indicando que as equações podem ser utilizadas para fins preditivos, no domínio experimental estudado.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para rendimento e força do gel em função das variáveis independentes, teste F e R^2 .

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F cal.	F tab.	R^2
Rendimento						
Regressão	272,24	1	272,24	46,68	18,51	0,83
Resíduo	52,48	9	5,83			
Falta de ajuste	45,17	7	6,45	1,98	19,35	
Erro	6,50	2	3,25			
Total	324,727300	10	32,47273			
Modelo $16,36 + 5,66(B)$						
Força do gel						
Regressão	54392,12	1	54392,12	24,62	18,51	0,83
Resíduo	11045,51	9	1227,22			

Falta de ajuste	8264,42	7	1180,63	2,16	19,35
Erro	1090,67	2	545,33		
Total	65437,64	10	6543,76		

Modelo 232,64 – 86,14(BB)

SS: sum of squares; DF: degrees of freedom; MS: mean square, LF: lack of fit

Tomando como base os dados experimentais, o emprego de temperaturas mais elevadas resultou em maiores rendimentos. No entanto, foi observado um decréscimo da força do gel da gelatina, o qual é atribuído à formação de maior quantidade de compostos de baixo peso molecular (Holzer, 1996), sendo adequada a temperatura de extração de até 60°C (Fig. 1).

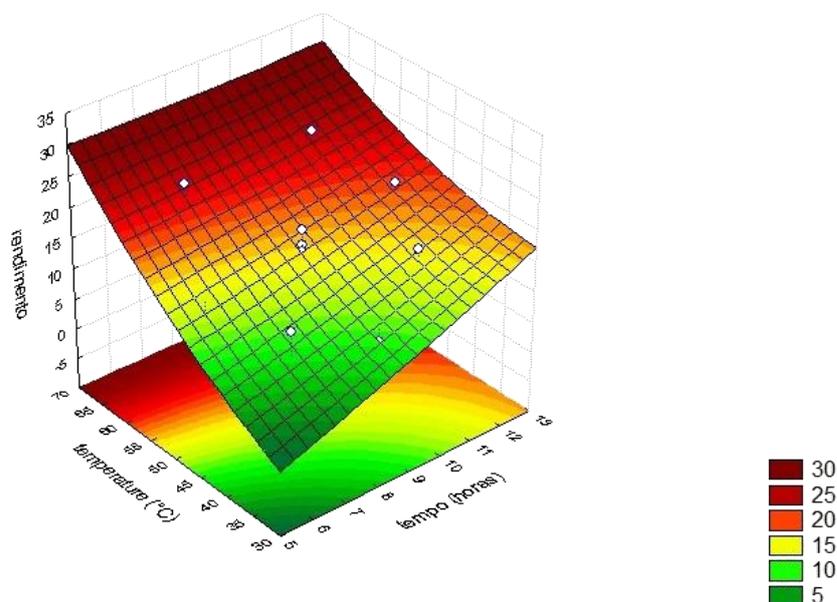


Figura 1: Superfície de resposta do rendimento em função do tempo (horas) e temperatura de extração (°C) de gelatina pré tratada com NaOH.

Pode-se observar (Fig. 2) que a elevação da temperatura e do tempo de extração provocou um incremento na força do gel, no entanto, com o gradativo aumento da temperatura, a força do gel decresceu. Os maiores valores da força do gel foram obtidos para temperaturas entre 50 e 60°C e tempos de 6 a 9 horas. Biluca, Marquetti e Alfaro (2011) observaram que a variação do tempo e da temperatura de extração apresentou grande influência sobre o rendimento da gelatina. Arnesen e Gildberg (2002) e Muyonga, Cole e Duodu (2004)

relataram que gelatinas obtidas por extrações a altas temperaturas, apresentam perfil de peso molecular menor do que a fração resultante de temperaturas mais baixas. Foi observado por Cho et al. (2005), que a temperatura de extração pode ser um fator chave para o processamento de gelatinas, pois temperaturas acima de 60°C podem levar à extração de proteínas de baixo peso molecular, aumentando o rendimento, porém reduzindo a força do gel.

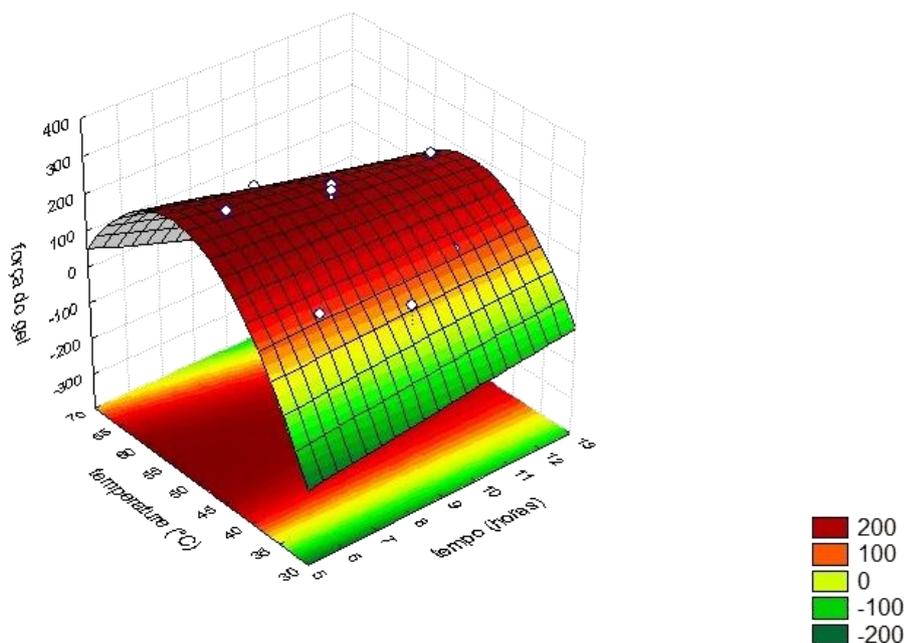


Figura 2: Superfície de resposta da força do gel em função do tempo (horas) e temperatura de extração (°C) de gelatina pré tratada com NaOH.

A Figura 3 mostra o gráfico da função desejabilidade para as respostas rendimento e força do gel. Observa-se que em 6 horas de extração a 58°C foram encontradas as condições máximas de desejabilidade (0,984), sendo possível obter valores de rendimento e força do gel de 19,7% e 244,3 g, respectivamente; ambos desejáveis. Jamilah e Harvinder (2002) encontraram rendimento para gelatina de duas espécies de tilápia de 6% e 19% e a força de gel entre 250 e 260 g.

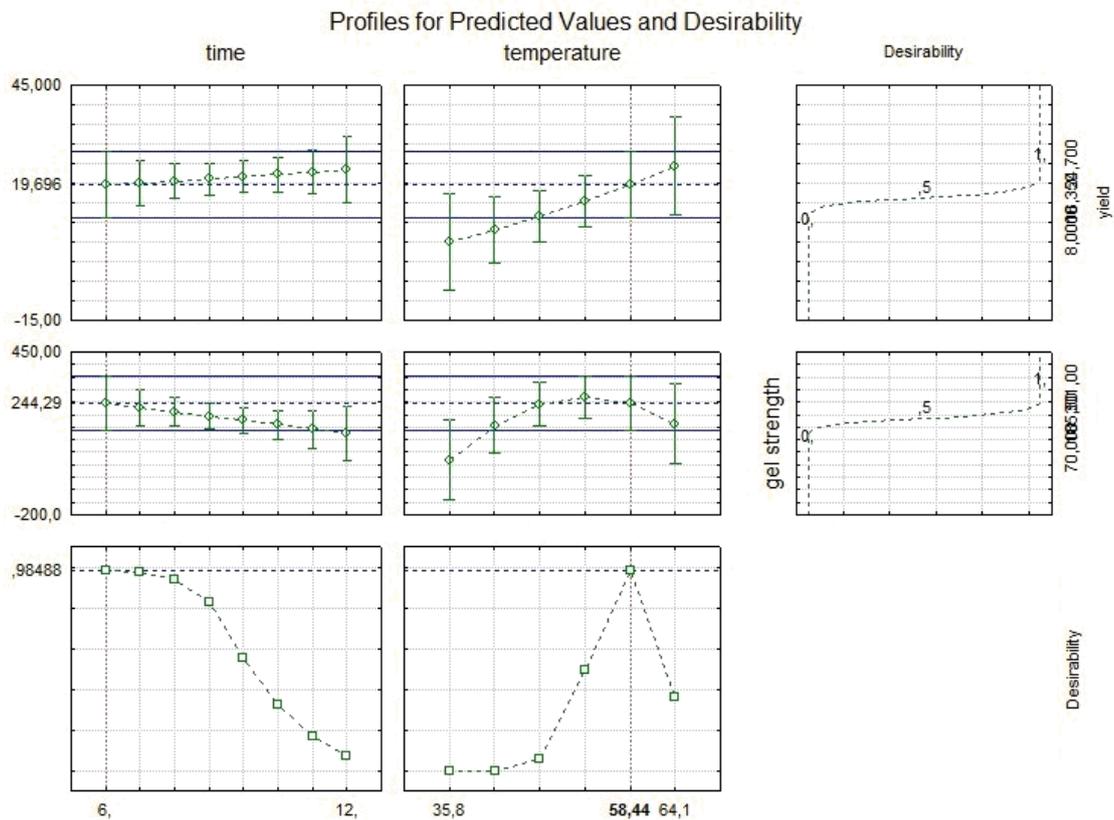


Figura 3: Função de desejabilidade para rendimento e força de gel.

Foram realizados ensaios para obtenção da gelatina, nas condições ótimas de temperatura (58°C) e tempo de extração (6 h), para comparar os valores experimentais das respostas rendimento e força do gel, com os valores preditos pelos modelos de regressão. A diferença entre o valor experimental e predito resultou num baixo desvio relativo (2% rendimento e 7% força do gel), demonstrando que o modelo pode ser utilizado para prever o rendimento e a força de gel da gelatina, dentro da faixa experimental estudada.

3.2 Caracterização físico-química da pele e da gelatina

Na Tabela 4 são apresentadas as propriedades físico-químicas da pele e da gelatina extraída a partir da pele de filhote.

Tabela 4. Propriedades físico químicas da pele e da gelatina extraída da pele de filhote

Componentes*	Pele	Gelatina
Umidade (%)	58,83 ± 0,57	7,51 ± 0,40
Lipídios (%)	14,25 ± 0,22	29,70 ± 2,48
Proteínas (%)	31,08 ± 0,99	72,76 ± 2,02
Cinzas (%)	0,37 ± 0,04	0,13 ± 0,04
pH	6,72 ± 0,01	9,06 ± 0,07
Atividade de água	0,98 ± 0,06	0,25 ± 0,01

* 3 replicatas

A umidade da pele está de acordo com o valor encontrado em pele de corvina (62,3%) e “shortfin scad” (*Decapterus macrosoma*) de 60,4% (Cheow et al., 2007). Por sua vez, a umidade da gelatina foi similar a observada por Cho et al. (2004) em gelatina de cartilagem de tubarão (7,98%) e inferior a observada por Eastoe e Leach (1977) em gelatinas comerciais (9 a 14%).

O teor de gordura na pele foi elevado (14,25± 0,22%), o que é uma característica da espécie do peixe estudada, que é classificado com peixe gordo (Souza et al., 2004). Shahiri et al. (2012) observaram conteúdo similar de lipídeos (13,12%), em pele de truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*). O elevado teor de lipídios da gelatina (29,7±2,48%) sugere a necessidade da extração da fração lipídica da pele do peixe, antes da extração do colágeno. O teor de proteína da pele do filhote (31,08 ± 0,99%) foi semelhante ao valor encontrado por Bueno et al. (2011) (28,5 ± 1,8%). É importante ressaltar que o teor de proteína na pele representará a quantidade de colágeno na gelatina e consequentemente o rendimento da extração (Biluca, Marquetti e Alfaro, 2011). A gelatina obtida apresentou um teor proteico (72,76 ± 2,02%) inferior ao observado por Alfaro (2013) de 81,16 ± 2,15%, em gelatina de pele de tilápia. O teor de cinzas na pele e na gelatina foi inferior ao relatado por Bueno et al. (2011) para pele de tilápia (1,9%) e por Haug et al., (2004) para a gelatina de peixes de água fria (0,82%).

Foi observado um valor mais elevado de pH na gelatina, em relação a pele, o que é atribuído ao tratamento químico com NaOH empregado na etapa de extração do colágeno (Gudmundsson e Hafsteinsson, 1997). De acordo com Shahiri (2012), a solubilidade do colágeno é mínima em pH 7 e 9, o que dificulta a dissolução da gelatina em água.

De acordo com o perfil de aminoácidos (Tabela 5) o teor total de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina) na pele e na gelatina liofilizada foi de 13,67% e 13,53%, respectivamente. Valor superior de iminoácidos foi encontrado por Alfaro et al. (2013) de 19,5%, em gelatina da pele de tilápia-do-nilo (*Johnius dussumieri*). O teor de iminoácidos constitui a principal diferença entre gelatina de peixe e gelatina de mamífero. Estes estabilizam as estruturas durante a formação do gel e proporcionam melhores propriedades viscoelásticas em gelatina de pele de peixe (Foegeding et al., 1996). A Lis também estabiliza a estrutura da gelatina formando ligações cruzadas entre as cadeias. Valores na pele (3,08%) e na gelatina de pele de filhote (3,43%) foram superiores ao encontrado por Cho et al. (2004) para gelatina de cartilagem de tubarão (2,27%). Gelatina de peixe de água fria contém menos iminoácidos que gelatina de peixe de água quente, a qual é mais similar à gelatina de mamífero (Haug et al., 2004). A transformação do colágeno em gelatina produz mudanças na composição molecular de vários aminoácidos (Taheri et al., 2009). A glicina foi o aminoácido majoritário, tanto na pele quanto na gelatina da pele de filhote.

Tabela 5. Perfil de aminoácidos totais presentes na pele e gelatina de filhote (g/100g de proteína).

Aminoácidos (g/100g)	Pele	Gelatina
Aspartato (Asp)	5,92	5,11
Glutamato (Glu)	9,10	9,44
Hidroxiprolina (HPro)	8,48	8,76
Serina (Ser)	1,85	1,86
Glicina (Gly)	23,77	25,33
Histidina (Hys)	0,36	0,26
Taurina (Tau)	2,74	2,34
Arginina (Arg)	5,13	5,98
Treonina (Thr)	10,60	10,63
Alanina (Ala)	10,36	11,17
Prolina (Pro)	5,19	4,777
Tirosina (Tyr)	0,63	0,49
Valina (Val)	2,70	2,41
Metionina (Met)	1,60	1,64
Cisteína (Cys)	0,04	0,01
Isoleucina (Ile)	1,24	1,30
Leucina (Leu)	3,36	3,21
Fenilalanina (Phe)	2,42	1,60

Lisina (Lis)	3,08	3,43
Triptofano (Trp)	0,06	0,17
Total	98,60	99,91

3.3 Caracterização tecnológica da gelatina

A Tabela 6 apresenta os resultados da caracterização tecnológica da gelatina da pele de filhote e da gelatina comercial, utilizada para efeitos de comparação.

Tabela 6. Caracterização tecnológica da gelatina de filhote e de gelatina comercial.

Componentes	Gelatina de Filhote	Gelatina Comercial
Rendimento (%)	18,27 ± 0,65	-
Força de gel (g)	263,66 ± 8,43 ^b	298 ± 14,38 ^a
Viscosidade (cP)	4,91 ± 0,14 ^a	4,20 ± 0,205 ^b
Ponto de Fusão (°C)	23,73 ± 0,20 ^b	28,16 ± 0,235 ^a
Poder emulsificante (%)	49,37 ± 0,02 ^a	46,67 ± 0,04 ^b
Poder espumante		
Solução 1%	120 ± 0,04 ^b	127 ± 0,06 ^a
Solução 2%	130 ± 0,02 ^b	137 ± 0,04 ^a
Solução 3%	140 ± 0,01 ^b	159 ± 0,03 ^a
L* (Luminosidade)	61,83 ± 1,12 ^b	76,15 ± 0,36 ^a
a* (verde-vermelho)	-2,24 ± 0,07 ^a	-3,39 ± 0,065 ^b
b* (azul-amarelo)	9,72 ± 0,71 ^a	27,16 ± 0,288 ^b
c* (croma)	9,97 ± 0,71 ^b	27,37 ± 0,293 ^a
h* (ângulo de tonalidade graus)	103,02 ± 0,50 ^a	97,18 ± 0,074 ^b

Teste de Tukey, com intervalo de 95% de confiança ($p < 0,05$). Médias de três determinações

O rendimento de extração da gelatina da pele de filhote foi similar a observada por Songchotikunpan et al. (2008) (18,1%) e Bueno et al. (2011) (18,3%), para a gelatina da pele de tilápia. Esse rendimento pode variar com o método de extração empregado e com a idade e a espécie do peixe utilizado (Muyonga et al., 2004; Jongiareonrak et al., 2006). Temperaturas mais elevadas também promovem maiores rendimentos e a extração completa (Holzer 1996).

A força do gel da gelatina da pele de filhote e da gelatina comercial foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), mas estão dentro da faixa desejada para alimentos (50-300g). Gelatinas comerciais geralmente

apresentam força do gel entre 90 e 300 g, sendo desejáveis valores entre 250 e 260 g (Jones 1977; Karim e Bhat 2009). A força do gel é a principal propriedade física da gelatina e determina o seu valor comercial.

A consistência do gel é a propriedade determinada pela composição em aminoácidos no produto. Na gelatina de peixe estudada o teor dos iminoácidos Pro e Hyp pode ser relacionado com as boas propriedades viscoelásticas do produto. A força do gel é mais estável quando o conteúdo de Hyp e Pro é maior e a quantidade de componentes de baixo peso molecular é menor (Gómez-Guillen et al., 2002). A distribuição de peso molecular em gelatina é função da fonte da qual ela é extraída. Gelatinas de peixes têm menor peso molecular que gelatinas de suínos e de bovinos (Muyonga et al 2004; Chiou et al., 2006). A gelatina extraída de peles da cabeça de carpa comum apresentou força do gel de 240 g (Silva et al., 2011). Grossman e Bergman (1992) e Muyonga et al. (2004) observaram valores de força do gel de 263 g e 229 g, para gelatina de pele de tilápia e de perca do Nilo, respectivamente.

A viscosidade da gelatina da pele de filhote foi superior à viscosidade da gelatina comercial ($p < 0,05$), porém dentro da faixa de viscosidade de 2 a 7 cP observada para gelatinas comerciais (Johnston-Banks 1990; Jamilah e Harvinder 2002). Silva, Bandeira e Pinto (2014) observaram viscosidade de 4,32 cP para a gelatina da pele de cobia (*Rachycentron canadum*), enquanto Grossman e Bergman (1992) observaram valor de 5,1cP para a gelatina da pele de tilápia.

O ponto de fusão da gelatina de peixe obtida foi inferior ($p < 0,05$) ao valor observado para a gelatina comercial usada como referência. Este comportamento pode ser explicado pelos menores teores dos aminoácidos Hpr e Pro na gelatina de peixe, quando comparada com a gelatina de mamíferos (15-20%) (Grossman e Bergman, 1992). A temperatura de fusão de gelatinas de pescado pode variar em função de fatores como: fonte de colágeno, método de preservação da matéria-prima, condições de extração da gelatina, composição em aminoácidos e distribuição de massa molar (Gilsenan e Ross-Murphy, 2000). Cho et al. (2005) observaram ponto de fusão de 24,3°C para gelatina de tuna (*T. albacares*) e Bueno et al. (2011) relataram valores de 24 a 26°C para o ponto de fusão da gelatina da pele de tilápia-do-nilo.

O poder emulsificante da gelatina da pele de filhote foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao observado para a gelatina comercial. De acordo com Guo et al. (1996), as alterações físico-químicas causadas pelo processamento térmico podem provocar a redução da capacidade emulsificante devido a alterações na estrutura da proteína, resultando em decréscimo na concentração de proteína disponível para a emulsificação. A capacidade de emulsificação depende do grau de exposição de resíduos hidrofóbicos no interior da gelatina. O aminoácido hidrofóbico Tyr representou 0,63% da gelatina da pele de filhote. Cho et al. (2004) encontrou de 0,10 a 0,24% de Tyr na gelatina de pele suína. A maior quantidade de Tyr na gelatina do peixe foi provavelmente responsável pela sua maior capacidade de emulsificação (Shahiri et al., 2012). Rawdkuen et al. (2013) observaram capacidade emulsificante para a gelatina de peixe ($38,37 \pm 0,72\%$) superior à observada para a gelatina comercial de bovino ($36,40 \pm 1,01$).

Para as diferentes concentrações de proteína, as soluções da gelatina da pele de filhote apresentaram capacidade de formação de espuma estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) à gelatina comercial. Por sua vez, para todas as soluções de gelatina a capacidade de formação de espuma aumentou com o incremento da concentração proteica. As superfícies hidrofóbicas da cadeia de peptídios são responsáveis por atribuir à gelatina sua propriedade emulsificante e de formação de espuma (Galazka et al 1999; Cole 2008). Rawdkuen et al. (2013) observaram que gelatinas de pele de peixe apresentaram maior poder espumante quando comparadas com gelatina comercial. Jellouli et al. (2011) relataram que a diferença na capacidade de formação de espuma, entre gelatinas de pele de peixe e bovinas pode ser atribuída ao teor dos aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Ileu, Leu, Pro, Met, Phe e Tyr.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os parâmetros de cor analisados, entre a gelatina da pele de filhote e a gelatina comercial analisada. A gelatina da pele do peixe apresentou coloração clara e brilhosa, enquanto que a gelatina comercial apresentou cor amarela intensa. A cor das gelatinas comerciais geralmente varia de amarelo pálido a âmbar escuro (Cole e Roberts, 1997). A diferença de cor entre gelatinas pode ocorrer devido à presença do pigmento melanina, de cor marrom-escuro, produzido pelos

melanócitos, presente na pele de peixe (Junqueira e Carneiro, 2008) ou devido ao processo de fabricação. A extração térmica da gelatina provoca reações de Maillard (Wang, Kian, Yao, 2011), assim a intensidade da coloração depende da temperatura de extração.

A turbidez das soluções de gelatina é um atributo que pode ou não ser importante, dependendo da aplicação. O atributo cor tem significado prático em produtos de confeitaria, que são frequentemente coloridos. Quanto menor for a variação da cor dos ingredientes de confeitaria, mais fácil será produzir um produto uniforme (Cole e Roberts, 1997).

3.4 Morfologia da gelatina

As eletromicrografias da gelatina da pele de filhote (Fig. 4) mostram claramente a formação de poros interligados, canais capilares e ligações cruzadas na periferia dos poros. No processamento da gelatina, durante a liofilização, há a formação de cristais de gelo durante o congelamento, seguida da sublimação durante a secagem a vácuo, provoca a formação de poros (Frydrych et al., 2011).

Grandes espaços vazios e desuniformes foram observados na estrutura da gelatina. Geralmente, o arranjo e associação de moléculas de proteína na matriz do gel contribuem diretamente para a resistência do gel de gelatina (Benjakul et al., 2009). A microestrutura do tecido de gel está relacionada com as propriedades físicas da gelatina (Yang et al., 2008). Géis com cadeias mais grossas pode ser desestruturado mais dificilmente por uma força aplicada, resultando em maior força do gel. Resultados semelhantes foram observados por Soottawat et al. (2009), Bhat, Tripathi e Kumar (2011), Liu et al. (2012), Henderson et al. (2013), em gelatina de pele de peixe.

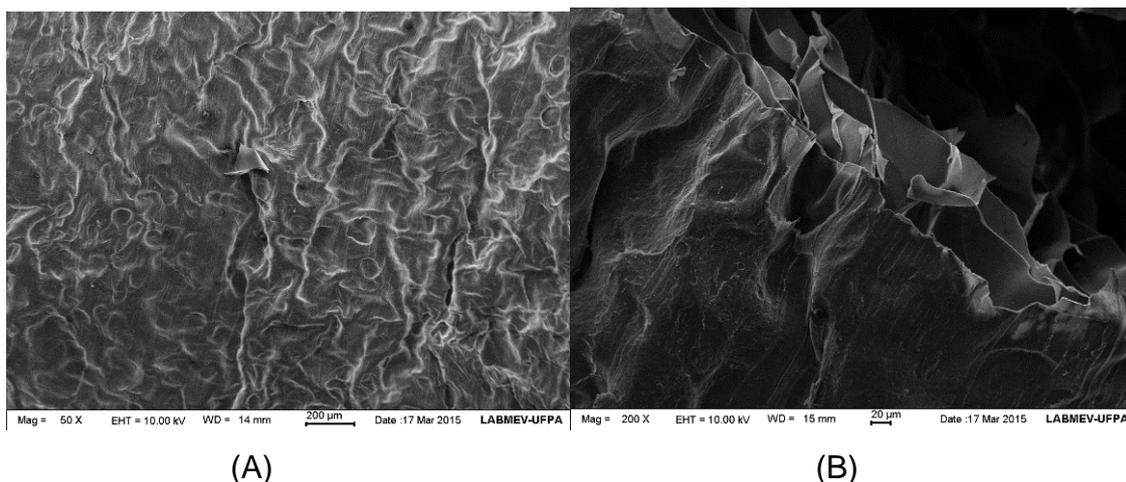


Figura 4: Micrografia eletrônica da gelatina de filhote nas dimensões 50x (A) e 200x (B).

4 CONCLUSÃO

De acordo com o modelo proposto, as condições ótimas de extração foram estabelecidas no tempo de 6 horas de extração e temperatura de 58 °C tendo efeito positivo no rendimento e força de gel. A gelatina de filhote apresentou coloração clara e brilhante e valores de aminoácidos inferiores ao relatados na literatura para peixe de água quente. A gelatina de pele de filhote e a gelatina comercial apresentaram propriedades químicas e funcionais dentro da faixa adequada para alimentos, podendo a gelatina de peixe ser considerada uma alternativa adicional para as indústrias de alimentos e áreas afins.

REFERÊNCIAS

- Alfaro, AT. (2004). Otimização do Processo e Determinação das Propriedades Funcionais da Gelatina de ossos de pescado. Dissertação, Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 103p. Rio Grande.
- Alfaro, AT, Fonseca, GG, Balbinot, E, Machado, A, Prentice, C (2013). Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. Food Scin. Technol 33: 592-595.
- Arnesen, JA, Gildberg, A. (2002). Preparation and characterisation of gelatine from the skin oh harp seal (*Phoca groenlandica*). Bioresource Technology, 82(2), 191-194.
- Benjakul, S, Oungbho, K, Visessanguan, W., Thiansilakul, Y. and Roytrakul, S. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. Food Chemistry 116 (2): 445-451.
- Bhat, S. Tripathi, A. Kumar, A. (2011). Supermacro porous chitosan–agarose–gelatin cryogels: *in vitro* characterization and *in vivo* assessment for cartilage tissue engineering. J R Soc Interface. 2011 Apr 6; 8(57): 540–554.
- Biluca, FC, Marquetti, C, Alfaro, AT. (2001). Produção de gelatina de pele e ossos de bagre (*Clarias gariepinus*). Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. 05: 418-426.
- Binsi, PK, Shamasundar, BA, Dileep, AO, Badii, F. Howell, NK. (2009). Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. Food Hydrocolloids, 23(1): 132–145.
- Bueno, CM, Alvim, ID, Koberstein, TCRD, Portela, MC, Grosso, C. (2011). Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. Brazilian Journal of Food Technology, 14: 65–73.

Cheow, CS, Norizah, MS, Kyaw, ZY, Howell, NK. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). Food Chemistry 101 (2007) 386–391.

Chiou, B, Avena-Bustillos, R. J, Shey, J, Yee, E, Bechtel, PJ, Imam, SH, Glenn, GM, Orts, WJ. (2006). Rheological and mechanical properties of cross linked fish gelatins. Polymer, 47: 6379–6386.

Cho, SM, Park, DC, Gu, YS, Ji, CI, Jang, DH, Lee, YB, Kim, SB (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrichus*) cartilage. Food Hydrocolloides. 18(4): 573-579.

Cho, SM, Gu, YS, Kim, SB. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids, 19: 221–229.

Choi, SS, Regenstein, JM. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. Journal of Food Science, 65: 194-199.

Cole, CGB, Roberts, JJ. (1997). Gelatine colour measurement. Meat Science, 45: 23-31.

Cole, ET, Cad, D, Benameur, H. (2008). Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. Advanced Drug Delivery Reviews, 60:747-756.

Djabourov, M.; Lechaire, L.; Gaill, F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. Biorheology. v. 30, 191-205, 1993.

Eastoe, JE, Leach, AA. (1997). Chemical constitution of gelatin. The Science and Technology of Gelatin. London: Academic Press, 73-108.

Foegeding, EA, Lanier, TC, Hultin, HO, (1996). Collagen In: O. R. Fennema (Ed.), Food chemistry. New York 3rd 902–906.

Frydrych, M, Wan, C, Stengler, R, O'Kelly, KU, Chen, B. (2011). Structure and mechanical properties of gelatin/sepiolite nanocomposite Foams J.Mater.Chem, 9103–9111.

Galazka, VB, Dickinson, E, Ledward, DA. (1999). Emulsifying behavior of globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: Comparison of thermal and high-pressure treatments. Food Hydrocolloids. 13:425-435.

Gilsenan, PM, Ross-Murphy, SB. (2000). Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. Food Hydrocolloids. 14:191-195.

Gomez-Guillén, MC, Fernández-Díaz, MD, Ulmo, N, Lizarbe, MA, Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids, 16:25-34.

Gómez-Guillen, MC, Ihl, M, Bifani, V, Silva, A, Monteiro, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Tucz). Food Hydrocolloids. 21(7): 1133-1143.

Grossman, S, Bergman, M. (1992). Process for the production of gelatin from fish skin. United States Patent No 5,093, 474.

Gudmundsson, M, Hafsteinsson. H. (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. Journal of Food Science, 62: 37-39.

Gudmundsson, M. (2000). Rheological properties of fish gelatins. Journal of Food Science, 67: 2172–2176.

Guo, MR, Fox, PF, Flynn, A, Kindsted, PS. (1996). Heat-induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. International Dairy Journal. 6:489-498.

Haug, IJ, Draget, KI, Smidsrod, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*. 18:203–213.

Henderson, LA, Stathis,A, James,C, Brown,R, McDonald,S, Macefield, VG, (2013). Real-time imaging of cortical areas involved in the generation of increases in skin sympathet- ic nerve activity when viewing emotionally charged images. *NeuroImage* 62.

Herausgegeben V, Ward, AG, Courts, UA. (1977). *The Science and Technology of Gelatin*. London. Academic Press, p. 508–557.

Holzer, D. (1996). Gelatin production. US Patent 5.484.888.

Hunterlab Inc. (2008). Applications Note: CIE L * a * b * Color Scale. 8:1–4.

Jamilah, B, Harvinder, KG. (2002). Properties of gelatins from skins of fish: black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77:81-84.

Jellouli, K. Balti, R. Bougatef, A. Hmidet, N, Barki, A. Nasri, M, (2011). Chemical composition and characteristic of skin gelatin from gray triggerfish (*Balistes capriscus*) *LWT Food Science and Tecnology*, 44(9) 1965-1970.

Johnston-Banks, FA. (1990). *Gelatin*. Food gels, New York: Elsevier Applied Food Science Series, 233-289.

Jones, NR. (1977). Uses of gelatin in edible products. In: Ward, A. G.; Courts, A. (Ed.). *The Science and Technology of Gelatin*. London: Academic Press; 365-394.

Jongiaronrak, A, Benjakul, S, Visessanguan, W, Tanaka, M. (2006). Skin gelatin from bigeye snapper and borwnstripe red snapper: chemical

compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food hydrocolloids*, 20:1216-1222.

Junqueira, LC, Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica: Texto/ Atlas*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 524 p.

Karim, AA, Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23:563–576.

Kim, S. K.; Mendis, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International*. v. 39, p. 383-393, 2006.

Kolodziejska, I, Skierka, E, Sadowska, M, Kolodziejski, W, Niecikowska, C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*, 700-706.

Leuenberger, BH. (1991). Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloids*, 5(4), 353-361.

Liu, H, Li, X, Zhou, G, Fan, H, Fan Y. (2012). Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 32, no. 15, pp. 3784–3793.

Montero, P, Gómez-Guillén, MC. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*. 65:434-438.

Muyonga, JH, Cole, CGB, Duodu, KG. (2004). Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18:581-592.

Nagarajan, M, Benjakul, S, Prodpran, T, Songtipya, HK. (2012). Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperature. *Food Hydrocolloids*, 29:389-397.

Official methods of analysis (AOAC) (2002). Association of Analytical Communities 17^a ed.

Rawdkuen, S, Thitipramote, N, Benjaku, S. (2013). Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. *International Journal of Food Science and Technology* 1093–1102.

Schrieber, R. and Gareis, H. (2007). *Gelatin handbook e Theory and industrial practice*. Wiley-VCH.

Shahiri TH, Maghsoudlou, Y, Motamedzadegan, A, Mahoonak, ARS. (2010). Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource Technology* 101:6207–6214.

Shahiri TH, Maghsoudlou, Y, Motamedzadegan, A, Sadeghi MAR, Rostamzad, H. (2012). Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *International Food Research Journal* 19(1): 251-257.

Silva R, Bandeira, SF, Petry, FC, Pinto, LAA. (2011). Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. *Ciênc. Rural*, 41:904-909.

Silva, R, Bandeira, SF, Pinto, LA A. (2014). Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Science and Technology* 57:580-585.

Songchotikunpan, P, Tattiyakul, J, Supaphol, P. (2008). Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42:247-255.

Sootawat B, Kwunchit O, Wonnop V, Yaowapa T, Sittiruk R. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. Food Chemistry 116:445–451.

Souza, MLR, Baccarin, AE, Viegas, Macedo, EM, Kronka, SN. (2004). Defumação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteira eviscerada e filé: aspectos referentes às características organolépticas, composição centesimal e perdas ocorridas no processamento. Revista Brasileira de Zootecnia, 33:27-36.

Taheri, A, Kenari, AMB, Gildberg, A, Behnam, S. (2009). Extraction and Physicochemical Characterization of Greater Lizardfish (*Saurida tumbil*) Skin and Bone Gelatin. Journal of Food Science 74(3):160–165.

Te Nijenhuis K. 1977. Gelatin Advances in polymer science pp. 160–193.

Wang, HY, Qian, H, Yao, W.R. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity: Food Chemistry, 128:573-584.

White, JA, Hart, RJ, Kry, JC. (1986). An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. Journal Automatic Chemical, 8:170-177.

Yang, H, Wang, Y, Zhou, P, Regenstein, JM. (2008). Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. Food Hydrocolloids, 22:1541-1550.

CAPÍTULO II: Extração de gelatina da pele de filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) pelo método de calagem

RESUMO

Este estudo teve como objetivo elaborar gelatina a partir de pele de peixe pelo método de calagem, determinar as condições ideais para o processamento e caracterizar as propriedades da gelatina obtida. O processo de extração da gelatina da pele de filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) foi otimizado utilizando solução de hidróxido de cálcio. A gelatina obtida foi caracterizada através das análises de rendimento, força de gel, cor, viscosidade, perfil de aminoácidos, microscopia eletrônica de varredura, ponto de fusão, capacidade de formar espuma e capacidade emulsificante. As condições otimizadas foram definidas em 10 dias de pré-tratamento e temperatura de 50°C. Para esta condição foi observada uma desejabilidade de 0,965 e valores de rendimento e força do gel de 20,24% e 221 g, respectivamente. A glicina foi o aminoácido majoritário, tanto na pele do peixe (23,77%), quanto na gelatina (23,39%) obtidas. A gelatina apresentou característica de gel extensível e consistente e sua microestrutura apresentou fios finos uniformes e pequenos espaços vazios em toda sua extensão, favorável para a indústria de alimentos

Palavras chaves: resíduo, força do gel, rendimento

ABSTRACT

This study aimed to prepare gelatin from fish skin by liming method, determine the optimal conditions for processing and characterizing the properties of gelatin obtained. The gelatin extraction process from kumakuma (*Brachyplathystoma filamentosum*) skin was optimized using a calcium hydroxide solution. The gelatin obtained was characterized through scanning electron microscopy and analyses of yield, gel strength, color, viscosity, amino acid profile, melting point, foaming capacity, and emulsifying capacity. The optimized conditions were defined over ten days of pre-treatment at 50 °C. This condition resulted in desirability of 0.965 and yield and gel strength values of 20.24% and 221 g, respectively. Glycine was the main amino acid both in the fish skin (11.68%) and in the gelatin obtained (23.39%). The gelatin had extendable and consistent gel characteristic and its microstructure showed even threads with small gaps throughout, which is favorable for the food industry.

Key words: residue; fish; gelatine.

1 INTRODUÇÃO

A extração de colágeno vem sendo realizada em peles e ossos de pescado de água fria (bacalhau, pescada, salmão, entre outros) e de água quente (atum, bagre, tilápia, entre outros). Os procedimentos utilizados para extrair o colágeno de pescado normalmente envolvem um prévio tratamento químico da matéria-prima e temperatura branda durante o processo de extração (Karim e Bhat, 2009). Dependendo do método empregado no pré-tratamento do colágeno, dois tipos de gelatina com diferentes características podem ser produzidas. A gelatina tipo A (ponto isoelétrico em pH 6-9) é produzida por tratamento ácido do colágeno e a gelatina tipo B (ponto isoelétrico em pH 5) é produzida quando o tratamento do colágeno ocorre por via alcalina (Stainsby 1987).

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno e é composta por aproximadamente 19 aminoácidos (Osborne, Voight, Hall, 1990). A estabilidade térmica do colágeno está relacionada com seu conteúdo em iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) e quanto mais elevado este conteúdo, maior é a estabilidade das ligações entre as proteínas. O colágeno se desnatura em temperaturas superiores a 40 °C, produzindo uma mescla de espécies, com uma, duas ou três cadeias polipeptídicas entrelaçadas ao acaso. Por outro lado, o resfriamento controlado do colágeno (abaixo da temperatura de fusão) conduz a recuperação de uma estrutura helicoidal (Wong 1994).

A extração de gelatina de peixes utilizando diferentes processos ainda é muito limitada. O processo de calagem, com hidróxido de cálcio no pré-tratamento do colágeno foi especialmente projetado para a extração de gelatina de peles e ossos de mamíferos e se estende normalmente de dias a meses, dependendo da concentração de hidróxido de cálcio e da temperatura utilizada (Schreber e Gareis, 2007). Um processo para a obtenção alcalina de gelatina tipo B de peixe foi patenteado por Stanley (2002) e consiste em uma extração inicial por calagem, durante 42 dias, seguido por extração com ácido. A utilização do Ca(OH)_2 é normalmente preferida, devido sua capacidade de regular a alcalinidade, não permitindo que o colágeno se alongue e perca sua firmeza (Ockerman e Hansen 1999). Adicionalmente, o rendimento e a força Bloom da gelatina são bem superiores (Jamilah et al., 2011).

A produção mundial de gelatina foi aproximadamente 326.000 toneladas, onde 46% são provenientes de peles suínas, 29.4% de couro bovino, 23.1% de ossos e 1.5 % de outras partes (GME, 2008). No entanto, a ocorrência frequente da doença Encefalopatia espongiforme bovina (BSE) tem gerado problemas para a saúde humana e, portanto, subprodutos de mamíferos são limitados para serem usados em processamento de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Cho et al., 2005). Desta forma, o estudo de processos para a obtenção de gelatina de peixe, especialmente de peles e ossos, tem aumentado, visando a obtenção de produto com propriedades equivalentes as da gelatina de mamíferos (Gudmundsson, 2002).

Os objetivos deste estudo foram elaborar gelatina a partir de pele de peixe pelo método de calagem, determinar as condições ideais para o processamento utilizando a metodologia de superfície de resposta, a função desejabilidade e caracterizar as propriedades da gelatina obtida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas peles frescas da espécie de peixe filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) adquiridas no mercado de peixe de Belém (Ver-o-peso). A matéria prima foi transportada sob refrigeração (2-4°C), em caixas isotérmicas, ao Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foram feitas as manipulações.

2.1 Obtenção da gelatina

A gelatina foi obtida pelo método de calagem, tomando como base a metodologia proposta por Jamilah et al. (2011). As peles do peixe foram lavadas em água corrente para a remoção de materiais indesejáveis e após a retirada do excesso de água, foram imersas em solução saturada de Ca(OH)_2 , na concentração de 27 g/L a 20 °C. Para cada kg de pele úmida foram usados 2 L da solução saturada, como meio de impregnação. Após o tempo de pretratamento (6 a 14 dias), as peles foram retiradas e lavadas com dez partes de água (m/m), para a remoção do excesso de álcali, mantendo as peles em pH 10. Para cada 20g de pele foi adicionada 100 mL de água destilada e o conjunto foi mantido em banho-maria (36 a 64 °C), para extração do colágeno. Em seguida, foi utilizado ácido clorídrico para reduzir o pH da solução para

aproximadamente 5. A solução foi então filtrada em papel de filtro Whatman nº4 e o colágeno desnaturado (gelatina) recolhido foi colocado em bandejas, congelado -50°C e liofilizado por 30 horas. O produto liofilizado (gelatina) foi embalado a vácuo em sacos de polietileno, armazenado a -22°C e posteriormente submetido aos ensaios do planejamento experimental.

2.2 Planejamento experimental

No planejamento experimental foram utilizados o delineamento composto central rotacional (DCCR) sendo as variáveis independentes tempo de pré-tratamento (dias) e temperatura de extração (°C). Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR) para definir as melhores condições para as respostas rendimento total do processo e força do gel. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Foram realizados onze ensaios (Tabela 1), sendo quatro ensaios fatoriais (combinação entre os níveis ± 1), três ensaios no ponto central (duas variáveis no nível 0) e quatro ensaios nos níveis axiais (uma variável no nível $\pm \alpha$ e a outra variável no nível 0). Para cada resposta foi verificada a significância das variáveis ou interações, segundo a equação polinomial descrita na Equação 1.

$$Y = f(X) = \beta_0 + \beta_1(A) + \beta_{11}(A)^2 + \beta_2(B) + \beta_{22}(B)^2 + \beta_{12}(AB) \quad \text{Eq. 1}$$

Y : variável dependente (rendimento e força do gel),

β_0 : constante

β_i , β_{ii} e β_{ij} : coeficientes de regressão

X_i e X_j : níveis das variáveis independentes.

Os desvios e desvios relativos entre os valores experimentais e previstos pelos modelos, para as condições ótimas de cada variável de resposta, foram calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente:

$$\text{Desvio} = Y - \bar{Y} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Desvio Relativo} = \frac{Y - \bar{Y}}{Y} * 100 \quad \text{Eq. 3}$$

onde: Y = resposta experimental e \bar{Y} = resposta prevista pelo modelo.

2.3 Determinações físico-químicas

Foram realizadas análises de umidade (método nº 950.46), proteínas totais fator de correção 5,55 (método nº 928.08), lipídeos (método nº 960.39) e cinzas (método nº 920.153), segundo AOAC (2002). O pH da pele foi determinado pelo método nº 981.12 da AOAC (2002) e o da gelatina pela metodologia proposta por Schrieber e Gareis (2007). O perfil de aminoácidos foi obtido em cromatógrafo líquido de alta performance Waters-PICO Tag™, Waters Model 712 WISP (Waters, Watford, Herts, UK), segundo White, Hart, and Fry (1986). A atividade de água foi determinada em higrômetro eletrônico Aqualab, 3TE - Decagon Devices Inc.USA. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A cor instrumental foi determinada em colorímetro (marca Minolta, modelo CR 310, Japan), no espaço CIE (Comission Internacionale de l'Eclairage) L^* , a^* , b^* , onde: L^* : luminosidade; a^* : intensidade da cor vermelha; b^* : intensidade da cor amarela. Foram calculados o índice de saturação C^* e o angulo de tonalidade h° (Hunterlab 2008).

2.4 Determinações das propriedades tecnológicas

Foram analisadas as propriedades tecnológicas da gelatina obtida: rendimento total da gelatina (%) calculados pela razão entre peso da gelatina e peso úmido da pele (Binsi et al 2009). A força do gel (Bloom) foi determinada em analisador de textura, usando sonda de teflon cilíndrica, com 12,5 mm de diâmetro, pressionando 4 mm no gel de gelatina com velocidade de 1 mm/s (Choi e Regenstein 2000).

As análises morfológicas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO-1430, USA. As amostras foram metalizadas com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 minutos. As condições de análises para as imagens de elétrons secundários foram: corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kV e distância de trabalho = 15 mm. O ponto de fusão foi determinado tomando como base a metodologia utilizada por Choi e Regenstein (2000). Para estabelecer a capacidade de formar espuma (CFE), soluções de gelatina, em diferentes concentrações (1, 2 e 3%), foram

homogeneizadas a 1750 rpm por 1 min a temperatura ambiente (24°C). A CFE foi calculada como a razão entre os volumes antes e após a homogeneização (Shahiri et al 2010).

A capacidade emulsificante (CE) foi determinada segundo Shahiri et al. (2010), com modificações. Foram misturados 20 mL de solução da gelatina a 3,3%, com 20 mL de óleo de soja. A mistura foi homogeneizada a 1750 rpm por 30 segundos e posteriormente centrifugada a 2000 xg por 5 minutos. A CE foi calculada como a razão entre o volume da porção emulsificada e o volume inicial. A viscosidade foi determinada de acordo com Yang et al (2008), onde a amostra foi colocada em banho a 45°C e transferida para o viscosímetro de Ostwald-Fensk (nº 100), o qual foi colocado em banho a 60°C durante 10 minutos para estabilizar a temperatura, sendo realizada a leitura e o valor expresso em centipoise (cP).

2.5 Análise estatística

Os dados experimentais do planejamento e análise de variância (ANOVA) e a determinação do ponto ótimo do planejamento através da função de desejabilidade foram analisados com auxílio do programa Statistica 7.0 for Windows.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização do processo de obtenção da gelatina

Nas duas últimas colunas da Tabela 1 são apresentados os resultados experimentais obtidos para rendimento (%) e força do gel (g).

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental 2² com os dados obtidos para rendimento (%) e força do gel (g).

Ensaio	Codificado		Real		Respostas	
	A	B	Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	Força do gel (g)
1	-1,00	-1,00	7,0	40,0	14	70,0
2	-1,00	1,00	7,0	60,0	30,0	39,0
3	1,00	-1,00	13,0	40,0	10,0	78,0
4	1,00	1,00	13,0	60,0	23,5	57,0
5	-1,41	0,00	6,0	50,0	21,0	89,0
6	1,41	0,00	14,0	50,0	16,0	163,0
7	0,00	-1,41	10,0	36,0	12,0	80,0
8	0,00	1,41	10,0	64,0	26,0	75,0
9	0,00	0,00	10,0	50,0	25,1	243,0
10	0,00	0,00	10,0	50,0	21,0	240,0
11	0,00	0,00	10,0	50,0	24,9	200,0

As estimativas dos coeficientes dos fatores para o modelo de cada resposta avaliada estão apresentadas na Tabela 2. Os efeitos destacados em negrito indicam que a variável apresentou efeito significativo ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Efeitos estimados das variáveis do polinômio de segunda ordem (Eq. 1), associada a significância para cada resposta estudada (erro puro).

Fatores	Rendimento (%)		Força do gel (g)	
	Efeitos	p-valor	Efeitos	p-valor
Constante	23,622	0,003	229,032	0,003
A	-4,544	0,114	33,000	0,199
AA	-5,216	0,132	-136,306	0,025
B	12,301	0,017	-15,639	0,454
BB	-4,143	0,164	-167,531	0,013
AB	-1,250	0,642	5,000	0,854

A = Tempo de extração (dias); B = Temperatura de extração (°C)

A obtenção de maiores rendimentos no processo de extração da gelatina é fundamental para viabilizar sua utilização como potencial fonte de produção. Com relação ao rendimento total o efeito foi significativo e positivo para temperatura de extração linear (B), ou seja, um aumento deste fator provocou um aumento no rendimento. Pode-se observar na Fig. 1, a obtenção de rendimentos mais elevados na faixa onde foram empregadas maiores temperaturas de extração; isto possivelmente propiciou a hidrólise mais pronunciada do colágeno, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos.

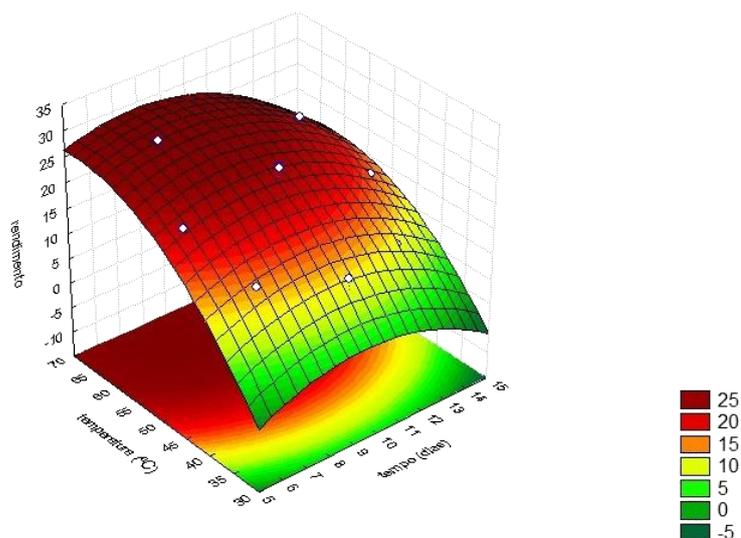


Figura 1: Superfície de resposta para rendimento em função do tempo (dias) e da temperatura de extração (°C) pelo método de calagem

Com relação a força do gel (Tabela 2), os efeitos foram significativos e negativos para tempo de pré-tratamento quadrático (AA) e temperatura de extração quadrática (BB), ou seja, um aumento nesses fatores acarreta numa diminuição na força do gel. Verifica-se também que o tempo de pré-tratamento linear (A) foi o que apresentou maior efeito sobre a força do gel.

O aumento da temperatura leva ao incremento da força do gel, no entanto, com o gradativo aumento, a força do gel tende a decrescer com a consequente formação de peptídeos de baixo peso molecular. Sabe-se que a força de gel e as demais propriedades funcionais das gelatinas (viscosidade, ponto de fusão, ponto de geleificação) são dependentes de sua distribuição de peso molecular e composição de aminoácidos (Johnston-Banks 1990). Os maiores valores de força do gel foram obtidos quando foram empregadas temperaturas na faixa de 50°C (Fig. 2).

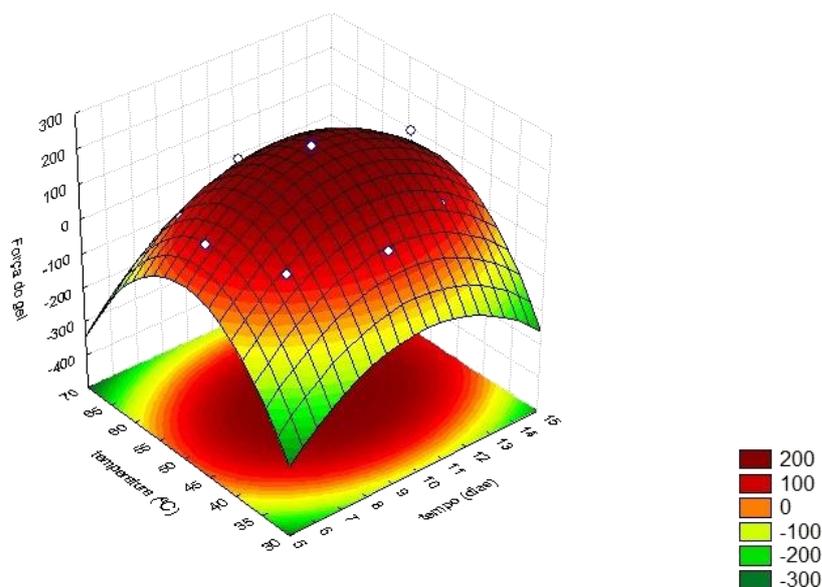


Figura 2: Superfície de resposta para força do gel em função do tempo (dias) e da temperatura (°C) de extração pelo método de calagem

A análise de variância (ANOVA) apresentou valores de R^2 de 0,93 e 0,92 para rendimento e força do gel respectivamente (Tabela 3), indicando que o modelo definiu o comportamento do processo de forma adequada, explicando mais de 92% da variação dos dados experimentais.

Tabela 3 – Modelo reduzido para rendimento e força do gel, em função das variáveis independentes, teste F e R^2 .

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F cal.	F tab.	R^2
Rendimento						
Regressão	292,10	1	292,1	21,36	18,51	0,93
Resíduo	123,05	9	13,67			
F. A.	112,37	7	16,05	3,0	19,35	
Erro	10,68	2	5,343			
Total	415,15	10	41,51564			
	Modelo		23,6228+6,1505(B)			
Força do gel						
Regressão	50126,82	2	25063,41	28,26	19,0	0,92
Resíduo	7093,36	8	886,67			
F. A.	5940,69	6	990,11	1,71	19,3	
Erro	1152,67	2	576,33			
Total	57220,18	10	5722,01			
	Modelo		229,03 -68,15 (AA)-83,76(BB)			

A falta de ajuste, para a equação da resposta rendimento e força do gel, não foi significativa (Tabela 3), visto que $F_{cal} < F_{tab}$ indicando que a equação preditiva pode ser utilizada para qualquer combinação dos valores das variáveis estudada.

O aumento no rendimento foi proporcional ao aumento da temperatura de extração, o que gerou maior hidrólise do colágeno, reduzindo a força do gel. A severidade do tratamento de extração é determinante sobre as propriedades funcionais da gelatina (Montero et al., 2002). A consistência do gel diminuiu para temperaturas de extração superiores a 50°C, o que está de acordo com Ledward (1986), Norman et al. (2000) e Cho et al. (2004). De acordo com os autores, maiores temperaturas de extração provocam a degradação das proteínas, e os fragmentos de proteínas produzidos reduzem a capacidade de gelificação e conseqüentemente a força do gel. Desta forma, o emprego de altas temperaturas e de tempos de pré-tratamento prolongados, são desejáveis para obtenção de maiores rendimentos, mas induzem à fragmentação das cadeias alfa (α) do colágeno, reduzindo a força do gel (Johnston-Banks 1990; Cho et al. 2004).

O aumento do tempo de pré-tratamento próximo ao ponto ótimo (10 dias) causou um aumento tanto no rendimento quanto na força do gel. Resultado semelhante foi encontrado por Johnston-Banks (1990) e Poppe (1992), que reportaram que o número de ligações cruzadas devem ser fragilizadas o suficiente para converter o colágeno numa forma adequada para a extração.

De acordo com a função desejabilidade para as respostas rendimento e força do gel (Fig. 3), um tempo de 10 dias de pré-tratamento e temperatura de extração de 50°C, apresentou uma condição máxima de desejabilidade (0,96), é possível obter 23,62% de rendimento e uma força do gel de 229,14 g, ambos desejáveis. De acordo com Jamilah e Harvinder (2002) o rendimento da gelatina de pescado varia de 6% a 19% e a força do gel de 250 a 260 g.

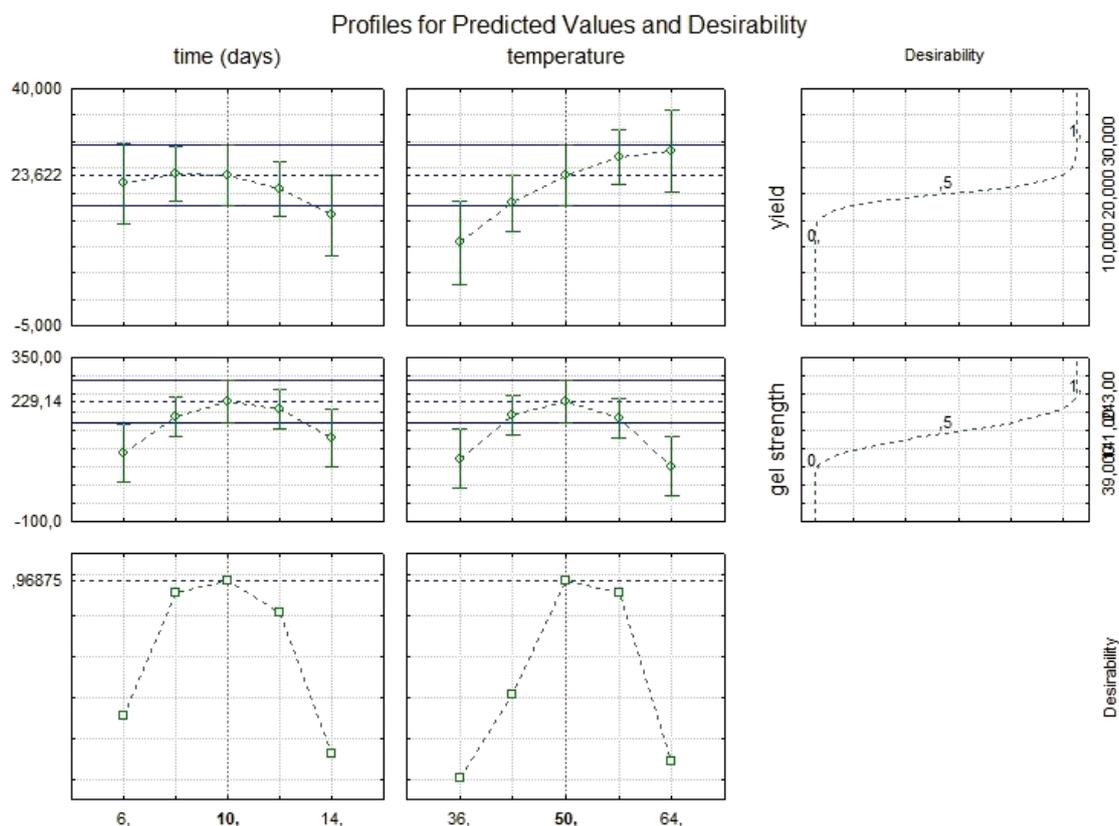


Figura 3 – Gráfico de desejabilidade para a extração de gelatina de pele de filhote.

Foram realizados ensaios com as condições ótimas de temperatura (50°C) e tempo de pré-tratamento (10 dias), para comparar os valores experimentais das respostas rendimento e força do gel, com os valores preditos pelos modelos de regressão. A diferença entre o valor experimental e predito resultou num desvio relativo de -3,6% para o rendimento e -16,6% para força do gel), demonstrando que o modelo pode ser utilizado para prever o rendimento e a força do gel da gelatina, dentro do domínio experimental.

3.2 Caracterização da pele e da gelatina

Na Tabela 4 são apresentados os valores da composição e dos parâmetros físico-químicos determinados na pele e na gelatina obtida

Tabela 4 – Composição e parâmetros físico-químicos da pele e da gelatina extraída da pele de filhote.

Components	Pele*	Gelatina*
Umidade (%)	58,83 ± 0,57	11,37 ± 0,98
Lipídeos (%)	14,25 ± 0,22	5,39 ± 0,21
Proteína (%)	31,08 ± 0,99	81,67 ± 0,83
Cinzas (%)	0,37 ± 0,04	0,34 ± 0,06
pH	6,72 ± 0,01	4,50 ± 0,08
Atividade de água	0,98 ± 0,06	0,25 ± 0,01

*Os valores são médias de 3 determinações.

A umidade da pele foi da mesma ordem de grandeza observada para corvina (*Johnius dussumieri*) (62,3%) e shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) (60,4%) (Cheow et al. 2007). Para a gelatina, a umidade mostrou-se dentro da faixa observada em gelatina comercial (9-14%) (Eastoe e Leach 1977).

O teor de gordura da pele foi elevado (14,25±0,22%), devido o peixe utilizado ser considerado um peixe de alto teor de gordura. Ribeiro et al. (2013) encontraram 14,5±0,3% de gordura no músculo de filhote. Shahiri et al. (2012) encontraram 13,12±0,20% de gordura na pele e 0,31±0,07% no colágeno de truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*). O teor de gordura de 5,39 ± 0,21% encontrado na gelatina mostra que os tratamentos prévios à extração com Ca(OH)₂ foram eficiente na redução deste componente.

Os teores de proteínas na pele (31,08±0,99%) e na gelatina (81,67±0,83%) foram semelhantes aos observados na pele (30,6±0,9%) e na gelatina (84,28±5,39%) de tilápia do Nilo (Rawdkuen et al., 2013). Jamilah et al. (2011) encontraram teores de proteínas de 31,01±0,48% e 80,02±0,33%, respectivamente, na pele e na gelatina extraída da pele de freshwater fish, pelo método de calagem.

O teor de cinzas da pele foi inferior ao relatado por Bueno et al. (2011) (1,9±0,3%), na pele de tilápia. Por sua vez, o teor de cinzas na gelatina foi próximo ao encontrado por Ratnasari (2013) (0,20 %), para redtail catfish extraída com Ca(OH)₂ e por Sarbon et al. (2013), para gelatina de pele de frango (0,37%). Segundo Jones (1977) e Muyonga et al. 2004), o teor máximo de cinzas recomendado para gelatina é de 2,6%. Porém, Benjakul et al. (2009) indicam que gelatina de alta qualidade não deve conter mais que 0,5% de cinzas.

Jongiareonrak et al. (2006) sugerem que o alto teor de proteínas e menor teor de umidade, cinzas e gordura na gelatina são determinados pela matéria-prima ou pelos produtos químicos residuais, após o processamento.

O baixo valor de pH da gelatina obtida ($4,5\pm 0,08$) é atribuído ao processo de extração, onde o pH da solução de gelatina foi reduzido com ácido forte. Cheow et al (2007) também relatam baixos valores de pH para a gelatina extraída de corvina (3,35) e de shortfin scad (4,87). O baixo valor de atividade de água sugere uma boa estabilidade da gelatina com relação à degradação microbiológica.

A Tabela 5 apresenta o perfil de aminoácidos na pele e da gelatina de filhote.

Tabela 5 – Perfil de aminoácidos da pele e da gelatina de filhote.

Aminoácidos		Pele*	Gelatina*
Ácido aspártico	Asp	5,91	5,07
Acido glutâmico	Glu	9,30	9,07
Hidroxiprolina	Hyp	8,40	9,35
Serina	Ser	1,85	1,84
Glicina	Gly	23,77	24,97
Histidina	Hys	0,36	0,28
Taurina	Tau	2,74	2,93
Arginina	Arg	5,13	5,06
Treonina	The	10,60	10,57
Alanina	Ala	10,36	11,70
Prolina	Pro	5,19	5,05
Tirosina	Tyr	0,63	0,33
Valina	Val	2,70	2,38
Metionina	Met	1,61	1,77
Cisteína	Cys	0,04	0,01
Isoleucina	Ileu	1,34	1,13
Leucina	Leu	3,86	3,06
Phenilalanina	Phe	2,42	1,34
Lisina	Lys	3,48	3,02
Triptofano	Trp	0,08	0,18
Total		99,77	99,11

* g/100g de proteína

Os iminoácidos prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp), que representaram 13,59% e 14,40% dos aminoácidos totais da pele e da gelatina, tem uma correlação direta com a força do gel (Holzer, 1996), pois desempenham papel importante na estabilização da tripla hélice (Ramachandran 1988). Na verdade, a composição em aminoácidos é determinante para as propriedades físicas da

gelatina. Gelatinas com conteúdo limitado de iminoácidos tendem a apresentar menores pontos de fusão (Ratnasari, 2013). Os valores de hidroxiprolina na pele (8,40%) e na gelatina (9,35%) apresentaram-se de acordo ao citado por Nalinanon et al. (2008) em que gelatina de peixe apresentam teor de 7 a 10% de hidroxiprolina do total de aminoácidos.

A glicina foi o aminoácido majoritário na pele (23,77%) e na gelatina (24,97%), e está de acordo com os resultados observados por Cho et al. (2004) e Silva et al. (2014) que encontraram respectivamente 27,54% de glicina em gelatina de cartilagem de tubarão e 30,7% em pele de cobia. De acordo com Nagarajan et al. (2012), um terço do colágeno é composto por glicina. Para fechar a estrutura da tripla hélice, as pequenas moléculas de glicina são necessárias para ocupar cada terceira posição (Te Nijenhuis, 1977). Segundo Piez e Sherman (1970), a formação e estabilização eficaz da estrutura da tripla hélice do colágeno requer a presença da sequência da repetição (Gly X-Y), em que X e Y pode ser qualquer aminoácido com, pelo menos, uma prolina ou hidroxiprolina em qualquer outro tripleto. Assim, GLY-PRO-Y, X-GLY-HYP e GLY-PRO-HYP são importantes para a estabilização da estrutura de colágeno (Privalov, 1982).

Foram identificadas pequenas quantidades de cisteína (0,01%) e metionina (1,77%) na gelatina, semelhante ao reportado por Hou et al. (2009). Esses aminoácidos desempenham um papel essencial na formação de pontes dissulfeto (Foegeding et al., 1996). A presença de cisteína poderia indicar que a gelatina continha uma pequena quantidade de proteína do estroma (Duan et al., 2011; Bougatef et al 2012).

Lisina estabiliza a estrutura da gelatina, formando estruturas entre cadeias de ligação cruzada. A percentagem de lisina foi de 3,02% na gelatina, resultado próximo ao encontrado por Cho et al. (2004) em gelatina de cartilagem de tubarão (2,27%) e gelatina suína (2,32%).

A Tabela 6 mostra os resultados da caracterização tecnológica da gelatina extraída de pele de filhote.

Tabela 6 – Caracterização tecnológica.

Componentes	Gelatina Ca(OH) ₂
Rendimento (%)	20,24 ± 0,02
Força do gel (g)	221,00 ± 9,93
Viscosidade (cP)	3,10 ± 0,26
Ponto de Fusão (°C)	23,16 ± 0,23
Poder emulsificante (%)	51,35±0,02
Poder espumante	
Solução 1%	106±0,04
Solução 2%	110±0,02
Solução 3%	116±0,01
L* (Luminosidade)	83,41 ± 2,42
a* (verde-vermelho)	-4,93 ± 0,19
b* (azul-amarelo)	9,63 ± 0,10
c* (croma)	10,82 ± 0,15
h* (ângulo de tonalidade graus)	117,09 ± 0,80

Médias de três determinações

O rendimento (Tabela 6) obtido para gelatina de pele de filhote pré-tratada com Ca(OH)₂ está próximo ao observado por Ratnasari et al. (2014) (23,12%), que utilizaram Ca(OH)₂ no pré-tratamento. Jamilah et al. (2011), no processo de extração com calagem por 14 dias, obtiveram rendimento de extração de 39,97%.

A utilização de Ca(OH)₂ para acondicionar a pele antes da extração resultou em ótima recuperação da gelatina em água. O tipo de pele, a concentração do ácido no pré-tratamento, as condições de pH, a taxa de colágeno a ser solubilizado, o tratamento de lavagem e o processo de inchamento estão entre os fatores que podem interferir no rendimento de extração de gelatina (Ratnasari et al. 2013).

Gomez-Guillen et al. (2001) observaram que gelatinas de diferentes espécies de peixes apresentaram diferentes estruturas e propriedades físicas.

Isso se deve a diferenças nas moléculas de colágenos contidas na pele (Jamilah e Harvinder 2002). Karim e Bhat (2009) observaram que a produtividade e a qualidade da gelatina são influenciadas pela espécie e idade do peixe, processo de extração e temperatura de pré-tratamento.

A consistência do gel é uma das propriedades funcionais mais importantes da gelatina. Os dados encontrados indicam que a força do gel da gelatina pré-tratada com Ca(OH)_2 favorece um gel firme e resistente dentro do intervalo desejável para alimento que é de 50-300g (GMIA 2003). Resultado semelhante foi observado para tilápia (*Oreochromis niloticus*) (263 g) (Grossman e Bergman, 1992), carpa (*Cyprinus carpio*) (267 g) (Kansakala et al., 2007) e catfish (*Ictalurus punctatus*) (252 g) (Yang et al., 2007).

A viscosidade da gelatina tratada com Ca(OH)_2 favoreceu uma gelatina consistente e gel extensível. O aumento da viscosidade é acompanhado pelo aumento da força do gel, da temperatura de fusão e do pH (Sperling 1985; Stainsby 1987). Grossman e Bergman (1992) observaram viscosidade de 6,28 cP para a gelatina de bagre, enquanto Yang et al., (2007) viscosidade inferior a 3,0 cP em gelatina de channel catfish. Os resultados indicam que variações na viscosidade podem ser relacionadas com as diferentes espécies de peixes de água doce e também com o método de extração.

O ponto de fusão da gelatina tratada com Ca(OH)_2 foi $23,16 \pm 0,23$, valor diretamente relacionado com o teor de iminoácidos na molécula de colágeno original. Ponto de fusão nesta faixa resulta em gelatina de rápida dissolução definindo as possíveis aplicações na indústria de alimentos. Cho et al. (2005) observaram pontos de fusão $24,3^\circ\text{C}$ para gelatina de tuna (*T. albacares*), $33,8^\circ\text{C}$ para gelatina de bovino e $36,5^\circ\text{C}$ para gelatina de suíno.

A gelatina apresentou poder emulsificante, sendo este parâmetro dependente do grau de exposição de resíduos hidrófobos no interior de gelatina (Shyni et al. 2014). O teor do aminoácido hidrofóbico tirosina (Tab. 5) na gelatina de pele de filhote foi de 0,33%. Shyni et al. (2014) citaram valor de 0,25 e 0,26% em gelatina de pele de rohu e tuna, respectivamente. A quantidade de tirosina é provavelmente responsável pelo alto poder emulsificante das gelatinas.

As soluções da gelatina obtidas, para uma mesma concentração de proteína, apresentaram capacidade de formação de espuma, que aumentou

com o incremento da concentração proteica, em todas as soluções de gelatina. As superfícies hidrofóbicas da cadeia de peptídeos são responsáveis por atribuir à gelatina as propriedades emulsificante e de formação de espuma (Galazka et al., 1999; Cole, 2008).

A gelatina extraída pelo método de calagem apresentou coloração esbranquiçada e brilhante. Jamilah et al. (2011), utilizando a extração pelo método de calagem, encontrou valor de L^* (79.45 ± 1.10), a^* (-0.71 ± 0.09) e b^* (5.75 ± 0.14) em gelatina de pele de striped catfish. O valor do croma (c^*) distante de zero significam coloração clara. O ângulo de tonalidade (h^*) define a tonalidade em si, e quando é positivo indica uma tendência a coloração clara (Cheow et al., 2007; Hunterlab Inc 2008). Tais valores corresponderam a coloração das gelatinas, no entanto, isso não tem influência sobre outras propriedades funcionais.

Na Figura 4 são apresentadas as eletromicrografias da gelatina da pele de filhote, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A microestrutura da gelatina apresentou fios finos uniformes e pequenos espaços vazios em toda sua extensão. Em geral, o arranjo e combinação de moléculas de proteínas na matriz do gel contribuem diretamente para a resistência do gel de gelatina, já que a microestrutura do tecido de gel está relacionada com as propriedades da gelatina (Yang et al. 2008; Benjakul 2009). Géis com menos ligações inter-cadeia ou cadeias mais finas podem ser degradados mais facilmente por uma força aplicada, resultando em menor força de gel (Kaewruang et al 2014).

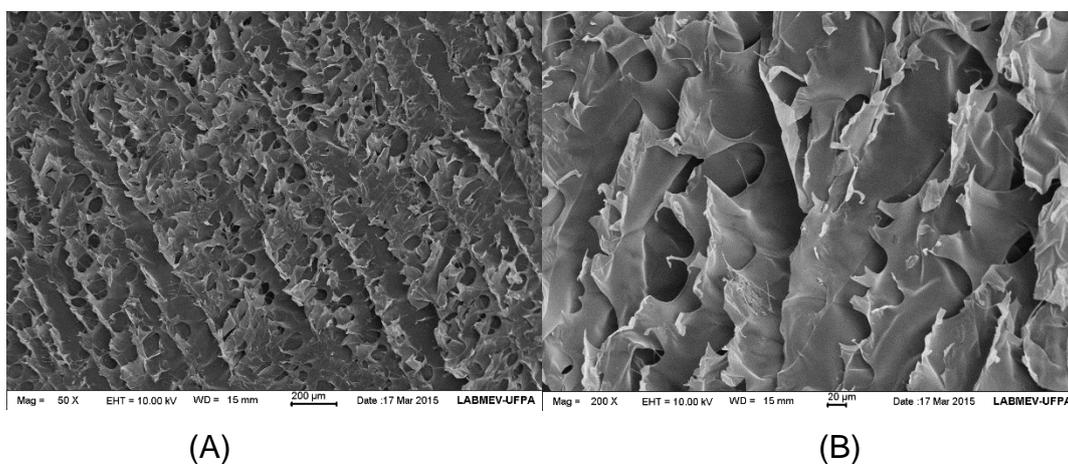


Figura 4: Eletromicrografias da gelatina da pele de filhote: 50x (A) e 200x (B).

4 CONCLUSÃO

De acordo com o modelo proposto, as condições ótimas de extração foram estabelecidas no tempo de 10 dias de pré-tratamento e temperatura de extração de 50 °C. O emprego de altas temperaturas foi desejável para obtenção de maiores rendimentos, mas provocaram a redução da força do gel da gelatina. A glicina foi o aminoácido encontrado em maior quantidade tanto na pele quanto na gelatina. A gelatina apresentou característica de gel extensível e consistente e na sua microestrutura apresentou fios finos uniformes, favorável para ser utilizado na indústria de alimentos

REFERÊNCIAS

Benjakul S, Oungbho K, Visessanguan W, Thiansilakul Y, Roytrakul S. 2009. Characteristic of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracantus*. Food Chemistry 116: 445-451.

Binsi PK, BA, Dileep AO, Badii F, Howell, NK. 2009. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. Food Hydrocolloids 23(1): 132–145.

Bougatef A, Balti R, Sila A, Nasri R, Graiaa G, Nasri M. 2012. Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*Mustelus mustelus*) skin gelatin. International Journal of Food Science and Technology 48(2): 248-254.

Bueno CM, Alvim ID, Koberstein TCRD, Portela MC, Grosso C. 2011. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. Brazilian Journal of Food Technology 14: 65–73.

Cheow CS, Norizah, MS, Kyaw, ZY, Howell NK. 2007. Preparation and characterization of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) Food Chemistry 101: 386–391.

Cho SM, Kwak KS, Park DC, Gu YS, Ji CI, Jang DH, Lee YB, Kim SB 2004 Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrichus*) cartilage. *Food Hydrocolloides*. 18(4): 573-579.

Cho SM, Gu YS, YB, Kim SB 2005 Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 19: 221-229.

Choi SS, Regenstein JM. 2000. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science* 65: 194-199.

Cole ET, Cad D, Benameur H. 2008. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 747-756.

Duan R, Zhang J, Xing F, Konno K, Xu B. 2011. Study on the properties of gelatins from skin of carp (*Cyprinus carpio*) caught in winter and summer season. *Food Hydrocolloids* 25: 368-373.

Eastoe, JE, Leach, AA. (1997). Chemical constitution of gelatin. *The Science and Technology of Gelatin*. London: Academic Press, 73-108.

Foegeding EA, Lanier TC, Hultin HO 1996. Collagen In: O. R. Fennema editor. *Food chemistry*. New York 3rd 902–906.

Galazka VB, Dickinson E, Ledward DA. 1999. Emulsifying behavior of globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: Comparison of thermal and high-pressure treatments. *Food Hydrocolloids* 13: 425-435.

Gelatin Manufacture Institution of America (GMIA). 2003. Standard Methods for Sampling and Testing of Gelatin. GMIA 271.

Gelatin Manufacturers of Europe (GME) 2008. <http://www.gelatine.org/en/gelatine/overview/127.htm>. Accessed 16.02.16.

Gomez-Guillen MC, Sarabia AL, Solas MT, Montero P. 2001. Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (*Lepidorhombus bosci*) skin gelatin. *Journal of the Science Food and Agriculture* 81: 665-673.

Grossman, S. Bergman, M. (1992). Process for the production of gelatin from fish skin. United States Patent No 5,093, 474

Gudmundsson M. 2002. Rheological properties of fish gelatin. *Journal of Food Science* 67: 2172-2176.

Holzer D. 1996. Gelatin production. US Patent 5.484.888.

Hou H, Li B, Zhao X, Zhuang Y, Ren G, Yan M, Cai Y, Zhang X, Chen L. 2009. The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chemistry* 15: 945–950.

Hunterlab Inc. 2008. Applications Note: CIE L * a * b * Color Scale. 8:1–4.

Jamilah B, Tan KW, Hartini MRU, Azizah A. 2011. Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids* 25: 1256-1260.

Jamilah B, Harvinder KG. 2002. Properties of gelatins from skins of fish: black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry* 77: 81-84.

Johnston-Banks, FA. 1990. Gelatin. *Food gels*, New York: Elsevier Applied Food Science Series 233-289.

Jones, NR. 1977. Uses of gelatin in edible products. In: Ward, A. G.; Courts, A. (Ed.). *The Science and Technology of Gelatin*. London: Academic Press; 365-394.

Jongiaronrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. 2006. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids* 20: 1216-1222.

Kaewruang, P. Benjakul, S. Prodpran, T, Encarnacion, A.B. Nalinanon, S. 2014. Impact of divalent salts and bovine gelatin on gel properties of phosphorylated gelatin from the skin of unicorn leatherjacket. *Food Science and Technology* 55: 477-482.

Kansakala LM, Xue E, Weilong Y, Hong SD, He Q. 2007. Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresource Technology* 98: 3338- 3343.

Karim AA, Bhat R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23: 563–576.

Ledward DA. 1986. Gelation of gelatin. In J. R. Mitchell, & D. A. Ledward (Ed) *Functional properties of food macromolecules* (pp. 171 – 201). London: Elsevier.

Montero P, Fernandez-Diaz M.D, Gómez-Guillén MC. 2002. Characterization of gelatina gels induced by high pressure. *Food Hydrocolloids* 16:197-205.

Muyonga, JH, Cole, CGB, Duodu, KG. 2004. Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids* 18: 581-592.

Nagarajan M, Benjakul S, Prodpran T, Songtipya HK. 2012. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperature. *Food Hydrocolloids* 29: 389-397.

Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. 2008. Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids* 22: 615-622.

Normand V, Muller S, Ravey JC, Paker A. 2000. Gelation kinetics of gelatin: a master curve and network modeling. *Macromolecules* 33: 1063–1071.

Ockerman HW, Hansen CL. 1999. Glue and gelatine. In. *Animal by-product processing and utilization*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 183-216.

Official methods of analysis (AOAC). 2002. Association of Analytical Communities 17^a ed.

Osborne, K.; Voight, MN.; Hall, D.E Utilization of Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) carcasses for the production of gelatin. In: M. N. VOIGHT; J. K. BOTTA (Eds.). *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability* Lancaster: Technomic Publishing Co., 1990. p. 143–151.

Piez KA, Sherman MR. 1970. Equilibrium and kinetic studies of the helix-coil transition in α 1-CB2, a small peptide from collagen. *Biochemistry* 9: 4134–4140.

Poppe J. 1992. Gelatin. In A. Imeson (Ed.), *Thickening and gelling agents for food* Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional. pp 98-123.

Privalov PL. 1982. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.* 35: 1–104.

Ramachandran VS. 1988. Perceiving shape from shading. *Scientific American*, 269:76-83.

Ratnasari I, Yuwono SS, Nusyam H, Widjanarko SB. 2013. Extraction and characterization of gelatin from different fresh water fishes as alternative sources of gelatin. *International Food Research Journal* 20(6): 3085-3091.

Ratnasari I, Sudarminto SY, Nusyam H, Simon B, Widjanarko E. 2014. Extraction Process Modification to Enhance Properties of Skin Gelatin of Pangas Catfish (*Pangasius pangasius*). Food and Public Health 4(3): 140-150.

Rawdkuen S, Thitipramote N, Benjaku S. 2013. Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. International Journal of Food Science and Technology 3: 1093–1102.

Ribeiro CFA, Park KJ, Hubinger MD, Ribeiro SCA, Bucci, CGC. 2013. Influência das variáveis de processo na desidratação osmótica de peixe piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*). Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais 15: 335-347.

Sarbon NM, Badii F, Howell NK. 2013. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. Food Hydrocolloids 30: 143-151.

Schrieber R, Gareis H. 2007. Gelatin handbook e Theory and industrial practice. Wiley-VCH. Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-31548-2

Shahiri TH, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Mahoonak ARS. 2010. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Bioresource Technology 101: 6207–6214.

Shahiri TH, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Sadeghi MAR, Rostamzad, H. 2012. Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). International Food Research Journal 19(1): 251-257.

Shyni, K. Hema, G.S Ninan, G. Mathew, S Joshy, C.G Lakshmanan, P.T Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna

(*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). Food Hydrocolloids 39: 68-76.

Silva R, Bandeira, SF, Pinto, LAA. 2014. Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). Food Science and Technology 57: 580-585.

Sperling LH. 1985. Introduction of physical polymer science. John Wiley and Sons. Inc New York.

Stainsby G. 1987. Gelatin gels, In: Pearson, A.M., Dutson, T.R., Baily, A.J. (Eds.), Collagen as Food: Advances in Meat Research, vol.4. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 209-222.

Stanley FD. 2002. Improved alkaline process for preparing type B fish gelatin. World Intellectual Property Organization. WO/2002/094959

Te Nijenhuis K. 1977. Gelatin Advances in polymer science pp. 160–193.

White JA, Hart RJ, Kry JC. 1986. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. Journal Automatic Chemical 8: 170-177.

Wong DWS. 1994. Mechanism and theory in food chemistry. New York: Van Nostrand Reinhold.

Yang H, Wang Y, Jiang M, Oh, JH, Herring J. Zhou P. 2007. Optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. Journal of Food Science 72(4):188-C195.

Yang H, Wang Y, Zhou P, Regeistein JM. 2008. Effects of alkaline and acid pre-treatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. Food Hydrocolloids 22(8):1541-1550.

CAPÍTULO III: Obtenção de gelatina de pele de dourada (*Brachyplathystoma rousseauxii*) utilizando dois processos de extração

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi demonstrar o efeito dos processos de extração utilizando hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 e hidróxido de sódio (NaOH) como pré-tratamento, sobre as propriedades da gelatina da pele de dourada (*Brachyplathystoma rousseauxii*). Foram utilizadas duas metodologias para extrair colágeno e obter gelatina a partir da pele de dourada (*Brachyplathystoma rousseauxii*). Foram utilizados pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e processo de extração a 64 °C por 6 horas em banho maria e a gelatina obtida foi caracterizada através das análises de rendimento, força de gel, cor, viscosidade, perfil de aminoácidos, ponto de fusão, capacidade emulsificante e microscopia eletrônica de varredura. A gelatina com pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) apresentou diferença ($p < 0,05$) e maior potencial tecnológico devido maior rendimento, maior quantidade de hidroxiprolina e melhores propriedades (força do gel, viscosidade, ponto de fusão, poder emulsificante), no entanto a gelatina extraída com Ca(OH)_2 apresentou géis fracos e menor ponto de fusão características adequadas para produtos refrigerados onde são necessárias baixas temperaturas de gelificação. As duas gelatinas apresentaram coloração clara e brilhante e a glicina como aminoácido majoritário. Conclui-se que as duas gelatinas obtidas podem ser utilizadas em várias aplicações em produtos de acordo com a característica que se deseja obter.

Palavras chave: colágeno; *Brachyplathystoma rousseauxii*; pré-tratamento; propriedades.

ABSTRACT

The objective of this research was to demonstrate the effect of extraction processes using calcium hydroxide Ca(OH)_2 and sodium hydroxide (NaOH) as a pretreatment on the properties of the golden skin gelatin (*Brachyplathystoma rousseauxii*). Two methodologies were employed to extract collagen and obtain gelatin from the skin of gilthead bream (*Brachyplathystoma rousseauxii*). Pre-treatment with sodium hydroxide (NaOH) and calcium hydroxide (Ca(OH)_2) was used and the gelatin obtained was characterized through analyses of yield, gel strength, color, viscosity, amino acid profile, melting point, emulsifying capacity, and scanning electron microscopy. When the characteristics of the gelatins obtained were compared, the one that used NaOH had greater ($p < 0.05$) technological potential due to higher yield, greater amount of imino acids, and better properties (gel strength, viscosity, melting point, emulsifying power). However, the gelatin extracted with Ca(OH)_2 had weak gels and lower melting point, which is appropriate for refrigerated products that require low gelling temperatures. It is concluded that the two gelatins obtained can be used in several applications in products according with the characteristic desired.

Keywords: collagen; *Brachyplathystoma rousseauxii*; pretreatment; properties.

1. INTRODUÇÃO

A gelatina é um polipeptídeo solúvel derivado da ruptura das ligações cruzadas entre cadeias polipeptídicas de colágeno. Quando o colágeno é tratado com ácido ou base e seguido por tratamento térmico, sua estrutura fibrosa é hidrolisada de forma irreversível, formando a gelatina (Zhou e Regenstein, 2004, 2005).

As propriedades das gelatinas são influenciadas por dois fatores principais: as características do colágeno e os pré-tratamentos aplicados no processo de extração do colágeno (Johnston-Banks, 1990). Neste contexto, a aplicação de diferentes pré-tratamentos e condições do processo de extração do colágeno tem evidenciado uma forte interferência sobre as propriedades da gelatina da pele de peixe e sobre o grau de conversão do colágeno em gelatina, o que está diretamente relacionado com o pH, a temperatura e o tempo de pré-tratamento, bem como com condições de extração (Montero e Gomez-Guillen, 2000; Zhou e Regenstein, 2004).

Os ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico, e os hidróxidos de sódio e de cálcio são substâncias amplamente utilizados na etapa de pré-tratamento do colágeno para a elaboração de gelatina de mamíferos (Choa, Gub e Kima, 2005). O colágeno da pele ou osso de mamíferos, quando tratado com solução ácida ou alcalina, se transforma em colágeno solúvel em água quente, por sua vez, o colágeno da pele de peixe, é mais facilmente hidrolisado com solução ácida ou alcalina mais brandas, por apresentar um alto teor de colágeno solúvel (Cho, Jahncke, Chin e Eun (2006).

Peles de peixe são materiais alternativos promissores para a extração de gelatina, por melhor utilizar os subprodutos de processamento de peixe e para atender às necessidades socioculturais (Montero e Gomez-Guillen, 2000). Existem restrições à gelatina de bovino e suíno em países em que predominam religiões como o judaísmo e o islamismo proíbem o consumo de qualquer produto relacionado com carne suína, enquanto os hindus são proibidos de consumir produtos de origem bovina (Karim e Bhat, 2009). Além disso, a gelatina de fontes aquáticas está livre de problemas sanitários como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) também conhecida como mal da vaca louca (Sadowska, Kolodziejska e Niecikowska, 2003).

No entanto, para ser aplicada na indústria de alimentos e farmacêutica, a gelatina de peixe depende de propriedades reológicas, como a força do gel e a viscosidade, bem como da transparência, da solubilidade e do ponto de fusão (Gomez-Guillen, et al., 2007).

A extração de gelatina utilizando pré-tratamento com hidróxido de sódio foram feitas em lulas (*Dosidicus gigas*) (Kim e Cho, 1996), tubarão azul (*Prionace glauca*) (Yoshimura et al. 2000), tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Jamilah e Harvinder, 2002), bacalhau (*Gadus morhua*), pescada (*Cynoscion* sp), areeiro (*Solea lascaris*) e linguado (*Paralichthys patagonicus*) (Gómez-Guillen et al., 2002), atum albacora (*Thunnus spp.*) (Cho, Gu e Kim, 2005), peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Yang et al., 2007) e corvina (*Argyrosomus regius*) (Cheow et al. 2007). Por sua vez, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio foi utilizado para extrair gelatina de peles de peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Liu, Li e Guo, 2008), tilápia vermelha (*Oreochromis nilotica*), walking catfish (*Clarias batrachus*), striped catfish (*Pangasius sutchi fowler*) (Jamilah et al., 2011), pangas catfish (*Pangasius pangasius*), Asian redtail catfish (*Hemibagrus nemurus*), striped snakehead (*Channa striata*), tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ratnasari et al., 2013) e pangas catfish (*Pangasius pangasius*) (Ratnasari et al., 2014).

O objetivo desta pesquisa foi demonstrar o efeito dos processos de extração utilizando hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 e hidróxido de sódio (NaOH) como pré-tratamento, sobre as propriedades da gelatina da pele de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas peles frescas da espécie de peixe dourada (*B. rousseauxii*), adquiridas no mercado de peixe de Belém (Ver-o-Peso) e transportadas refrigeradas a 5°C em caixas isotérmicas para o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Foram realizados os planejamentos experimentais utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) sendo as variáveis

independentes tempo de extração (6, 7, 9 11 e 12 horas) e temperatura de extração (35, 40, 50, 60 e 64°C) no pré-tratamento com NaOH e tempo de pré-tratamento (6, 7, 10, 13 e 14 dias) e temperatura de extração (35, 40, 50, 60 e 64°C) no pré-tratamento com Ca(OH)₂. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR) para definir as melhores condições para as respostas rendimento total do processo e força do gel e função desejabilidade para escolha do ponto ótimo do planejamento.

2.1 Obtenção da gelatina pelo método NaOH

O colágeno foi obtido seguindo metodologia descrita por Montero e Gómez-Guillén (2000), com adaptações. Após lavagem em água corrente, as peles do peixe foram cortadas nas dimensões 4 cm x 4 cm. Inicialmente foram imersos em solução aquosa de NaCl 0,6M por 15 min, seguida por imersão em solução de NaOH 0,3 M por 15 min e, finalmente, em solução de ácido acético (C₂H₄O₂) 0,02M por 60 minutos. Em todas as etapas, a imersão ocorreu sob agitação branda, com posterior lavagem das peles em água, com 3 repetições. O material resultante foi adicionado de água e colocado em banho-maria para extração do colágeno a 64°C por 6 horas, condições ótimas do planejamento. Após o tempo de extração, o material sobrenadante foi recolhido e submetido à filtração em papel de filtro Whatman nº4. O colágeno desnaturado obtido foi colocado em bandejas, congelado a -50°C e liofilizado por 30 horas. O produto liofilizado (gelatina) foi embalado a vácuo e armazenado -22°C.

2.2 Obtenção da gelatina pelo método Ca(OH)₂

A gelatina foi obtida pelo método de calagem, com base na metodologia proposta por Jamilah et al. (2011). As peles do peixe foram lavadas em água corrente, para remover materiais indesejáveis, e o excesso de água foi removido. As peles foram então imersas em um solução saturada de Ca(OH)₂, na concentração de 27 g/L a 20 °C. Para cada kg de pele úmida foi usado 2 L de Ca(OH)₂. O tempo de pré-tratamento nesta solução foi de 12 dias (condições ótimas do planejamento), após as peles foram retiradas e lavadas com água (1:10), para remover o excesso de Ca(OH)₂, mantendo as peles em

pH 10. À cada 20g de pele foi adicionada 100 mL de água destilada e o conjunto foi mantido em banho-maria a 64 °C por 6 horas para extração do colágeno. Em seguida, foi utilizado ácido clorídrico puro (0,5 mL) para reduzir o pH da solução. O colágeno extraído foi filtrado em filtro Whatman nº4, acondicionado em bandejas, congelado -50°C e liofilizado por 30 horas. O produto liofilizado (gelatina) foi embalado a vácuo e armazenada -22°C, para posterior análise.

2.3 Determinações físico-químicas

Foram realizadas análises de umidade (método nº 950.46), proteínas totais (método nº 928.08), lipídeos (método nº 960.39) e cinzas (método nº 920.153), todos segundo a AOAC (2002). O pH da pele foi determinado pelo método nº 981.12 da AOAC (2002) e da gelatina pela metodologia proposta por Schrieber e Gareis (2007). Para a determinação do perfil de aminoácidos foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta performance Waters-PICO Tag™, Waters Model 712 WISP (Waters, Watford, Herts, UK), segundo metodologia proposta por White, Hart and Fry (1986). A atividade de água foi determinada em termohigrômetro eletrônico (Aqualab 3TE, Decagon Devices Inc. Pullman USA). Para determinação da cor instrumental foi utilizado um colorímetro (CR 310, Minolta, Japan), no espaço CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) L*, a*, b*, onde: L*: luminosidade; a*: intensidade da cor vermelha; b*: intensidade da cor amarela. Foram calculados o índice de saturação C* e o ângulo de tonalidade h° (Hunterlab, 2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Determinação das propriedades tecnológicas

O rendimento total (%) foi calculado pela razão entre o peso da gelatina e o peso úmido da pele (Binsi et al., 2009). A força do gel (Bloom) foi determinada em analisador de textura, usando sonda de teflon cilíndrica, com 12,5 mm de diâmetro, pressionando 4 mm no gel de gelatina com velocidade de 1 mm/s (Choi e Regenstein, 2000).

As análises morfológicas foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo LEO-1430, USA. As amostras foram metalizadas com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 min. As condições de análises para

as imagens de elétrons secundários foram: corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kV e distância de trabalho = 15 mm. O ponto de fusão foi realizado baseado na metodologia descrita por Choi e Regenstein (2000).

A capacidade emulsificante (CE) foi determinada segundo Shahiri et al. (2010), com modificações. Foram misturados 20 mL de solução de gelatina a 3,3%, com 20 mL de óleo de soja. A mistura foi homogeneizada a 1750 rpm por 30 segundos e posteriormente centrifugada a 2000 x g por 5 minutos. A CE foi calculada como a razão entre o volume da porção emulsificada e o volume inicial. A viscosidade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Yang et al. (2008). A amostra foi colocada em banho a 45 °C e transferida para o viscosímetro de Ostwald-Fensk (nº 100), o qual foi colocado em banho a 60 °C durante 10 minutos, para a estabilização da temperatura, sendo realizada a leitura e o valor expresso em centipoise (cP).

2.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análises de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, para determinar as diferenças estatística entre as médias das análises realizadas nas gelatinas, com intervalo de 95% de confiança ($p < 0,05$). Para este fim, foi utilizado o software STATISTICA 7 for Windows.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da pele e da gelatina

Na Tabela 1 são apresentadas as características físico-químicas da pele e da gelatina extraída a partir da pele de dourada, pelas duas vias estudadas.

Tabela 1. Características físico químicas da pele e das gelatinas da pele de dourada obtidas por pré-tratamento com NaOH e Ca(OH)_2 .

Propriedades*	Pele	NaOH	(CaOH)_2
Umidade (%)	54.26±0.38	7.01±1.84 ^a	6.32±0.19 ^a
Lipídios (%)	17.59±1.90	25.09±0.24 ^a	20.87±0.70 ^b
Proteínas (%)	28.68±2.20	70.93±1.57 ^a	74.43±0.90 ^a

Cinzas (%)	0.36±0.03	0.07±0.02 ^a	0.19±0.17 ^a
pH	6.52±0.04	10.06±0.04 ^a	9.30±0.21 ^b
Atividade de água	0.96±0.02	0.25±0.05 ^a	0.23±0.03 ^a

* 3 replicatas; médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si

A umidade e a proteína da pele de dourada apresentaram valores próximos aos observados para peles de atum albacora (*Thunnus albacares*) (60.1% e 28.8%) (Rahman et al., 2008), patudo (*Priacanthus hamrur*) (52.79% e 25.19)% (Binsi et al., 2009) e atum (*Katsuwonus pelamis*) (56.5% e 27.7%) (Shyni et al., 2014). Estes últimos autores encontraram também 18.3% de lipídeos, 0.68% de cinzas e um pH de 6.3, para a pele da espécie de peixe estudada.

Os teores de umidade e a proteína da gelatina obtida quando o pré-tratamento foi realizado com NaOH foram similares ao observado para atum albacora (*Thunnus albacares*) (8.3% e 78.1%) (Rahman et al., 2008). Koli et al. (2012) encontraram para gelatina de pele de poleiro rosa (*Nemipterus japonicus*), 8.73% de umidade, 72.63% de proteínas e 0.30% de cinzas. Em gelatina de walking catfish (*Clarias batrachus*) obtida por pré-tratamento com Ca(OH)₂ foi encontrado 7.29% de umidade, 77.88% de proteína e 0.18% de cinzas (Jamilah et al., 2011).

Ambas gelatinas foram classificadas como do tipo A o que é atribuído ao tratamento químico com ácido empregado na etapa de pré-tratamento do colágeno. A baixa concentração de ácido (0,02M) no pré-tratamento com NaOH não foi suficiente para hidrolizar e promover a desaminação de glutamina e asparagina em ácido glutâmico e ácido aspártico (Johnston-Banks, 1990), não ocorrendo a redução do pH para 5. Enquanto que na gelatina com pré-tratamento com Ca (OH)₂, foi realizada uma pequena adição de ácido (0,5 mL) para reduzir pH visto que quando adicionado em maiores quantidades (1 mL), o valor do pH situava-se em 3,0 causando redução na força de gel. De acordo com FIB (2011) a firmeza do gel é independente do pH por uma ampla faixa de valores acima de 5.0. Isso é particularmente importante em sistemas alimentícios ácidos, tais como os encontrados em certos produtos de confeitaria, sobremesas gelatinosas à base de água e em produtos que usam culturas lácticas. Norziah et al, (2014) encontrou pH 8 para gelatina tipo A a partir de residuo de surimi.

A Tabela 2 apresenta o perfil de aminoácidos totais presentes na pele e gelatina de filhote (mg/g de proteína).

Tabela 2. Perfil de aminoácidos totais presentes na pele e da gelatina de dourada (mg/g de proteína) obtidas por pré-tratamento com NaOH e Ca(OH)₂.

Aminoácidos (mg/g)	Pele	NaOH	(CaOH) ₂
Aspartato (Asp)	3.70	2.56	3.28
Glutamato (Glu)	5.95	5.16	6.40
Hidroxiprolina (Hpro)	9.17	9.23	8.08
Serina (Ser)	2.51	2.85	2.81
Glicina (Gly)	13.27	16.46	17.71
Histidina (Hys)	0.73	0.80	1.30
Taurina (Tau)	0.08	Não detectado	Não detectado
Arginina (Arg)	4.16	5.27	5.71
Treonina (Thr)	1.95	2.02	1.65
Alanina (Ala)	4.56	6.03	7.04
Prolina (Pro)	6.87	8.89	9.78
Tirosina (Tyr)	0.71	0.63	0.43
Valina (Val)	1.88	1.43	1.43
Metionina (Met)	0.99	1.22	1.27
Cisteína (Cys)	0.66	1.05	0.68
Isoleucina (Ile)	1.33	1.20	1.14
Leucina (Leu)	2.33	1.80	1.83
Fenilalanina (Phe)	1.44	1.03	1.04
Lisina (Lys)	2.61	2.30	2.30
Pro + Hpro(Pro+Hpro)	16,04	18,12	17,86

As proteínas da pele e das gelatinas da pele de dourada apresentaram como aminoácido majoritário a glicina, seguido da prolina, hidroxiprolina e alanina (Tab. 2). Resultado semelhante foi observado por Arnesen e Gildberg (2007), para gelatinas de harp seal (*Phoca groenlandica*) e por Regenstein e Zhou (2007), para a gelatina de alaskan pollock (*Theragra chalcogramma*). Por sua vez, os teores de metionina, taurina, histidina e tirosina, em ambas gelatinas, foram baixos.

Os teores de iminoácidos (Pro + HPro) foram de 16.04% na pele, 18.12% na gelatina pré-tratada com NaOH e 17.86% na gelatina pré-tratada com Ca(OH)₂. Acredita-se que a estabilidade estrutural de gelatina é largamente dependente da quantidade de hidroxiprolina (Cho et al. 2004), o que foi superior em gelatina com pré-tratamento com NaOH (9,23%). Diferentes autores relatam teores de iminoácido da mesma ordem de

grandeza, para gelatinas obtidas das peles de bacalhau (*Gadus morhua*) (17.0%) (Grossman e Bergman, 1992); perca do Nilo (*Lates niloticus*) (21.5%) (Muyonga et al., 2004); carpa (*Cyprinus carpio*) (19.47%) (Kasankala et al., 2007), bagre (*Bagre marinus*) (20%) (Liu, Li, Guo, 2008) e patudo (*Priacanthus hamrur*) (14.43%) (Binsi et al., 2009).

Como o aminoácido predominante na pele e nas gelatinas foi a glicina, de acordo com Lehninger, Nelson e Cox (1993), a estabilidade do colágeno e da gelatina é proporcional ao conteúdo de iminoácido e da glicina. Para completar a ligação na tripla hélice, moléculas de glicina são necessárias para ocupar cada terceira posição (Te Nijenhuis, 1977). Aminoácidos como triptofano e cisteína estão normalmente ausentes em gelatina convencional (FIB, 2011). No entanto, a presença de cisteína em baixa concentração, tanto na pele quanto nas gelatinas, foi semelhante ao encontrado por Badii e Howell (2006) e Cheow et al. (2007), em gelatina da pele de carapau (*Scomber scombrus*) e corvina (*Otolithes ruber*).

3.2 Caracterização tecnológica da gelatina

A Tabela 3 mostra as propriedades tecnológicas das gelatinas de dourada obtidas por pré-tratamento com NaOH e Ca(OH)₂.

Tabela 3. Propriedades tecnológicas das gelatinas de dourada obtidas por pré-tratamento com NaOH e Ca(OH)₂.

Propriedades	NaOH	Ca(OH) ₂
Rendimento (%)	30.6±1.24 ^a	21.33±0.24 ^b
Força de gel (g)	312±16.5 ^a	157±13.58 ^b
Viscosidade (cP)	3.4±0.16 ^a	2.5±0.16 ^b
Ponto de fusão (°C)	29.6±0.47 ^a	23±0.14 ^b
Poder emulsificante (%)	48.7±0.55 ^a	43.6±2.36 ^b
L* (Luminosidade)	65.02±1.11 ^b	85.01±2.21 ^a
a* (verde-vermelho)	0.40±0.17 ^a	-0.79±0.42 ^b
b* (azul-amarelo)	5.94±0.75 ^b	10.53±1.07 ^a
c* (croma)	5.95±0.74 ^b	10.57±1.10 ^a
h* (ângulo de tonalidade graus)	85.92±2.12 ^b	94.09±2.06 ^a

Teste de Tukey, com intervalo de 95% de confiança (p < 0,05); médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si

Os rendimentos das gelatinas foram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$), mas ambos foram considerados elevados, de acordo com Karim e Bhat (2009), o rendimento de extração de gelatina de peixe varia entre 6 e 19%. A diferença no valor de rendimento entre as amostras pode estar relacionada ao tempo de pré-tratamento. O tempo curto (2h) de pré-tratamento com NaOH e temperatura de extração de 64°C favoreceu maiores rendimentos. De acordo com Schrieber e Gareis (2007), o rendimento da extração aumenta com a elevação da temperatura (de 50 a 70° C). Enquanto que longo tempo (12 dias) de pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ utilizado pode ter contribuído para o menor rendimento, estando de acordo com os resultados de Cho et al. (2005). Segundo Yoshimura et al. (2000) o colágeno dissolve-se na solução de pré-tratamento e resulta numa perda em rendimento de gelatina ou devido à lixiviação de colágeno durante a lavagem (Jamilah e Harvinder, 2002), no pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Rahman et al. (2008) observaram rendimento de 18.0% em gelatina extraída da pele de albacora (*Thunnus albacares*). Sinthusamran et al. (2014), ao estudarem o efeito da temperatura e do tempo de extração do colágeno de seabass (*Lates calcarifer*) observaram que o rendimento de extração foi maior a 55° C, quando comparado com o processo realizado a 45 °C onde rendimento máximo foi obtido com 6 h de extração.

Várias pesquisas utilizando pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obtiveram rendimentos próximos aos encontrados para a dourada: 21.28% para Asian redtail catfish (*Hemibagrus wyckioides*), 21.93% para tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ratnasari et al., 2013) e 23.12% para pangas catfish (*Pangasius pangasius*) (Ratnasari et al., 2014). Rendimentos mais elevados foram observados para tilápia vermelha (*Híbrido de oreochromis sp*) (39.97%), Walking catfish (*Clarias batrachus*) (32.06%) e striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) (26.23%) (Jamilah et al. 2011).

O valor de força do gel da gelatina com pré-tratamento $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (157 ± 13.58 g) foi estatisticamente inferior ($p < 0.05$) à gelatina extraída com NaOH (312 ± 16.5 g). Os grupos hidroxila da hidroxiprolina atuam na estabilidade de α hélice, através de ligações de pontes de hidrogênio com a molécula de água, bem como ligações de hidrogênio direta com grupo carbonila (Wong, 1989), sendo a estabilidade estrutural de gelatina largamente dependente da

quantidade de hidroxiprolina (Cho et al, 2004), onde o valor superior foi em gelatina com pré-tratamento com NaOH (9,23%) quando comparado ao pré-tratamento com Ca(OH)_2 (8,08%)

Outro fator que pode ter influenciado a menor força do gel em gelatina extraída com Ca(OH)_2 pode ser atribuída à adição de ácido no pré-tratamento, para reduzir o pH. A hidrólise ácida pode ter afetado a ligação cruzada do colágeno como relatado por Zhou e Regenstein (2005), reduzindo a força do gel. A força do gel da gelatina de peixe varia de 124 a 426 g e as das gelatinas bovina e suína valores de 200 a 300 g (Karim e Bhat, 2009). Johnston-Banks (1990) apresentam uma classificação para a força do gel de gelatinas como: baixo (<150 g), média (150 a 220 g) e elevada (220 a 300 g). Por sua vez, Gudmundsson e Hafsteinsson (1997) sugerem que a força do gel pode depender do ponto isoelétrico da proteína e até certo ponto pode ser controlada pelo ajuste do pH.

A gelatina com pré-tratamento com NaOH pode ser considerada de elevada força de gel e oferece mais vantagens para boa parte das aplicações, por exemplo, permite um tempo mais curto de secagem para o produto final, sendo usada em quantidades menores. São mais efetivas e utilizadas em vários produtos fornecendo a textura ideal para gomas de mascar, patês, pastilhas etc. Gelatinas com baixa força do gel atuam em iogurte como protetor coloidal, prevenindo a sinérese e ajustando a consistência, de cremosa até quase sólida, em sobremesas lácteas como flan, pudim e leite gelificado, age como gelificante e estabilizante, conferindo textura lisa e macia além de ser empregada como agente aerante em mousses (FIB, 2011).

Gudmundsson e Hafsteinsson (1997), Montero e Gomez-Guillen (2000) e Fernandez- Diaz, Montero e Gomez-Guillen (2001) observaram valores de força do gel na faixa de 100 a 210 g, para gelatinas de peles de pescada, bacalhau e areeiro. Por sua vez, valores superiores de força do gel foram observados para gelatina de pele de atum (*P. macracanthus*) (254.10 g) (Benjakul et al., 2009) e de pele de robalo (*Centropomus undecimalis*) (282-369 g) (Sinthusamran et al., 2014). Utilizando pré-tratamento com Ca(OH)_2 , Liu, Li e Guo (2008) obtiveram gelatina de pele de peixe-gato (*Ictalurus punctatus*), com força do gel de 276.5 g. Ratnasari et al. (2013) e Ratnasari et al. (2014) observaram força do gel de 191.20 g para a gelatina de tilapia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*) e de 343.18 g para a gelatina de pangas catfish (*Pangasius pangasius*), respectivamente.

A viscosidade da gelatina obtida com NaOH foi superior à viscosidade da gelatina obtida com Ca(OH)_2 (Tab. 3), porém ambos os valores ficaram dentro da faixa de 2 a 7 cP observada para gelatinas comerciais (Johnston-Banks 1990; Jamilah e Harvinder 2002). Jamilah e Harvinder (2002), Yang et al. (2007) e Ratnasari et al. (2014) observaram valores de viscosidade de 3.2-3.3 cP, para gelatinas de tilápia vermelha, bagre e pangas catfish (*Pangasius pangasius*), extraídas utilizando pré-tratado com Ca(OH)_2 . Segundo Stainsby (1987), a variação no valor do pH pode promover alteração na viscosidade da gelatina, sendo que viscosidades mínimas ocorrem em meio alcalino ($\text{pH} > 10$). A redução da viscosidade pode ser vantajosa durante o desenvolvimento e formulação de novos produtos alimentares, tais como bebidas lácteas (Bhat e Karim, 2009) e também em indústria de aplicações de confeitos de amidos moldados, onde a alta velocidade de trabalho dos modernos equipamentos de produção requer o uso de uma gelatina com baixa viscosidade para prevenir o endurecimento das extremidades junto com a rápida distribuição nos moldes.

O ponto de fusão da gelatina extraída com NaOH foi estatisticamente superior ($p > 0,05$), ao observado na gelatina extraída com Ca(OH)_2 (Tabela 3). Este comportamento pode ser correlacionado ao teor de hidroxiprolina, a força do gel e a viscosidade, que foram também superiores na gelatina extraída com NaOH. Segundo Choi e Regenstein (2000) e Gudmundsson (2002), o ponto de fusão de gelatinas aumenta com o tempo de maturação e com os níveis de hidroxiprolina. Gelatinas com maior ponto de fusão fornecem maior sensação durante a degustação e consumo (Gómez-Guillén et al., 2002). Valores de ponto de fusão de 28,9 °C foram observados para a gelatina de tilápia preta (*Tilapia rendalli*) (Jamilah & Harvinder, 2002), 25,1 °C para a de bagre (*Bagre marinus*) (Liu, Li e Guo, 2008), 27,1 °C para a pele de silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Boran et al., 2010), 24,9 °C para a de Walking catfish (*Clarias batrachus*) (Jamilah et al., 2011) e 25°C para a gelatina de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ratnasari et al., 2013), 26.3-27.0 °C para a gelatina de robalo (*Centropomus undecimalis*) (Sinthusamran et al., 2014).

O poder emulsificante da gelatina da pele de dourada (NaOH) apresentou-se superior e diferente ($p < 0,05$) ao observado na gelatina $(\text{CaOH})_2$. O grau de exposição dos resíduos hidrófobos e a maior quantidade de tirosina (Tab. 2) podem ter sido responsáveis pela maior capacidade de emulsificação da gordura (Ninan, et al, 2011). A natureza anfotérica e zona hidrofóbica na cadeia peptídica faz a gelatina se comportar como um emulsionante e que pode ser utilizado na fabricação de caramelos emulsões água-em-óleo, tais como margarina de baixo teor de gordura, molhos de salada e chantilly (Baziwane e He, 2003). Koli, et al., (2012) encontraram capacidade emulsificante em gelatina de pele e osso de corvina (*Otolithes ruber*) de 55,70% e 40,50%, respectivamente. Os mesmos autores encontraram para poleiro rosa (*Nemipterus japonicus*) valor de 47,50% e 35,50%, respectivamente Lassoued et al., (2014) encontraram poder emulsificante de 36,42% em gelatina de pele de thornback ray (*Raja clavata*).

A cor da gelatina depende das matérias-primas usadas e método de extração (Ockerman e Hansen, 1999) mas, em geral, a cor não influencia nas propriedades funcionais. Valores de L^* , b^* , c^* e h^* na gelatina extraída com NaOH foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) e inferior ao comparado com a gelatina extraída com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, apresentando esta última uma coloração mais clara e brilhante. Pela sua alta transparência e brilho, a gelatina promove uma aparência atraente, além de fornecer textura e elasticidade características, mantendo a estrutura e evitando a cristalização dos açúcares (FIB, 2011).

Shyni et al. (2014) encontraram valor de L^* de $82,8 \pm 0,40$ em gelatina de tubarão e a classificou como branco perolado. Muyonga et al. (2004) afirmaram que a eficiência do processo de filtração durante a extração da gelatina afeta o grau de claridade da solução de gelatina, no entanto, a cor não afeta as propriedades funcionais (Ockerman e Hansen, 1988). Jamilah et al. (2011) encontraram valores de L^* , a^* e b^* de 79.45, -0.71 e 5.75 para gelatina de tilápia vermelha com pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

3.3 Morfologia da gelatina

Analisando as eletromicrografias das gelatinas submetidas ao pré-tratamento com NaOH e com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ é possível observar que as duas (Fig

1A e 1B) apresentaram estrutura de gel fina sendo que a primeira apresentou uma estrutura com maior número de filamentos de proteínas vazios (Fig. 1A), possivelmente, correlacionada com a baixa agregação de cadeias peptídicas durante a gelificação. Geralmente, o arranjo e associação de moléculas de proteína na matriz de gel contribuem diretamente para a resistência do gel de gelatina (Benjakul et al., 2009). Ratnasari et al. (2014) observaram uma microestrutura desuniforme, com fio ligeiramente espesso e pequenos espaços vazios, para a gelatina da pele de Pangas Catfish (*Pangasius pangasius*), submetida a pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

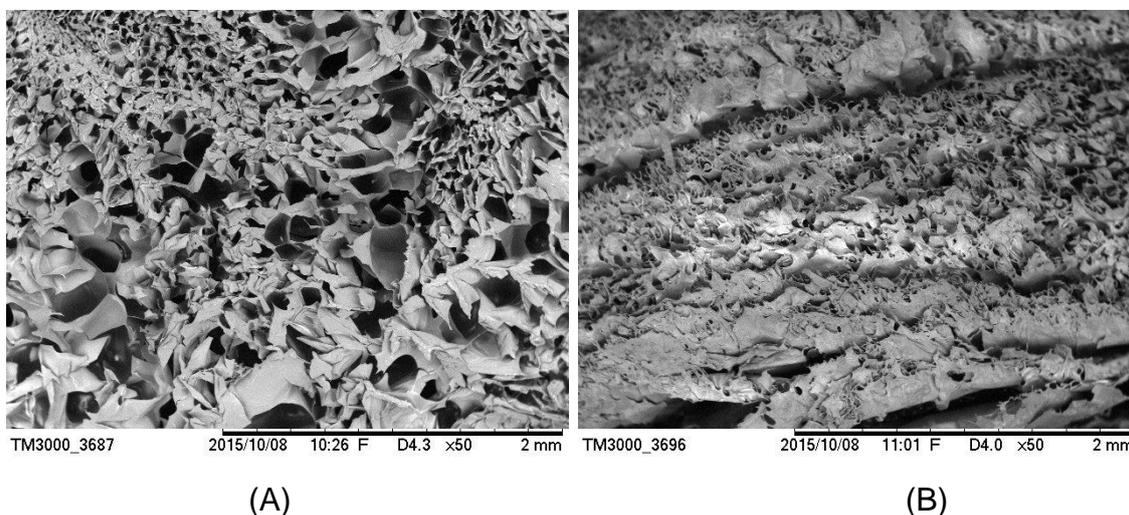


Figura 1: Eletromicrografia da gelatina da pele de dourada, com um aumento de 50x. (A) pré-tratamento com NaOH; (B) pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

4. CONCLUSÃO

Com base neste estudo, foi possível concluir que a gelatina extraída com pré-tratamento com NaOH apresentou nas suas propriedades funcionais maior potencial tecnológico devido maior rendimento, maior quantidade de hidroxiprolina e melhores propriedades (força do gel, viscosidade, ponto de fusão, poder emulsificante) podendo ser utilizada como ingrediente em diversos produtos. A gelatina extraída com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apresentou géis fracos e menor

ponto de fusão características adequadas para produtos refrigerados onde são necessárias baixas temperaturas de gelificação.

REFERÊNCIAS

Arnesen, JA, Gildberg, A. (2002). Preparation and characterization of gelatin from the skin on harp seal (*Phoca groenlandica*). *Bioresource Technology*, 82(2), 191-194.

Ahmad, B. Benjakul, S. 2011. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pre-treatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25: 381-388.

Badii, F. Howell, N.K. (2006) Fish gelatine: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*. 20(5):630-640.

Baziwane, D., & He, Q. (2003). Gelatin: the paramount food additive. *Food Reviews International*, 19(4), 423-435.

Bhat, R, Karim, AA (2009). Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatina *Food Chemistry* 113 : 1160–1164

Benjakul, S, Oungbho, K, Visessanguan, W. Thiansilakul, Y, Roytrakul, S. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chemistry* 116:445–451.

Binsi, PK, Shamasundar, BA, Dileep, AO, Badii, F. Howell, NK. (2009). Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, 23(1): 132–145.

Boran, G., Mulvaney, S. J., & Regenstein, J. M. (2010). Rheological properties of gelatin from silver carp skin compared to commercially available gelatins from different sources. *Journal of Food Science*, 75(8), E565–E571.

Cheow, CS, Norizah, MS, Kyaw, ZY, Howell, NK. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry* 101 (2007) 386–391.

Cho, SM, Gu, YS, Kim, SB. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 19: 221–229.

Cho, S. H., Jahncke, M. L., Chin, K. B., Eun, J. B. (2006). The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja Kenojei*) skins. *Food Hydrocolloids*, 20, 810–816.

Choa, S.M, Gub, Y.S, Kima, S.B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*,19: 221–229.

Choi, SS, Regenstein, JM. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, 65: 194-199.

Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. (2001). 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*, 74, 161-167.

Gómez-Guillén, MC, Fernández-Díaz, MD, Ulmo, N, Lizarbe, MA, Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16:25-34.

Gómez-Guillen, M.C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., and Montero, P. 2007. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food hydrocolloids*, 21: 1133-1143.

Grossman, S. Bergman, M. (1992). Process for the production of gelatin from fish skin. United States Patent No 5,093, 474.

Gudmundsson, M, Hafsteinsson. H. (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, 62: 37-39.

Hunterlab Inc. (2008). Applications Note: CIE L * a * b * Color Scale. 8:1–4.

Jamilah, B, Harvinder, KG. (2002). Properties of gelatins from skins of fish: black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77:81-84.

Jamilah, B., Tan., K.W., Umi Hartini, M.R., Azizah, A. 2011. Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids*. 25: 1256-1260.

Johnston-Barks, F.A. 1990. Gelatin. In Harris, P. (Ed.), *Food Gels*. London: Elsevier Applied Food Science Series, 150 pp.

Kasankala, L. M., Xue, Y., Weilong, Y., Hong, S. D., & He, Q. (2007). Optimization of gelatin extraction from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 98(17), 338e343.

Karim, AA, Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23:563–576.

Kim JS, Cho SY. Screening for raw material of modified gelatin in marine animal skins caught in coastal offshore water in Korea. *Agric Chem Biotechnol*. 1996;39:134–139.

Koli, JM, Basu, S, Nayak, BB, Patange, SB, Pagarkar, AU, Gudipati, V.(2012) Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger-toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). food and bioproducts processing 90: 555–562

Lassoued, I, Jridi, M, Nasri, R, Dammak, A, Hajji, M, Nasri, M, Barkia, A. (2014). Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatina. Food Hydrocolloids 41: 309-318.

Ledward, D. A. (1986). Gelation of gelatin. In J. R. Mitchell, & D. A. Ledward (Eds.), Functional properties of food macromolecules (pp. 171–201). London: Elsevier.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Principles of biochemistry: with an extended discussion of oxygen-binding proteins. New York: Worth Publishers, 1993. 1013 p.

Liu, H., Li, D., and Guo, S. 2008. Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin from fish skins preserved by different methods. LWT-Food Science and Technology 41: 414-419.

Muyonga, JH, Cole, CGB, Duodu, KG. (2004). Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocolloids, 18:581-592.

Montero, P, Gómez-Guillén, MC. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscai*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. Journal of Food Science. 65:434-438.

Normand, V., Muller, S., Ravey, J. C., & Paker, A. (2000). Gelation kinetics of gelatin: a master curve and network modeling. Macromolecules, 33:1063–1071.

- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (1999). Glue and gelatine. In *Animal by-product processing and utilization* (pp. 183e216). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ratnasari, I, Yuwono, SS, Nusyam, H, Widjanarko, S. B. (2013). Extraction and characterization of gelatin from different fresh water fishes as alternative sources of gelatina. *International Food Research Journal* 20(6): 3085-3091.
- Ratnasari I, Sudarminto SY, Nusyam H, Simon BW. (2014). Extraction process modification to enhance properties of skin gelatin of Pangas Catfish (*Pangasius pangasius*). *Food and Public Health* 4(3): 140-150.
- Rahman, MS, Al-Saidi, GS, Guizani, N. (2008). Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatina. *Food Chemistry* 108 : 472–481.
- Regenstein e Zhou (2007). Comparison of water gel desserts from fish skin and pork gelatins using instrumental measurements. *Journal of food science* 72(4):196-201
- Sadowska, M., I. Kolodziejska and C. Niecikowska. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.*, 101: 621-625. 2003. *Food Chem.*, 81: 257-262.
- Schrieber, R. and Gareis, H. 2007. *Gelatin Handbook. Theory and Industrial practice*. P. 375. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA.
- Shahiri T. H, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Sadeghi M.A.R. 2010. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Biores Technol* 101: 6207-6214.
- Shyni, K, Hema, GS, Ninan, G, Mathew, S, Joshy, CG, Lakshmanan. PT (2014) Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna

(*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocolloids* 39:68-76

Sinthusamran, S, Benjakul, S, Kishimura, H. (2014). Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. *Food Chemistry* 152 : 276–284.

Stainsby, G., 1987. Gelatin gels, In: Pearson, A.M., Dutson, T.R., Baily, A.J. (Eds.), *Collagen as Food: Advances in Meat Research*, vol.4. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 209-222

Te Nijenhuis K. 1977. Gelatin *Advances in polymer science* pp. 160–193.

White, JA, Hart, RJ, Kry, JC. (1986). An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. *Journal Automatic Chemical*, 8:170-177.

Wong, D. W. S. (1989). *Mechanism and theory in food chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc.

Yang, H., Wang, Y., Jiang, M., Oh, J. H., Herring, J., & Zhou, P. (2007). 2-step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. *Journal of Food Science*, 72, C188–C195.

Yang, H, Wang, Y, Zhou, P, Regenstein, JM. (2008). Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*, 22:1541-1550.

Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D., & Shirai, K. (2000). Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 685–690.

Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2004). Optimization of extraction conditions for pollock skin gelatin. *Journal of Food Science*, 69, C393–C398.

Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2005). Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*, 70, C392–C396.