



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AGROINDUSTRIAL

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
GELATINA DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis urolepis hornorum*)**

Aluno: Alexandre da Trindade Alfaro

ALEXANDRE DA TRINDADE ALFARO

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
GELATINA DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis urolepis hornorum*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências (área do conhecimento:
Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientadores: Prof. Dr. Celso Medina Fagundes
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández

Pelotas, 2008

Banca examinadora

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
(FURG)

Prof. Dr. CELSO MEDINA FAGUNDES
(UFPEL)

Prof. Dr. WLADIMIR PADILHA DA SILVA
(UFPEL)

Prof. Dr. CLÁUDIO RAFAEL KUHN
(CEFET/RS)

A minha família, em especial aos meus avós, Florestino e Emília.

Dedico.

Todos os dias antes de dormir, lembro e esqueço como foi o dia, sempre em frente, não temos tempo a perder ... temos todo tempo do mundo... somos tão jovens.

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Germano Dornelles, pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández, pelo incentivo, ensinamentos e longa amizade.

Aos Prof. Dr. Celso Medina Fagundes e Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, pelo apoio e prontidão necessários para que fosse possível concluir este trabalho.

Ao recanto água-viva pela doação da matéria-prima.

Ao colega de trabalho Prof. Msc. Edilson Ferreira da Silva pelo imprescindível auxílio na formatação do trabalho.

Ao colega de trabalho Prof. Dr. Mário Cunha pelas valiosas dicas na revisão da tese.

À professora Joanita pela revisão do português da tese.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado e ao Prof. Dr. João Vendruscolo pela disponibilização da Máquina Universal de Testes (Instron).

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Suínos e Aves pela cooperação na liofilização das amostras.

Aos colegas de trabalho, professores da coordenação de Química da UTFPR, pela flexibilidade que permitiu me ausentar por alguns períodos, para que conseguisse realizar este trabalho.

Aos amigos do Cassino: Ceccon, Ana, Nathale, Fernando, Evandro, Márcio, Lelo, Valério, Ângela e Didi.

Aos amigos Dirceu e Dona Diva que me hospedaram nas diversas vezes que estive em Pelotas para concluir esse trabalho.

Aos amigos: Márcio, Edenes, Felipe, Mayara pelo incentivo e amizade.

À amiga Jaqueline Matzenbacher, pelo companheirismo e incentivo.

Ao pessoal técnico da UTFPR, FURG e UFPEL pelo apoio e atenção dispensada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, pela solicitude e ensinamentos.

Aos alunos Bruna, Eduardo, Ana, Michele e Ângela companheiros no desenvolvimento deste trabalho, pela prontidão, dedicação e seriedade.

Aos bolsistas do Laboratório de Qualidade Agroindustrial (LAQUA) da UTFPR pela prontidão e disponibilidade.

Ao Laboratório de Biopolímeros e a Prof. Dra. Claire Tondo Vendruscolo pela disponibilização da estrutura laboratorial.

Aos amigos Ricardo Toralles e Caroline Borges pela disponibilidade e auxílio nas análises de viscoelasticidade

Ao colega Luciano Lucchetta pelo auxílio na análise de cor.

Ao amigo Gustavo Fonseca pelo auxílio na análise de força de gel, no analisador de textura (TA-XTplus).

À amiga Lucielen dos Santos, pelo auxílio na parte estatística do trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela flexibilidade que permitiu a realização deste trabalho.

À tia Fátima pelo apoio e incentivo para que eu pudesse buscar meus objetivos.

A minha família pelo apoio, confiança, incentivo e compreensão da minha ausência.

A todos os amigos da FURG, UFPEL e UTFPR que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ALFARO, Alexandre da Trindade. **Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*)**. 2008. 130f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A indústria da pesca é uma grande geradora de subprodutos ricos em colágeno, como pele e ossos. O aproveitamento integral destes recursos aumentaria o faturamento das empresas e reduziria problemas ambientais. O colágeno produz gelatina quando sofre desnaturação térmica. A gelatina tem muitas aplicações em produtos alimentícios, farmacêuticos, fotográficos entre outros, sendo uma substância caracterizada pela sua capacidade de formar géis termoreversíveis. Doenças relacionadas a bovinos e restrições religiosas a gelatina de mamíferos, tem motivado um crescente interesse em gelatinas de pescado. Este trabalho teve como objetivos determinar as condições ótimas de extração de gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*); caracterizar a amostra que apresentou maior força de gel e avaliar o efeito de alguns agentes nas suas propriedades funcionais. Para isso, foram empregadas técnicas de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de extração. As concentrações de NaOH (%) e H₂SO₄ (%), temperatura de extração (°C) e tempo de extração (h) , foram escolhidas como variáveis independentes, enquanto as variáveis resposta foram rendimento (%), viscosidade (cP) e força de gel (g). Observou-se que as concentrações de NaOH (%) e H₂SO₄ (%) possuem influencia significativa (p<0,05) sobre a viscosidade e força de gel, enquanto, a temperatura de extração (°C) e o tempo de extração (h) apresentaram influencia significativa (p< 0,05) sobre todas as variáveis dependentes. Os resultados sugerem que a elevação da temperatura e o prolongamento do tempo de extração propiciam elevados rendimentos, porém podem levar à redução da viscosidade e força de gel da gelatina. A gelatina de pele de tilápia obtida nas condições de processo que proporcionaram maior força de gel (propriedade comercial mais importante) foi caracterizada quanto a suas propriedades físico-químicas, microbiológicas, reológicas e estruturais. A gelatina obtida apresentou força de gel de 221g e viscosidade de 5,98cP, quando submetida a tempo de maturação de 18±1h. De maneira geral, o conteúdo iônico foi baixo e o rendimento do processo foi de 5,10%. A gelatina atendeu às exigências da legislação brasileira quanto aos padrões microbiológicos, com valor de pH 4,66 e pontos de fusão e geleificação de 25°C e 21°C, respectivamente. Então, foram avaliados os efeitos de vários agentes em duas diferentes concentrações e valores de pH (5,0 e 8,0) nas propriedades funcionais desta gelatina. Os dados obtidos foram comparados com os valores gerados pela gelatina sem adição de agentes e gelatina comercial de mamíferos. Os agentes testados nas concentrações especificadas (sacarose 4 e 8% (p/v), glicerol 5 e 10% (v/v), NaCl 0,3 e 0,8mol/L, MgCl₂ 0,3 e 0,8mol/L, MgSO₄ 0,3 e 0,8mol/L, KCl 0,3 e 0,8mol/L e transglutaminase 10 e 15mg/mL) geraram ligeira modificação na turbidez e levaram a um incremento da viscosidade. As propriedades reológicas variaram em proporções diferentes dependendo do agente, concentração e pH do meio. Com as suas incorporações o tempo necessário para formação do gel tende a ser prolongado.

Palavras-chave: Gelatina, pele, tilápia, otimização, caracterização, agentes.

ABSTRACT

ALFARO, Alexandre da Trindade. **Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*)**. 2008. 130f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The fishery industry is a great generator of collagen-rich by-products, such as skin and bones. The integral utilization of these resources would increase the profits of the companies and would reduce environmental problems. Collagen produces gelatin when it suffers thermal denaturation. The gelatin has several applications in food, pharmaceutical, photographic products among others, being a substance characterized by its capacity to form thermal reversible gel. Diseases related to bovine and religious restrictions to the mammalian gelatin have motivated a growing interest in fish gelatins. This work had as objective to determine the excellent conditions of gelatin extraction of tilapia skin (*Oreochromis urolepis hornorum*); to characterize the sample that presented greater gel force and to evaluate the effect of some agents in its functional properties. For this, were applied techniques of factorial design and response surface methodology to the optimization of the process of extraction. The concentrations of NaOH (%) and H₂SO₄ (%), extraction temperature and extraction time (h) were chosen as independent variables, while the response variables were yield (%), viscosity (cP), and gel strength (g). It was observed that the concentration of NaOH (%) and H₂SO₄(%) have significative influence ($p < 0,05$) upon the viscosity and gel strength, while the extraction temperature (°C) and the extraction time (h) showed significative influence ($p < 0,05$) upon all the dependent variables. The results suggest that the temperature rising and extraction time prolongation provide high yield, however they can lead to the reduction of viscosity and gel strength of the gelatin. The tilapia skin gelatin obtained in the conditions of process which provided greater gel strength (the most important commercial property) was characterized according to its physicochemical, microbiological, rheological and structural properties. The gelatin obtained has presented gel strength of 221g and viscosity of 5,98cP, when submitted to time of maturation of 18±1h. In general, the ionic content was low and the process yield was of 5,10%. The gelatin has regarded the Brazilian legislation demands related to the microbiological standards, with value of pH 4,66 and melting and gelling points of 25°C and 21°C, respectively. Then, the effects of several agents were analyzed in two different concentrations and values of pH (5,0 and 8,0) in the functional properties of this gelatin. The data obtained were compared to the values generated by gelatin with no addition of agents and commercial mammalian gelatin. The agents tested, in the specified concentrations (sucrose 4 and 8% (p/v), glycerol 5 and 10% (v/v), NaCl 0,3 and 0,8 mol/L, MgCl₂ 0,3 and 0,8 mol/L, MgSO₄ 0,3 and 0,8 mol/L, KCl 0,3 and 0,8 mol/L and transglutaminase 10 and 15mg/mL) have generated slight modification in the turbidity and led to an increase of viscosity. The rheological properties have varied in different proportions, depending on the agent, concentration and pH. With its incorporations, the setting time tends to be prolonged.

Key-words: Gelatin, skin, tilapia, optimization, characterization, agents.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de NaOH (%) e temperatura de extração (°C) (concentração de H₂SO₄ fixada em 0,25% e tempo de extração em 9 h) em função do rendimento da gelatina de pele de tilápia. 57
- Figura 2** Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de H₂SO₄ (%) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e tempo de extração em 9 h) em função do rendimento da gelatina de pele de tilápia. 57
- Figura 3** Superfície de resposta e diagrama de contorno do tempo de extração (h) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e concentração de H₂SO₄ em 0,25%) em função do rendimento da gelatina de pele de tilápia..... 57
- Figura 4** Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para o rendimento (% p/p) da gelatina de pele de tilápia. 58
- Figura 5** Superfície de resposta e diagrama de contorno do tempo de extração (h) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e concentração de H₂SO₄ em 0,25%) em função da viscosidade da gelatina de pele de tilápia. 62
- Figura 6** Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a viscosidade (cP) da gelatina de pele de tilápia. 63
- Figura 7** Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de NaOH (%) e concentração de H₂SO₄ (%) (tempo de extração fixado em 9 h e temperatura de extração em 50°C) em função da força de gel da gelatina de pele de tilápia. 66
- Figura 8** Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de H₂SO₄ (%) e tempo de extração (h) (temperatura de extração fixado em 50°C e concentração de NaOH em 0,25%) em função da força de gel da gelatina de pele de tilápia. 66

Figura 9	Superfície de resposta e diagrama de contorno do tempo de extração (h) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e concentração de H ₂ SO ₄ em 0,25%) em função da força de gel da gelatina de pele de tilápia.	66
Figura 10	Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a força de gel (g) da gelatina de pele de tilápia.	67

Capítulo 2

Figura 1	Análise eletroforética da gelatina por SDS em gel de poliacrilamida: a) gelatina de pele de tilápia; b) marcador padrão de proteína HiMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen).....	85
Figura 2	Determinação da força de gel na amostra de gelatina, submetida à refrigeração a 7±1°C (temperatura de maturação) por 18±1 h....	88
Figura 3	Módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' (a) ângulo de fase δ, (b) durante resfriamento de 40°C para 7°C da amostra de gelatina de pele de tilápia.....	90
Figura 4	Módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' (a) ângulo de fase δ, (b) durante aquecimento de 7°C para 40°C da amostra de gelatina de pele de tilápia.....	91

Capítulo 3

Figura 1	Valores de turbidez das amostras de gelatina de tilápia em pH 5,0.	104
Figura 2	Valores de turbidez das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.	105
Figura 3	Valores de viscosidade das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.	105
Figura 4	Valores de viscosidade das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.	106
Figura 5	Valores do módulo de elasticidade (G') e módulo viscosidade (G''), das amostras de gelatina de pele de tilápia, mensurados a 7°C em valores de pH 5,0 e 8,0, plotados em função da ponto de fusão (<i>melting point</i>).....	107

Figura 6	Valores dos pontos de geleificação (<i>gelling point</i>) das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.	108
Figura 7	Valores dos pontos de geleificação (<i>gelling point</i>) das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.	108
Figura 8	Valores dos pontos de fusão (<i>melting point</i>) das amostras de gelatina em pH 5,0.	109
Figura 9	Valores dos pontos de fusão (<i>melting point</i>) das amostras de gelatina em pH 8,0.	110
Figura 10	Valores da força de gel das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.....	110
Figura 11	Valores da força de gel das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.	111

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Valores reais das variáveis do planejamento experimental e seus respectivos níveis codificados.	51
Tabela 2	Matriz de planejamento experimental com valores codificados e resultados obtidos para rendimento (RE), força de gel (FG) e viscosidade (V).	53
Tabela 3	Efeitos estimados no rendimento das gelatinas de pele de tilápia.	55
Tabela 4	Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para o rendimento da gelatina de pele de tilápia.	56
Tabela 5	Resultados dos rendimentos experimental (p/p) e previsto (p/p) pelo modelo, desvio e desvio relativo nas condições ótimas do processo.	58
Tabela 6	Efeitos estimados na viscosidade das gelatinas de pele de tilápia.....	60
Tabela 7	Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a viscosidade da gelatina de pele de tilápia.	61
Tabela 8	Resultados da viscosidade experimental e prevista pelo modelo, desvio e desvio relativo nas condições ótimas do processo.	62
Tabela 9	Efeitos estimados na força de gel das gelatinas de pele de tilápia.	64
Tabela 10	Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a força de gel da gelatina de pele de tilápia.	65
Tabela 11	Resultados da força de gel experimental e prevista pelo modelo, desvio e desvio relativo nas condições ótimas do processo.	67

Capítulo 2

Tabela 1	Composição centesimal da pele de tilápia.	79
Tabela 2	Composição centesimal da gelatina de pele de tilápia.	79
Tabela 3	Íons de soluções da gelatina de pele de tilápia.	81
Tabela 4	Cor e turbidez da gelatina de pele de tilápia.	81
Tabela 5	Rendimento e pH natural da gelatina de pele de tilápia.	82
Tabela 6	Avaliações microbiológicas da gelatina de pele de tilápia.	83

Tabela 7	Composição de aminoácidos da gelatina de pele de tilápia.	87
Tabela 8	Força de gel da gelatina de pele de tilápia em diferentes tempos de maturação.	89
Tabela 9	Viscosidade da gelatina de pele de tilápia em diferentes tempos de maturação.	92

Capítulo 3

Tabela 1	Tempo de formação de gel (minutos) das gelatinas adidas de vários agentes em diferentes concentrações e valores de pH.	112
-----------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemical
ANOVA – Análise de variância
BU – base úmida
BS – base seca
BSI – British Standard Institution
cP – centipoise
°C – graus Celsius
cm – centímetros
DCCR – delineamento composto central rotacional
eq. – equação
FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
g – gramas
gap – distância (mm) utilizada em medidas viscoelásticas
GC - gelatina de pele de tilápia
GL1 - gelatina de pele de tilápia contendo glicerol 5% (v/v)
GL2 – gelatina de pele de tilápia contendo glicerol 10% (v/v)
GP - gelatina de mamíferos
h – unidade de horas
Kc1 - gelatina de pele de tilápia contendo KCl 0,3 mol/L
Kc2 - gelatina de pele de tilápia contendo KCl 0,8 mol/L
Mg1 - gelatina de pele de tilápia contendo MgCl₂ 0,3 mol/L
Mg2 - gelatina de pele de tilápia contendo MgCl₂ 0,8 mol/L
MgS1 - gelatina de pele de tilápia contendo MgSO₄ 0,3 mol/L
MgS2 - gelatina de pele de tilápia contendo MgSO₄ 0,8 mol/L
ml – mililitros
mod - modelo
Na1 - gelatina de pele de tilápia contendo NaCl 0,3 mol/L
Na2 - gelatina de pele de tilápia contendo NaCl 0,8 mol/L
ppm – partes por milhão
p/v – relação peso volume
RSM – metodologia de superfície de resposta

SA1 - gelatina de pele de tilápia contendo sacarose 4% (p/v)

SA2 - gelatina de pele de tilápia contendo sacarose 8% (p/v)

SDS PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TG1 - gelatina de pele de tilápia contendo transglutaminase 10 mg/mL

TG2 - gelatina de pele de tilápia contendo transglutaminase 15 mg/mL.

v/v – relação volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
1 REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1 Subprodutos da industrialização de pescado	22
1.1.1 Conceito	22
1.1.2 Generalidades	22
1.1.3 Características dos subprodutos	23
1.1.4 Aproveitamento de subprodutos.....	24
1.1.5 Qualidade dos subprodutos	24
1.2 Colágeno	25
1.2.1 Conceito	25
1.2.2 Estrutura molecular	25
1.2.3 Composição de aminoácidos	26
1.2.4 Tipos	27
1.2.5 Colágeno de pescado	28
1.2.6 Fontes	28
1.2.7 Aplicações.....	29
1.3 Colágeno versus gelatina	29
1.4 Gelatina	30
1.4.1 Conceito	30
1.4.2 Composição de aminoácidos	30
1.4.3 Estrutura.....	31
1.4.4 Processos de Extração	31
1.4.5 Gelatina de pescado	32
1.4.6 Processamento de gelatina de pescado	34
1.4.7 Parâmetros de qualidade	37
1.4.7.1 Umidade	37
1.4.7.2 Cinzas.....	37
1.4.7.3 Metais pesados.....	37
1.4.7.4 Força de gel.....	37
1.4.7.5 Viscosidade	38
1.4.7.6 Cor e Claridade.....	38
1.4.7.7 Valor de pH.....	38
1.4.7.8 Pontos de geleificação e fusão	38
1.4.7.9 Ponto isoeletrico	39
1.4.7.10 Microbiologia.....	39
1.4.8 Aplicações.....	39
2 METODOLOGIA GERAL	41
2.1 Material	41
2.2 Pré-tratamento da matéria-prima	41
2.3 Extração da gelatina	41
2.4 Planejamento experimental	42
2.5 Rendimento (RE)	43
2.6 Força de gel	43
2.7 Viscosidade	44
2.8 Composição centesimal da matéria-prima	44
2.9 Composição centesimal da gelatina	44
2.10 Avaliação de minerais	44

2.11 Avaliação de cor e turbidez	44
2.12 Determinação do pH.....	45
2.13 Avaliações microbiológicas.....	45
2.14 Eletroforese.....	45
2.15 Análise de aminoácidos	45
2.16 Preparo das amostras	46
2.17 Propriedades viscoelásticas.....	46
Capítulo 1 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA GELATINA DE PELE DE TILÁPIA (<i>Oreochromis urolepis hornorum</i>)	47
RESUMO	48
ABSTRACTS.....	48
1 Introdução	48
2 Material e métodos	49
2.1 Material	49
2.2 Pré-tratamento da matéria-prima	50
2.3 Extração da gelatina	50
2.4 Planejamento experimental	50
2.5 Rendimento (RE).....	51
2.6 Força de gel (FG)	52
2.7 Viscosidade (V).....	52
3 Resultados e discussão.....	52
3.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	52
4 Conclusões	67
Agradecimentos.....	68
5 Referências	68
Capítulo 2 - OBTENÇÃO DE GELATINA DE PELE DE TILÁPIA (<i>Oreochromis urolepis hornorum</i>) e sua caracterização.....	71
RESUMO	72
ABSTRACT	72
1 Introdução	72
2 Material e métodos	74
2.1 Material	74
2.2 Pré-tratamento e extração da gelatina.....	74
2.3 Composição centesimal da matéria-prima	75
2.4 Composição centesimal da gelatina	75
2.5 Avaliação de minerais	75
2.6 Rendimento	75
2.7 Avaliação de cor e turbidez	75
2.8 Determinação do pH.....	76
2.9 Avaliações microbiológicas.....	76
2.10 Força de gel.....	76
2.11 Propriedades viscoelásticas.....	76
2.12 Eletroforese.....	77
2.13 Análise de aminoácidos	77
2.14 Viscosidade.....	78

3 Resultados e discussão	78
3.1 Composição centesimal da pele de tilápia	78
3.2 Composição centesimal da gelatina	79
3.3 Avaliação de minerais	80
3.4 Cor e turbidez.....	81
3.5 Rendimento e pH natural	82
3.6 Avaliações microbiológicas.....	83
3.7 Composição de aminoácidos e distribuição de peso molecular da gelatina	84
3.8 Força de gel da gelatina	88
3.9 Propriedades viscoelásticas.....	89
3.10 Viscosidade.....	91
4 Conclusões	93
Agradecimentos	93
5 Referências	93
Capítulo 3 - EFEITO De AGENTES NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA GELATINA DE PELE DE TILÁPIA (<i>Oreochromis urolepis hornorum</i>) EM DIFERENTES VALORES DE pH	96
RESUMO	99
ABSTRACT	99
1 Introdução	99
2 Material e métodos	101
2.1 Material	101
2.2 Pré-tratamento da matéria-prima	101
2.3 Extração da gelatina	102
2.4 Preparo das amostras	102
2.5 Avaliação da turbidez.....	102
2.6 Força de gel.....	103
2.7 Viscosidade.....	103
2.8 Propriedades viscoelásticas.....	103
3 Resultados e discussão	104
4 Conclusões	112
Agradecimentos	113
5 Referências	114
3 DISCUSSÃO GERAL	122
4 CONCLUSÕES GERAIS	124
REFERÊNCIAS	125

INTRODUÇÃO GERAL

Diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos com intuito de apresentar opções para corrigir a deficiência protéica enfrentada por vários povos no mundo. Uma dessas linhas de trabalho é direcionada para a utilização mais racional dos recursos marinhos disponíveis.

Nesse sentido, sabe-se que o pescado é uma excelente fonte de proteína, pois seus músculos são compostos de proteínas de elevado valor nutritivo por conterem alta porção de aminoácidos essenciais, particularmente aqueles que são limitantes em proteínas de origem vegetal (SGARBIERI, 1999). As proteínas do pescado estão divididas em classes, baseadas em sua solubilidade ou nos componentes não-protéicos que podem ser parte integrante delas. Proteínas solúveis em água são chamadas albuminas e as proteínas solúveis em sais são conhecidas como globulinas (CONTRERAS, 1994).

O colágeno é a principal proteína estrutural do reino animal (COLE, 2006), e estima-se que no processamento de pescado, o resíduo após filetagem possa ser de até 75% do peso total (SHAHIDI, 1994), dos quais, grande parte consiste em pele e ossos com elevada quantidade desta proteína. O colágeno é caracterizado pelos altos teores de glicina, prolina e hidroxiprolina, sendo desnaturado na presença de padrões ácidos diluídos e convertido em proteína solúvel como a gelatina, quando solubilizado em soluções aquecidas (JOHNS, 1977).

Derivada do colágeno, a gelatina tem muitas aplicações em produtos alimentícios, farmacêuticos, fotográficos entre outros, é uma substância caracterizada por sua capacidade de formar géis termoreversíveis (SIMON et al., 2002); por ser uma substância sem cor e aroma; solúvel em água quente; e que quando presente em 1%, geleifica após o resfriamento, mas perde essa propriedade em fervura contínua. Todas as gelatinas possuem composição similar, contendo água, pequena quantidade de sais minerais e proteína pura do tecido conectivo. No entanto, dependendo da matéria-prima e pré-tratamento empregados, vários tipos de gelatina, com diferentes propriedades, podem ser obtidas (SCHOTT, 2001).

Tradicionalmente a extração de colágeno para produção de gelatina é realizada utilizando como matéria-prima ossos e peles de mamíferos, principalmente bovinos e suínos. No entanto, recentemente surgiram problemas sanitários relacionados com bovinos, como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (GILSENAN;

ROSS-MURPHY, 2000; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a). Existem também restrições à gelatina de mamíferos em países onde predominam religiões como islamismo e judaísmo, onde somente são aceitas se concebidas conforme os requerimentos da religião (GUDMUNDSSON; HÁFSTEINSSON 1997; CHOI; REGENSTEIN, 2000; JAMILAH; HARVINDER, 2002). Essas situações têm despertado um crescente interesse em gelatinas de pescado.

Por esses motivos, alguns grupos de pesquisa têm se dedicado à determinação das características da gelatina de pescado, no entanto, pouco ainda se conhece sobre suas propriedades funcionais e possíveis aplicações. Considera-se ainda, que a grande maioria dos estudos sobre gelatina de pescado dirige-se à análise de suas diferentes propriedades em relação à gelatina de mamíferos ou entre as diferentes espécies de pescado. No entanto, poucos trabalhos são voltados para a determinação da influência do processo de obtenção e a ação de agentes nas propriedades da gelatina. A produção de gelatina a partir de pele de pescado, subproduto da indústria pesqueira mostra-se como alternativa para o aproveitamento integral dos recursos aquáticos disponíveis, levando ao incremento dos lucros das indústrias processadoras e à redução de problemas de poluição ambiental.

O presente trabalho teve como objetivos a otimização dos parâmetros de processamento da gelatina obtida a partir de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*), a caracterização da gelatina que apresentou maior força de gel e a avaliação da influência de alguns agentes (sais, transglutaminase, glicerol e sacarose) nas suas propriedades funcionais.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Subprodutos da industrialização de pescado

1.1.1 Conceito

Não há uma definição para os constituintes dos subprodutos da indústria pesqueira, usualmente, fala-se em vísceras, cabeça, aparas, ossos e pele. As regulamentações, geralmente, os divide entre subprodutos que podem ser destinados para consumo humano e descarte (RUSTAD, 2003).

Segundo Oetterer (1994), o termo subproduto se refere a todos os resíduos e sobras do processamento de alimentos e que apresentam valor relativamente baixo. No caso de pescado, o material residual pode-se constituir de aparas do toalete antes do enlatamento, carne escura, camarões fora do tamanho para descasque manual ou mecânico, cabeças e carcaças.

Porém, deve-se observar que os subprodutos pesqueiros possuem valiosas proteínas e frações lipídicas, bem como vitaminas e sais minerais (RUSTAD, 2003). Assim a contínua pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias de utilização desses subprodutos são necessários para agregar valor a esses materiais, hoje desperdiçados ou subutilizados.

1.1.2 Generalidades

Nos últimos anos, tem aumentado gradativamente o interesse por subprodutos da indústria pesqueira, sendo considerados hoje como uma potencial fonte de recursos para exploração, ao invés de resíduos descartáveis.

As ações “depreciativas” do homem, tais como, a pesca indiscriminada e a excessiva poluição, entre outros, levou ao comprometimento das reservas naturais. Devido a essa demanda e diante do *déficit* quantitativo e qualitativo alimentar, torna-se necessário o emprego de técnicas que permitam o aproveitamento integral dos recursos disponíveis (SUZUKI, 1987).

Ainda, além da elevada exploração dos recursos, somente parte da captura é destinada ao consumo humano. O resíduo de pescado proveniente do processo de filetagem, por exemplo, pode contabilizar até 75% do pescado capturado, em peso (SHAHIDI, 1994). Globalmente, mais de 91 milhões de toneladas de pescado são capturados por ano, e segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e

Alimentação (FAO) o descarte anual de pescado é estimado em aproximadamente 20 milhões de toneladas (RUSTAD, 2003).

Existe um grande potencial na indústria pesqueira para utilização mais racional de seus subprodutos. Nos países do Norte da Europa onde a pesca é uma das principais atividades econômicas, países como a Islândia onde as indústrias pesqueiras são as mais importantes, o total de captura é de cerca de 2 milhões de toneladas, representando 62% do valor dos produtos exportados e aproximadamente 49% dos ganhos com exportação a cada ano (RUSTAD, 2003). Portanto, a utilização de tecnologias para aproveitamento integral dos recursos pesqueiros traria um grande incremento à economia do país. Para exemplificar, em 2001, um total de 232.000 toneladas métricas de resíduos foram acumulados somente pelas indústrias pesqueiras da Noruega, das quais 125.000 toneladas foram rejeitadas, enquanto apenas 107.000 foram utilizadas. Somente 36.000 toneladas foram utilizadas para consumo humano, o que corresponde a 15,5% do total (RUBIN, 2007). O restante foi usado para a produção de silagem e alimentação animal.

1.1.3 Características dos subprodutos

Ao processar o pescado, os resíduos gerados pela indústria são diversos. Os resíduos obtidos são fundamentalmente sólidos, arrastados pela água de tratamento, durante a manipulação do pescado, e sólidos solúveis ou dispersos na água de processamento. Dentre os resíduos sólidos incluem-se cabeças, pele, espinhas, caudas, pedaços de músculo, nadadeiras, escamas, vísceras, entre outros. Nos resíduos arrastados com a água durante a manipulação, além dos já citados, têm-se também os solúveis que se dispersam na água de processamento (TEJADA, 1992).

Deve-se observar ainda que, do ponto de vista da composição dos resíduos, esses estão constituídos por: proteínas de funções e origens diferentes, lipídeos, nitrogênio não-protéico, carboidratos, substâncias minerais, entre outros; com uma proporção diferente de cada um deles, em função dos resíduos de onde provêm (CONTRERAS, 1994).

1.1.4 Aproveitamento de subprodutos

Pode-se afirmar que o aproveitamento de subprodutos não é novidade. Nos países do Norte da Europa, vários subprodutos já foram e ainda são utilizados para vários propósitos; a pele de pescado, por exemplo, têm sido utilizada para a confecção de roupas, sapatos e bolsas, entre outros (RUSTAD, 2003).

Também nesse sentido, o recente declínio nos estoques de espécies tradicionais de pescado, associado ao aumento da demanda mundial de proteínas de origem animal, tem contribuído para o desenvolvimento de técnicas visando o melhor aproveitamento dos recursos.

Segundo estudiosos, os subprodutos do processamento de pescado são excelente matéria-prima para preparação de alimentos de alto valor protéico (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002); com o seu aproveitamento alternativo, 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 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).

Portanto, é possível ordenar os subprodutos de pescado em diferentes categorias de utilização, como matérias para obtenção de fertilizantes e ração até para alimentos e produtos especiais (RUSTAD, 2003).

1.1.5 Qualidade dos subprodutos

A qualidade da matéria-prima processada determina as possibilidades de utilização dos seus rejeitos. A manufatura também é muito importante, pois os subprodutos pesqueiros são extremamente susceptíveis à degradação microbiana, reações enzimáticas e oxidação caso a conservação e manipulação não sejam satisfatórias (RUSTAD, 2003). Alterações na matéria-prima durante o processamento podem afetar seriamente a qualidade do produto e subproduto gerados, muitas vezes acarretando enfermidades.

Porém, observando-se os cuidados necessários desde a captura, aliados à temperatura adequada, processamento rápido, e à manutenção de um padrão geral de limpeza nas instalações, é possível obter subprodutos com características adequadas para processamento.

1.2 Colágeno

1.2.1 Conceito

O termo colágeno é derivado de palavras gregas que significam “produzir cola” (COELHO et. al, 2001), sendo essa, sua primeira aplicação industrial.

O colágeno é uma glicoproteína que contém pequena quantidade de galactose e glicose (XIONG, 1997), sendo um importante constituinte estrutural de vertebrados e invertebrados. Está presente em abundância nos mamíferos, sendo a maior proteína constituinte de peles, tendões, cartilagens, ossos e tecido conectivo em geral (SCHOTT, 2001). Nos pássaros e peixes possui papel similar e é um importante constituinte estrutural do corpo dos invertebrados (BALIAN; BOWES, 1977).

1.2.2 Estrutura molecular

A molécula de colágeno (tropocolágeno) é uma estrutura com tamanho aproximado de 2800 Å e peso molecular de 300 KDa; composta de três cadeias polipeptídicas, designadas cadeias α de igual tamanho, as quais apresentam peso molecular aproximado de 100KDa, enroladas em torno de um eixo comum (BALIAN; BOWES, 1977), as quais formam uma estrutura de tripla-hélice estabilizada por pontes de hidrogênio (NORLAND, 1990). A intensidade das ligações cruzadas é altamente variável, está diretamente relacionada com o tipo de colágeno, tecido, espécie do animal, idade, entre outros (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

A molécula também contém extensões de peptídeos, denominadas de N-terminal e C-terminal, com pesos aproximados de 20KDa e 35KDa, respectivamente (XIONG, 1997); são regiões curtas, também chamadas telopeptídeos e não formam estrutura tripla hélice (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Estas extensões de peptídeos que são uma estrutura globular, são requeridas para iniciação da síntese das moléculas de tropocolágeno, sendo quebradas por limitada proteólise, tornando-se fibras helicoidais, formadas no espaço extracelular (XIONG, 1997). Nos C-terminais ocorre a armação das cadeias α para formar a tripla-hélice. As três α cadeias, espontaneamente, se enrolam formando uma hélice para a direita. Após a formação espontânea da hélice, ligações cruzadas entre as cadeias são formadas na região do N-terminal (COLE, 2006).

Quando soluções de colágeno são aquecidas acima de 40°C, ocorre a desnaturação e a estrutura helicoidal é perdida. Então, podem ser observados dois componentes α denominados α_1 e α_2 , dois β e outro componente γ com peso molecular similar ao da molécula de tropocolágeno. Os dois componentes β são dímeros de duas cadeias α , sendo designados β_{11} se formados por duas cadeias α_1 e β_{12} se por uma cadeia α_1 e outra α_2 . A molécula de tropocolágeno do colágeno tipo I é formada por duas cadeias α_1 e uma α_2 , sendo designada γ_{112} (BALIAN; BOWES, 1977). A proporção de componentes α para β tende a variar de acordo com o tecido e método de extração empregados (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

No colágeno solúvel em sal, a proporção de componentes β tende a ser menor do que no colágeno biologicamente mais velho, solúvel em ácido. Em geral, os monômeros da cadeia α são solúveis no sal; e seus dímeros ligados covalentemente (componente beta) e trímeros (componente gama) são solúveis em ácidos ou álcalis (XIONG, 1997).

Como a gelatina é derivada da hidrólise do colágeno, suas propriedades e capacidade de geleificação envolvem a parcial renaturação e desnaturação das moléculas de colágeno, suas características dependem amplamente do colágeno utilizado (LEDWARD, 1986; JOHNSTON-BANKS, 1990).

1.2.3 Composição de aminoácidos

As principais características da composição de aminoácidos do colágeno são alta quantidade de glicina e dos iminoácidos, prolina e hidroxiprolina (NORLAND, 1990), e a pequena quantidade de aminoácidos aromáticos sulfurados (BALIAN; BOWES, 1977). A glicina, aminoácido mais abundante no colágeno representa um terço do conteúdo total, enquanto a hidroxiprolina e a prolina constituem a outra terça parte (COELHO et al., 2001).

Cada molécula de colágeno contém aproximadamente 33% de glicina, 12% de prolina e 11% de hidroxiprolina (XIONG, 1997), sendo esta última empregada na determinação de colágeno presente num tecido; visto que o colágeno é a única proteína que contém quantidade relativamente elevada e constante de hidroxiprolina, a qual não é encontrada em quantidades apreciáveis em outras proteínas (PARDI, 1996).

Cada cadeia α é composta por mais de 1.000 resíduos de aminoácidos, os componentes α , designados α_1 e α_2 diferem em sua composição de aminoácidos. Em α_1 há menor quantidade de histidina, hidroxilisina, tirosina e cadeias laterais hidrofóbicas do que α_2 , porém maior quantidade de hidroxiprolina (BALIAN; BOWES, 1977). A região central da tripla-hélice da molécula de colágeno é composta por segmentos de tripeptídeos com uma repetição de unidades -Gly-Pro-X- ou -Gly-X-Hyp-. A distribuição de resíduos polares e não-polares na posição X determina a ordem de agregação das moléculas dentro das fibras (XIONG, 1997).

O colágeno de pescado possui uma grande variação na sua composição de aminoácidos; seu conteúdo de hidroxiprolina, e em menor grau de prolina, é menor do que o do colágeno de mamíferos, sendo isto compensado por maiores concentrações de outros hidróxi aminoácidos, como serina e treonina (EASTOE; LEACH, 1977).

1.2.4 Tipos

Existem pelo menos 19 variedades de colágeno denominadas de tipos I a XIX (BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998), 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).

O colágeno tipo I é encontrado em todos tecidos conectivos, incluindo ossos e peles; é um heteropolímero com duas cadeias α_1 , uma cadeia α_2 contendo um terço de glicina, pouca quantidade de tirosina e histidina e ausência de triptofano (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004b). O tipo II é o maior componente de cartilagens e o tipo III tem predominância em tecidos vasculares, pele e intestinos (XIONG, 1997).

1.2.5 Colágeno de pescado

Tem sido largamente relatada a existência dos colágenos tipos I e V em tecidos de pescado, embora, o colágeno tipo V esteja presente em quantidades substancialmente menores (SATO et al., 1988, 1989, 1991; MIZUTA et al., 2004).

A maioria dos colágenos de pescado que têm sido estudados consistem em duas variedades de cadeias α , que são normalmente designadas como α_1 e α_2 (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). No entanto, a existência de duas formas moleculares de colágeno Tipo I, $[\alpha_1]_2 \alpha_2$ e $\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$ em pele de pescado, foi reportada por Piez (1965) e Kimura et al. (1987).

Estas variedades de cadeias α , embora tendo aproximadamente o mesmo peso molecular (~ 100 KDa) podem ser separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS PAGE), devido as suas diferentes afinidades por SDS (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004b).

1.2.6 Fontes

Considerável quantidade de colágeno, sob forma de subproduto de matadouros ou frigoríficos, como peles, tendões, aponeuroses e órgãos, nem sempre são racionalmente aproveitados (COELHO et al., 2001). Estes subprodutos das indústrias cárneas podem então ser utilizados para a extração de gelatina e colágeno solúvel em ácido. A pele de animais, por exemplo, contém 30 a 35% de proteínas e destas 90 a 95% são representadas pela fração de colágeno (COELHO et al., 1998).

Os ossos, outra grande fonte de colágeno, no entanto, a sua composição varia consideravelmente de acordo com a espécie e o tipo. Esta variação deve-se, principalmente ao fato de que os ossos contêm vários tipos de tecidos, dentre eles: cartilagens, tecidos ósseos esponjosos, tecidos ósseos compactos, entre outros (JOHNS, 1977). Os ossos antes da extração do colágeno, passam pelo processo de desmineralização, sendo o produto obtido chamado de osseína (HINTERWALDNER, 1977).

As mais abundantes fontes de colágeno são mamíferos, especialmente bovinos e suínos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). A pele é um dos subprodutos mais disponíveis nas indústrias de produtos derivados de suínos (COELHO et al., 1998).

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).

1.2.7 Aplicações

O colágeno, em sua forma purificada, possui várias aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos. A qualidade e aplicação específica do colágeno extraído, esta diretamente relacionada com suas propriedades funcionais e pureza (RUSTAD, 2003).

Embora com diversas aplicações na indústria de alimentos, o colágeno tem sido pouco aproveitado tecnologicamente, visto, as suas propriedades funcionais como extensor, umidificante e emulsionante, ligante e potencializador de textura. Na indústria de carnes as propriedades funcionais do colágeno podem ser aproveitadas em produtos reestruturados e emulsionados, conferindo-lhes melhores resultados tecnológicos e econômicos. Na Europa, é prática corrente a utilização de colágeno de pele suína em diferentes tipos de produtos fermentados, atuando fundamentalmente como fixador das emulsões cárneas (COELHO et al., 1998).

Diversas fontes de colágeno são utilizadas na fabricação de produtos cárneos emulsionados, dentre as quais se salientam a pele suína, colágeno de ossos e o colágeno de músculo esquelético (COELHO et al., 1998). A grande vantagem é que o colágeno trata-se de uma proteína pura e digestível, considerada pela maioria das legislações como um alimento e não como um aditivo (COELHO et al., 2001).

1.3 Colágeno *versus* gelatina

A gelatina é obtida pelo aquecimento do colágeno acima da temperatura de transição do rolo helicoidal (estrutura tripla-hélice), causando um colapso estrutural. Estas mudanças ocorrem em uma faixa relativamente estreita de temperatura, onde primeiro ocorre o colapso da estrutura helicoidal da molécula de colágeno, e então, o desenrolamento das cadeias, levando ao lento decréscimo do peso molecular (JOHNS; COURTS, 1977). Após a desnaturação térmica, as fibras de colágeno apresentam comportamento essencialmente elástico, como uma rede aleatória (COLE, 2006). Esse tratamento é necessário para romper as ligações não-covalentes e desorganizar a estrutura da proteína, e assim, produzir adequado inchamento e ruptura das ligações intra e intermoleculares, causando a solubilização

do colágeno (STAINSBY, 1987; GÓMEZ-GUILLÉN; MONTERO, 2001), levando a conversão em gelatina, com aumento da capacidade de hidratação (MONTERO et al., 1995).

1.4 Gelatina

1.4.1 Conceito

O termo gelatina é aplicado a uma série de proteínas alimentares obtidas pela hidrólise de colágeno animal, contido em ossos e peles (GÓMEZ-GUILLÉN; MONTERO, 2001). A sua manufatura envolve a conversão de colágeno presente nos tecidos em gelatina e a remoção do material não-colagenoso presente (JOHNS; COURTS, 1977). Todos os tipos de gelatina possuem composição similar, ou seja, água, pequena quantidade de sais minerais e proteína de tecido conectivo pura. No entanto, dependendo do material utilizado, do processo de pré-tratamento empregado e da intensidade da hidrólise, vários tipos de gelatina, com propriedades diferentes podem ser obtidas (SCHOTT, 2001).

1.4.2 Composição de aminoácidos

A gelatina com sua estrutura geleificada pode reter até 50 vezes seu peso em água (OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990). Suas propriedades são influenciadas pelo tratamento utilizado no processo e pelo colágeno inicial, que é diferente, dependendo da espécie de peixe, e assim variando o conteúdo de aminoácidos e iminoácidos (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

A gelatina é composta por aproximadamente 19 aminoácidos; e caracterizada pelo alto conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina (EASTOE; LEACH, 1977; OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990). 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 conseqüente redução da temperatura de geleificação (NORLAND, 1990). Acredita-se que a presença de hidroxiprolina seja o fator mais determinante para estabilidade das gelatinas, devido a sua habilidade para formar pontes de hidrogênio através do grupamento -OH, embora a prolina também, seja importante nesse aspecto (LEDWARD, 1986). É importante ressaltar que a gelatina não é um alimento

nutricionalmente completo, devido à carência do aminoácido essencial triptofano em sua composição (OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990).

1.4.3 Estrutura

As propriedades físicas da gelatina dependem não somente da sua composição de aminoácidos, mas também do conteúdo relativo de cadeias com componentes α , β ou γ e agregados de alto peso molecular, bem como da presença de fragmentos de proteína de baixo peso molecular (JOHNSTON-BANKS, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). A severidade do tratamento de extração é determinante para as propriedades funcionais da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). Gelatinas resultantes de extrações realizadas utilizando maior temperatura apresentam perfil de peso molecular menor do que a fração de gelatina resultante de extrações a menor temperatura (ARNESEN; GILDBERG, 2002; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a).

Segundo Johnston-Banks (1990), a força de gel das gelatinas é proporcional à soma das α -cadeias, seus dímeros (β -componentes) e peptídeos; enquanto que a viscosidade, a taxa de fixação e o ponto de fusão aumentam com a maior quantidade de compostos de alto peso molecular. Portanto, enquanto a composição de aminoácidos é dependente principalmente da espécie, a distribuição de peso molecular da gelatina é muito dependente do processo de extração (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a).

1.4.4 Processos de Extração

A extração de gelatina pode ser realizada por diferentes tipos de pré-tratamentos, dentre eles: o alcalino e o ácido (SCHOTT, 2001).

Processo ácido - 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, 2006). 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; COURTS, 1977).

Processo alcalino – 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; 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. Vários métodos têm sido sugeridos para acelerar o processo alcalino, mas poucos têm sido avaliados industrialmente (HINTERWALDNER, 1977). 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; COURTS, 1977).

1.4.5 Gelatina de pescado

A grande maioria das gelatinas comerciais é derivada de mamíferos, obtidas principalmente, a partir de pele suína e couro bovino, mas por muitas razões sócio-culturais, cresce a exigência de fontes alternativas. Algumas destas razões são, por exemplo, restrições religiosas como a do judaísmo e islamismo, além de doenças relacionadas a bovinos (GUDMUNDSSON; HÁFSTEINSSON 1997; CHOI; REGENSTEIN, 2000; JAMILAH; HARVINDER, 2002; KOLODZIEJSKA et al, 2003). A gelatina de pescado não teria essas restrições e, além disso, sob o ponto de vista econômico, a utilização de subprodutos pesqueiros para obtenção de gelatina seria bastante interessante para as indústrias processadoras de pescado (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003).

Alguns grupos de pesquisa têm se dedicado à determinação das características da gelatina de pescado (NORLAND, 1990; OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990; GROSSMAN; BERGMAN, 1992; HOLZER, 1996; GUDMUNDSSON;

HAFFSTEINSSON, 1997; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002; ARNESEN; GILDBERG, 2002; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a), no entanto, pouco ainda se conhece sobre suas propriedades funcionais e possíveis aplicações. Deve-se considerar ainda, que a grande maioria dos estudos sobre gelatina de peixe são dirigidos à análise de suas diferentes propriedades em relação à gelatina de mamíferos ou entre as espécies. No entanto, poucos trabalhos são voltados para a determinação da influência do processo de obtenção e à ação de agentes nas suas propriedades funcionais.

A maioria desses estudos aponta como uma das principais restrições à utilização da gelatina de peixe, suas propriedades reológicas inferiores quando comparada à gelatina de mamíferos (CHOI; REGENSTEIN, 2000; CHO; GU; KIM, 2004), o que restringe a sua gama de aplicações (LEUENBERGER, 1991). Gelatinas de peixe geralmente apresentam temperaturas de geleificação e fusão mais baixas e também menor força de gel do que gelatinas de mamíferos (NORLAND, 1990; FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003).

Segundo Johnston-Banks (1990), as propriedades da gelatina são influenciadas por dois principais fatores: as características do colágeno inicial e o processo de extração. Diferentes espécies de peixe apresentam grande variação na composição de aminoácidos do colágeno. Particularmente, o teor de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) varia significativamente de acordo com a espécie do peixe (BALIAN; BOWES, 1977; GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997; POPPE, 1992). O teor de iminoácidos, principalmente hidroxiprolina, depende da temperatura ambiente do habitat do peixe, e isso afeta a estabilidade térmica do colágeno (BALIAN; BOWES, 1977). Colágeno de peixes de água quente, como a tilápia, possuem conteúdo de iminoácidos superior a peixes de água fria (GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997), resultando em gelatinas com melhores propriedades funcionais (LEUENBERGER, 1991; GROSSMAN; BERGMAN, 1992; GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000). Já o processo de extração é de fundamental importância, porque determina a distribuição de peso molecular da gelatina (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a) e as diferenças no conteúdo de componentes do colágeno (cadeias α , β e γ componentes); e a razão entre cadeias α_1 e α_2 influencia o comportamento da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

Para a produção de gelatina a partir de pele de pescado também deve-se considerar alguns outros fatores, como a diferente estrutura de tripla hélice das moléculas de colágeno, além da alta susceptibilidade do material colagenoso à degradação, devido ao menor conteúdo de ligações cruzadas não-reduzíveis intra e intermoleculares (NORLAND, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002), em contraste ao colágeno mais estável de mamíferos (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003). Já, o colágeno de ossos de pescado possui maior estabilidade microbiológica, devido a maior incidência de ligações cruzadas, quando comparado com o colágeno de outros tecidos como pele (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a). Então, medidas para controle da qualidade dos subprodutos são essenciais, visto que as propriedades da gelatina de pescado, além da fonte e da espécie, dependem fortemente da conservação da matéria-prima (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Cuidados como evitar que após a filetagem do pescado a pele seja mantida com os demais subprodutos, onde está sujeita a rápida ação enzimática e deterioração microbiana, levando a um sério comprometimento da gelatina obtida a partir desse material (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003), amenizariam esses efeitos.

Portanto, a utilização de subprodutos para a produção de gelatina de pescado como alternativa para a substituição da gelatina produzida a partir de mamíferos, levanta algumas questões como a grande diversidade de espécies aquáticas e também a alta susceptibilidade desse colágeno, principalmente do obtido da pele, a deterioração quando comparado ao oriundo dos mamíferos (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003).

1.4.6 Processamento de gelatina de pescado

Osborne, Voight e Hall (1990) produziram gelatina de ossos, cabeça e tripas de lumpus, através do processo de solubilização ácida. Os resultados obtidos foram comparados com uma gelatina comercial, onde a gelatina de pescado apresentou teor de umidade e pH similar ao padrão de comparação. Constataram, porém, que a gelatina de pescado possuía teores de cinza consideravelmente maiores, e que a gelatina comercial possuía maior força de gel e ponto de fusão. A análise sensorial comparativa entre as gelatinas mostrou que a gelatina de lumpus é mais escura do que a gelatina comercial, sendo também mais adocicada e apresentando um derretimento mais rápido na boca. Das três matérias-primas utilizadas, a gelatina

obtida a partir da cabeça foi a que apresentou os melhores resultados, sob o ponto de vista do conteúdo de aminoácidos, rendimento de gelatina, facilidade de produção e quantidade de matéria-prima por espécime.

Gudmundsson e Hafsteinsson (1997) estudaram os efeitos do tratamento químico utilizado para obtenção de gelatina de pele de bacalhau. Efetuaram um planejamento experimental com pontos centrais para otimização do processo, com três variáveis dependentes com cinco níveis (0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 p/v) para concentrações de hidróxido de sódio e ácido sulfúrico e os níveis (0,4; 0,7; 1,0; 1,2; 1,4 p/v) para o ácido cítrico. Seus efeitos no rendimento, força de gel e viscosidade foram estimados utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM). Concluíram que as concentrações de NaOH, ácido sulfúrico e ácido cítrico afetam o rendimento e qualidade das gelatinas. Os maiores rendimentos foram obtidos quando foram utilizadas, no tratamento da pele, baixas concentrações (0,1 e 0,2 p/v) de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio seguido de tratamento com ácido cítrico 0,7 p/v. Os efeitos na força de gel, viscosidade, odor, claridade, cor e pH da gelatina variaram consideravelmente. No entanto, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou ácido cítrico 0,7 p/v com diferentes concentrações de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio. Os autores relataram também que a gelatina seca por liofilização apresentou maior força de gel que a seca por ar quente.

Gilsenan e Ross-Murphy (2000) estudaram as características reológicas de gelatina de mamíferos e de fontes marinhas. Concluíram que gelatinas de peixes de água fria possuem ponto de fusão mais baixo do que as gelatinas de mamíferos, devido ao menor conteúdo de iminoácidos, o que reduz a tendência à formação da hélice intermolecular. No entanto, gelatinas de peixes de água quente possuem propriedades similares à gelatina de mamíferos.

Jamilah e Harvinder (2002) realizaram um estudo sobre a extração e as propriedades físico-químicas das gelatinas de pele de tilápia negra (*Oreochromis mossambicus*) e tilápia vermelha (*Oreochromis nilotica*). Foram determinadas as aparências visuais, o odor, o pH, a força de gel, a viscosidade, o ponto de fusão e o perfil de aminoácidos das gelatinas. Ambas apresentaram aparência esbranquiçada, clara e brilhante. A gelatina de tilápia negra apresentou odor mais intenso. A gelatina de tilápia negra apresentou força de gel de 180,8 g e a gelatina de tilápia vermelha, 128,1g. Ambas apresentaram pH em torno de 3, e a gelatina de tilápia negra

mostrou-se significativamente mais viscosa, com ponto de fusão mais alto e maior conteúdo de aminoácidos.

Gómez-Guillén e Montero (2001) extraíram gelatina de pele de linguado-areeiro (*Lepidorhombus boscii*) utilizando vários ácidos orgânicos, determinando pH, propriedades viscoelásticas, força de gel e turbidez. Concluíram que o tipo de ácido usado influencia nas propriedades viscoelásticas da gelatina resultante. Os ácidos acético e propiônico produziram as gelatinas com os mais altos módulos de elasticidade e viscosidade, temperatura de fusão e força de gel, especialmente quando as peles foram tratadas previamente com NaOH diluída. Bons resultados também foram obtidos utilizando ácido láctico e fórmico para solubilização do colágeno. Relataram também que quando as concentrações de ácido foram aumentadas acima de 0,05M, não houve melhora nas propriedades reológicas das gelatinas.

Fernández-Díaz, Montero e Gómez-Guillén (2003) avaliaram o efeito do congelamento da pele de pescado antes da extração, nas propriedades reológicas da gelatina, concluindo que a estrutura molecular da gelatina, também é afetada pelo congelamento prévio da pele, pois diminui a quantidade de dímeros e trímeros das α -cadeias e polímeros de alto peso molecular. A quase ausência de polímeros de alto peso molecular impede o correto fortalecimento das cadeias durante o período de maturação, levando à diminuição da força de gel.

Gómez-Guillén et al. (2002) produziram gelatina a partir de diferentes espécies marinhas, caracterizando-as quanto as suas propriedades físicas e estruturais. Eles constataram que a gelatina obtida de espécies de peixes planos como o linguado apresenta géis mais termoestáveis com melhor capacidade de geleificação em comparação com peixes de água fria, como o bacalhau e a merluza, o que foi atribuído às diferenças no conteúdo de aminoácidos, à relação entre as cadeias α_1/α_2 do colágeno e à diferença de distribuição de pesos moleculares. A gelatina de lula apresentou propriedades viscoelásticas intermediárias entre os peixes planos e os de água fria, além de significativa diferença quanto ao conteúdo de aminoácidos e distribuição de peso molecular.

1.4.7 Parâmetros de qualidade

As propriedades funcionais das gelatinas dependem das suas características físico-químicas e estruturais, que serão determinantes para reger sua aplicabilidade. Os principais atributos mensurados para determinar a qualidade das gelatinas são:

1.4.7.1 Umidade

A gelatina comercial apresenta conteúdo de umidade entre 9-14%, com ocasionais amostras fora dessa faixa (EASTOE; LEACH, 1977). Com umidade de 13% a temperatura ambiente (25°C) a gelatina mantém equilíbrio com a umidade do ar ambiente (COLE, 2006). Gelatinas com 6% a 8% de umidade são muito higroscópicas, tornando-se difícil mensurar seus atributos físicos com precisão (COLE, 2006).

1.4.7.2 Cinzas

O máximo teor de cinzas recomendado para gelatina é 2,6% (JONES, 1977; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a), embora, usualmente a gelatina com conteúdo de cinzas acima de 2% possa ser aceita para aplicações alimentícias (CHO, et al., 2004). Segundo Jones (1977), o conteúdo máximo de cinzas é freqüentemente especificado, porém não é imprescindível, exceto pelo fato de indicar o conteúdo de cálcio, informação de suma importância em algumas aplicações.

1.4.7.3 Metais pesados

A determinação de metais pesados na gelatina é complexa, devido à dificuldade para a completa degradação da gelatina e também porque o principal componente das cinzas da gelatina pode ser de baixa solubilidade, como sulfato de cálcio, com variável capacidade para absorver traços de metais pesados (COLE, 2006).

1.4.7.4 Força de gel

É o mais importante atributo da gelatina, e quando determinado por método padrão, é chamado de força de Bloom (WAINWRIGHT, 1977). No entanto, vários instrumentos, de tipo penetromêtro, têm sido adaptados para sua determinação (COLE, 2006). Gelatinas comerciais geralmente possuem força de Bloom de 90 – 300g (JONES, 1977), sendo esta a propriedade física que, principalmente,

determina o seu valor comercial (WAINWRIGHT, 1977). A força de gel é amplamente dependente da distribuição de peso molecular e da composição de aminoácidos da gelatina (JOHNSTON-BANKS, 1990).

1.4.7.5 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 (WAINWRIGHT, 1977). A viscosidade das gelatinas também é um importante parâmetro para determinação de seu valor comercial.

1.4.7.6 Cor e Claridade

Geralmente, gelatinas comerciais possuem coloração que varia de um amarelo pálido para um âmbar escuro (COLE; ROBERTS, 1997). A turbidez das soluções de gelatina é um atributo que pode ou não ser importante, dependendo da aplicação (COLE, 2006). Apesar da cor das gelatinas ser um atributo de grande importância comercial, ainda não existe nenhum método universalmente aceito para sua medida (COLE; ROBERTS, 1997).

1.4.7.7 Valor de pH

Vários valores de pH têm sido reportados dentro da faixa de 3,8 a 5,0 para gelatinas processadas por pré-tratamento ácido e 4,7 a 7,5 para processadas por pré-tratamento alcalino (JONES, 1977). No entanto, o valor de pH natural da gelatina somente é importante em sistemas ligeiramente tamponados (JONES, 1977).

1.4.7.8 Pontos de geleificação e fusão

Géis de gelatina são formados, quando em solução, moléculas de gelatina são parcialmente reestruturadas, assumindo a estrutura do colágeno (JOHNS; COURTS, 1977). Esse processo de geleificação envolve a transição de um enrolamento sem forma definida para tripla hélice da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). A temperatura de transição é denominada ponto de geleificação, do mesmo modo, o ponto de fusão é relatado como o ponto de desnaturação desta estrutura. As temperaturas de geleificação e

fusão das gelatinas são dependentes da proporção de prolina e hidroxiprolina da molécula de colágeno original (LEDWARD, 1986; GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000), e do pré-tratamento empregado (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). Os pontos de fusão e geleificação variam consideravelmente (JONES, 1977) e são importantes parâmetros para a determinação das possíveis aplicações da gelatina.

1.4.7.9 Ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da gelatina varia consideravelmente de acordo com o pré-tratamento utilizado; as processadas com ácido possuem ponto isoelétrico na faixa de pH 6,0 a 9,5, enquanto que as processadas com álcalis estão entre 4,8 e 5,2 (WAINWRIGHT, 1977). O maior ponto isoelétrico da gelatina processada com ácido se deve à severidade e duração do processo ácido, que causa limitada hidrólise das cadeias laterais dos aminoácidos aspargina e glutamina. Enquanto no processo alcalino o tratamento com soda cáustica ou longo processo alcalino (*liming*), leva à rápida hidrólise das cadeias laterais da aspargina e glutamina para os ácidos aspártico e glutâmico, resultando em gelatinas de menor ponto isoelétrico (COLE, 2006). O ponto isoelétrico da gelatina pode ser de fundamental importância para sua aplicação, dependendo da faixa de pH do produto a que se destina (JONES, 1977).

1.4.7.10 Microbiologia

A gelatina é um excelente nutriente para a maioria dos microrganismos, portanto, cuidados devem ser tomados durante sua manufatura para evitar possíveis contaminações (COLE, 2006). Entre os microrganismos presentes na gelatina destacam-se os do gênero Clostrídios, que podem causar sensíveis perdas econômicas (THIESSEN, 1994). Porém, a contagem total de mesófilas em placas é geralmente aceita na maioria dos países como limitante de presença de Coliformes, *E. coli*, *Salmonella*, Clostrídios, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (COLE, 2006).

1.4.8 Aplicações

A gelatina é uma importante proteína fibrosa, com inúmeras aplicações, particularmente nas indústrias farmacêutica, fotográfica e de alimentos (OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002), sendo utilizada na produção

de filmes fotográficos, colas, cápsulas, geléias, doces, cremes, vinhos (clarificação), gelatina para sobremesa, entre outros (OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990). Sua utilização deve-se a suas características físicas e químicas únicas, dentre as quais a habilidade de formar géis termicamente reversíveis (SIMON et al., 2002).

Devido a suas propriedades tecnológicas, na indústria de alimentos, pode ser usada como ingrediente para melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade de alimentos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Além disso, a gelatina não é somente utilizada devido a suas propriedades funcionais, mas também como uma importante fonte de proteína. Em geral, as propriedades primárias da gelatina incluem formação de gel, texturização, retenção de água e efeitos de superfície, como na formação de espumas e emulsões (THIESSEN, 1994). A importância da gelatina como uma valiosa proteína de dietas saudáveis tem sido documentada em vários estudos clínicos (SCHOTT, 2001). Além disso, gelatina pode ser considerada um alimento altamente digestivo, ideal para complementar determinados tipos de dietas (JOHNSTON-BANKS, 1990).

É conhecido que a qualidade da gelatina, para suas particulares aplicações, está diretamente relacionada a suas propriedades reológicas (STAINSBY, 1987). Gelatinas provenientes de mamíferos possuem propriedades reológicas superiores à gelatinas de pescado (CHOI; REGENSTEIN, 2000; CHO; GU; KIM, 2004), o que lhe possibilita uma maior gama de aplicações. No entanto, gelatinas com características de baixa temperatura de fusão, como a maioria das gelatinas de pescado, podem ser utilizadas para manufatura de produtos específicos, obtendo maior valor comercial do que gelatina de mamíferos, comumente utilizada como aditivo alimentar (ARNESEN; GILDBERG, 2002). Algumas dessas aplicações são a utilização como agente de cobertura e como base para fotoresistores solúveis em água, utilizados em tubos de televisão (NORLAND, 1990; ARNESEN; GILDBERG, 2002).

Segundo Norland (1990), simplificando as características da gelatina se poderia dividir suas aplicações em:

- gelatina comestível - livre de metais pesados e esteticamente satisfatória;
- gelatina industrial - atende exclusivamente as características físicas e químicas necessárias para a sua aplicação industrial;
- gelatina fotográfica - os requerimentos são extremamente severos, devido ao filme fotográfico necessitar ter uma longa vida de prateleira;

- cola - essencialmente adesiva.

2 METODOLOGIA GERAL

2.1 Material

Peles frescas de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) recém filetadas, foram obtidas numa empresa localizada na cidade de Pato Branco (Paraná, Brasil). Para avaliar a influência de agentes nas propriedades funcionais da gelatina extraída de pele de tilápia, utilizou-se a enzima transglutaminase (transglutaminase + lactose + maltodextrina, 100 U/g, ACTIVA MP[®], Ajinomoto, Limeira, SP, Brasil), glicerol (Merck, São Paulo, SP, Brasil), sacarose e os sais: NaCl, MgCl₂, MgSO₄, e KCl (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Todos os reagentes que foram utilizados são de grau analítico (P.A.).

2.2 Pré-tratamento da matéria-prima

As peles foram lavadas em água corrente para retirada do material superficial aderido e cortadas em peças de aproximadamente de 4cm x 4cm. Então, o material foi imerso em solução salina de NaCl 0,2% (p/v) por 5 minutos sob agitação contínua.

2.3 Extração da gelatina

As variáveis e níveis do planejamento fatorial foram definidos com base em testes preliminares e métodos descritos por Grossman e Bergman (1992) e Gudmundsson e Hafsteinsson (1997). As peles cortadas e limpas foram submetidas a tratamento alcalino 1:10 (p/v), em soluções de NaOH 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35% (p/v), por período de 80 minutos a temperatura de 10°C e então, foram lavadas em água corrente para retirada do álcali em excesso, até pH abaixo de 8. Após esse procedimento, as peles foram submetidas a tratamento ácido 1:10 (p/v), em soluções de H₂SO₄ 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35% (p/v), por 80 minutos e lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade. As peles foram então submetidas a um segundo tratamento ácido 1:10 (p/v), em solução de ácido cítrico 0,7% (p/v), por 80 minutos, e lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade.

As extrações de gelatina foram realizadas em água deionizada em temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C, mantendo a proporção de 2mL de solução para 1g de pele por períodos de 3, 6, 9, 12 e 15h. Após a extração, o material foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro Whatman nº 4, liofilizado e moído.

Para continuidade do trabalho foi realizada nova extração, utilizando os parâmetros que levaram a obtenção da gelatina com maior força de gel, que são os seguintes: NaOH 0,3% (p/v), H₂SO₄ 0,3% (p/v), temperatura de extração 45°C e tempo de extração de 6h. Todos os demais procedimentos foram iguais aos citados acima.

2.4 Planejamento experimental

Foi empregado um planejamento fatorial 2⁴ com oito pontos axiais ($\alpha = 2$) e três pontos centrais, totalizando 27 (vinte e sete) ensaios (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). As variáveis independentes foram concentração de NaOH (%), concentração de H₂SO₄ (%), temperatura de extração (°C) e tempo de extração (h), enquanto as variáveis dependentes foram rendimento (%), força de gel (g) e viscosidade (cP). A tab. 1 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis reais e codificados.

Tabela 1 - Valores reais das variáveis do planejamento experimental e seus respectivos níveis codificados

Variáveis	- 2	-1	0	+1	+ 2
Concentração do NaOH% (X ₁)	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35
Concentração de H ₂ SO ₄ % (X ₂)	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35
Temperatura de extração °C (X ₃)	40	45	50	55	60
Tempo de extração h (X ₄)	3	6	9	12	15

Os desvios e desvios relativos entre os valores experimentais e previstos pelos modelos para as condições ótimas de cada variável resposta, foram calculados através das equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{Desvio} = Y - \hat{Y} \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{Desvio relativo} = \left(\frac{Y - \hat{Y}}{Y} \right) * 100 \quad (\text{eq. 2})$$

Onde: Y = resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

Os dados experimentais foram analisados com auxílio do programa Statistica 6.0 para Windows (Statsoft™, Inc., Tulsa, USA).

2.5 Rendimento (RE)

Para o cálculo do rendimento foi considerado o peso seco de gelatina e o peso úmido das peles de tilápia, segundo a equação 3:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{peso seco de gelatina}}{\text{peso úmido peles}} * 100 \quad (\text{eq. 3})$$

2.6 Força de gel

Foi determinada a força de gel nas amostras de gelatina a 6,67% (p/v), preparadas pela dissolução em água destilada a 60°C, sob agitação mecânica constante por 30 minutos. As amostras foram submetidas à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação) por $18 \pm 1\text{h}$, $42 \pm 1\text{h}$ e $66 \pm 1\text{h}$. A força de gel foi determinada utilizando uma Máquina Universal de Testes, Instron modelo 1130 (Instron, Co. Canton, MA, USA), com célula de carga de 2KN e velocidade de cruzamento de cabeça de 1mm/s, utilizando-se haste cilíndrica de aço de 12,7mm de diâmetro com base plana e analisador de textura (Stable Microsystems, Surrey, Inglaterra), modelo TA-XTplus, com célula de carga de 5kg, e velocidades de pré-teste, teste e pós-teste de 1,5mm/s, 1,0mm/s e 1,0mm/s, respectivamente. Utilizou-se haste cilíndrica de Teflon® de 1,27cm de diâmetro, com base plana.

Em ambos equipamentos as hastes foram forçadas a 4mm dentro da amostra a temperaturas entre 8 e 10°C e a força máxima(g) determinada.

2.7 Viscosidade

A gelatina foi preparada e armazenada conforme descrito para análise de força de gel. Sua viscosidade foi determinada segundo método da British Standard Institution (B.S.I., 1975). A amostra foi derretida em banho a 45°C e transferida para o viscosímetro de Ostwald-Fensk (nº 100). O viscosímetro foi colocado em banho a 60°C e aguardou-se 10 minutos para a estabilização da temperatura, sendo então, determinada.

2.8 Composição centesimal da matéria-prima

Umidade e cinzas foram determinadas por método gravimétrico, segundo A.O.A.C. (1995). Lipídios foram determinados segundo o método de extração de Soxhlet, de acordo com a A.O.A.C. (1995). Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo A.O.A.C. (1995), utilizando fator de conversão de 5,4 (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a).

2.9 Composição centesimal da gelatina

Umidade, cinzas e lipídios das gelatinas foram determinados, segundo British Standard Institution (B.S.I., 1975). Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo A.O.A.C. (1995); utilizando fator de conversão de 5,5 (LEACH; EASTOE, 1977).

2.10 Avaliação de minerais

Foram utilizadas lâmpadas catódicas para a quantificação de cada elemento analisado (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^+ , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}) em espectrofotômetro de absorção atômica GBC (mod. Avanta). Realizaram-se leituras de amostras líquidas com dissociação molecular em chama, utilizando gás acetileno. Foram preparadas curvas-padrão para a absorção em duas diferentes concentrações. Soluções 10% (p/v) e 1% (p/v) de gelatina foram preparadas antes das análises, pela dissolução em água destilada a 60°C, sob constante agitação, por 30 minutos.

2.11 Avaliação de cor e turbidez

A determinação de cor foi realizada utilizando espectro colorímetro esférico Hunter Ultrascan (mod. Minolta Cr-300 series), no gel de gelatina a 6,67% (p/v), preparado pela dissolução em água destilada a 60°C, sob constante agitação

mecânica por 30 minutos, após 18 ± 1 h de maturação à temperatura de $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Para determinação da turbidez foi utilizado o método descrito por Cole e Roberts (1996), em solução de gelatina 6,67% (p/v) utilizando turbidímetro Quimis (mod. Q - 179P –TURB).

2.12 Determinação do pH

Para determinação do pH foi utilizado o método da British Standard Institution (B.S.I., 1975). Foi preparada uma solução 1% (p/v) de gelatina em água destilada a 60°C , sob agitação mecânica constante, por 30 minutos; sendo após, resfriada até temperatura ambiente, aproximadamente 25°C . A determinação do pH foi realizada em aparelho medidor de pH Analion (mod. PM 608).

2.13 Avaliações microbiológicas

Coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp e Clostrídios sulfito redutores foram determinados segundo Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

2.14 Eletroforese

Foi seguido o procedimento descrito por Gómez-Guillén, et al. (2002), dissolvendo gelatina em água destilada 5mg/ml a 60°C , seguido de adição de tampão contendo β -mercaptoetanol. As amostras foram desnaturadas por aquecimento a 90°C , por 5 minutos e analisadas por SDS, segundo Laemmli (1970), utilizando gel de empilhamento de 4% e de resolução 8%, em cuba Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) com 25 mA/gel. As bandas foram reveladas com Croomassie Blue R250 durante 72h. Foi utilizado marcador padrão de proteína HiMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen).

2.15 Análise de aminoácidos

A determinação de aminoácidos foi realizada no Centro de Química de Proteínas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), em analisador Beckman 6300 (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA). A gelatina foi hidrolisada por 22h a $110 \pm 1^\circ\text{C}$ em HCl 6N sob atmosfera de nitrogênio (N_2).

2.16 Preparo das amostras

As amostras de gelatina 6,67% (p/v) foram preparadas sob agitação constante, por 30 minutos, a 45°C, em água deionizada, pela dissolução em soluções com valores de pH 5,0 e 8,0, ajustados pela adição de HCl 0,1mol/L e NaOH 0,1mol/L. Foram preparadas amostras de gelatina de mamíferos (GP), gelatina de pele de tilápia (GC) e gelatina de pele de tilápia contendo os seguintes agentes e respectivas concentrações: sacarose 4% (p/v) (SA1) e 8% (p/v) (SA2); glicerol 5% (v/v) (GL1) e 10% (v/v) (GL2); NaCl 0,3mol/L (Na1) e 0,8mol/L (Na2); MgCl₂ 0,3mol/L (Mg1) e 0,8mol/L (Mg2); MgSO₄ 0,3mol/L (MgS1) e 0,8mol/L (MgS2); KCl 0,3mol/L (Kc1) e 0,8mol/L (Kc2); e transglutaminase 10mg/mL (TG1) e 15mg/mL (TG2).

2.17 Propriedades viscoelásticas

As propriedades viscoelásticas foram determinadas em reômetro marca Haake modelo Rheostress RS-150 (Haake, Karlsruhe, Alemanha), utilizando software Rheowin Job Manager. Utilizou-se para o estudo dinâmico viscoelástico cone-placa de 35mm de diâmetro e 1° de ângulo com gap = 0,14mm. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente, logo antes do início das análises.

As amostras foram submetidas a uma rampa de temperatura, sendo resfriadas de 40°C para 7°C, e voltando a ser aquecidas até 40°C. Os experimentos foram realizados em tensão de 3,0Pa, frequência de 1Hz e taxa de variação de temperatura de 0,5°C/min, monitorando-se o processo de geleificação através dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' . O ponto de geleificação (*gelling point*) foi determinado no ponto de intersecção dos módulos G' e G'' durante o resfriamento da amostra, segundo metodologia de Gudmundsson (2002). O ponto de fusão (*melting point*) foi determinado do mesmo modo, durante subsequente aquecimento. O ângulo de fase (δ) foi representado em função da temperatura para observação do comportamento viscoelástico da amostra.

O tempo de formação do gel (*setting time*) foi determinado como o tempo em minutos entre a última temperatura do máximo ângulo de fase e a primeira temperatura do mínimo ângulo de fase. As amostras foram mantidas a 7°C durante alguns minutos antes de serem aquecidas até 40°C, para a avaliação do comportamento dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' em temperatura padrão.

**Capítulo 1 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
EXTRAÇÃO DA GELATINA DE PELE DE TILÁPIA
(*Oreochromis urolepis hornorum*)**

RESUMO

Planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimização do processo de extração de gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). As concentrações de NaOH (%) e H₂SO₄ (%), temperatura de extração (°C) e tempo de extração (h), foram escolhidas como variáveis independentes, enquanto as variáveis resposta foram rendimento (%), viscosidade (cP) e força de gel (g). As concentrações de NaOH (%) e H₂SO₄ (%) possuem influência significativa ($p < 0,05$) sobre a viscosidade e força de gel, enquanto, a temperatura de extração (°C) e o tempo de extração (h) apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre todas as variáveis dependentes. Os resultados sugerem que a elevação da temperatura e o prolongamento do tempo de extração propiciam elevados rendimentos, porém podem levar à redução da viscosidade e força de gel da gelatina.

Palavras-chave: Otimização, extração, gelatina, pele de tilápia.

ABSTRACTS

Factorial design and response surface methodology were used to the optimization of the process of extraction of tilapia skin gelatin (*Oreochromis urolepis hornorum*). The concentrations of NaOH (%) and H₂SO₄ (%) extraction temperature (°C) and extraction time (h) were chosen as independent variables, while the response variables were yield (%), viscosity (cP) and gel strength (g). The concentrations of NaOH (%) and H₂SO₄ (%) have significant influence ($p < 0,05$) in viscosity and gel strength, while the extraction temperature (°C) and the extraction time (h) showed significant influence ($p < 0,05$) upon all dependent variables. The results suggest that the temperature rising and extraction time prolongation provide high yield, however they can lead to the reduction of viscosity and gel strength of the gelatin.

Key-words: Optimization, extraction, gelatin, tilapia skin

1 Introdução

O termo gelatina é aplicado a uma série de proteínas alimentares obtidas pela hidrólise do colágeno animal, contido em ossos e peles (GÓMEZ-GUILLÉN; MONTERO, 2001). A sua manufatura envolve a conversão do colágeno presente nos tecidos e a remoção do material não-colagenoso presente (JOHNS; COURTS, 1977). Atualmente, há um crescente interesse na utilização de gelatina de pescado com propósitos técnicos avançados, bem como, para a substituição da gelatina de mamíferos na produção de alimentos (GILDBERG, ARNESEN; CARLEHÖG, 2002). Estima-se que no processamento de pescado, o resíduo oriundo da filetagem possa representar até 75% do peso total (SHAHIDI, 1994), sendo, que aproximadamente 30%

destes rejeitos consistem em pele e ossos com elevada quantidade de colágeno (GÓMEZ-GUILLÉN, et al., 2002). Essa grande quantidade de subprodutos poderia ser utilizada para uma variada gama de aplicações.

Para propósitos tecnológicos, a gelatina pode ser usada como ingrediente para melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade de alimentos, além de apresentar propriedades de formação de filmes e capacidade de encapsulação de moléculas, as quais despertam interesse nas indústrias farmacêuticas e fotográficas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). O volume de gelatina utilizado anualmente pela indústria alimentícia mundial é considerável e está em crescimento (MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2000). As gelatinas comerciais são derivadas de ossos e peles de mamíferos (suínos e bovinos), obtidas através de pré-tratamento ácido ou alcalino, resultando em gelatinas tipo A e B, respectivamente.

A utilização de subprodutos de pescado para a produção de gelatina, como alternativa para a substituição daquela produzida a partir de mamíferos, levanta algumas questões, como a alta diversidade de espécies aquáticas e a alta susceptibilidade à deterioração desse colágeno, quando comparado ao de mamíferos (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo a otimização dos parâmetros de processamento da gelatina obtida a partir de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). Para tanto, foram empregadas técnicas de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta (RSM), em função do seu rendimento (%), viscosidade (cP) e força de gel (g).

2 Material e métodos

2.1 Material

Foram utilizadas peles frescas de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) recém filetadas, obtidas junto à empresa localizada na cidade de Pato Branco (Paraná, Brasil). As peles foram estocadas a -18°C até sua utilização (aproximadamente 1 dia depois). Todos os reagentes que foram utilizados são de grau analítico (P.A.).

2.2 Pré-tratamento da matéria-prima

As peles foram lavadas em água corrente para retirada do material superficial aderido e cortadas em peças de aproximadamente de 4cm x 4cm. Então, o material foi imerso em solução salina de NaCl 0,2% (p/v) por 5 minutos sob agitação contínua.

2.3 Extração da gelatina

As variáveis e níveis do planejamento fatorial foram definidos com base em testes preliminares e métodos descritos por Grossman e Bergman (1992) e Gudmundsson e Hafsteinsson (1997). As peles cortadas e limpas foram submetidas a tratamento alcalino 1:10 (p/v), em soluções de NaOH 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35% (p/v), por período de 80 minutos a temperatura de 10°C e então, foram lavadas em água corrente para retirada do álcali em excesso, até pH abaixo de 8,0. Após esse procedimento, as peles foram submetidas a tratamento ácido 1:10 (p/v), em soluções de H₂SO₄ 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35% (p/v), por 80 minutos e lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade. As peles foram então submetidas a um segundo tratamento ácido 1:10 (p/v), em solução de ácido cítrico 0,7% (p/v), por 80 minutos, e lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade.

As extrações de gelatina foram realizadas em água deionizada em temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60°C, mantendo a proporção de 2mL de solução para 1g de pele por períodos de 3, 6, 9, 12 e 15h. Após a extração, o material foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro Whatman nº 4, liofilizado e moído.

2.4 Planejamento experimental

Para verificar a relação entre as variáveis (fatores independentes) relevantes ao processo e as variáveis dependentes foram utilizadas técnicas de planejamento fatorial (delineamento composto central rotacional) e metodologia de superfície de resposta (RSM). Foi empregado um planejamento fatorial 2⁴ com oito pontos axiais ($\alpha = 2$) e três pontos centrais, totalizando 27 (vinte e sete) ensaios (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). As variáveis independentes foram concentração de NaOH (%), concentração de H₂SO₄ (%), temperatura de extração (°C) e tempo de extração (h) , enquanto as variáveis

dependentes foram rendimento (%), força de gel (g) e viscosidade (cP). A tab. 1 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis reais e codificados.

Tabela 1 - Valores reais das variáveis do planejamento experimental e seus respectivos níveis codificados

Variáveis	- 2	-1	0	+1	+ 2
Concentração do NaOH% (X_1)	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35
Concentração de H ₂ SO ₄ % (X_2)	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35
Temperatura de extração °C (X_3)	40	45	50	55	60
Tempo de extração h (X_4)	3	6	9	12	15

Os desvios e desvios relativos entre os valores experimentais e previstos pelos modelos para as condições ótimas de cada variável resposta, foram calculados através das equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{Desvio} = Y - \hat{Y} \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{Desvio relativo} = \left(\frac{Y - \hat{Y}}{Y} \right) * 100 \quad (\text{eq. 2})$$

Onde: Y = resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

Os dados experimentais foram analisados com auxílio do programa Statística 6.0 para Windows (Statsoft™, Inc., Tulsa, USA).

2.5 Rendimento (RE)

Para o cálculo do rendimento foi considerado o peso seco de gelatina e o peso úmido das peles de tilápia, segundo a equação 3:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{peso seco de gelatina}}{\text{peso úmido peles}} \times 100 \text{ (eq. 3)}$$

2.6 Força de gel (FG)

Foi determinada a força de gel nas amostras de gelatina a 6,67% (p/v), preparadas pela dissolução em água destilada a 60°C, sob agitação mecânica constante por 30 minutos. As amostras foram submetidas à refrigeração a 7°C (temperatura de maturação) por 18 ± 1 h. A força de gel foi determinada utilizando uma Máquina Universal de Testes, Instron modelo 1130 (Instron, Co. Canton, MA, USA), com célula de carga de 2KN e velocidade de cruzamento de cabeça de 1mm/s, utilizando-se haste cilíndrica de aço de 12,7mm de diâmetro com base plana. A haste foi forçada a 4mm dentro da amostra a temperaturas entre 8 e 10°C e a força máxima(g) determinada.

2.7 Viscosidade (V)

A gelatina foi preparada e armazenada conforme descrito para análise de força de gel. Sua viscosidade foi determinada segundo método da British Standard Institution (B.S.I., 1975). A amostra foi derretida em banho a 45°C e transferida para o viscosímetro de Ostwald-Fensk (nº 100). O viscosímetro foi colocado em banho a 60°C e aguardou-se 10 minutos para a estabilização da temperatura, sendo então, determinada.

3 Resultados e discussão

3.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O processo de obtenção da gelatina é determinante para suas propriedades. Sabe-se que a qualidade da gelatina depende de suas propriedades físico-químicas, as quais são fortemente influenciadas pela severidade do processo de manufatura (JOHNSTON-BANKS, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). A tab. 2 apresenta a matriz do planejamento experimental, com os dados obtidos para rendimento (%), força de gel (g) e viscosidade (cP).

Tabela 2 - Matriz de planejamento experimental com valores codificados e resultados obtidos para rendimento (RE), força de gel (FG) e viscosidade (V).

Ensaio	X₁	X₂	X₃	X₄	RE (%)	*FG (g)	*V (cP)
1	-1	-1	-1	-1	4,56	196	6,12
2	+1	-1	-1	-1	5,22	208	5,78
3	-1	+1	-1	-1	3,88	209	5,24
4	+1	+1	-1	-1	5,1	226	5,98
5	-1	-1	+1	-1	6,64	189	4,61
6	+1	-1	+1	-1	6,97	186	4,23
7	-1	+1	+1	-1	7,02	190	4,67
8	+1	+1	+1	-1	6,03	194	3,98
9	-1	-1	-1	+1	6,45	187	3,78
10	+1	-1	-1	+1	6,78	189	3,90
11	-1	+1	-1	+1	7,67	193	4,06
12	+1	+1	-1	+1	5,64	207	3,56
13	-1	-1	+1	+1	8,07	187	3,33
14	+1	-1	+1	+1	8,05	180	3,67
15	-1	+1	+1	+1	7,55	178	3,78
16	+1	+1	+1	+1	7,57	177	2,98
17	-2	0	0	0	7,12	191	3,89
18	+2	0	0	0	6,89	197	4,09
19	0	-2	0	0	6,55	186	4,45
20	0	+2	0	0	7,05	187	4,10
21	0	0	-2	0	5,78	218	5,78
22	0	0	+2	0	8,24	200	2,78
23	0	0	0	-2	3,98	199	3,67
24	0	0	0	+2	8,12	187	2,56
25	0	0	0	0	7,25	203	3,05
26	0	0	0	0	6,98	206	3,45
27	0	0	0	0	7,42	210	3,15

* Valores médios referentes a três determinações.

A obtenção de maiores rendimentos no processo de extração da gelatina de pele de tilápia é fundamental para viabilizar sua utilização como potencial fonte de produção. Os principais efeitos dos fatores dependentes e suas interações de segunda ordem sobre o rendimento para um nível de confiança de 95%, são apresentados na tab. 3. A variação da temperatura de extração (X_3) apresentou grande influência sobre o rendimento. O aumento da temperatura de extração provocou uma elevação, em média, de 1,46% no rendimento da gelatina, sendo esta variável altamente significativa ($p < 0,000043$). Sabe-se que a temperatura de extração desempenha importante papel no que tange ao rendimento do processo. O emprego de temperaturas elevadas provoca maior hidrólise no colágeno propiciando maiores rendimentos. Zhou e Regenstein (2004) observaram que a temperatura de pré-tratamento também possui influência sobre o rendimento, sendo que pré-tratamentos a temperatura ambiente geram grandes perdas. Pode-se observar nas Fig. 1 e 2 que a elevação da temperatura contribuiu para o gradativo aumento dos rendimentos; menores concentrações de NaOH (%) e H_2SO_4 propiciaram a obtenção de maiores rendimentos, porém ambas variáveis não foram significativas a um nível de confiança de 95%. Gudmundsson e Hafsteinsson (1997) observaram que tratamentos em baixas concentrações de íons H^+ e OH^- permitem a obtenção de maiores rendimentos em gelatinas extraídas de pele de bacalhau.

A variável tempo de extração (X_4) apresentou grande influência sobre o rendimento, mostrando-se altamente significativa ($p < 0,000009$). O aumento do tempo de extração levou a um aumento médio de 1,72% no rendimento (tab.3). No pré-tratamento, o número de ligações cruzadas é reduzido, tendo este processo continuação durante a extração, onde as ligações cruzadas e peptídicas continuam a ser quebradas. Deve-se considerar também que no pré-tratamento ácido, de certo modo, as mudanças ocorridas antes da extração são mínimas, ocorrendo grande quebra de ligações cruzadas durante a extração (JOHNS; COURTS, 1977). Pode-se observar na Fig. 3, a obtenção de rendimentos mais elevados na faixa onde foram empregadas maiores temperaturas de extração em conjunto com tempos prolongados; isto possivelmente propiciou a hidrólise mais pronunciada do colágeno, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos.

Tabela 3 – Efeitos estimados no rendimento das gelatinas de pele de tilápia.

Fatores	Efeitos	Desvio padrão	Valor t (12)	Valor p
X ₁	-0,078333	0,233774	-0,33508	0,743348
X ₂	-0,106667	0,233774	-0,45628	0,656335
X ₃	1,460000	0,233774	6,24536	0,000043*
X ₄	1,720000	0,233774	7,35754	0,000009*
X ₁ X ₁	-0,194583	0,247954	-0,78475	0,447813
X ₁ X ₂	-0,385000	0,286313	-1,34468	0,203594
X ₁ X ₃	-0,105000	0,286313	-0,36673	0,720204
X ₁ X ₄	-0,365000	0,286313	-1,27483	0,226501
X ₂ X ₂	-0,297083	0,247954	-1,19814	0,253992
X ₂ X ₃	-0,105000	0,286313	-0,36673	0,720204
X ₂ X ₄	0,055000	0,286313	0,19210	0,850878
X ₃ X ₃	-0,192083	0,247954	-0,77467	0,453528
X ₃ X ₄	-0,400000	0,286313	-1,39707	0,187690
X ₄ X ₄	-0,672083	0,247954	-2,71051	0,018937*

* significativas ($p < 0,05$)

% variação explicada (R^2) = 89,8

A tab. 4 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o rendimento. Nesta etapa os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos. Nota-se que o teste-F assegurou a validade do modelo, visto que o F calculado apresentou valor aproximadamente quatorze vezes superior ao valor listado, para um intervalo de confiança de 95%, sendo o F calculado para a regressão altamente significativo (valor p 0,000000001). Portanto, pode-se afirmar que o modelo foi significativo e preditivo.

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para o rendimento da gelatina de pele de tilápia.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	Valor p
Regressão	32,93	3	10,97	42,19	0,000000001
Resíduo	5,98	23	0,26		
Total	38,91	26			

$$F_{3;23;0,05} = 3,02$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 89,8$$

Avaliando-se os resultados da análise estatística pode-se verificar que apenas foram significativas as variáveis temperatura de extração e o termo linear e quadrático do tempo de extração. As demais variáveis e os efeitos de interação não foram significativas a um nível de confiança de 95%. Foi utilizado o modelo, sem os parâmetros estatisticamente não significativos, que possuiu um percentual de variação explicado (R^2) de aproximadamente 84%. O modelo expresso pela equação 4 foi gerado na forma codificada, representando o rendimento (RE) da gelatina em função das variáveis significantes ($p < 0,05$).

$$RE = - 5,43700 + 0,14600 (X_3) + 0,82200 (X_4) - 0,02974 (X_4) (X_4)$$

Rendimento RE
 Temperatura de extração °C (X_3)
 Tempo de extração h (X_4)

(eq. 4)

Dessa forma, o modelo foi utilizado na construção das superfícies de resposta, permitindo a visualização do rendimento da gelatina em função das variáveis que apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre essa variável dependente.

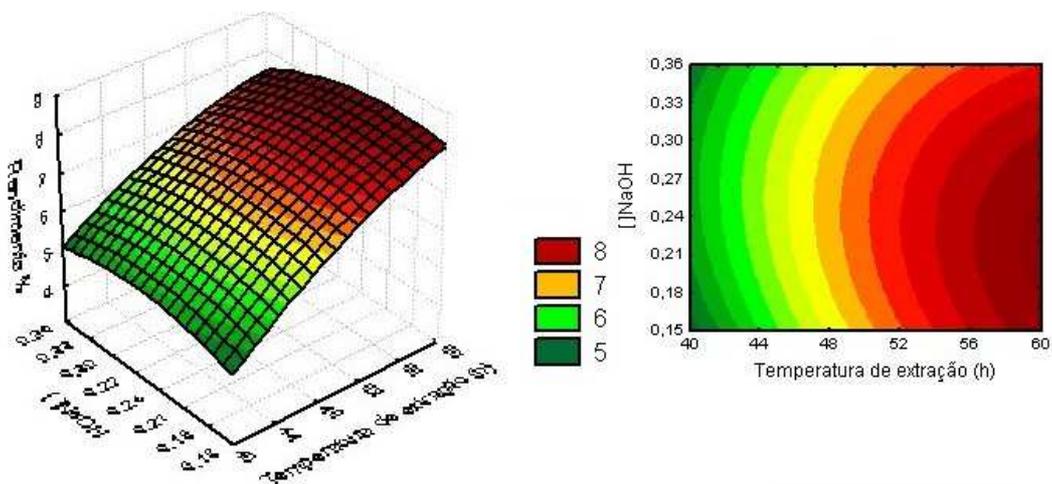


Figura 1 – Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de NaOH (%) e temperatura de extração (°C) (concentração de H_2SO_4 fixada em 0,25% e tempo de extração em 9 h) em função do rendimento da gelatina de pele de tilápia.

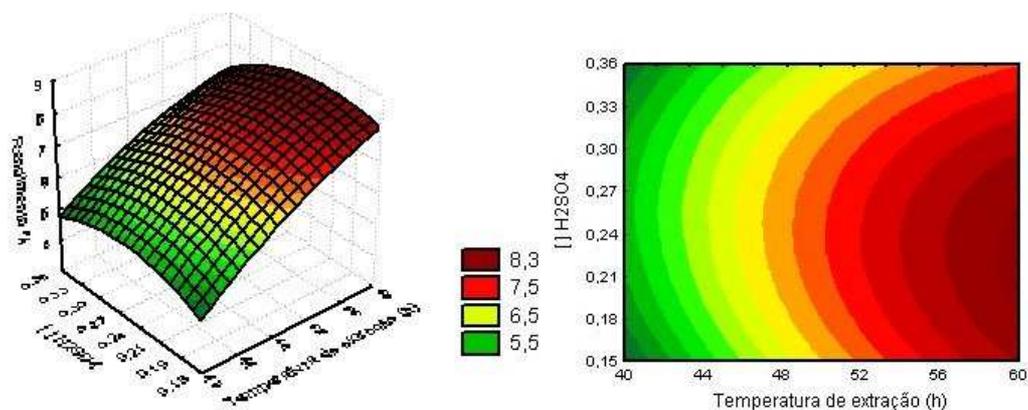


Figura 2 – Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de H_2SO_4 (%) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e tempo de extração em 9 h) em função do rendimento da gelatina de pele de tilápia.

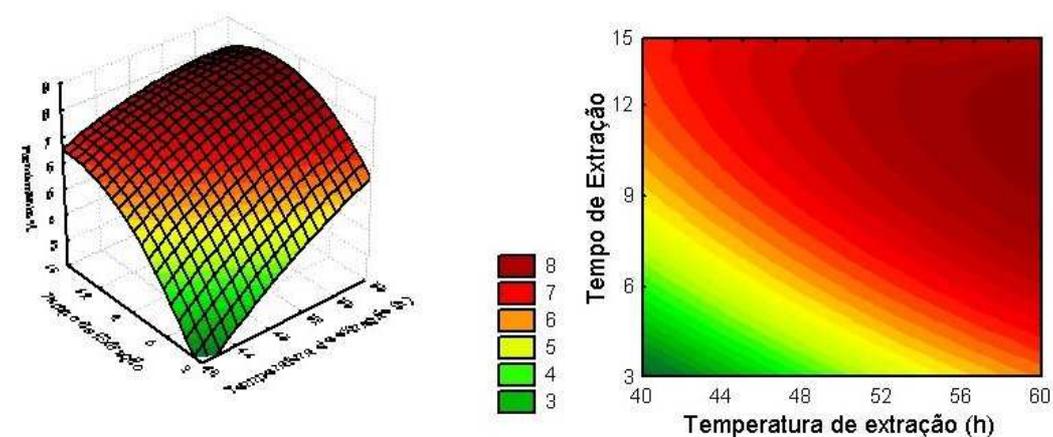


Figura 3 – Superfície de resposta e diagrama de contorno do tempo de extração (h) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e concentração de H_2SO_4 em 0,25%) em função do rendimento da gelatina de pele de tilápia.

O resultado experimental e predito pelo modelo nas condições ótimas, bem como o desvio e desvio relativo, são apresentados na tab. 5.

Tabela 5 – Resultados dos rendimentos experimental (p/p) e previsto (p/p) pelo modelo, desvio e desvio relativo nas condições ótimas do processo.

Ensaio 22	Rendimento experimental (%)	Rendimento previsto (%)	Desvio	Desvio relativo (%)
	8,24	8,31	-0,13	-1,57

Pode-se verificar que o desvio e desvio relativo foram baixos, demonstrando que o modelo, sob estas condições, pode prever com precisão o rendimento do processo. A Fig. 4 apresenta os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo para o rendimento, observando-se uma boa concordância entre eles, como era de se esperar, devido ao resultado da ANOVA.

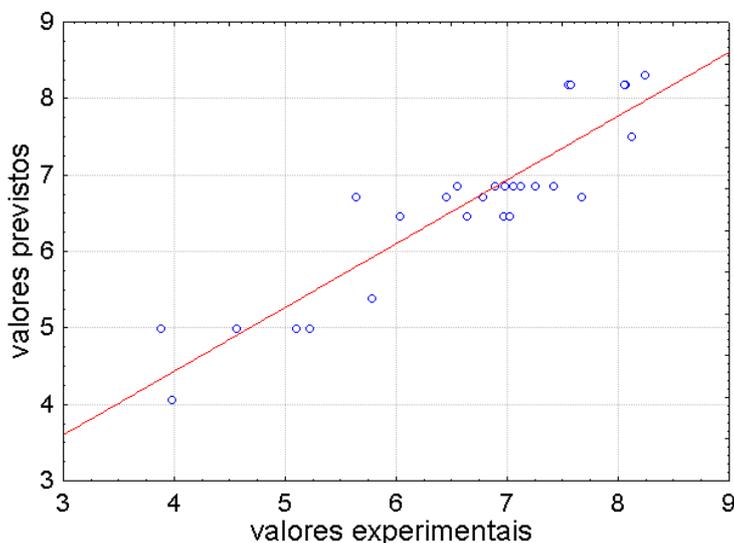


Figura 4 – Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para o rendimento (% p/p) da gelatina de pele de tilápia.

Assim como no rendimento, as variáveis tempo de extração e temperatura de extração (termos linear e quadrático) mostraram influência significativa ($p < 0,05$) sobre a viscosidade da gelatina (tab.6). Pode-se observar (Fig. 5) que os aumentos da temperatura de extração e do tempo de extração

geraram reduções na viscosidade da gelatina em média de 1,09cP e 1,14cP, respectivamente. Possivelmente, as elevações nestas variáveis levaram a um incremento do rendimento, devido à ocorrência de hidrólise mais pronunciada do colágeno, e em função disso, provavelmente ocorreu a fragmentação excessiva das cadeias, gerando um aumento de peptídeos com peso molecular menor do que α . Sabe-se que a viscosidade das soluções de gelatina são influenciadas por sua distribuição de pesos moleculares (GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997), onde pesos moleculares maiores geram aumento da viscosidade (SPERLING, 1985). Portanto, o emprego de maiores temperaturas e tempos de extração foram desejáveis para incrementar o rendimento, no entanto, levaram a um decréscimo da viscosidade da gelatina, devido à formação de maior quantidade de compostos de baixo peso molecular. Arnesen e Gildberg (2002) e Muyonga, Cole, e Duodu (2004a) relataram que gelatinas obtidas por extrações a altas temperaturas, apresentam perfil de peso molecular menor, do que a fração resultante de temperaturas mais baixas.

Os termos quadráticos da concentração de NaOH (%) e concentração de H₂SO₄ também apresentaram efeitos significativos sobre a viscosidade da gelatina, para um intervalo de confiança de 95%. Concordando com Zhou e Regenstein (2004) que observaram, na extração de gelatina de pele de polaca do Alaska, que as concentrações de H⁺ e OH⁻ possuem significativo efeito na viscosidade.

Tabela 6 – Efeitos estimados na viscosidade das gelatinas de pele de tilápia.

Fatores	Efeitos	Desvio padrão	Valor t (12)	Valor p
X ₁	-0,09250	0,223355	-0,41414	0,686079
X ₂	-0,15583	0,223355	-0,69769	0,498666
X ₃	-1,09750	0,223355	-4,91369	0,000358*
X ₄	-1,14750	0,223355	-5,13755	0,000246*
X ₁ X ₁	0,53313	0,236904	2,25038	0,043967*
X ₁ X ₂	-0,12375	0,273553	-0,45238	0,659065
X ₁ X ₃	-0,19375	0,273553	-0,70827	0,492306
X ₁ X ₄	-0,02125	0,273553	-0,07768	0,939362
X ₂ X ₂	0,67563	0,236904	2,85189	0,014572*
X ₂ X ₃	0,03875	0,273553	0,14165	0,889703
X ₂ X ₄	0,07125	0,273553	0,26046	0,798924
X ₃ X ₃	0,67813	0,236904	2,86244	0,014289*
X ₃ X ₄	0,51125	0,273553	1,86892	0,086228
X ₄ X ₄	0,09562	0,236904	0,40364	0,693574

* significativas ($p < 0,05$)
 % variação explicada (R^2) = 85,4

A tab. 7 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os ensaios do DCCR, tendo como variável dependente a viscosidade da gelatina de pele de tilápia. O teste-F assegurou a validade do modelo, já que o F calculado apresentou valor onze vezes maior que o F tabelado, para um intervalo de confiança de 95%. O F calculado para a regressão foi altamente significativo (valor p 0,000000005), sendo o modelo considerado preditivo.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a viscosidade da gelatina de pele de tilápia.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	Valor p
Regressão	21,51	5	4,30	30,71	0,000000005
Resíduo	3,12	21	0,14		
Total	24,63	26			

$F_{5;21;0,05} = 2,68$

% variação explicada (R^2) = 85,4

Foi grande a variação entre coeficiente de regressão com todos os parâmetros (15 parâmetros) e o coeficiente de regressão sem os parâmetros estatisticamente não significativos (6 parâmetros). Desta forma, optou-se por gerar o modelo com todos os parâmetros. A equação 5 expressa na forma codificada o comportamento viscoso da gelatina em função das variáveis significantes para um intervalo de confiança de 95%.

$$\text{Viscosidade} = 63,1141 + 106,6250 (X_1) (X_1) + 135,1250 (X_2) (X_2) - 1,5419 (X_3) + 0,0136 (X_3) (X_3)$$

(eq. 5)

Concentração de NaOH % (X_1)
 Concentração de H_2SO_4 % (X_2)
 Temperatura de extração °C (X_3)

O teste-F validou o modelo, sendo possível construir a superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento viscoso da gelatina em função das variáveis que apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre essa variável dependente.

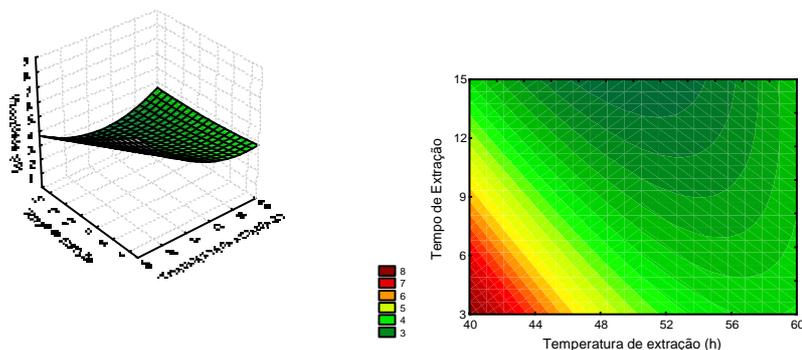


Figura 5 – Superfície de resposta e diagrama de contorno do tempo de extração (h) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e concentração de H₂SO₄ em 0,25%) em função da viscosidade da gelatina de pele de tilápia.

A tab. 8 apresenta o valor experimental para a viscosidade da gelatina e o valor previsto pelo modelo nas condições ótimas, bem como, o desvio e desvio relativo, que foram calculados através das equações 1 e 2, respectivamente.

Tabela 8 – Resultados da viscosidade experimental e prevista pelo modelo, desvio e desvio relativo nas condições ótimas do processo.

Ensaio 1	Viscosidade experimental (cP)	Viscosidade prevista (cP)	Desvio	Desvio relativo (%)
	6,12	5,59	0,53	8,66

A pequena diferença entre o valor experimental e predito, habilita o modelo a estimar a viscosidade da gelatina obtida sob estas condições. Os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo, podem ser observados na Fig. 6.

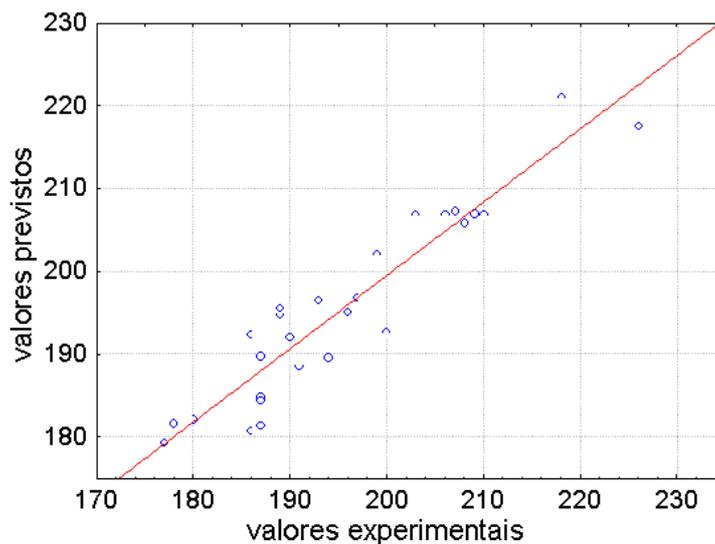


Figura 6 – Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a viscosidade (cP) da gelatina de pele de tilápia.

As concentrações de NaOH% e H₂SO₄% (termos lineares e quadráticos) apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a força de gel da gelatina (tab.9). O aumento nas concentrações dos íons H⁺ e OH⁻ propiciou a elevação da força de gel, enquanto, a interação quadrática dos termos levou à sua redução. Pode-se observar (Fig. 7 e 8) que a elevação das concentrações de H⁺ e OH⁻ leva ao incremento da força de gel, no entanto, com o gradativo aumento das concentrações, a força de gel tende a decrescer. Os maiores valores de força de gel foram obtidos quando foram empregadas concentrações de NaOH e H₂SO₄ na faixa de 0,24 - 0,30%. Conhece-se que as propriedades físicas da gelatina são influenciadas pelo conteúdo relativo de cadeias com α , β ou γ componentes, agregados de alto peso molecular e fragmentos de proteína de baixo peso molecular (JOHNSTON-BANKS, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Portanto, a severidade do tratamento de extração é determinante para as propriedades funcionais da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). Possivelmente, o decréscimo na força de gel da gelatina quando foram empregadas maiores concentrações, se deve à formação de compostos de baixo peso molecular, visto, que a força de gel é dependente da fração de α cadeias e seus dímeros (β componentes) (JOHNSTON-BANKS, 1990; CHO et al., 2004).

Da mesma maneira que na avaliação estatística das outras variáveis dependentes (rendimento e viscosidade), as variáveis tempo de extração

(termos linear e quadrático) e temperatura de extração mostraram possuir influência significativa ($p < 0,01$) sobre a força de gel (tab.9). Reiterando, que as reduções na força de gel e na viscosidade e a elevação no rendimento, com os aumentos da temperatura e tempo de extração, resultam da hidrólise pronunciada da molécula de colágeno, com a conseqüente 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). Portanto, o emprego de altas temperaturas e tempos de extração prolongados, são desejáveis para obtenção de maiores rendimentos (Fig. 3), mas induzem à fragmentação das α -cadeias de colágeno, levando à redução da viscosidade e força de gel (Fig. 5 e 9).

Tabela 9 – Efeitos estimados na força de gel das gelatinas de pele de tilápia.

Fatores	Efeitos	Desvio padrão	Valor t (12)	Valor p
X ₁	4,1667	1,892052	2,20219	0,047948*
X ₂	4,5000	1,892052	2,37837	0,034866*
X ₃	-14,1667	1,892052	-7,48746	0,000007*
X ₄	-10,3333	1,892052	-5,46144	0,000145*
X ₁ X ₁	-6,8750	2,006824	-3,42581	0,005024*
X ₁ X ₂	3,7500	2,317281	1,61828	0,131570
X ₁ X ₃	-6,5000	2,317281	-2,80501	0,015896*
X ₁ X ₄	-2,7500	2,317281	-1,18674	0,258295
X ₂ X ₂	-10,6250	2,006824	-5,29443	0,000190*
X ₂ X ₃	-7,2500	2,317281	-3,12867	0,008713*
X ₂ X ₄	-3,5000	2,317281	-1,51039	0,156819
X ₃ X ₃	0,6250	2,006824	0,31144	0,760812
X ₃ X ₄	3,2500	2,317281	1,40251	0,186102
X ₄ X ₄	-7,3750	2,006824	-3,67496	0,003178*

* significativas ($p < 0,05$)
% variação explicada (R^2) = 93,2

A tab. 10 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a força de gel. Deve ser ressaltado que a resposta apresentou um alto percentual de variação explicada ($R^2 = 0,9325$) e a validade do modelo foi assegurada pelo teste-F. O $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi altamente significativo (valor p 0,00000001) e apresentou valor aproximadamente doze vezes maior que o valor listado ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) do delineamento composto central rotacional para a força de gel da gelatina de pele de tilápia.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$	Valor p
Regressão	3593,97	9	399,33	29,95	0,00000001
Resíduo	226,69	17	13,33		
Total	3820,66	26			

$F_{9;17;0,05} = 2,49$

% variação explicada (R^2) = 93,2

O modelo codificado (equação 6) representa o comportamento da força de gel da gelatina em função das variáveis significantes ($p < 0,05$). Devido à pequena variação entre o coeficiente de regressão com todos os parâmetros (15 parâmetros) e o coeficiente de regressão sem os parâmetros estatisticamente não significativos (10 parâmetros), optou-se por gerar o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos, o qual possui um percentual de variação explicado (R^2) de aproximadamente 89%. O valor do R^2 sugere que o modelo pode prever com boa aproximação o comportamento da variável dependente.

$$\text{Força de gel} = - 330,28 + 1400,00 (X_1) - 1416,67 (X_1) (X_1) + 1853,33 (X_2) - 2166,67 (X_2) (X_2) + 5,46 (X_3) + 5,86 (X_4) - 0,42 (X_4) (X_4) - 13,00 (X_1) (X_3) - 14,50 (X_2) (X_3)$$

(eq. 6)

Concentração de NaOH % (X_1)
 Concentração de H_2SO_4 % (X_2)
 Temperatura de extração °C (X_3)
 Tempo de extração h (X_4)

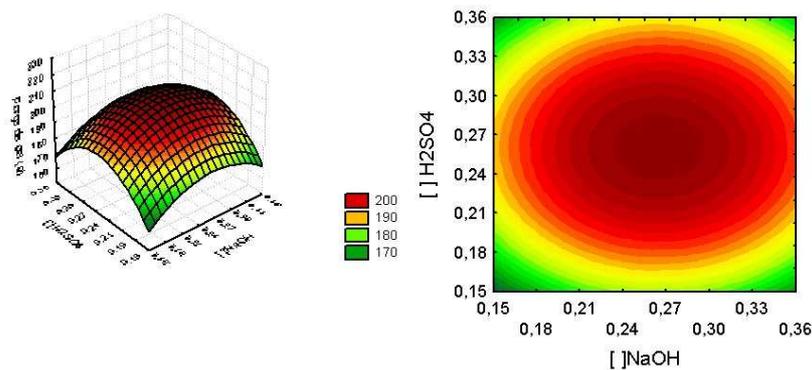


Figura 7 – Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de NaOH (%) e concentração de H₂SO₄ (%) (tempo de extração fixado em 9 h e temperatura de extração em 50°C) em função da força de gel da gelatina de pele de tilápia.

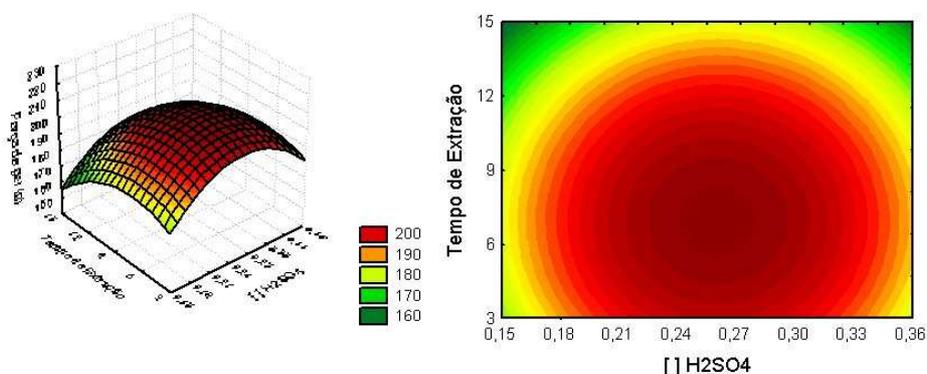


Figura 8 – Superfície de resposta e diagrama de contorno da concentração de H₂SO₄ (%) e tempo de extração (h) (temperatura de extração fixado em 50°C e concentração de NaOH em 0,25%) em função da força de gel da gelatina de pele de tilápia.

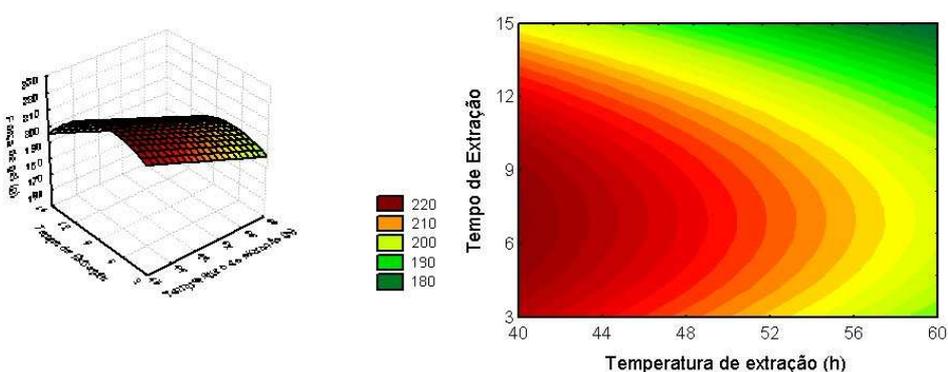


Figura 9 – Superfície de resposta e diagrama de contorno do tempo de extração (h) e temperatura de extração (°C) (concentração de NaOH fixada em 0,25% e concentração de H₂SO₄ em 0,25%) em função da força de gel da gelatina de pele de tilápia.

O valor experimental e calculado pelo modelo para expressar a força de gel da gelatina nas condições ótimas e o desvio e desvio relativo são apresentados na tab. 11.

Tabela 11 – Resultados da força de gel experimental e prevista pelo modelo, desvio e desvio relativo nas condições ótimas do processo.

Ensaio 4	Rendimento experimental (g)	Rendimento previsto (g)	Desvio	Desvio relativo (%)
	226	218	8	3,53

Como esperado, a diferença entre o valor experimental e previsto foi pequena, resultando num baixo desvio relativo (3,53%), demonstrando que o modelo pode ser utilizado para prever a força de gel da gelatina, quando obtida sob estas condições. A Fig. 10 apresenta os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo para a força de gel.

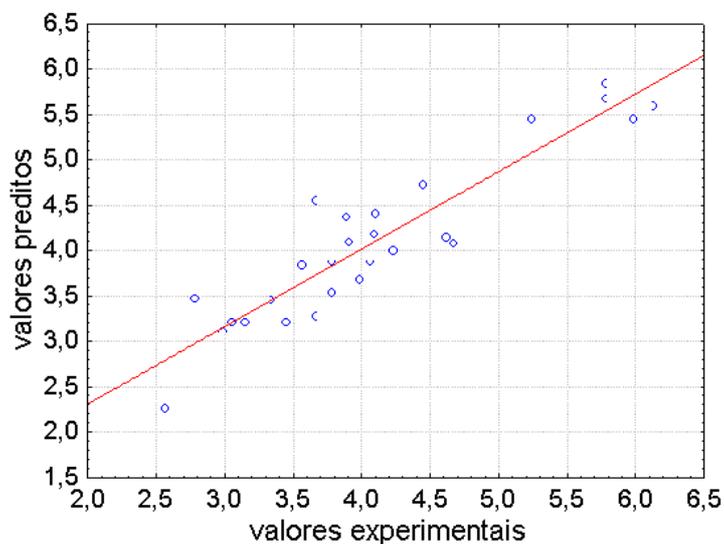


Figura 10 – Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a força de gel (g) da gelatina de pele de tilápia.

4 Conclusões

Os maiores valores de força de gel foram obtidos quando utilizadas concentrações de NaOH e H₂SO₄ na faixa de 0,24 - 0,30 %. O emprego de altas temperaturas e tempos de extração prolongados são desejáveis para

obtenção de maiores rendimentos, mas levam à redução da viscosidade e da força de gel da gelatina. Das variáveis avaliadas no planejamento fatorial, a gelatina com maior força de gel, foi obtida quando os níveis: NaOH 0,3% (p/v), H₂SO₄ 0,3% (p/v), temperatura de extração 45°C e tempo de extração de 6h, foram utilizados.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SUÍNOS E AVES, Concórdia (SC), pela liofilização das amostras.

5 Referências

ARNESEN, J. A.; GILDBERG A. Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). **Bioresource Technology**. v. 82 p. 191-194, 2002.

BARROS NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299 p.

B.S.I. (British Standards Institution) **Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)**. London. 1975.

CHO, S. M.; KWAK, K. S.; PARK, D. C.; GU, Y. S.; JI, C. I.; JANG, D. H.; LEE, Y. B.; KIM S. B. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, v. 18 p. 573–579, 2004.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 281-286, 2003.

GILDBERG, A.; ARNESEN, J. A.; CARLEHÖG, M. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**. v.38 p. 475-480, 2002.

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

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus bosci*) skins with several organic acids. **Journal of Food Science**. v.66 p.213–216, 2001.

GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. **Process for the production of gelatin from fish skins**. US Patent 5,093,474, 1992.

GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON, H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37–39, 1997.

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

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin. In: ELSEVIER APPLIED FOOD SCIENCE SERIES. *Food gels*, New York, 1990. p. 233–289.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus bosci*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 3, p. 434-438, 2000.

MONTERO, P. FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. **Food Hydrocolloids**. v. 16 p. 197-205, 2002.

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

SHAHIDI, F. Seafood processing by-products. In F. SHAHIDI; J. R. BOTTA (Eds.), *Seafoods chemistry, processing, technology and quality*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1994. p. 320–334.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. New York: John Wiley, 1985.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Optimization of extraction conditions for Pollock skin gelatin. **Journal of Food Science**. v. 69 p. 393–398, 2004.

**Capítulo 2 - OBTENÇÃO DE GELATINA DE PELE
DE TILÁPIA (*Oreochromis urolepis hornorum*) E
SUA CARACTERIZAÇÃO**

RESUMO

Foi produzida gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) e caracterizada quanto a suas propriedades físico-químicas, microbiológicas, reológicas e estruturais. A gelatina apresentou valor de pH 4,66, ligeiramente superior aos descritos para gelatinas processadas por solubilização ácida. Com tempo de maturação de 18±1h, a força de gel e a viscosidade apresentaram valores de 221g e 5,98cP, respectivamente, sendo observado comportamento similar entre as mesmas com o prolongamento deste tempo. De maneira geral, o conteúdo iônico foi baixo e o rendimento do processo foi de 5,10%. A gelatina apresentou padrões microbiológicos que atendem às exigências da legislação brasileira e pontos de fusão e geleificação de 25°C e 21°C, respectivamente.

Palavras-chave: pescado, gelatina, pele de tilápia, caracterização.

ABSTRACT

Tilapia skin gelatin (*Oreochromis urolepis hornorum*) was produced and characterized according to its physicochemical, microbiological, rheological and structural properties. The gelatin has shown value of pH 4,66, slightly superior to the ones described for gelatins processed by acid solubilization. With time of maturation of 18±1h, the gel strength and viscosity showed values of 221g and 5,98cP, respectively, and it was observed a similar behavior between them with the prolongation of this time. In general, the ionic content was low and the efficiency of the process was of 5,10%. The gelatin showed microbiological standards that regard the demands of Brazilian legislation and melting and gelling points of 25°C and 21°C, respectively.

Key-words: fish, gelatin, tilapia skin, characterization.

1 Introdução

Tradicionalmente, a extração de colágeno para produção de gelatina é realizada utilizando como matéria-prima ossos e peles de mamíferos, principalmente provenientes de bovinos e suínos. No entanto, recentes problemas sanitários relacionados com bovinos, como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a) e restrições à gelatina de mamíferos em países em que predominam religiões como islamismo e judaísmo, onde somente são aceitas se concebidas conforme os requerimentos da religião (GUDMUNDSSON; HÁFSTEINSSON 1997; CHOI; REGENSTEIN, 2000; JAMILAH; HARVINDER, 2002), tem despertado um crescente interesse em gelatinas de pescado. Grande quantidade de subprodutos, contendo elevada quantidade de colágeno,

são gerados no processamento de pescado, os quais podem ser utilizados para a manufatura de gelatina.

Segundo Johnston-Banks (1990), as propriedades da gelatina são grandemente influenciadas por dois principais fatores: características do colágeno inicial e processo de extração. As propriedades de geleificação das gelatinas são fortemente influenciadas pela origem da matéria-prima utilizada no processo, devido, aos diferentes conteúdos de prolina e hidroxiprolina no colágeno de diferentes espécies, que estão relacionados com a temperatura e o habitat do animal (KOLODZIEJSKA et. al, 2003). Já o processo de extração é de fundamental importância porque é determinante para distribuição de peso molecular da gelatina (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a), diferenças no conteúdo de componentes do colágeno (cadeias α , β e γ componentes) e a razão entre cadeias α_1 e α_2 influenciam o comportamento da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

Uma das principais restrições à utilização da gelatina de pescado, deve-se a suas inferiores propriedades reológicas quando comparada à gelatina de mamíferos (CHOI; REGENSTEIN, 2000; CHO; GU; KIM, 2004), o que restringe a sua gama de aplicações (LEUENBERGER, 1991). Gelatinas de pescado geralmente apresentam temperaturas de geleificação e fusão mais baixas e também menor força de gel do que gelatinas de mamíferos (NORLAND, 1990; FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003). Colágenos de peixes de água quente, como a tilápia, possuem conteúdo de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) superior a peixes de água fria (GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997) resultando em gelatinas com melhores propriedades funcionais (LEUENBERGER, 1991; GROSSMAN; BERGMAN, 1992; GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000).

Este trabalho teve como propósito determinar as propriedades físico-químicas (composição centesimal, análise de minerais, cor, turbidez, rendimento do processo e pH natural), microbiológicas (Coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp e Clostrídios sulfito redutores), reológicas (ponto de fusão, ponto de geleificação, viscosidade e força de gel) e estruturais (distribuição de peso molecular e composição de aminoácidos) da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). A utilização dessa espécie no estudo, deve-se aos relatos

a respeito de seu potencial para fabricação de gelatina, bem como, as suas superiores propriedades reológicas, em relação às demais espécies já estudadas.

2 Material e métodos

2.1 Material

Foram utilizadas peles frescas de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) recém processadas, obtidas junto à empresa localizada na cidade de Pato Branco (Paraná, Brasil). As peles foram estocadas a -18°C até sua utilização (aproximadamente 1 dia depois). Todos os reagentes que foram utilizados são de grau analítico (P.A.).

2.2 Pré-tratamento e extração da gelatina

A extração foi realizada conforme parâmetros definidos em planejamento fatorial anterior, onde a amostra obtida por esta metodologia apresentou maior força de gel (g). As peles foram lavadas em água corrente, sob agitação contínua para retirada do material superficial aderido; e, cortadas em peças de aproximadamente 4cm x 4cm. A seguir, o material foi submetido à imersão em solução salina de NaCl 0,2% (p/v) por 5 minutos sob agitação contínua. As peles cortadas foram, então, submetidas a tratamento alcalino 1:10 (p/v), em solução de NaOH 0,3% (p/v), por período de 80 minutos, à temperatura de 10°C . Após esse procedimento, foram lavadas em água corrente para retirada do álcali em excesso, até pH abaixo de 8. A seguir, as peles foram submetidas a tratamento ácido 1:10 (p/v), em solução de H_2SO_4 0,3% (p/v), por 80 minutos; e, posteriormente, lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade. As peles foram então submetidas a um segundo tratamento ácido 1:10 (p/v), em solução de ácido cítrico 0,7% (p/v), por 80 minutos; e lavadas em água corrente até pH próximo a neutralidade.

A extração da gelatina foi realizada em biorreator BIOSTAT B (B. Braun Biotech International, Alemanha) em água deionizada por 6h à temperatura de 45°C , mantendo a proporção de 2mL de solução para 1g de pele. Após a extração, o material foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro Whatman nº 4, sendo então liofilizado e moído.

2.3 Composição centesimal da matéria-prima

Umidade e cinzas foram determinadas por método gravimétrico, segundo A.O.A.C. (1995). Lipídios foram determinados segundo o método de extração de Soxhlet, de acordo com a A.O.A.C. (1995). Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo A.O.A.C. (1995), utilizando fator de conversão de 5,4 (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a).

2.4 Composição centesimal da gelatina

Umidade, cinzas e lipídios das gelatinas foram determinados, segundo British Standard Institution (B.S.I., 1975). Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo A.O.A.C. (1995); utilizando fator de conversão de 5,5 (LEACH; EASTOE, 1977).

2.5 Avaliação de minerais

Foram utilizadas lâmpadas catódicas para a quantificação de cada elemento analisado (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^+ , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}) em espectrofotômetro de absorção atômica GBC (mod. Avanta). Realizaram-se leituras de amostras líquidas com dissociação molecular em chama, utilizando gás acetileno. Foram preparadas curvas-padrão para a absorção em duas diferentes concentrações. Soluções 10% (p/v) e 1% (p/v) de gelatina foram preparadas antes das análises, pela dissolução em água destilada a 60°C, sob constante agitação, por 30 minutos.

2.6 Rendimento

Para o cálculo do rendimento foi considerado o peso seco de gelatina e o peso úmido das peles de tilápia, segundo a equação 1:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{peso seco de gelatina}}{\text{peso úmido peles}} \times 100 \text{ (eq. 1)}$$

2.7 Avaliação de cor e turbidez

A determinação de cor foi realizada utilizando espectro colorímetro esférico Hunter Ultrascan (mod. Minolta Cr-300 series), no gel de gelatina a 6,67% (p/v), preparado pela dissolução em água destilada a 60°C, sob

constante agitação mecânica por 30 minutos, após 18 ± 1 h de maturação à temperatura de $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Para determinação da turbidez foi utilizado o método descrito por Cole e Roberts (1996), em solução de gelatina 6,67% (p/v) utilizando turbidímetro Quimis (mod. Q -179P –TURB).

2.8 Determinação do pH

Para determinação do pH foi utilizado o método da British Standard Institution (B.S.I., 1975). Foi preparada uma solução 1% (p/v) de gelatina em água destilada a 60°C , sob agitação mecânica constante, por 30 minutos; sendo após, resfriada até temperatura ambiente, aproximadamente 25°C . A determinação do pH foi realizada em aparelho medidor de pH Analion (mod. PM 608).

2.9 Avaliações microbiológicas

Coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp e Clostrídios sulfito redutores foram determinados segundo Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

2.10 Força de gel

A força de gel foi determinada na amostra de gelatina a 6,67% (p/v), preparada pela dissolução em água destilada a 60°C , sob agitação mecânica constante, por 30 minutos. A amostra foi submetida à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação) por 18 ± 1 h, 42 ± 1 h e 66 ± 1 h. A força de gel foi determinada utilizando analisador de textura (Stable Microsystems, Surrey, Inglaterra), modelo TA-XTplus, com célula de carga de 5kg, e velocidades de pré-teste, teste e pós-teste de 1,5mm/s, 1,0mm/s e 1,0mm/s, respectivamente. Utilizou-se haste cilíndrica de Teflon[®] de 1,27cm de diâmetro, com base plana. A haste foi forçada a 4mm dentro da amostra, a temperaturas entre 8 e 10°C , e a força máxima(g) determinada.

2.11 Propriedades viscoelásticas

As propriedades viscoelásticas foram determinadas em reômetro Rheostress Haake RS-150 (Haake, Karlsruhe, Alemanha), utilizando software

Rheowin Job Manager. Utilizou-se para o estudo dinâmico viscoelástico cone-placa de 35mm de diâmetro e 1° de ângulo com gap = 0,14mm. A amostra de gelatina a 6,67% (p/v) foi preparada pela dissolução em água destilada, a 60°C, sob constante agitação mecânica, por 30 minutos, antes do início das análises.

A amostra foi submetida a uma rampa de temperatura, sendo resfriada de 40°C para 7°C, voltando a ser aquecida até 40°C. Os experimentos foram realizados em tensão de 3,0Pa, frequência de 1Hz e taxa de variação de temperatura de 0,5°C/min, monitorando-se o processo de geleificação através dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' . O ponto de geleificação (*gelling point*) foi determinado no ponto de intersecção dos módulos G' e G'' durante o resfriamento da amostra, segundo metodologia de Gudmundsson (2002). O ponto de fusão (*melting point*) foi determinado do mesmo modo, durante subsequente aquecimento. As amostras foram mantidas a 7°C durante alguns minutos, antes de serem aquecidas até 40°C, para a avaliação do comportamento dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' em temperatura padrão.

O ângulo de fase (δ) foi representado em função da temperatura para observação do comportamento viscoelástico da amostra.

2.12 Eletroforese

Foi seguido o procedimento descrito por Gómez-Guillén, et al. (2002), dissolvendo gelatina em água destilada 5mg/ml a 60°C, seguido de adição de tampão contendo β -mercaptoetanol. As amostras foram desnaturadas por aquecimento a 90°C, por 5 minutos e analisadas por SDS, segundo Laemmli (1970), utilizando gel de empilhamento de 4% e de resolução 8%, em cuba Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) com 25 mA/gel. As bandas foram reveladas com Croomassie Blue R250 durante 72h. Foi utilizado marcador padrão de proteína HiMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen).

2.13 Análise de aminoácidos

A determinação de aminoácidos foi realizada no Centro de Química de Proteínas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), em analisador

Beckman 6300 (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA). A gelatina foi hidrolisada por 22 h a 110 em HCl 6M sob atmosfera de nitrogênio (N₂)

2.14 Viscosidade

A gelatina 6,67% (p/v) foi preparada pela dissolução em água destilada a 60°C, sob agitação mecânica constante, por 30 minutos e submetida à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação) por $18 \pm 1\text{h}$. A viscosidade foi determinada segundo método da British Standard Institution (B.S.I., 1975). A amostra foi derretida em banho a 45°C e transferida para viscosímetro de Ostwald-Fensk (nº 100). O viscosímetro foi colocado em banho a 60°C e aguardou-se 10 minutos até a estabilização da temperatura, então a viscosidade foi determinada.

3 Resultados e discussão

3.1 Composição centesimal da pele de tilápia

A pele de tilápia apresentou teor de cinzas em base úmida de 4,24% (tab.1), sendo este valor intermediário aos observados por Muyonga, Cole e Duodu (2004a) para espécimes jovens (3,7%) e adultos (6,0%) de perca do Nilo. Segundo os autores, essa diferença deve-se a maior calcificação das escamas em função da idade. No presente trabalho não foi considerada a idade do animal, não sendo possível, desta forma, traçar um comparativo. O percentual médio de gordura da amostra foi de 3,85%; portanto, é necessário que os tratamentos prévios à extração sejam eficientes na retirada do material lipídico; sabe-se, que o odor peculiar das peles de pescados deve-se aos compostos nitrogenados e às gorduras que contêm grandes porcentagens de ácidos não saturados (GROSSMAN; BERGMAN, 1992).

Tabela 1 – Composição centesimal da pele de tilápia.

Componentes %	B.U.	B.S.
Umidade	72,6	-
Gordura	3,85	13,09
Proteína	21,30	72,47
Cinzas	4,24	14,42

Valores médios referentes a duas determinações.

B.U. = base úmida; B.S. = base seca.

O conteúdo médio de proteína em base úmida, encontrado na pele de tilápia foi de 21,30%, sendo semelhante aos valores descritos para perca do Nilo jovens (20,3%) e adultas (21,6%), por Muyonga, Cole e Duodu (2004a). É válido ressaltar, que o teor de proteínas presente na pele do pescado, representará a quantidade máxima de colágeno presente no tecido e, portanto, o máximo rendimento possível de gelatina.

3.2 Composição centesimal da gelatina

O teor médio de umidade da gelatina foi de 15% (tab.2), estando acima da faixa descrita para gelatinas comerciais, que geralmente apresentam conteúdo de umidade entre 9-14%, com ocasionais amostras fora dessa faixa (EASTOE; LEACH, 1977).

Tabela 2 – Composição centesimal da gelatina de pele de tilápia.

Componentes %	B.U.	B.S.
Umidade	15	-
Gordura	0,25	0,29
Proteína	81,16	97,18
Cinzas	2,10	2,51

Valores médios referentes a duas determinações.

B.U. = base úmida; B.S. = base seca.

O conteúdo de lipídios, conforme esperado, foi baixo (0,25%), sendo ligeiramente superior aos descritos para gelatinas de outras espécies de pescado por Cho, Gu e Kim (2004) e Muyonga, Cole e Duodu (2004a), de

0,21% e 0,20%, respectivamente; indicando que os sucessivos banhos, nas etapas prévias a extração, foram eficientes na remoção do conteúdo lipídico das peles de tilápia.

Observou-se na gelatina um conteúdo de cinzas em base úmida de 2,1%, valor superior aos relatados por Haug, Draget e Smidsrod (2004) para gelatina de peixes de águas frias (0,82%), entretanto, inferior ao máximo teor de cinzas recomendado, que é de 2,6% (JONES, 1977; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a). Segundo Jones (1977), o conteúdo de cinzas é freqüentemente especificado, porém não deve ser considerado como um fator indispensável, exceto pelo fato de indicar o conteúdo máximo de cálcio da amostra, informação de grande importância em algumas aplicações da gelatina.

3.3 Avaliação de minerais

Segundo Norland (1990), de modo bastante geral, uma gelatina comestível deve apresentar-se livre de metais pesados e esteticamente satisfatória. Na tab. 3 são mostrados os conteúdos iônicos das soluções de gelatina de pele de tilápia 10 e 1% (p/v). Foram observados baixos valores para os íons Zn^{2+} e Mn^{2+} e valores pouco superiores para os íons Cu^{2+} (0,8 ppm) e Fe^{3+} (0,9 ppm). Segundo Jones (1977), gelatinas contendo mais que 20-50 ppm de cobre e 2 ppm de ferro, podem causar manchas escuras em produtos cárneos.

Os conteúdos dos íons Li^+ e K^+ foram ligeiramente maiores, mas de maneira geral, a quantidade desses íons na solução de gelatina, como esperado, foi baixa. Haug, Draget e Smidsrod (2004) não conseguiram mensurar íons K^+ em soluções de gelatinas de hadoque e de polaca do Alasca, concordando com este trabalho; no entanto, encontraram valores iônicos para Na^+ , consideravelmente maiores que Ca^{2+} ; discordando de Giménez, Gómez-Guillén e Montero (2005), que relataram índices de Na^+ menores que Ca^{2+} , para gelatinas de linguado, o que está de acordo com os dados obtidos para gelatinas de tilápia, que apresentaram valores de Na^+ e Ca^{2+} de 40 e 60,0 ppm, respectivamente. Sabe-se que um alto conteúdo de cálcio deve ser evitado para muitos propósitos, nos quais o brilho do gel é requerido, visto que na

presença de ácidos pode ser precipitado, nublando ou formando depósitos na superfície do produto (JONES, 1977).

Tabela 3 – Íons de soluções da gelatina de pele de tilápia.

Concentração (ppm)	Íons							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Li ⁺	Fe ³⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺
10 % (p/v)	42,0	NM	48,0	NM	NM	NM	NM	NM
1 % (p/v)	40,0	1,0	60,0	1,0	0,9	0,8	0,6	0,6

Valores médios referentes a três determinações.
NM = não mensurável.

3.4 Cor e turbidez

A turbidez, em termos práticos, é a redução da transparência, devido à presença de matéria em suspensão. A turbidez das soluções de gelatina é um atributo que pode ser importante, dependendo da sua aplicação (COLE, 2006). A solução de gelatina 6,67% (p/v) apresentou turbidez de 67 NTU (tab.4). Sabe-se que valores de turbidez são largamente dependentes da eficiência do processo de clarificação (filtração) (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a). Neste trabalho foi realizada dupla filtração, encontrando valor ligeiramente superior aos descritos por Cole e Roberts (1997), para gelatinas de pele de mamíferos. Considere-se ainda que valores elevados de turbidez interferem nas determinações de cor (COLE; ROBERTS, 1996; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a).

Tabela 4 – Cor e turbidez da gelatina de pele de tilápia.

Gelatina de pele de tilápia			
Turbidez (NTU)	Cor		
	L	a	b
67	89,25	-0,44	2,48

Valores médios referentes a três determinações.
Cor: L – brilho; a – vermelho – verde; b – amarelo – azul.

A gelatina apresentou coloração amarela esbranquiçada e brilhosa, semelhante à cor das gelatinas comerciais, que geralmente variam de amarelo

pálido a âmbar escuro (COLE; ROBERTS, 1997). Valores de cor, similares ao da gelatina obtida neste trabalho, foram observados em gelatinas de pele de tilápia negra e vermelha, quando a mesma metodologia de determinação foi empregada (JAMILAH; HARVINDER, 2002). Apesar da cor das gelatinas ser um atributo de grande importância comercial, ainda não existe nenhum método universalmente aceito para sua medida (COLE; ROBERTS, 1997).

3.5 Rendimento e pH natural

O rendimento da gelatina de pele de tilápia foi de 5,10% (tab.5), calculado conforme a equação 1. Esse valor é inferior aos valores relatados por Jamilah e Harvinder (2002) para gelatinas de pele de tilápia negra e vermelha, que foram de 5,39% e 7,81%, respectivamente; e consideravelmente menor ao rendimento descrito por Grossman e Bergman (1992) para tilápia sp. (15%) e por Holzer (1996) que relatou método de extração de gelatina de pele com possibilidade de atingir rendimentos superiores a 20%.

Sabe-se que baixas temperaturas resultam em rendimentos inferiores e incompleta extração, enquanto, temperaturas mais elevadas tendem a degradar a gelatina produzida, afetando sua qualidade (HOLZER, 1996). No entanto, a temperatura empregada neste trabalho na etapa de extração, foi semelhante a dos trabalhos citados anteriormente, indicando que o menor rendimento, provavelmente, deve-se à excessiva perda de colágeno durante as etapas de lavagem anteriores.

Tabela 5 – Rendimento do processo e pH natural da gelatina de pele de tilápia.

Gelatina de pele de tilápia	
Rendimento (%)	pH natural*
5,10	4,66

* Valor médio referente a três determinações.

O valor de pH médio, determinado na gelatina de pele de tilápia foi de 4,66, situando-se acima dos valores descritos por Jamilah e Harvinder (2002), que relataram valores de pH para gelatinas de pele de tilápia negra (3,81) e vermelha (3,05). O pH encontrado é consideravelmente mais alto que outros

relatados, porém, encontra-se dentro da faixa de valores descritos para gelatinas solubilizadas com ácido, que estão entre 3,8 a 5,0 (JONES, 1977). Sabe-se que o pH da solução de gelatina é afetado pelo tratamento químico empregado durante a etapa de extração (GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997). Portanto, o pH natural mais elevado da gelatina deve-se possivelmente a eficiência das etapas de lavagem subseqüentes aos tratamentos químicos durante a preparação das peles, antes da etapa de extração.

3.6 Avaliações microbiológicas

A gelatina é um excelente nutriente para a maioria dos microrganismos, portanto cuidados devem ser tomados durante sua manufatura para evitar possíveis contaminações (COLE, 2006). Embora, a legislação brasileira especifique como limite máximo para gelatina e similares: Coliformes 45°C (10,0NMP/g), *Staphylococcus* coagulase positiva ($5,0 \times 10^2$ UFC/g), *Salmonella* sp (ausência em 25g); a contagem total de mesófilas em placas é geralmente aceita na maioria dos países como determinante da qualidade microbiológica de gelatinas (COLE, 2006). A tab. 6 apresenta os resultados das análises microbiológicas da gelatina de pele de tilápia e os limites máximos permitidos. Podemos observar que a gelatina apresentou-se de acordo com os padrões requeridos pela legislação brasileira vigente.

Tabela 6 – Avaliações microbiológicas da gelatina de pele de tilápia.

Microrganismo	Resultado	Padrão (ANVISA)
Coliformes 45°C	2,3 NMP/g	10,0 NMP/g
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	< 10,0 UFC/g	$5,0 \times 10^2$ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Clostrídios sulfito redutores	< 10,0 UFC/g	-

Valores médios referentes a três determinações.

Mesmo não sendo exigida pela legislação brasileira, foi determinada a presença de Clostrídios, devido à susceptibilidade da amostra à deterioração por este grupo de microrganismos. Na gelatina de pele tilápia, não foi observada a presença de Clostrídios sulfito redutores.

Os resultados sugerem que a gelatina de pele de tilápia processada sob estas condições, apresenta condições microbiológicas satisfatórias.

3.7 Composição de aminoácidos e distribuição de peso molecular da gelatina

O colágeno tipo I é a espécie molecular mais abundante nos vertebrados e geralmente compreende duas subunidades α_1 e uma α_2 , que formam um heterotrímero $(\alpha_1)_2 \alpha_2$ (KIMURA et al., 1981). A maioria dos colágenos de pescado que têm sido estudados consistem nessas duas variedades de cadeias α (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). No entanto, muitos peixes teleósteos têm apresentado uma terceira subunidade (α_3) que não tem sido encontrada nos outros vertebrados (KIMURA et al., 1987). Kimura (1992) relatou a presença da terceira subunidade α_3 , também em espécies de peixes não-teleósteas.

A gelatina de pele de tilápia apresentou distribuição de peso molecular típica de colágeno tipo I, apresentando bandas correspondentes às cadeias α_1 e α_2 (~ 100KD) (Fig. 1). Sob as condições experimentais deste trabalho, não foram observadas cadeias α_3 , no entanto, nota-se a presença de peptídeos de baixo peso molecular e pequena fração de β componentes (~ 200KDa). A gelatina utilizada para a análise de peso molecular e todas as demais caracterizações, foi obtida sob as mesmas condições de extração da amostra que apresentou maior força de gel na etapa anterior do trabalho. Conhece-se que a força de gel é dependente do conteúdo relativo de cadeias com α , β ou γ componentes, agregados de alto peso molecular e fragmentos de proteína de baixo peso molecular (JOHNSTON-BANKS, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). No gel da análise eletroforética, constatou-se a presença de dímeros (β componentes), porém, aparentemente em menor quantidade que os demais constituintes. Essa redução pode ter ocorrido em função da hidrólise pronunciada da molécula, formando peptídeos de menor peso molecular, como pode ser observado (Fig. 1). Outra possível explicação seria o congelamento prévio das peles; segundo, Fernández-Diaz, Montero e Gómez-Guillen (2003) a estrutura molecular da gelatina é afetada pelo congelamento prévio da pele,

pois reduz a quantidade de dímeros e trímeros das α -cadeias e polímeros de alto peso molecular.

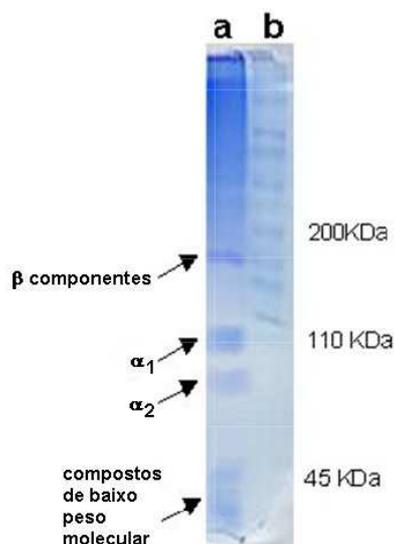


Figura 1 - Análise eletroforética da gelatina por SDS em gel de poliacrilamida: a) gelatina de pele de tilápia; b) marcador padrão de proteína HiMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen)

As propriedades funcionais da gelatina são dependentes da distribuição de seus pesos moleculares e da sua composição de aminoácidos (JOHNSTON-BANKS, 1990). Sabe-se que além da distribuição dos diferentes componentes do colágeno (cadeias α , β e γ componentes) e da razão entre cadeias α_1 e α_2 , diferenças no conteúdo de iminoácidos são determinantes para o comportamento da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

A tab. 7 apresenta a composição de aminoácidos da gelatina de pele de tilápia. Verifica-se que o conteúdo de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina) foi de 21,67%. Segundo Gilseman e Ross-Murphy (2000), o conteúdo total de iminoácidos é tipicamente em torno de 24% para mamíferos e de 16-18% para a maioria das espécies de pescado. A gelatina de pele de tilápia apresentou teor de iminoácidos superior aos valores relatados para outras espécies de pescado, no entanto, substancialmente inferior aos relatados por Grossman e Bergman (1992), para tilápia sp, que se situam em torno de 25%.

Jamilah e Harvinder (2002) reportaram conteúdo total de aminoácidos superior para gelatinas de pele de tilápia negra, quando comparado à tilápia

vermelha. No entanto, ambas apresentaram altos teores de glicina e treonina e baixo teor de prolina. Os valores superiores para força de gel (tab. 8) relatados neste estudo, em relação aos citados pelos autores mencionados, possivelmente deve-se ao maior conteúdo de prolina encontrado na gelatina desta espécie. Sabe-se que a estabilidade das gelatinas, tem sido reportada ser proporcional ao conteúdo total de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) (MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2000).

Sabe-se, que o teor dos iminoácidos pode variar significativamente de acordo com a espécie do pescado (BALIAN; BOWES, 1977; GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004b). Outros grupos de pesquisa (GIMÉNEZ; GÓMEZ-GUILLÉN; MONTERO, 2005; JONGJAREONRAK et al., 2006; CHIOU et al., 2006; CHEOW et al., 2007; KASANKALA et al., 2007; ARNESEN; GILDBERG, 2007) já relataram em seus trabalhos, diferentes teores de iminoácidos em gelatinas extraídas de outras espécies [linguado de Dover (18%), perca olhuda e perca vermelha (~22,5%), polaca do Alasca e salmão rosa do Alasca (~16%), corvina do Norte do Atlântico (~12%), castanha-riscada de asa curta (~10%), carpa capim (~19%), e salmão do Atlântico (~17%)], encontrando conteúdos de iminoácidos que variam entre 10 e 22,5%.

Tabela 7 - Composição de aminoácidos da gelatina de pele de tilápia.

Aminoácidos	g/100g de proteína
Lisina	3,52
Histidina	1,03
Arginina	8,25
Ac. Aspártico	5,15
Treonina	2,85
Serina	3,04
Ac. Glutâmico	9,35
Prolina	12,64
Glicina	23,74
Alanina	10,85
Cistina	-
Valina	2,17
Metionina	1,45
Isoleucina	0,93
Leucina	2,36
Tirosina	0,62
Fenilalanina	2,15
Hidroxiprolina	9,03
Hidroxilisina	1,52
Iminoácidos (pro+Hip)	21,67

Altos conteúdos dos ácidos glutâmico (9,35) e aspártico (5,15) foram determinados. É conhecido que, durante a hidrólise ácida, parte dos aminoácidos glutamina e aspargina são convertidos a suas formas ácidas. O conteúdo de alanina (10,85) foi ligeiramente superior ao relatado por Grossman e Bergman (1992) para gelatina de tilápia sp. (9,27). A alanina, juntamente com a prolina e hidroxiprolina, é encontrada na região não-polar da cadeia, onde a seqüência de aminoácidos Gly-Pro-X predomina (LEDWARD, 1986). O alto conteúdo desses aminoácidos vem sendo descrito como principal responsável pelas melhores propriedades viscoelásticas da gelatina de tilápia, quando comparada com gelatinas de peixes de água fria (SARABIA; GÓMEZ-GUILLÉN; MONTERO, 2000).

3.8 Força de gel da gelatina

Gelatinas comerciais geralmente possuem força de gel de 90 – 300g (JONES, 1977), sendo, principalmente esta, a propriedade física que determina o seu valor comercial (WAINWRIGHT, 1977). Na Fig. 2, podemos observar que a força de gel da gelatina de pele de tilápia (221 g) é intermediária aos valores reportados por Jamilah e Harvinder (2002) para gelatinas de pele de tilápia negra (180,76g) e vermelha (128,11g) e Grossman e Bergman (1992) para tilápia sp. (263g). Zhou e Regenstein (2005) e Cho, Gu e Kim (2004) relataram valores de força de gel para gelatinas de polaca do Alasca e atum de cauda amarela de 400g e 426g, respectivamente, consideravelmente maiores aos encontrados neste trabalho. Gómez-Guillén et. al. (2002), reportaram diferenças na força de gel para gelatinas obtidas de pele de linguado (~ 350g), linguado areeiro (340g), bacalhau (70g) e merluza (100g). As variações acima observadas poderiam ser explicadas por diferenças entre os processos de obtenção da gelatina e o conteúdo de iminoácidos das respectivas espécies de pescado. Sabe-se que as propriedades da gelatina são largamente influenciadas pelo processo de extração e pelo colágeno original (JOHNSTON-BANKS, 1990), que pode variar significativamente de acordo com a espécie (GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997; MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a), sendo largamente dependente da temperatura do habitat do peixe (BALIAN; BOWES, 1977).

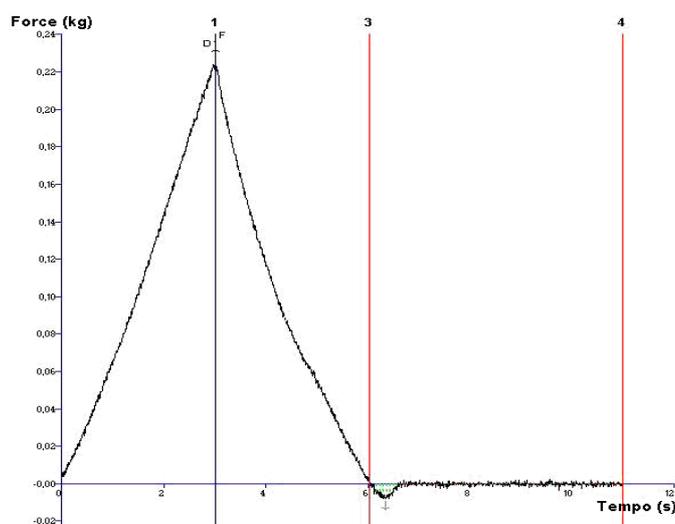


Figura 2 – Determinação da força de gel na amostra de gelatina de pele de tilápia, submetida à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação) por 18 ± 1 h.

A gelatina de pele de tilápia apresentou conteúdo de iminoácidos de 21,67% (tab.7) com teores de prolina e hidroxiprolina de 12,64 e 9,03, respectivamente. Segundo Arnesen e Gildberg (2002), a baixa força de gel em gelatinas está diretamente relacionada a baixos conteúdos de hidroxiprolina. Conhece-se que variações na quantidade desse iminoácido ocasionam menor formação de pontes de hidrogênio da gelatina em soluções aquosas (NORLAND, 1990). Acredita-se que a hidroxiprolina seja o fator mais determinante para a estabilidade das gelatinas, devido a sua habilidade para formar pontes de hidrogênio através do grupamento $-OH$, embora a prolina também seja importante (LEDWARD, 1986).

O prolongamento do tempo de maturação para 42 e 66h propiciou uma elevação média de 12% e 14%, respectivamente, na força de gel da gelatina (tab. 8). Sabe-se que o tempo de maturação e temperatura influenciam nas propriedades dos géis de gelatina (KOLODZIEJSKA et al., 2003). Arnesen e Gildberg et al. (2007) relataram aumento de 250% na força de gel da gelatina de pele de bacalhau, quando o tempo de estocagem foi prolongado para 144h (6 dias). O fortalecimento do gel durante a maturação é principalmente atribuído à regeneração da estrutura helicoidal pelas cadeias polipeptídicas do colágeno e à formação de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos hidroxilados e as moléculas de água (HAUG; DRAGET; SMIDSROD, 2004; ARNESEN; GILDBERG, 2007).

Tabela 8 – Força de gel da gelatina de pele de tilápia em diferentes tempos de maturação.

Gelatina de pele de tilápia	Força de gel (g)	Força de gel (g)	Força de gel (g)
	18±1h	42±1h	66±1h
	221	249	253

Valores médios referentes a três determinações.

3.9 Propriedades viscoelásticas

As temperaturas de geleificação e fusão das gelatinas vêm sendo relacionadas com a proporção de prolina e hidroxiprolina da molécula de colágeno original (LEDWARD, 1986; GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000;

HAUG; DRAGET; SMIDSRØD, 2004), e com o tratamento utilizado no processo (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). Portanto, os pontos de geleificação e fusão das gelatinas são fortemente dependentes da sua distribuição de peso molecular e composição de aminoácidos (JOHNSTON-BANKS 1990). Como relatado anteriormente, a gelatina de pele de tilápia apresentou distribuição de peso molecular típica de colágeno tipo I e conteúdo de iminoácidos (21,67%) inferior aos valores relatados para maioria das gelatinas derivadas de mamíferos, que são, em geral, de aproximadamente 24% (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000).

O comportamento dos módulos de elasticidade G' , viscosidade G'' (a) e ângulo de fase δ (b), monitorados durante o resfriamento de 40°C para 7°C, podem ser observados na Fig. 3. Em temperatura próxima a 25°C observa-se o incremento do módulo elasticidade G' em relação ao módulo viscosidade G'' (Fig. 3 a), denotando o início do processo de geleificação; efeito confirmado pelo decréscimo do ângulo de fase δ (Fig. 3 b), demonstrando o comportamento viscoelástico da gelatina e a tendência ao predomínio do componente elástico, abaixo dessa temperatura. Então, o processo ocorre rapidamente até o ponto de geleificação (*gelling point*), em torno de 21°C, onde acontece a intersecção dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' .

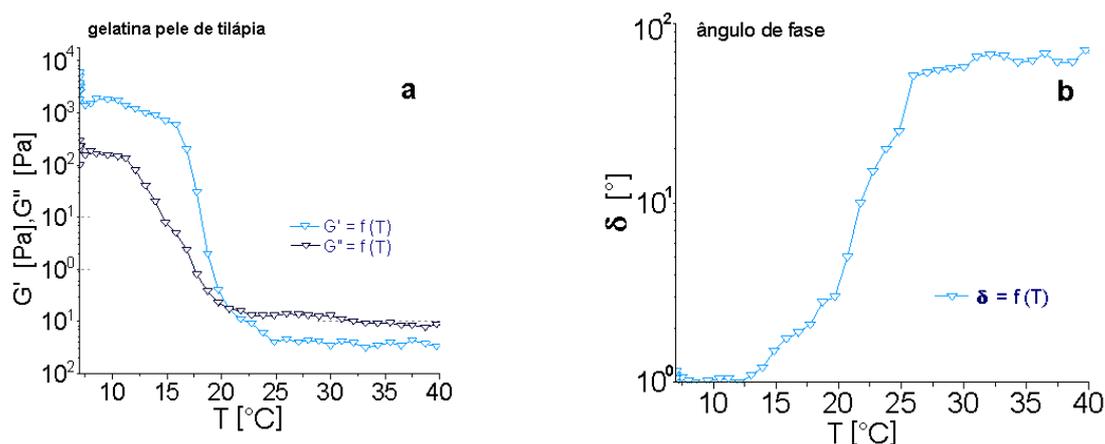


Figura 3 – Módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' (a) ângulo de fase δ , (b) durante resfriamento de 40°C para 7°C da amostra de gelatina de pele de tilápia.

O comportamento viscoelástico da gelatina, sob subsequente aquecimento, pode ser observado na Fig. 4. O processo de fusão da gelatina tem início, quando a temperatura está em torno de 12°C, como pode ser

observado pelo aumento do ângulo de fase (Fig. 4 b), resultante do decréscimo do módulo elasticidade G' em relação ao módulo viscosidade G'' . Com a tendência contínua ao decréscimo do componente elástico G' o ponto de fusão (*melting point*) é observado em temperatura próxima a 25°C (Fig. 4 a).

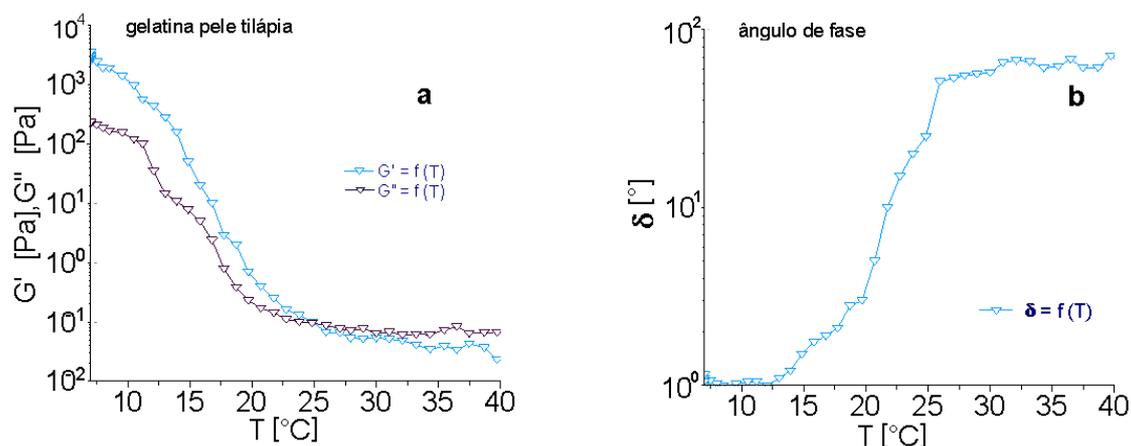


Figura 4 – Módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' (a) ângulo de fase δ , (b) durante aquecimento de 7°C para 40°C da amostra de gelatina de pele de tilápia.

Para avaliação da influência do frio sobre as propriedades viscoelásticas da gelatina, a amostra foi mantida à temperatura de 7°C, por alguns minutos, antes de iniciar-se o aquecimento. Choi e Regenstein (2000) e Fernández-Díaz, Montero e Gómez-Guillén (2003), relataram em seus trabalhos grande influência do tempo de maturação, sobre as propriedades viscoelásticas da gelatina de pescado, aumentando seus pontos de fusão. Como pode ser observado na Fig. 3 a, ocorre considerável aumento do módulo elasticidade G' durante o intervalo demonstrado. Segundo, Gómez-Guillén et al. (2002), esta elevação da elasticidade é resultante da rápida maturação causada pelo frio.

3.10 Viscosidade

Sob aspecto de funcionalidade, a viscosidade da solução de gelatina é a segunda mais importante propriedade física da gelatina (COLE, 2006). Gelatinas com baixa viscosidade resultam em géis frágeis, enquanto gelatinas de alta viscosidade produzem géis consistentes e extensíveis (WAINWRIGHT, 1977). A viscosidade das gelatinas também é um importante parâmetro para determinação de seu valor comercial.

Na tab. 9 observa-se que a gelatina apresentou maior viscosidade (5,98cP) que o valor descrito por Grossman e Bergman (1992) para gelatina de pele de tilápia sp. (5,1cP). Segundo Gudmundsson (2002) o comportamento viscoso da gelatina é resultante da espécie e das condições de processo, utilizados na sua manufatura. Sabe-se que a viscosidade das gelatinas é parcialmente influenciada pela distribuição de pesos moleculares e polidispersia (SPERLING, 1985; GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997; JAMILAH; HARVINDER, 2002). Segundo Johnston-Banks (1990), a viscosidade das gelatinas aumenta com a maior quantidade de compostos de alto peso molecular. No caso da gelatina de pele de tilápia, a análise eletroforética (Fig. 1) demonstra a presença de pequena fração de β componentes ($\sim 200\text{KDa}$) que, possivelmente, contribuíram para o aumento da viscosidade; no entanto, não se observa a presença de compostos com maior peso molecular. Valores de viscosidade para a maioria das gelatinas comerciais têm sido reportados entre 2,0 - 7,0cP, e acima de 13,0 cP para gelatinas especiais (JOHNSTON-BANKS, 1990; GUDMUNDSSON; HAFSTEINSSON, 1997; JAMILAH; HARVINDER, 2002).

Tabela 9 – Viscosidade da gelatina de pele de tilápia em diferentes tempos de maturação.

Gelatina de pele de tilápia	Viscosidade (cP)	Viscosidade (cP)	Viscosidade (cP)
	18 \pm 1 h	42 \pm 1 h	66 \pm 1 h
	5,98	6,32	6,35

Valores médios referentes a três determinações.

Pode-se observar o comportamento viscoso da gelatina submetida a diferentes tempos de maturação (tab. 9), onde se nota um incremento de 5,70% na viscosidade com o aumento do tempo de maturação para 42 \pm 1h; no entanto, o prolongamento do tempo para 66 \pm 1h somente aumentou em 6,20% a sua viscosidade. Comportamento similar foi observado na força de gel da gelatina de pele de tilápia.

4 Conclusões

O processo teve baixo rendimento, e a gelatina obtida possui distribuição de peso molecular típica de colágeno tipo I com conteúdo de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina) de 21,67%. A força de gel e viscosidade aumentaram com o prolongamento do tempo de maturação e os pontos de fusão e geleificação foram de 25°C e 21°C, respectivamente. A gelatina apresentou coloração amarela esbranquiçada, baixo conteúdo iônico e padrões microbiológicos que atendem as exigências da legislação brasileira. A composição centesimal foi semelhante ao das gelatinas comerciais, com teor de umidade ligeiramente elevado.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SUÍNOS E AVES, Concórdia (SC), pela liofilização das amostras.

5 Referências

A.O.A.C. **Official methods and recommended practices of the american oil chemist's society**. Washington: D. Feistane, 1995.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG A. Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). **Bioresource Technology**. v. 82 p. 191-194, 2002.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG A. Extraction and characterization of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Bioresource Technology**. v. 98 p. 53-57, 2007.

B.S.I. (British Standards Institution) **Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)**. London. 1975.

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

CHEOW, C. S.; NORIZAH, M. S.; KYAW, Z. Y.; HOWELL, N. K. Preparation and characterization of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 386-391, 2007.

CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P. J.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer**. v.47 p. 6379–6386, 2006.

CHO, S. M.; GU, Y. S.; KIM S. B. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 221-229, 2004.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**. v. 65 p. 194–199, 2000.

COLE, C. G. B. Gelatin Food Science. Disponível em: <<http://www.gelatin.co.za>>. Acesso em: 23 jul. 2006.

COLE, C. G. B.; ROBERTS, J. J. Changes in the molecular composition of gelatin due to the manufacturing process and animal age, as shown by electrophoresis. **Journal of the Society of the Leather Technologists and Chemists**, v. 80, p. 136–141, 1996.

COLE, C. G. B.; ROBERTS, J. J. Gelatine colour measurement. **Meat Science**, v. 45, n. 1, p. 23-31, 1997.

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

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 281-286, 2003.

GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. **Food Hydrocolloids**. v. 14 p. 191–195, 2000.

GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. The role of salt washing of fish skin in chemical and rheological properties of gelatin extracted. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 951-957, 2005.

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

GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. **Process for the production of gelatin from fish skins**. US Patent 5,093,474, 1992.

GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37–39, 1997.

GUDMUNDSSON, M. Rheological properties of fish gelatin. **Journal Food Science**. v. 67 p. 2172-2176, 2002.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 203–213, 2004.

HOLZER, D. **Gelatin production**. US Patent 5,484,888, 1996.

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

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin. In: ELSERVIER APPLIED FOOD SCIENCE SERIES. Food gels, New York, 1990. p. 233–289.

JONES, N. R. Uses of gelatin in edible products. In: WARD, A. G.; COURTS, A. (Eds.). The science and technology of gelatin. London: Academic Press, 1977. p. 365-394.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1216–1222, 2006.

KASANKALA, L. M., XUE, Y., WEILONG, Y., HONG, S. D.; HE, Q. Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3338–3343, 2007.

KIMURA, S.; KAMIMURA, T.; TAKEMA, Y.; KUBOTA, M. Lower vertebrate collagen evidence for type I-like collagen in the skin of lamprey and shark. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 669 p. 251-257, 1981.

KIMURA, S.; OHNO, Y.; MIYAUCHI, Y.; UCHIDA, N. Fish skin Type I collagen: wide distribution of $\alpha 3$ subunit in teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 88 B, p.27-34, 1987.

KIMURA, S. Wide distribution of the skin type I collagen $\alpha 3$ chain in bony fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102 B, p. 255-260, 1992.

KOŁODZIEJSKA, I.; KACZOROWSKI, K.; PIOTROWSKA, B.; SADOWSKA, M. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. **Food Chemistry**. v. 86(2), p. 203-209, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 277, p. 680–685, 1970.

LEACH, A. A.; EASTOE, J. E. The chemical examination of gelatins. In: WARD, A. G.; COURTS, A. (Eds.). The science and technology of gelatin. London: Academic Press, 1977. p. 475-506.

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

LEUENBERGER, B. H. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. **Food Hydrocolloids**. v. 5(4) p. 353–361, 1991.

MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. **Food Hydrocolloids**. v. 16 p. 197-205, 2002.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boschii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65 (3), p. 434-438, 2000.

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

MUYONGA, J. H., COLE, C.G.B., DUODU, K. G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**. v. 85 p. 81-89, 2004b.

NORLAND, R. E. Fish gelatin. In: VOIGHT, M. N.; BOTTA, J. K. (Eds.). *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1990. p. 325-333.

SARABIA, A. I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. The effect of added salt on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. **Food Chemistry**. v. 70 p. 71–76, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. New York: John Wiley, 1985.

THIESSEN, F. Importância da gelatina alimentícia como aditivo aglutinante. **Revista Nacional da Carne**, v. 6, p. 18-21, 1994.

WAINWRIGHT, F. W. Physical tests for gelatin and gelatin products. In A. G. WARD; A. COURTS (Eds.). *The science and technology of gelatin*. London: Academic Press, 1977. p. 508–557.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska Pollock skin gelatin extraction. **Journal of Food Science**. v. 70 p. 392–396, 2005.

**Capítulo 3 - EFEITO DE AGENTES NAS
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA GELATINA DE
PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis urolepis
honorum*) EM DIFERENTES VALORES DE PH**

RESUMO

Foram avaliados os efeitos de vários agentes em duas diferentes concentrações e valores de pH (5,0 e 8,0) nas propriedades funcionais da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) e comparados com a gelatina sem adição de agentes e gelatina comercial de mamíferos. Os agentes testados, nas concentrações especificadas (sacarose 4 e 8% (p/v), glicerol 5 e 10% (v/v), NaCl 0,3 e 0,8mol/L, MgCl₂ 0,3 e 0,8mol/L, MgSO₄ 0,3 e 0,8mol/L, KCl 0,3 e 0,8mol/L e transglutaminase 10 e 15mg/mL) geraram ligeira modificação na turbidez e levaram a um incremento da viscosidade. As propriedades reológicas variaram em proporções diferentes, dependendo do agente, concentração e pH do meio. Com as suas incorporações, o tempo necessário para formação do gel tende a ser prolongado.

Palavras-chave: Tilápia, pele, gelatina, agentes, propriedades funcionais.

ABSTRACT

The effects of several agents have been evaluated in two different concentrations and values of pH (5,0 and 8,0) in the functional properties of the tilapia skin gelatin (*Oreochromis urolepis hornorum*) and compared to the gelatin with no agents addition and commercial mammalian gelatin. The agents tested, in the specified concentrations (sucrose 4 and 8% (p/v), glycerol 5 and 10% (v/v), NaCl 0,3 and 0,8 mol/L, MgCl₂ 0,3 and 0,8 mol/L, MgSO₄ 0,3 and 0,8 mol/L, KCl 0,3 and 0,8 mol/L and transglutaminase 10 and 15 mg/mL) have generated slight modification in the turbidity and led to an increase of viscosity. The rheological properties have varied in different proportions, depending on the agent, concentration and pH. With its incorporations, the setting time tends to be prolonged.

Key-words: Tilapia, skin, gelatin, agents, functional properties.

1 Introdução

Nos últimos anos tem aumentado gradativamente o interesse por subprodutos da indústria pesqueira, os quais são considerados hoje como potencial fonte de recursos para exploração. Os subprodutos do processamento de pescado são excelente matéria-prima para preparação de alimentos de alto valor protéico (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Com o seu aproveitamento alternativo, é possível reduzir os custos, maximizando os lucros das indústrias e minimizando problemas de poluição ambiental.

Existe um crescente interesse em utilizar gelatina de peixe com propósitos técnicos avançados, bem como para a substituição da gelatina de mamíferos na produção de alimentos (GILDBERG; ARNESEN; CARLEHÖG, 2002). Embora as gelatinas de mamíferos e aves tenham sido extensivamente estudadas, pouco é conhecido sobre as gelatinas de peixe (NORLAND, 1990; OSBORNE; VOIGHT; HALL, 1990; GROSSMAN; BERGMAN, 1992; HOLZER, 1996; GUDMUNDSSON; HAFFSTEINSSON, 1997; SARABIA; GÓMEZ-GUILLÉN; MONTERO, 2000). Uma das principais restrições à utilização da gelatina de peixe, deve-se a suas inferiores propriedades reológicas quando comparada à gelatina de mamíferos (CHOI; REGENSTEIN, 2000; CHO; GU; KIM, 2004), o que restringe a sua gama de aplicações.

Géis são formados quando, em solução, moléculas de gelatina são parcialmente reestruturadas, assumindo a estrutura do colágeno (JOHNS; COURTS, 1977). Esse processo de geleificação envolve a transição de um enrolamento sem forma definida para tripla hélice da gelatina (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002). Essa temperatura de transição é denominada ponto de geleificação; do mesmo modo, o ponto de fusão é relatado como o ponto de desnaturação dessa estrutura. As temperaturas de geleificação e fusão das gelatinas são dependentes da proporção de prolina e hidroxiprolina da molécula de colágeno original (LEDWARD, 1986; GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000; HAUG; DRAGET; SMIDSRØD, 2004), e do pré-tratamento empregado (MONTERO; FERNÁNDEZ-DÍAZ; GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

Substâncias modificadoras de gelatina podem ser usadas para obter propriedades reológicas desejáveis, podendo ser utilizados solutos, como sais, glicerol e enzimas (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2001). Eletrólitos, em geral, influenciam as propriedades biofísicas (inchamento, solubilidade, gelatinização, viscosidade e capacidade de retenção de água) de proteínas, dependendo da força iônica e pH do sistema (ASGHAR; HENRICKSON, 1982). Não-eletrólitos, como açúcar e glicerol, usualmente, conduzem a um aumento na força de gel das gelatinas (FERNÁNDEZ-DÍAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2001).

Conhece-se que a adição de diferentes sais influencia na temperatura de fusão e rigidez de gelatinas de animais de sangue quente (HARRINGTON;

VON HIPPEL, 1961); portanto, sais podem ser utilizados para desencadear interações nas gelatinas, alterando suas características (ELYSÉE-COLLEN; LENCKI, 1996). Agentes promotores de ligações cruzadas também podem ser utilizados para melhorar as propriedades reológicas das gelatinas. Entre eles o glutaraldeído é uma boa alternativa, devido a sua reatividade com o grupo amino e seu baixo custo, no entanto, existem alguns relatos sobre sua toxicidade (CHIOU, et al., 2006). Outra possibilidade seria a utilização da enzima transglutaminase, que forma ligações covalentes cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina, tornando a estrutura da molécula mais estável.

Este trabalho teve como objetivo, estudar a influência de alguns agentes (sais, transglutaminase, glicerol e sacarose) em diferentes valores de pH (5,0 e 8,0) nas propriedades funcionais (turbidez, força de gel, ponto de geleificação, ponto de fusão, tempo de formação do gel e viscosidade) de gelatina extraída de pele de tilápia.

2 Material e métodos

2.1 Material

Peles frescas de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*) recém filetadas, foram obtidas junto à empresa localizada na cidade de Pato Branco (Paraná, Brasil). As peles foram estocadas à -18°C até sua utilização (aproximadamente 24 horas depois). Utilizou-se a enzima transglutaminase (transglutaminase + lactose + maltodextrina, 100 U/g, ACTIVA MP[®], Ajinomoto, Limeira, SP, Brasil), glicerol (Merck, São Paulo, SP, Brasil), sacarose e os sais: NaCl, MgCl₂, MgSO₄, e KCl (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Todos os reagentes que foram utilizados são de grau analítico (P.A.).

2.2 Pré-tratamento da matéria-prima

As peles foram lavadas em água corrente, para retirada do material superficial aderido, e cortadas em peças de aproximadamente de 4 cm x 4cm. Então, o material foi submetido à imersão em solução salina de NaCl 0,2% (p/v) por 5 minutos, sob agitação contínua.

2.3 Extração da gelatina

A extração foi realizada conforme parâmetros definidos em planejamento fatorial anterior. As peles cortadas e limpas foram submetidas a tratamento alcalino 1:10 (p/v), em solução de NaOH 0,3% (p/v), por período de 80 minutos, à temperatura de 10°C, e a seguir, lavadas em água corrente para retirada do álcali em excesso, até pH abaixo de 8. Após esse procedimento, as peles foram submetidas a tratamento ácido 1:10 (p/v), em solução de H₂SO₄ 0,3% (p/v), por 80 minutos, e posteriormente, lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade. As peles foram então submetidas a um segundo tratamento ácido 1:10 (p/v), em solução de ácido cítrico 0,7% (p/v), por 80 minutos, e lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade.

A extração da gelatina foi realizada em biorreator BIOSTAT B (B. Braun Biotech International, Alemanha) em água deionizada, por 6h, à temperatura de 45°C, mantendo a proporção de 2mL de solução para 1g de pele. Após a extração, o material foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro Whatman nº 4, liofilizado e moído.

2.4 Preparo das amostras

As amostras de gelatina 6,67% (p/v) foram preparadas sob agitação constante, por 30 minutos, a 45°C, em água deionizada, pela dissolução em soluções com valores de pH 5,0 e 8,0, ajustados pela adição de HCl 0,1mol/L e NaOH 0,1mol/L. Foram preparadas amostras de gelatina de mamíferos (GP), gelatina de pele de tilápia (GC) e gelatina de pele de tilápia contendo os seguintes agentes e respectivas concentrações: sacarose 4% (p/v) (SA1) e 8% (p/v) (SA2); glicerol 5% (v/v) (GL1) e 10% (v/v) (GL2); NaCl 0,3mol/L (Na1) e 0,8mol/L (Na2); MgCl₂ 0,3mol/L (Mg1) e 0,8mol/L (Mg2); MgSO₄ 0,3mol/L (MgS1) e 0,8mol/L (MgS2); KCl 0,3mol/L (Kc1) e 0,8mol/L (Kc2); e transglutaminase 10mg/mL (TG1) e 15mg/mL (TG2).

2.5 Avaliação da turbidez

A turbidez foi mensurada logo após a preparação das amostras. A determinação foi realizada em turbidímetro Quimis (mod. Q -179P –TURB), segundo método descrito por Cole e Roberts (1996).

2.6 Força de gel

Após o preparo, as amostras foram submetidas à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação) por $18 \pm 1\text{h}$. A força de gel foi determinada utilizando analisador de textura (Stable Microsystems, Surrey, Inglaterra), modelo TA-XTplus, com célula de carga de 5kg, e velocidades de pré-teste, teste e pós-teste de 1,5mm/s, 1,0mm/s e 1,0mm/s, respectivamente. Utilizou-se haste cilíndrica de Teflon[®] de 1,27cm de diâmetro, com base plana. A haste foi forçada a 4mm dentro da amostra a temperaturas entre 8 e 10°C , e a força máxima(g) determinada.

2.7 Viscosidade

As gelatinas, após o preparo, foram submetidas à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação) por $18 \pm 1\text{h}$ e suas viscosidades determinadas segundo método da British Standard Institution (B.S.I., 1975). A amostra foi derretida em banho a 45°C e transferida para o viscosímetro de Ostwald-Fensk (nº 100). O viscosímetro foi colocado em banho a 60°C e aguardou-se 10 minutos para a estabilização da temperatura, sendo então, a viscosidade determinada.

2.8 Propriedades viscoelásticas

As propriedades viscoelásticas foram determinadas em reômetro marca Haake modelo Rheostress RS-150 (Haake, Karlsruhe, Alemanha), utilizando software Rheowin Job Manager. Utilizou-se para o estudo dinâmico viscoelástico cone-placa de 35mm de diâmetro e 1° de ângulo com gap = 0,14mm. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente, logo antes do início das análises.

As amostras foram submetidas a uma rampa de temperatura, sendo resfriadas de 40°C para 7°C , e voltando a ser aquecidas até 40°C . Os experimentos foram realizados em tensão de 3,0Pa, frequência de 1Hz e taxa de variação de temperatura de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$, monitorando-se o processo de geleificação através dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' . O ponto de geleificação (*gelling point*) foi determinado no ponto de intersecção dos módulos G' e G'' durante o resfriamento da amostra, segundo metodologia de

Gudmundsson (2002). O ponto de fusão (*melting point*) foi determinado do mesmo modo, durante subsequente aquecimento. O ângulo de fase (δ) foi representado em função da temperatura para observação do comportamento viscoelástico da amostra.

O tempo de formação do gel (*setting time*) foi determinado como o tempo em minutos entre a última temperatura do máximo ângulo de fase e a primeira temperatura do mínimo ângulo de fase. As amostras foram mantidas a 7°C durante alguns minutos antes de serem aquecidas até 40°C, para a avaliação do comportamento dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' em temperatura padrão.

3 Resultados e discussão

As propriedades funcionais das gelatinas são determinantes para reger sua aplicabilidade. De maneira simplificada, a turbidez pode ser considerada como a redução da transparência, devido à presença de matéria em suspensão. Como pode ser verificado nas Fig. 1 e 2, os agentes testados nas concentrações especificadas, geraram ligeira modificação na turbidez; no entanto, não houve comportamento similar entre eles. Pode-se verificar nos dois valores de pH avaliados, que os menores valores de turbidez foram observados quando adicionados $MgSO_4$ 0,3mol/L e KCl 0,3mol/L; enquanto, a adição de sacarose 8% (p/v) resultou em considerável aumento da turbidez.

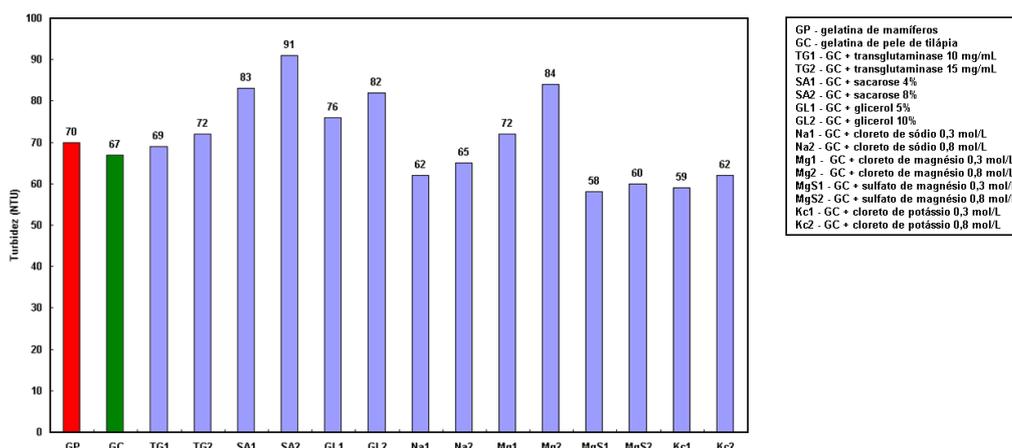


Figura 1 – Valores de turbidez das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.

Não foram observadas diferenças na turbidez em função do pH da solução. Dependendo da posterior aplicação da gelatina, a turbidez pode ou não ser um atributo importante (COLE, 2006).

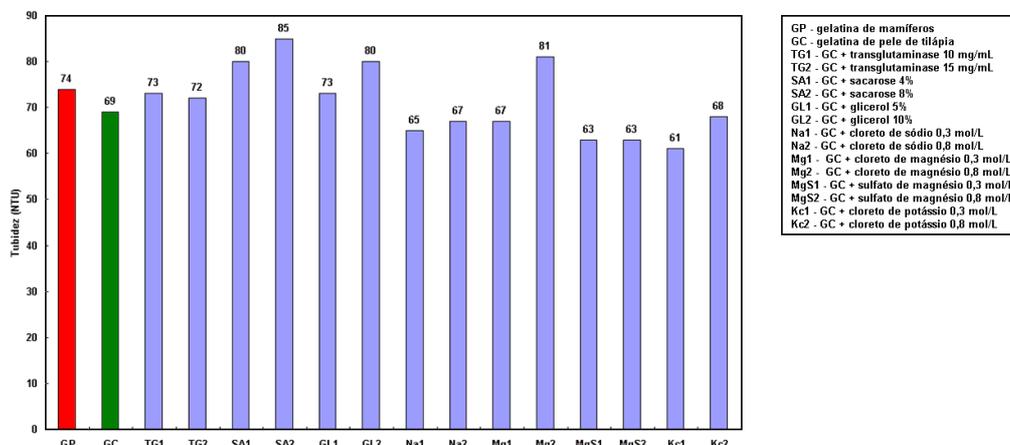


Figura 2 – Valores de turbidez das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0

Todos os agentes levaram a um incremento da viscosidade da solução de gelatina, independente da concentração e pH avaliados. Em pH 5,0, glicerol (ambas concentrações) gerou as maiores elevações na viscosidade, alcançando valores de 6,24cP e 7,45cP (Fig. 3). Esse aumento na viscosidade pode ser resultante da alteração na disposição da água circundante às moléculas de gelatina, com a conseqüente quebra/formação de ligações de hidrogênio e exposição de sítios hidrofóbicos da cadeia protéica, devido a interações ocorridas com os agentes. Essas alterações geram mudanças conformacionais, levando a um desdobramento pronunciado das cadeias da gelatina, acarretando um aumento da sua viscosidade.

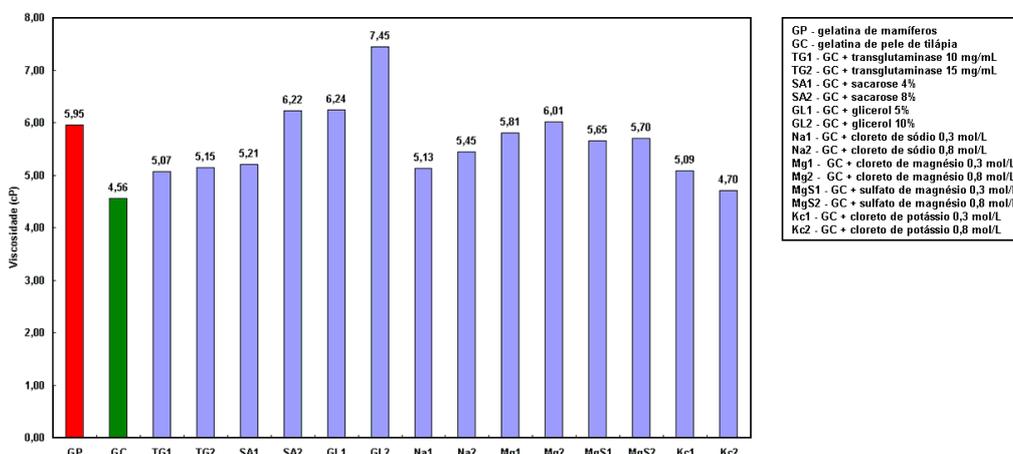


Figura 3 – Valores de viscosidade das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.

Todas as gelatinas, com exceção daquela adida de MgSO_4 0,8 mol/L, apresentaram menores valores de viscosidade em pH 8,0 (Fig. 4). A proximidade ao ponto isoelétrico, possivelmente, possibilitou maior agregação entre as frações protéicas, levando à redução da viscosidade da solução.

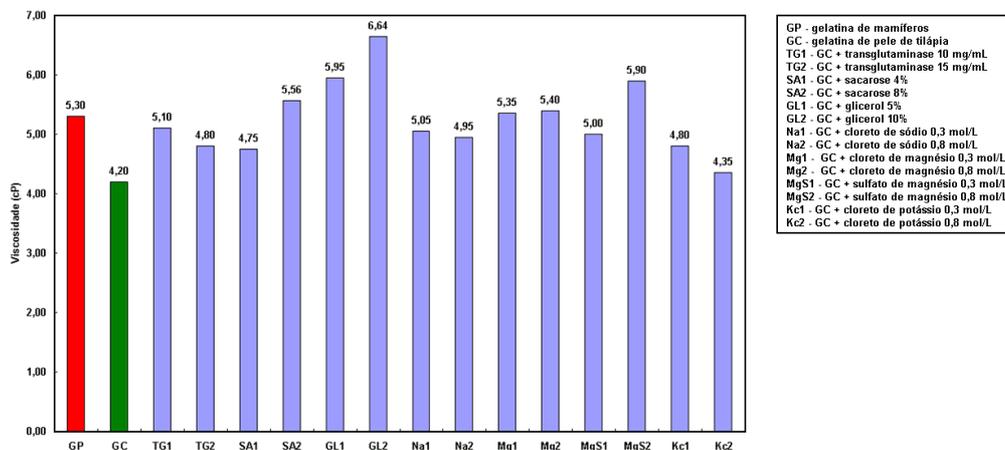


Figura 4 – Valores de viscosidade das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.

Para a avaliação das propriedades viscoelásticas, as gelatinas foram mantidas a 7°C por alguns minutos, antes de iniciar-se o aquecimento. A escolha dessa temperatura, como padrão para analisar o seu comportamento, deve-se aos relatos da rápida maturação causada pelo frio (CHOI; REGENSTEIN, 2000; FERNADEZ-DIAZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2003), levando a alterações da sua elasticidade. As amostras variaram em proporções diferentes dependendo do agente, da concentração e do pH do meio. Na Fig. 5 pode-se constatar que a gelatina apresentou considerável aumento do seu módulo elasticidade (G'), quando adicionados MgSO_4 , transglutaminase e sacarose em ambas as concentrações e pH 5,0. Condições semelhantes foram observadas no comportamento do módulo viscoso (G''), exceto nas amostras contendo sacarose, que, contrariamente ao ocorrido no módulo elasticidade (G''), apresentaram redução em relação à amostra controle.

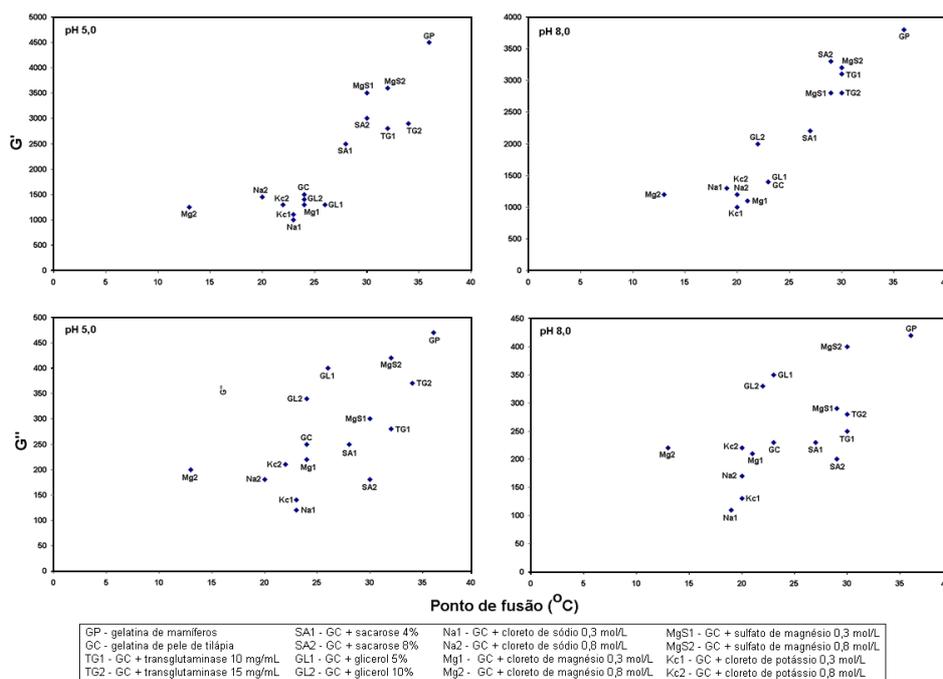


Figura 5 – Valores do módulo de elasticidade (G') e módulo viscosidade (G''), das amostras de gelatina de pele de tilápia, mensurados a 7°C em va lores de pH 5,0 e 8,0, plotados em função da ponto de fusão (*melting point*).

A ação desses agentes sobre as propriedades viscoelásticas da gelatina é comprovada sob subsequente aquecimento, onde verifica-se que a temperatura de fusão (Fig. 8 e 9) aumentou consideravelmente quando foram incorporados. Já, a adição de glicerol gerou sensível aumento no módulo viscosidade (G'') das amostras, mas praticamente não alterou o módulo elasticidade (G') e o ponto de fusão da gelatina.

Assim como observado para temperatura de fusão, a adição de $MgSO_4$, transglutaminase e sacarose propiciaram a elevação das temperaturas de geleificação (*gelling point*) das gelatinas, exceto na amostra contendo $MgSO_4$ 0,3mol/L em pH 8,0, que apresentou igual valor ao controle (Fig. 6 e 7). De modo geral, as temperaturas de geleificação tendem a ser menores em pH 8,0, no entanto, nenhuma diferença acentuada foi observada.

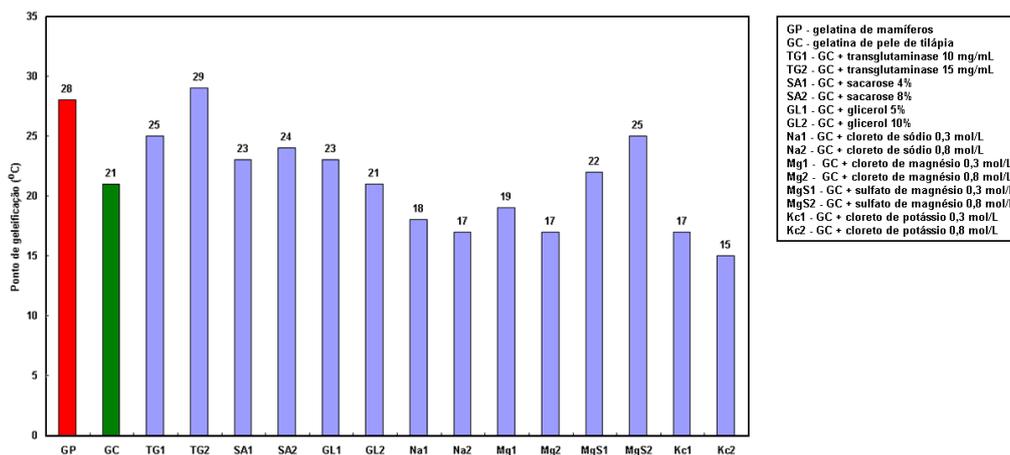


Figura 6 – Valores dos pontos de geleificação (*gelling point*) das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.

Os pontos de fusão e geleificação, das amostras contendo transglutaminase, aumentaram consideravelmente principalmente em pH 5,0. A reatividade desta enzima está diretamente relacionada ao perfil de aminoácidos da proteína, visto que a mesma catalisa ligações covalentes cruzadas entre os resíduos de glutamina e lisina, propiciando maior estabilidade ao gel. De acordo com Fernandez-Diaz, Montero e Gómez-Guillén (2001) o efeito da transglutaminase depende da maneira e quantidade adicionada.

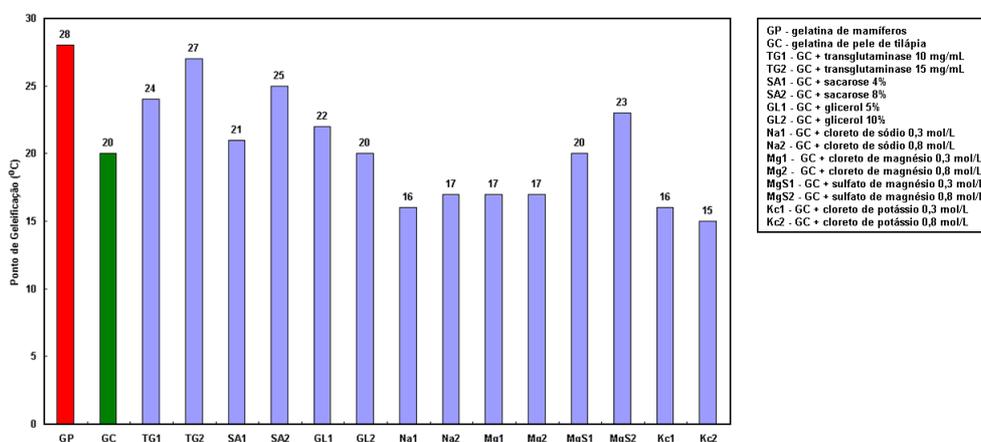


Figura 7 – Valores dos pontos de geleificação (*gelling point*) das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.

As soluções de gelatina, adicionadas de NaCl, KCl e $MgCl_2$ em ambas as concentrações e valores de pH, apresentaram redução do seu módulo elasticidade (G') (Fig. 5). Uma possível explicação para este comportamento, pode ser a concentração testada para esses sais, onde alta força iônica poderia levar a um acentuado desdobramento das cadeias da proteína,

prejudicando a formação de zonas de junção e a subsequente formação da hélice da gelatina. Na Fig. 8 verifica-se que as mesmas amostras em valor de pH 6,0, apresentaram redução da temperatura de fusão em relação à amostra controle (GC), com exceção da solução de gelatina contendo $MgCl_2$ 0,3mol/L, que apresentou igual temperatura de fusão.

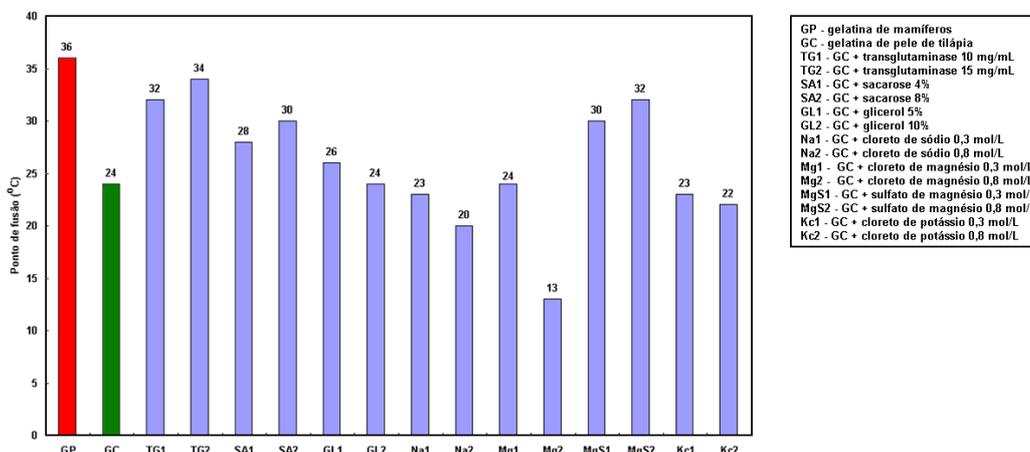


Figura 8 – Valores dos pontos de fusão (*melting point*) das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.

De modo geral, os sais de cloreto levaram a reduções nas propriedades viscoelásticas da gelatina, enquanto, a adição de $MgSO_4$ (sal contendo íon Mg^{2+}) claramente maximizou as propriedades reológicas avaliadas; no entanto, este efeito não foi verificado quando adicionado $MgCl_2$, o que pode ter ocorrido devido à presença do ânion Cl^- . Possivelmente, o maior tamanho do íon sulfato impediu sua aproximação dos centros positivamente carregados da proteína, onde os íons cloreto por possuir menor diâmetro, conseguiram aproximar-se e interagir mais facilmente. A permanência livre, em solução aquosa, dos íons sulfato permitiu então pronunciada reatividade com as moléculas de água circundantes, elevando o número de interações eletrostáticas, permitindo maior abertura das cadeias protéicas, aumentando a probabilidade da formação de zonas de junção. A adição de sais contendo o íon cloreto resultou em reduções no módulo viscosidade (G''), e de modo geral, esse módulo tende a apresentar valores menores em pH 8, 0 (Fig. 5).

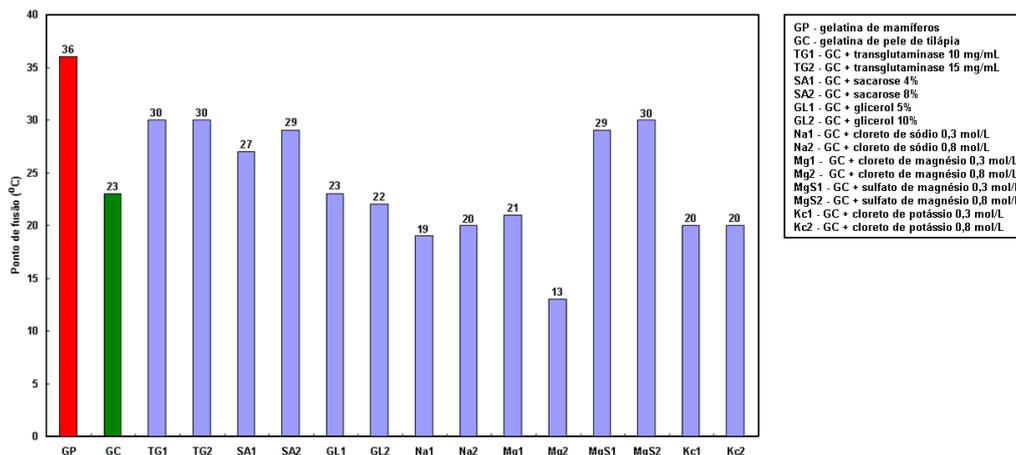


Figura 9 – Valores dos pontos de fusão (*melting point*) das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.

Nas Fig. 10 e 11 pode-se observar que a força de gel da gelatina aumentou consideravelmente quando foi adicionado $MgSO_4$ 0,8mol/L, alcançando valor ligeiramente superior ao da amostra de gelatina de mamíferos (GP) e consideravelmente maior que da gelatina de pescado controle (GC). Sarabia, Gómez-Guillén e Montero (2000) e Fernández-Díaz, Montero e Gómez-Guillén (2001), observaram aumento na força de gel de gelatinas de outras espécies de pescado, quando adicionado esse sal, atribuindo tal efeito à promoção de maior número de interações eletrostáticas, com a formação de zonas de junção adequadas, devido ao correto desdobramento da estrutura.

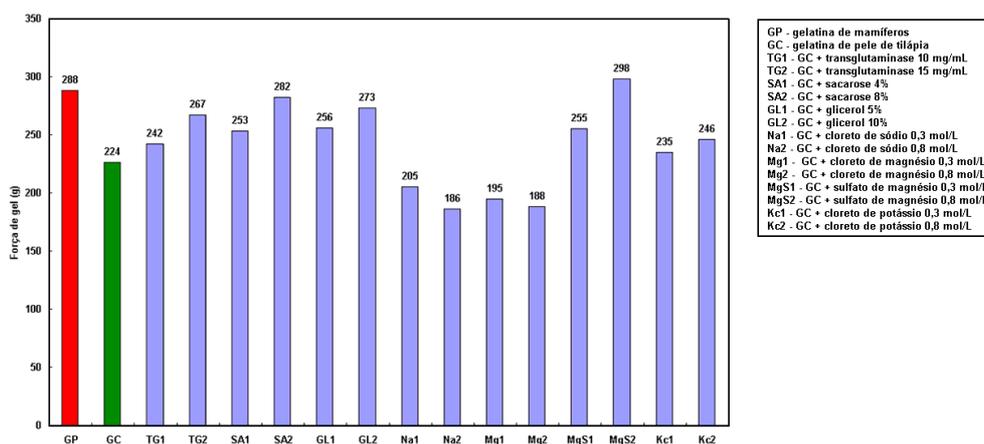


Figura 10 – Valores da força de gel das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 5,0.

Transglutaminase, sacarose e glicerol também elevaram consideravelmente a força de gel da gelatina, quando incorporados. Choi e Regenstein (2000) avaliaram o efeito da adição de sacarose em várias gelatinas, observando que o aumento no conteúdo adicionado, resulta em

elevação da força de gel. Naftalian e Symons (1974) sugeriram que esse aumento da força de gel, ocorre devido à sacarose atuar estabilizando as ligações de hidrogênio. Sabe-se que essas ligações desempenham papel fundamental na estabilidade térmica, onde, as superiores propriedades reológicas de gelatinas de mamíferos são atribuídas a sua distribuição de aminoácidos, principalmente à maior quantidade de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) presentes. Acredita-se que eles sejam determinantes para formação de pontes de hidrogênio em soluções aquosas, com a conseqüente elevação da temperatura de geleificação (NORLAND, 1990). Segundo Ledward (1986), o conteúdo de hidroxiprolina presente é determinante, devido a sua habilidade para formar pontes de hidrogênio através do grupamento - OH.

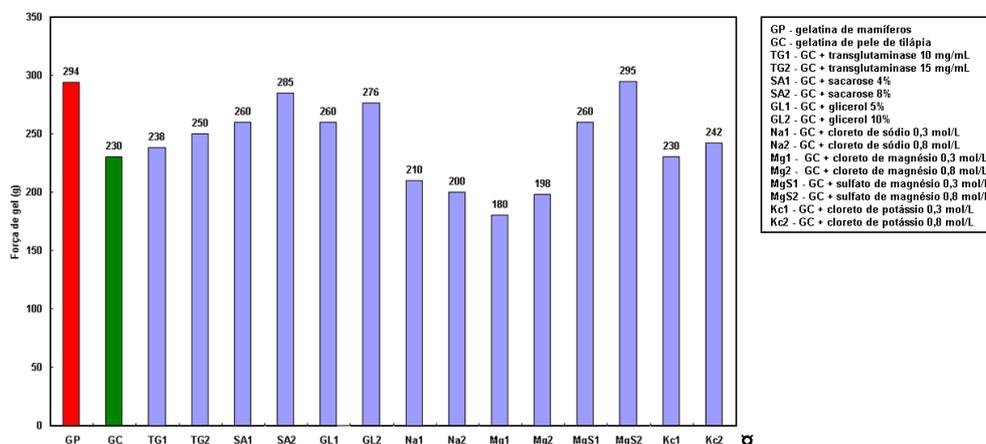


Figura 11 – Valores da força de gel das amostras de gelatina de pele de tilápia em pH 8,0.

Como pode ser observado na tab. 1, o tempo para formação de gel (*setting time*) tende a ser prolongado pela adição dos agentes. Somente as gelatinas contendo sacarose apresentaram menores tempos em ambos pHs quando comparados à amostra controle. Nota-se que, nas amostras contendo glicerol foram necessários tempos consideravelmente superiores para a formação do gel. Como citado anteriormente, a adição de glicerol, possivelmente, gerou um pronunciado desdobramento das cadeias da gelatina, que conseqüentemente levou a um aumento no tempo necessário para a subseqüente geleificação.

O tempo necessário para a formação do gel foi superior ao controle em todas as amostras adidas de sais. Conhece-se que os sais podem desencadear interações nas gelatinas, alterando suas características

(ELYSÉE-COLLEN; LENCKI, 1996). Dentre os sais avaliados, $MgSO_4$ (ambos pHs) conduziu aos maiores tempos de geleificação. De maneira geral, o tempo para formação de gel (*setting time*) tende a ser maior em pH 5,0. Possivelmente, essa diferença deve-se à gelatina em pH 8,0 se encontrar mais próxima do seu ponto isoelétrico, possibilitando a ocorrência de maior interação entre as cadeias protéicas, permitindo que o processo de geleificação ocorra num menor espaço de tempo.

Tabela 1 – Tempo de formação de gel (minutos) das gelatinas adidas de vários agentes em diferentes concentrações e valores de pH.

Amostras	pH 5,0	pH 8,0
Gelatina de mamíferos (GP)	10	8
Gelatina de pele de tilápia (GC)	12	11
GC + transglutaminase (10 mg/g)	12	12
GC + transglutaminase (15 mg/g)	13	11
GC + sacarose (4% p/v)	11	10
GC + sacarose (8% p/v)	10	10
GC + glicerol (5% v/v)	17	16
GC + glicerol (10% v/v)	19	18
GC + NaCl (0,3 mol/L)	13	13
GC + NaCl (0,8 mol/L)	14	13
GC + $MgCl_2$ (0,3 mol/L)	16	14
GC + $MgCl_2$ (0,8 mol/L)	14	13
GC + $MgSO_4$ (0,3 mol/L)	19	16
GC + $MgSO_4$ (0,8 mol/L)	17	15
GC + KCl (0,3 mol/L)	15	14
GC + KCl (0,8 mol/L)	14	12

4 Conclusões

Todos os agentes aumentaram a viscosidade da solução de gelatina, principalmente em pH 5,0. A incorporação dos agentes causou modificação na turbidez, no entanto, não houve comportamento similar entre eles. A adição de

MgSO₄, transglutaminase e sacarose, em ambas as concentrações e valores de pH, aumentaram os pontos de geleificação, de fusão e a força de gel.

A força de gel e a viscosidade da gelatina aumentaram pela adição de glicerol, no entanto, isso não ocorreu com as temperaturas de geleificação e de fusão. Dentre os agentes, a adição de sulfato de magnésio, MgSO₄ (em ambos valores de pH) conduziu a propriedades reológicas mais próximas aos da gelatina de mamíferos, enquanto as soluções de gelatina adidas de NaCl, KCl e MgCl₂, em ambas as concentrações e valores de pH, apresentaram redução nas suas propriedades reológicas.

Agradecimentos

À empresa Ajinomoto, de Limeira, São Paulo (Brasil), pela doação da enzima transglutaminase ACTIVA MP[®]; e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SUÍNOS E AVES, Concórdia (SC), pela liofilização das amostras.

5 Referências

ASGHAR, A.; HENRICKSON, R. L. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen food systems. In: **ADVANCES IN FOOD RESEARCH**. London: Academic Press, 1982. p. 232 – 272.

B.S.I. (British Standards Institution) **Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)**. London. 1975.

CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P. J.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer**. v.47 p. 6379–6386, 2006.

CHO, S. M.; GU, Y. S.; KIM S. B. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 221-229, 2004.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**. v.65 p. 194–199, 2000.

COLE, C. G. B. Gelatin Food Science. Disponível em: <<http://www.gelatin.co.za>>. Acesso em: 23 jul. 2006.

COLE, C. G. B.; ROBERTS, J. J. Changes in the molecular composition of gelatin due to the manufacturing process and animal age, as shown by electrophoresis. **Journal of the Society of the Leather Technologists and Chemists**, v. 80, p. 136–141, 1996.

ELYSÉE-COLLEN, B.; LENCKI, R. W. Effect of ethanol, ammonium sulfate, and temperature on the phase behaviour of type B gelatin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p.1651–1657, 1996.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius*

merluccius) and their modification by the coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. **Food Chemistry**, v. 74, p. 161-167, 2001.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 281-286, 2003.

GILDBERG, A.; ARNESEN, J. A.; CARLEHÖG, M. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**. v.38 p. 475-480, 2002.

GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. **Food Hydrocolloids**. v. 14 p. 191–195, 2000.

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

GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. **Process for the production of gelatin from fish skins**. US Patent 5,093,474, 1992.

GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37–39, 1997.

GUDMUNDSSON, M. Rheological properties of fish gelatin. **Journal Food Science**. v. 67 p. 2172-2176, 2002.

HARRINGTON, W. F.; VON HIPPEL, P. H. **The structure of collagen and gelatin**. Advances in protein chemistry, 1961. 138p.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 203–213, 2004.

HOLZER, D. **Gelatin production**. US Patent 5,484,888, 1996.

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

LEDWARD, D. A. Gelation of gelatin. In: J. R. MITCHELL; D. A. LEDWARD (Eds.), *Functional properties of food macromolecules*, London: Elsevier, 1986. p. 171–201.

MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. **Food Hydrocolloids**. v. 16 p. 197-205, 2002.

NAFTALIAN, R. J.; SYMONS, M. C. R. The mechanism of sugar-dependent stabilization of gelatin gels. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 352, p. 173-176, 1974.

NORLAND, R. E. Fish gelatin. In: VOIGHT, M. N.; BOTTA, J. K. (Eds.). *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1990. p. 325-333.

OSBORNE, K.; VOIGHT, M. N.; 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.

SARABIA, A. I., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. The effect of added salt on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. **Food Chemistry**. v. 70 p. 71–76, 2000.

3 DISCUSSÃO GERAL

O processo de obtenção de gelatina a partir de pele de tilápia pode ser otimizado quanto ao seu rendimento e às propriedades físicas que determinam seu valor comercial (força de gel e viscosidade). Os resultados demonstram que a obtenção de maiores rendimentos está diretamente relacionado ao emprego de altas temperaturas e tempos de extração prolongados. No entanto, a gelatina produzida, apresenta menores valores de viscosidade e força de gel, possivelmente em função da excessiva fragmentação das cadeias α de colágeno. Das variáveis avaliadas no planejamento fatorial, a gelatina com maior força de gel foi obtida nas seguintes condições do processo: NaOH 0,3% (p/v), H₂SO₄ 0,3% (p/v), temperatura de extração 45°C e tempo de extração de 6h.

A gelatina que apresentou maior força de gel (226g) nos ensaios do planejamento fatorial foi caracterizada quanto a suas propriedades físico-químicas, microbiológicas, reológicas e estruturais. O processo apresentou baixo rendimento, possivelmente devido à perda excessiva de colágeno durante a etapa de pré-tratamento das peles. A distribuição de peso molecular foi típica de colágeno tipo I e o conteúdo de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina) foi de 21,67%. A força de gel e a viscosidade aumentaram com o prolongamento do tempo de maturação, provavelmente, em função da melhor organização mais pronunciada da estrutura helicoidal da molécula. Segundo Kolodziejska et al. (2003), o tempo de maturação e a temperatura influenciam nas propriedades dos géis de gelatina. A gelatina apresentou coloração amarela esbranquiçada e baixo conteúdo iônico, onde os íons encontrados em maior quantidade foram Na⁺ e Ca²⁺ com valores de 40 e 60,0 ppm, respectivamente. A composição centesimal foi semelhante ao das gelatinas comerciais com padrões microbiológicos que atendem as exigências da legislação brasileira. Os pontos de fusão e geleificação foram de 25°C e 21°C, respectivamente.

Alguns agentes foram utilizados com intuito de maximizar algumas importantes propriedades funcionais da gelatina. Com a adição, ocorreu ligeira modificação na turbidez, no entanto, não foi verificado comportamento similar entre os agentes testados. A incorporação dos agentes gerou aumento na viscosidade da solução de gelatina, principalmente em pH 5,0; o que

possivelmente ocorreu devido a alterações na disposição da água circundante às moléculas de gelatina, com a conseqüente quebra/formação de ligações de hidrogênio e exposição de sítios hidrofóbicos da cadeia protéica, levando ao desdobramento pronunciado da proteína. Todas as gelatinas, com exceção daquela adicionada de MgSO_4 0,8 mol/L, apresentaram menor valor de viscosidade em pH 8,0, onde a proximidade com o ponto isoelétrico, possivelmente, possibilitou maior agregação entre as frações protéicas, levando à redução da viscosidade da solução.

A incorporação de sulfato de magnésio (MgSO_4), transglutaminase e sacarose, em ambas as concentrações e valores de pH, levaram a um aumento dos pontos de geleificação, de fusão e da força de gel. Choi e Regenstein (2000) avaliaram o efeito da adição de sacarose em várias gelatinas, observando que o aumento no conteúdo adicionado, resulta em elevação da força de gel. Naftalian e Symons (1974) sugeriram que esse aumento da força de gel, ocorre devido à sacarose atuar estabilizando as ligações de hidrogênio. Sabe-se que essas ligações desempenham papel fundamental na estabilidade térmica das gelatinas. A adição de glicerol elevou os valores de força de gel e viscosidade, mas o mesmo não ocorreu com as temperaturas de geleificação e de fusão.

Dentre os agentes avaliados, a adição de sulfato de magnésio (MgSO_4) conduziu a propriedades reológicas mais próximas às da gelatina de mamíferos. Sarabia, Gómez-Guillén e Montero (2000) e Fernández-Díaz, Montero e Gómez-Guillén (2001), observaram aumento na força de gel de gelatinas de outras espécies de pescado, quando adicionado esse sal, atribuindo tal efeito à promoção de maior número de interações eletrostáticas, com a formação de zonas de junção adequadas, devido ao correto desdobramento da estrutura.

A incorporação de NaCl, KCl e MgCl_2 , gerou redução nas propriedades avaliadas. Isto, possivelmente ocorreu devido à utilização de concentrações muito elevadas para esses sais, prejudicando a formação de zonas de junção e a formação da hélice da gelatina sob resfriamento.

Portanto, as propriedades funcionais da gelatina de pele de tilápia podem ser otimizadas, através da utilização de parâmetros adequados de extração e a incorporação de diferentes agentes, desde que em corretas

concentrações, sendo possível obter propriedades funcionais similares às da gelatina de mamíferos.

4 CONCLUSÕES GERAIS

O emprego de altas temperaturas e tempos de extração prolongados são desejáveis para obtenção de maiores rendimentos, mas geram a redução da viscosidade e da força de gel da gelatina. Das variáveis avaliadas no planejamento fatorial, a gelatina com maior força de gel foi obtida nas seguintes condições do processo: NaOH 0,3% (p/v), H₂SO₄ 0,3% (p/v), temperatura de extração 45°C e tempo de extração de 6h.

A gelatina que apresentou maior força de gel nos ensaios do planejamento fatorial foi caracterizada quanto a suas propriedades físico-químicas, microbiológicas, reológicas e estruturais. O processo apresentou baixo rendimento, a distribuição de peso molecular da gelatina foi típica de colágeno tipo I, com conteúdo de iminoácidos (prolina + hidroxiprolina) de 21,67%. A força de gel e a viscosidade aumentaram com o prolongamento do tempo de maturação e os pontos de fusão e geleificação foram de 25°C e 21°C, respectivamente. A gelatina apresentou coloração amarela esbranquiçada, baixo conteúdo iônico e padrões microbiológicos que atendem as exigências da legislação brasileira.

NaCl, KCl, MgSO₄, MgCl₂, glicerol, transglutaminase e sacarose em duas concentrações e dois diferentes valores de pH, foram utilizados com intuito de maximizar algumas importantes propriedades da gelatina. Com a adição, ocorreu ligeira modificação na turbidez e aumento da viscosidade da solução de gelatina, principalmente em pH 5,0. A incorporação de MgSO₄, transglutaminase e sacarose, em ambas as concentrações e valores de pH, levaram a um aumento dos pontos de geleificação, de fusão e da força de gel, enquanto que o emprego de glicerol elevou os valores de força de gel e viscosidade, mas o mesmo não ocorreu com as temperaturas de geleificação e de fusão. Dentre os agentes avaliados, o sulfato de magnésio (MgSO₄) levou a obtenção das melhores propriedades reológicas, enquanto, a incorporação de NaCl, KCl e MgCl₂, gerou a redução destas propriedades.

As propriedades funcionais da gelatina de pele de tilápia podem ser otimizadas, através da utilização de adequados parâmetros de extração e a incorporação de diferentes agentes.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. **Official methods and recommended practices of the american oil chemist's society**. Washington: D. Feistane, 1995.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG A. Extraction and characterization of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Bioresource Technology**. v. 98 p. 53-57, 2007.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG A. Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). **Bioresource Technology**. v. 82 p. 191-194, 2002.

ASGHAR, A.; HENRICKSON, R. L. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen food systems. In: **ADVANCES IN FOOD RESEARCH**. London: Academic Press, 1982. p. 232 – 272.

BAILEY, A. J.; PAUL, R. G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and aging of collagen. **Mechanism of Aging and Development**. v. 106 p.1-56, 1998.

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

BARROS NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299 p.

B.S.I. (British Standards Institution) **Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)**. London. 1975.

CHEOW, C. S.; NORIZAH, M. S.; KYAW, Z. Y.; HOWELL, N. K. Preparation and characterization of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 386-391, 2007.

CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P. J.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer**. v.47 p. 6379–6386, 2006.

CHO, S. M.; GU, Y. S.; KIM S. B. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 221-229, 2004.

CHO, S. M.; KWAK, K. S.; PARK, D. C.; GU, Y. S.; JI, C. I.; JANG, D. H.; LEE, Y. B.; KIM S. B. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, v. 18 p. 573–579, 2004.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**. v.65 p. 194–199, 2000.

COELHO, H. S.; MORANDINI, L. M. B.; SANTANA, A. M.; TERRA, N. N. Características físico-químicas do salame tipo italiano contendo couro suíno cozido. **REVISTA NACIONAL DA CARNE**. v. 278. ANO XXIV, 2001.

COELHO, H. S.; MORANDINI, L. M. B.; ROSA, C. S.; SANTANA, A. M.; TERRA, N. N.; KUBOTA, E. H. Obtenção do couro suíno cozido para adição em embutidos cárneos. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Anais v. 2, 1998.

COLE, C. G. B. Gelatin Food Science. Disponível em: <<http://www.gelatin.co.za>>. Acesso em: 23 jul. 2006.

COLE, C. G. B.; ROBERTS, J. J. Gelatine colour measurement. **Meat Science**, v. 45, n. 1, p. 23-31, 1997.

COLE, C. G. B.; ROBERTS, J. J. Changes in the molecular composition of gelatin due to the manufacturing process and animal age, as shown by electrophoresis. **Journal of the Society of the Leather Technologists and Chemists**, v. 80, p. 136–141, 1996.

CONTRERAS, E. G. **Bioquímica de pescados e derivados**; São Paulo: FUNEP, 1994.

ELYSÉE-COLLEN, B.; LENCKI, R. W. Effect of ethanol, ammonium sulfate, and temperature on the phase behaviour of type B gelatin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p.1651–1657, 1996.

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

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 281-286, 2003.

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

GILDBERG, A.; ARNESEN, J. A.; CARLEHÖG, M. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**. v.38 p. 475-480, 2002.

GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. **Food Hydrocolloids**. v. 14 p. 191–195, 2000.

GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. The role of salt washing of fish skin in chemical and rheological properties of gelatin extracted. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 951-957, 2005.

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

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus bosci*) skins with several organic acids. **Journal of Food Science**. v.66 p.213–216, 2001.

GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. **Process for the production of gelatin from fish skins**. US Patent 5,093,474, 1992.

GUDMUNDSSON, M. Rheological properties of fish gelatin. **Journal Food Science**. v. 67 p. 2172-2176, 2002.

GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON, H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37–39, 1997.

HARRINGTON, W. F.; VON HIPPEL, P. H. **The structure of collagen and gelatin**. Advances in protein chemistry, 1961. 138p.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 203–213, 2004.

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

HOLZER, D. **Gelatin production**. US Patent 5,484,888, 1996.

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

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

JOHNS, P. The structure and composition of collagen containing tissues. In A. G. WARD; A. COURTS (Eds.), *The science and technology of gelatin*. London. Academic Press, 1977. p. 138–177.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin. In: *ELSERVIER APPLIED FOOD SCIENCE SERIES. Food gels*, New York, 1990. p. 233–289.

JONES, N. R. Uses of gelatin in edible products. In: WARD, A. G.; COURTS, A. (Eds.). *The science and technology of gelatin*. London: Academic Press, 1977. p. 365-394.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1216–1222, 2006.

KASANKALA, L. M., XUE, Y., WEILONG, Y., HONG, S. D.; H. E. Q. Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3338–3343, 2007.

KIMURA, S. Wide distribution of the skin type I collagen α 3 chain in bony fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102 B, p. 255-260, 1992.

KIMURA, S.; OHNO, Y.; MIYAUCHI, Y.; UCHIDA, N. Fish skin Type I collagen: wide distribution of an $\alpha 3$ subunit in teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.** v.88 B p.27-34, 1987.

KIMURA, S.; KAMIMURA, T.; TAKEMA, Y.; KUBOTA, M. Lower vertebrate collagen evidence for type I-like collagen in the skin of lamprey and shark. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 669 p. 251-257, 1981.

KOŁODZIEJSKA, I.; KACZOROWSKI, K.; PIOTROWSKA, B.; SADOWSKA, M. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. **Food Chemistry.** v. 86(2), p. 203-209, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 277, p. 680–685, 1970.

LEACH, A. A.; EASTOE, J. E. The chemical examination of gelatins. In: WARD, A. G.; COURTS, A. (Eds.). The science and technology of gelatin. London: Academic Press, 1977. p. 475-506.

LEDWARD, D. A. Gelation of gelatin. In: J. R. MITCHELL; D. A. LEDWARD (Eds.), Functional properties of food macromolecules, London: Elsevier, 1986. p. 171–201.

LEUENBERGER, B. H. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. **Food Hydrocolloids.** v. 5(4) p. 353–361, 1991.

MIZUTA, S.; FUJISAWA, S.; NISHIMOTO, M.; YOSHINAKA, R. Biochemical and immunochemical detection of types I and V collagens in tiger puffer (*Takifugu rubripes*). **Food Chemistry.** v.89, p. 373-377, 2004.

MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. **Food Hydrocolloids.** v. 16 p. 197-205, 2002.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 3, p. 434-438, 2000.

MONTERO, P.; ALVAREZ, C.; MARTÍ, M. A.; BORDERÍAS, A. J. Plaice skin collagen extraction and functional properties. **Journal of Food Science**. v. 59 (5) p. 1- 3, 1995.

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

MUYONGA, J. H., COLE, C.G.B., DUODU, K. G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**. v. 85 p. 81-89, 2004b.

NAFTALIAN, R. J.; SYMONS, M. C. R. The mechanism of sugar-dependent stabilization of gelatin gels. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 352, p. 173-176, 1974.

NORLAND, R. E. Fish gelatin. In: VOIGHT, M. N.; BOTTA, J. K. (Eds.). *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1990. p. 325-333.

OETTERER M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**. v. 5 p. 119-131, 1994.

OSBORNE, K.; VOIGHT, M. N.; 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.

PARDI, M. C.; SANTOS, F. I.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**, v.2 , 1ª ed.,1996.

PIEZ, K. A. Characterization of collagen from cod fish skin containing three chromatographically different α chains. **Biochemistry**, v. 12 p.2590–2596, 1965.

POPPE, J. Gelatin. In: A. IMESON (Eds.), Thickening and gelling agents for food. Glasgow, UK: Blackie, 1992. p. 98–123.

RUBIN, M. **Marine by-products a huge unexploited potential for value adding**. Disponível em: <www.rubin.no>. Acesso em 15 de dez. 2007.

RUSTAD T. Utilization of marine by-products. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 2 (4), 2003.

SARABIA, A. I., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. The effect of added salt on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. **Food Chemistry**. v. 70 p. 71–76, 2000.

SATO, K.; OHASHI C.; OHTSUK, I. K.; KAWABATA M. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39 p. 1222-1225, 1991.

SATO; K., YOSHINAKA, R.; ITOH, Y.; SATO, M. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. **Comparative Biochemistry Physiology**. v. 92B p. 87-91, 1989.

SATO, K.; YOSHINAKA, R.; SATO, M.; ITOH, Y.; SHIMIZU, Y. Isolation of Types I and V collagens from carp muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 90B p. 155-158, 1988.

SCHOTT, A. Functions of gelatine in food applications. **American association of cereal Chemists, Inc.**, v. 46 p. 414-416, 2001.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**; Ed.Varela, 1999.

SHAHIDI, F. Seafood processing by-products. In F. SHAHIDI; J. R. BOTTA (Eds.), *Seafoods chemistry, processing, technology and quality*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1994. p. 320–334.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SIMON, A.; VANDANJON, L.; LEVESQUE, G.; BOURSEAU, P. Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. **Desalination**. v. 144 p. 313-318, 2002.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. New York: John Wiley, 1985.

STAINSBY, G. Gelatins gel. In: PEARSON A.M., DUTSON, BAILY A.J. (eds.) *Advances in meat research*. v. 4. Collagen as a food. New York: Van Nostrand Reinhold Co. Inc., 1987. p. 209-222.

SUZUKI, T. **Tecnología de las Proteínas de Pescados y Krill**; Zaragoza. Ed. Acribia, 1987.

TEJADA, M. **Tratamiento de residuos sólidos de la industria transformadora del pescado**. Alimentación, Equipos y Tecnología, 1992.

THIESSEN, F. Importância da gelatina alimentícia como aditivo aglutinante. **Revista Nacional da Carne**. v. 6 p. 18-21, 1994.

WAINWRIGHT, F. W. Physical tests for gelatin and gelatin products. In A. G. WARD; A. COURTS (Eds.). *The science and technology of gelatin*. London. Academic Press, 1977. p. 508–557.

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

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska Pollock skin gelatin extraction. **Journal of Food Science**. v. 70 p. 392–396, 2005.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Optimization of extraction conditions for Pollock skin gelatin. **Journal of Food Science**. v. 69 p. 393–398, 2004.