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

ELABORAÇÃO DE FILMES À BASE DE GELATINA MODIFICADA DE PELES DE CARPA COMUM (*Cyprinus carpio*): AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE QUITOSANA E LIPÍDIOS NAS PROPRIEDADES DOS FILMES

BRUNA MOURA BASTOS

PROF. DR. LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO
Orientador
DRA. JAQUELINE MOTTA DE MOURA
Coorientadora

Rio Grande, RS

2020

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

ELABORAÇÃO DE FILMES À BASE DE GELATINA MODIFICADA DE PELES DE CARPA COMUM (*Cyprinus carpio*): AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE QUITOSANA E LIPÍDIOS NAS PROPRIEDADES DOS FILMES

BRUNA MOURA BASTOS

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

PROF. DR. LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO
Orientador
DRA. JAQUELINE MOTTA DE MOURA
Coorientadora

Rio Grande, RS

2020

Ficha Catalográfica

B327e Bastos, Bruna Moura.
Elaboração de filmes à base de gelatina modificada de peles de carpa comum (*cyprinus carpio*): avaliação da incorporação de quitosana e lipídios nas propriedades dos filmes / Bruna Moura Bastos. – 2020.
103 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.
Orientador: Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto.
Coorientadora: Dra. Jaqueline Motta de Moura.

1. Filmes Biopoliméricos 2. Fração Lipídica 3. Gelatina de Pescado 4. Polímero Biodegradável 5. Reticulação I. Pinto, Luiz Antonio de Almeida II. Moura, Jaqueline Motta de III. Título.

CDU 597.554.3:665.931.7

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Bruna Moura Bastos e aprovada em 29 de fevereiro de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto - FURG

Prof. Dr. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Jr. – FURG

Profa. Dra. Catarina Motta de Moura – UNIPAMPA

“Não há emoção, há paz.

Não há ignorância, há conhecimento.

Não há paixão, há serenidade.

Não há caos, há harmonia.

Não há morte, há a Força”.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Obrigada Senhor por ter permitido que eu entrasse nessa jornada, com saúde, apoio dos meus familiares, com fé e perseverança de que eu completaria e sairia vencedora no final!

Aos meus pais, Jurema e Breno, e ao meu irmão Thiago

Não tenho como expressar a sorte e a gratidão que tenho por ter vocês, que sempre estiveram ao meu lado, mesmo à distância, dando forças, amor, carinho e tranquilidade para que eu pudesse enfrentar todos os obstáculos até o dia da conquista!

Aos meus mestrandos e amigos, Mayke, Ana Luiza, Pedro, Nathiéli e Francisco Henrique

Se eu teria terminado o mestrado sem vocês? Sim...mas a que preço? Vocês foram o meu esteio, meus braços, pernas e coração nesse mestrado! Muito mais que colegas, amigos ou, por vezes, ICs, vocês foram minha Ohana! Estarei eternamente em dívida por todo amor, alegrias, risadas, doces, caronas, chimarrões, mojitos, cevas, histórias, almoços e puxões de orelha!

As minhas amigas

Não se pode ir a lugar algum sem ter para onde voltar! Obrigada gurias por terem me apoiado e por estarem comigo de alma! Em especial a Manoela Martins, Lívia, Manoela Barcellos, Renata e Camila.

Ao meu querido, doce e paizão Luiz

Quem dera que todos os laboratórios do mundo tivessem um técnico tão espetacular, profissional, atencioso e humano quanto o senhor! Obrigada imensamente por todo carinho, segurança, força e pelas cucas que tu me deste ao longo destes 24 meses!

A Bruna Farias e ao Prof. Dr. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Júnior

Por terem auxiliado e lapidado essa mestranda! Vocês foram os responsáveis por, a cada dia, instigar mais e mais o meu desejo pela pesquisa científica e por um trabalho melhor! Obrigada por terem tido paciência com todas as minhas perguntas, por mais simplória que fossem, vocês sempre deram atenção e me trataram com respeito!

A minha coorientadora, Jaqueline Motta de Moura

Obrigada por ter iluminado muitas vezes um trabalho que se perdia em meio a tantas análises! Obrigada por ter sido humana comigo e por ter dado uma chance ao meu potencial!

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto

O senhor viu luz, quando ninguém mais. O senhor viu uma chama, ávida por conhecimento e soube transformá–la em uma fornalha! Obrigada por ter acredito e confiado em mim como sua orientada. E mais, obrigada por ter lutado por mim e transformar minha teimosia em determinação!

Aos colegas do LTI e da Secagem

Obrigada pela paciência com as minhas dúvidas, em ensinar o que, para mim, parecia impossível aprender, cedendo seu tempo e conhecimentos para auxiliar na realização deste trabalho! Em especial aos colegas Patrick, Vanessa Esquerdo, Jenifer, Estéfani, Andrei, Silvia e Janaína.

Aos professores do PPGECA

Pelos ensinamentos e ética passados.

Ao CEME–SUL, ao CIA, a Dra. Bruna Vaz e a Dra. Clarice Izumi

Pela realização das análises, que foram essenciais para finalização deste trabalho.

A FURG

Por toda infraestrutura, equipamentos, investimento em profissionais qualificados e em pesquisa pública e de qualidade

Ao CNPq

Pela bolsa de estudos.

RESUMO

Materiais obtidos de polímeros biodegradáveis, oriundos de resíduos da indústria pesqueira, podem ser uma alternativa para a redução do impacto ambiental, causado pelos polímeros derivados do petróleo. A gelatina é uma proteína, obtida através da hidrólise parcial do colágeno, uma substância encontrada em altas concentrações na pele e ossos dos animais. Como a gelatina de pescado apresenta propriedades reológicas inferiores às de mamíferos, a reticulação com o uso do ácido gálico torna-se uma alternativa promissora para o melhoramento destas propriedades e sua utilização na formação de filmes. A quitosana é um polímero biodegradável, atóxico e biocompatível, que quando combinada com gelatina, tende a melhorar as propriedades mecânicas de filmes poliméricos. No entanto, ambas são altamente hidrofílicas, e a combinação delas tende a aumentar a solubilidade dos filmes e a permeação de vapor d'água. Assim, a utilização de uma fração hidrofóbica, como lipídios, pode auxiliar na redução destes problemas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi obter gelatina de peles de carpa comum (*Cyprinus carpio*), reticular quimicamente com ácido gálico, comparar com gelatina bovina comercial Tipo A e produzir de filmes à base de gelatina de pescado, reticulada ou não, avaliando a adição de quitosana e fração lipídica extraída de atum (*Thunnus thynnus*) (óleo branqueado da cabeça e ácidos graxos livres – AGL), nas propriedades dos filmes. Inicialmente, foram obtidos os biomateriais gelatina, quitosana, óleo branqueado e ácidos graxos livres. Após, foram obtidos 9 filmes em triplicata pela técnica *casting*, totalizando 27 amostras, com o filme controle sendo o que utilizou como base apenas a gelatina de pele de carpa pura. Os filmes foram analisados quanto a espessura (E), propriedades mecânicas (tensão na ruptura (TR) e alongamento na ruptura (AR)), permeabilidade ao vapor d'água (PVA), atributos de cor, transmitância UV, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (FT–IR), análises térmicas (DSC, DTG/TGA) e difração de raio–X. Todos os processos de extração dos biomateriais foram satisfatórios. A gelatina apresentou um bom rendimento (20,41% b.u. e 13,84 g 100 g^{-1} em hidroxiprolina) e elevada força do gel (227 g). A quitosana apresentou grau de desacetilação de 85% e massa molar de 159 kDa. Quanto ao óleo e os ácidos graxos livres, estes apresentaram em média 68,2% de insaturados. Todos os filmes apresentaram espessura, cor e transparências características de gelatinas de pescado. Os filmes reticulados com ácido gálico que incorporam a quitosana e a fração lipídica apresentaram melhores valores de RT, AR e PVA, em relação aos demais. A análise de MEV mostrou superfícies desiguais quando houve a reticulação e a incorporação dos biomateriais, indicando que a incorporação da quitosana e da fração lipídica não apresentou boa miscibilidade com o ácido gálico. A análise FT–IR indicou que a reticulação causou uma diminuição das amidas II e III, o que levou a uma redução das estruturas α–hélice. A análise DSC evidenciou que todos os filmes apresentaram maiores temperaturas de fusão, indicando menor degradação térmica e melhor qualidade que o filme controle. Quanto aos DRX, estes mostraram que, independente da reticulação, todos os filmes apresentam estruturas amorfas. Desta forma, os resultados expressaram que a incorporação dos biomateriais é promissora no aprimoramento das propriedades de filmes à base de gelatina de pescado, reticulada com um agente não eletrólito.

Palavras–chave: Filmes biopoliméricos. Fração lipídica. Gelatina de pescado. Polímero biodegradável. Reticulação.

ABSTRACT

FILM PREPARATION BASED ON MODIFIED GELATIN FROM COMMON CARP SKINS (*Cyprinnus carpio)*: EVALUATION OF THE INCORPORATION OF CHITOSAN AND LIPIDS IN THE PROPERTIES OF THE FILMS

Materials obtained from biodegradable polymers, derived from residues from the fishing industry, can be an alternative to reduce the environmental impact caused by oil-derived polymers. Gelatin is a protein, obtained through partial hydrolysis of collagen, a substance found in high concentrations in the skin and bones of animals. As fish gelatine has lower rheological properties than mammals, crosslinking with the use of gallic acid becomes a promising alternative for improving these properties and their use in the formation of films. Chitosan is a biodegradable, non-toxic and biocompatible polymer, which when combined with gelatin, tends to improve the mechanical properties of polymeric films. However, both are highly hydrophilic, and the combination of these tends to increase the solubility of the films and the permeation of water vapor. Thus, the use of a hydrophobic fraction, such as lipids, can help to reduce these problems. In this context, the objective of this work was to obtain gelatin from skins of common carp (*Cyprinus carpio*), chemically crosslinked with gallic acid, compare with commercial bovine gelatin Type A and produce films based on fish gelatin, reticulated or not, evaluating the addition of chitosan and lipid fraction extracted from tuna (*Thunnus thynnus*) (bleached head oil and free fatty acids - AGL), in the properties of the films. Initially, gelatin, chitosan, bleached oil, and free fatty acids were obtained. Afterward, 9 films were obtained in triplicate using the casting technique, totaling 27 samples, with the control film being the one that used only pure carp skin gelatin as a base. The films were analyzed for thickness (T), mechanical properties (stress at break (SB) and elongation at break (EB)), water vapor permeability (WVP), color attributes, UV transmittance, scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FT–IR), thermal analysis (DSC, DTG / TGA) and X-ray diffraction. All biomaterials extraction processes were satisfactory. Gelatin showed a good yield (20.41% b.u. and 13.84 g 100 g – 1 in hydroxyproline) and high gel strength (227 g). Chitosan showed 85% deacetylation and 159 kDa molar mass. As for oil and free fatty acids, they presented an average of 68.2% unsaturated. All films showed thickness, color and transparencies characteristic of fish gelatins. The films crosslinked with gallic acid that incorporates chitosan and the lipid fraction showed better values of RT, AR and PVA, than the others. SEM analysis showed uneven surfaces when there was crosslinking and incorporation of biomaterials, indicating that the incorporation of chitosan and lipid fraction did not present good miscibility with gallic acid. FT–IR analysis indicated that crosslinking caused a decrease in amides II and III, which led to a reduction in α – helix structures. The DSC analysis showed that all films had higher melting temperatures, indicating less thermal degradation and better quality than the control film. As for XRDs, they showed that, regardless of cross-linking, all films have amorphous structures. Thus, the results expressed that the incorporation of biomaterials is promising in improving the properties of fish gelatin-based films, cross-linked with a non-electrolyte agent.

Keywords: Biopolymeric films. Lipid fraction. Fish gelatine. Biodegradable polymer. Crosslinking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais variedades de carpa comum (*Cyprinus carpio*) 266

Figura 2 – Estrutura da fibra de colágeno 28

Figura 3 – Processo de extração de gelatina do Tipo A e Tipo B 29

Figura 4 – Estrutura química (a) quitina e (b) quitosana 344

Figura 5 – Fluxograma do processo de extração de gelatina a partir de peles de pescado 422

Figura 6 – Matérias–primas utilizadas para extração da gelatina de pele de carpa comum .. 555

Figura 7 – Gelatinas de pele de carpa: (a) filtrada, (b) clarificada e (c) liofilizada 577

Figura 8 – Filmes biopoliméricos elaborados à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum 666

Figura 9 – Transparência dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum..... 69

Figura 10 – Transmitância UV-Vis dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum..... 68

Figura 11 – Micrografias MEV de filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou gelatina reticulada com ácidos gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum 70

Figura 12 – Espectros FT–IR dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum..... 722

Figura 13 – Termogramas DSC dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum..... 755

Figura 14 – Termogramas TGA dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incoporados com quitosana e fração lipídica de atum 766

Figura 15 – Termogramas DTG dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum..... 77

Figura 16 – Difratogramas de raio-X dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum..... 78

Figura 1A – Fluxograma para obtenção do óleo branqueado de cabeça de atum 97

Figura 2A – Interações intermoleculares nos filmes de (a) gelatina, (b) gelatina/glicerol, (c) gelatina reticulada com ácido gálico e glicerol e (d) gelatina reticulada com ácido gálico, glicerol e incorporada com quitosana 96

Figura 3A – Estrutura química do triacilglicerol e dos principais ácidos graxos encontrados nos óleos 99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Métodos de extração de gelatinas de diferentes fontes animais 32

Quadro 2 – Pré–tratamentos para obtenção de gelatina de peles de carpa. 42

Quadro 3 – Metodologias oficiais AOAC para determinação das composições proximais das peles *in natura* de carpa comum e das gelatinas obtidas 47

Quadro 4 – Grupos funcionais referentes as estruturas da gelatina, encontrados no filme controle (C) 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal das peles e gelatina extraída clarificada. 56

Tabela 2 – Rendimentos do processo de extração da gelatina de peles de carpa comum 57

Tabela 3 – Propriedades reológicas e físico–químicas das gelatinas controle, reticulada e bovina 58

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos do óleo branqueado de cabeça de atum e dos AGL..... 60

Tabela 5 – Valores de propriedades mecânicas, espessura e PVA dos filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou reticulada com ácido gálico e incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum..... 62

Tabela 6 – Parâmetros de cor (ângulo Hue – ° H) e diferença total de cor (ΔE) dos filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum 65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 OBJETIVOS 23
2.1 OBJETIVO GERAL 23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25
3.1 AQUICULTURA E A GERAÇÃO DE RESÍDUOS 25
3.2 IMPORTÂNCIA DA CARPA COMUM 26
3.3 FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO COLÁGENO 26
3.4 GELATINA 28
3.4.1 Fontes de gelatina 30
3.4.2 Gelatina de pescado 31
3.4.3 Gelatina modificada 32
3.5 QUITOSANA 34
3.6 COMPONENTES LIPÍDICOS 35
3.6.1 Compostos lipídicos de pescado 35
3.7 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE GELATINA 36
3.7.1 Filmes à base de gelatina de pescado incorporados com quitosana 37
3.7.2 Filmes emulsionados 38

4 MATERIAIS E MÉTODOS 41
4.1 MATÉRIAS–PRIMAS 41
4.2 PRODUÇÃO DE GELATINAS 41
4.2.1 Obtenção de gelatina de peles de carpa 41
4.2.2 Clarificação das gelatinas 43
4.2.3 Modificação das gelatinas 43
4.2.4 Liofilização das gelatinas 43
4.3 PRODUÇÃO DE QUITOSANA 44
4.4 PRODUÇÃO DE ÓLEO DE CARPA BRANQUEADO 44
4.5 OBTENÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES 44
4.6 DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS 45
4.6.1 Filmes de gelatina e gelatina reticulada 45
4.6.2 Filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana 45
4.6.3 Filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana e óleo de atum 46
4.6.4 Filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana e ácidos graxos livres (AGL) 46
4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS 46
4.7.1 Caracterização das soluções de gelatina 47
4.7.1.1 Composição centesimal 47
4.7.1.2 Rendimento em massa 47
4.7.1.3 Rendimento em hidroxiprolina 47
4.7.1.4 Força de gel 48
4.7.1.5 Viscosidade 48
4.7.1.6 Temperatura de fusão 49
4.7.1.7 Determinação do ponto de gelificação 49

4.7.1.8 Grau de reticulação 49
4.7.2 Caracterização da quitosana 49
4.7.3 Caracterização da fração lipídica 50
4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES 51
4.8.1 Espessura dos filmes 51
4.8.2 Propriedades mecânicas 51
4.8.3 Permeabilidade ao vapor de água 52
4.8.4 Propriedades ópticas 52
4.8.5 Transmitância UV e luz visível dos filmes 53
4.8.6 Microscopia de eletrônica de varredura 53
4.8.7 Espectroscopia de infravermelho (FT–IR) 53
4.8.8 Propriedades térmicas dos filmes 53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS 55
5.1.1 Caracterização das gelatinas 55
5.1.1.1 Composição proximal 55
5.1.1.2 Rendimentos em massa e hidroxiprolina 56
5.1.1.3 Propriedades reológicas e físico–químicas 57
5.1.1.4 Grau de reticulação 59
5.1.2 Caracterização da quitosana 59
5.1.3 Caracterização da fração lipídica 60
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES 61
5.2.1 Espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor d'água 61
5.2.2 Atributos de cor e transmitância UV-VIS 65
5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 70
5.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT–IR) 71
5.2.5 Análises térmicas 73
5.2.6 Análise de difração de raio–X 78

6 CONCLUSÃO 79

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 81

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

APÊNDICES 95
APÊNDICE 1 – Obtenção do óleo branqueado 97
APÊNDICE 2 – Interações intermoleculares nos filmes à base de gelatina 98
APÊNDICE 3 – Estruturas químicas do triacilglicerol e de ácidos graxos 99

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório *The State of World Fisheries and Aquaculture* (FAO, 2016), a aquicultura ultrapassou a pesca, correspondendo a metade do consumo mundial de pescado. No Brasil, segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXEBR, 2019), a produção de peixes de cultivo atingiu em 2018, o valor de 722,560 mil toneladas. Globalmente, a aquicultura vem se apoiando nas espécies de carpa representando, em 2016, 39% do total produzido (FAO, 2018). No Brasil, a criação de carpa está presente em 119.916 propriedades, sendo 93% delas na região Sul e, destas, 47% encontram–se no Rio Grande do Sul (BAPTISTA et al., 2018). Paralelo a esse novo cenário de aumento da produção e do consumo de pescado, há a preocupação com o descarte e/ou aproveitamento dos resíduos excedentes da etapa de produção industrial. De forma geral, resíduos podem ser classificados como componentes gasosos, líquidos ou sólidos que, quando lançados no meio ambiente sem o devido tratamento, poderão ocasionar graves alterações físicas, químicas e biológicas para a vida aquática e terrestre (PEREDA et al., 2011). Neste contexto, a preocupação se deve a quantidade de resíduos produzidos pela indústria pesqueira, pois, enquanto o processamento bovino e suíno beneficia aproximadamente 100% da matéria–prima animal, a indústria pesqueira chega no máximo a 40%, pois os resíduos como cabeça, ossos, peles e vísceras somam entre 60% e 70% do total excedente (SANTOS et al., 2018).

A gelatina é utilizada como um ingrediente alimentar, obtida por tratamento térmico e, consequente, desnaturação do colágeno (BAILEY; LIGHT, 1989). Extraída em maior escala de ossos e peles bovinas e suínas, a gelatina obtida do colágeno oriundo destas fontes, tem sido há alguns anos, motivo de preocupação e de debates entre diversos consumidores, devido aos efeitos de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina, a febre aftosa e por consumidores das culturas *kosher* e *hallal* (ZHANG et al., 2016). Como fontes alternativas de colágeno para obtenção da gelatina, surgem os pescados e seus resíduos. No entanto as gelatinas de pescado apresentam aplicações restritas pois, devido aos baixos níveis dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina, formam géis com baixa estabilidade e valores de força de gel inferiores quando comparados à gelatina de mamíferos (LEUENBERGER, 1991). Para aproximar e/ou elevar suas propriedades físico–químicas em relação as gelatinas de mamíferos, podem ser realizadas modificações químicas com agentes de reticulação, bem como a incorporação de outros materiais, visto que a gelatina apresenta longas cadeias com diferentes grupos funcionais passíveis de interações (BANDEIRA et al., 2015; CAI et al., 2019; TAVASSOL-KAFRANI; GOLI; FATHI, 2017; XU; XUC; YANG, 2015).

A quitosana é um biopolímero com propriedades atrativas, os quais incluem fonte de obtenção renovável, não–toxicidade, biodegradabilidade, além de seu caráter policatiônico (MOURA, 2018). Sua utilização como surfactante para melhorar a tensão na ruptura e as propriedades antimicrobianas de filmes de gelatina tem sido cada vez mais estudada (BRANDALISE, 2017; URUNGA et al., 2019). Porém, os filmes produzidos apenas com esses dois polímeros tendem a apresentar elevada solubilidade e alta permeação ao vapor de água, devido a ambas apresentarem caráter hidrofílico (BANDEIRA et al., 2015). No entanto, o desempenho físico de filmes à base de gelatina, com adição de quitosana, pode ser melhorado incorporando ácidos graxos em sua matriz (MOURA, 2018). A utilização de óleo de pescado nestes filmes pode favorecer as propriedades de barreira ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofóbica (CAI et al., 2019).

Neste contexto, o Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI), da Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), tem desenvolvido há vários anos, pesquisas na utilização de resíduos de espécies aquáticas, tendo como intuito a agregação de valor aos subprodutos, como a extração de gelatina, produção de quitosana e extração de óleos. Processos de extração de gelatinas, a partir de diferentes espécies de pescado, como bijupirá (SILVA et al., 2014), corvina (BANDEIRA et al., 2015; BANDEIRA et al., 2017), tilápia do Nilo e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (SANTOS et al., 2018), foram desenvolvidos pelo laboratório. Nestes trabalhos, foram obtidas e avaliadas gelatinas de ossos e de peles dos pescados, além da obtenção de filmes biopoliméricos e a avaliação dos efeitos de modificação química, com agentes reticulantes, e da incorporação de quitosana e de concentrados de ácidos graxos. Atualmente, o laboratório tem desenvolvido pesquisas para a aplicação destes filmes de gelatina de pescado, incorporados com quitosana e ácidos graxos insaturados, para a aplicação em embalagens ativas em filés de merluza (MOURA, 2018). Assim, devido à relevância dos temas abordados e com o intuito de unir temas anteriores como um novo projeto, justifica–se a continuidade do estudo proposto no presente trabalho, pelo desenvolvimento de filmes de gelatinas de pescado, reticuladas quimicamente e incorporados com quitosana, óleo branqueado e ácidos graxos livres, também de pescado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve por objetivo obter, modificar e comparar gelatinas de peles de carpa comum, reticuladas e não-reticuladas quimicamente com o uso de um agente não eletrólito, para produção de filmes à base de gelatina de pescado, avaliando os efeitos da incorporação de quitosana, óleo branqueado e ácidos graxos livres de atum no melhoramento das propriedades mecânicas e de permeação dos filmes, em comparação com filme de gelatina bovina comercial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar gelatinas de pele de carpa comum, modificadas quimicamente com o uso de ácido gálico como agente reticulante não–eletrólito;
- Produzir e caracterizar quitosana a partir de resíduos de camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*), óleo branqueado e ácidos graxos livres (AGL) de cabeças de atum *(Thunnus thynnus)*.
- Investigar o efeito da quitosana na tensão na ruptura (TR) e no alongamento (AR) dos filmes, com e sem reticulação;
- Investigar os efeitos do óleo branqueado de atum e dos AGL na permeabilidade ao vapor d’água (PVA) dos filmes, com e sem reticulação;
- Avaliar os filmes quanto as propriedades mecânicas, análises térmicas (TGA e DSC), morfologia (MEV), espectroscopia de infravermelho (FT–IR), atributos de cor e transparência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AQUICULTURA E A GERAÇÃO DE RESÍDUOS

No ano de 2016, a produção mundial de pescados movimentou mais de 170 milhões de toneladas, gerando um retorno de US$ 362 milhões. Destes, 110,2 milhões de toneladas (US$ 243,5 milhões) equivaleram a produção aquícola global (entre peixes comestíveis, plantas aquáticas e produtos não alimentares). Dentre os peixes comestíveis cultivados pela aquicultura, 54,1 milhões de toneladas correspondem a peixes com barbatanas, sendo os principais a carpa, a tilápia e o bagre (FAO, 2018). Segundo Schulter e Vieira Filho (2017), a produção de pescados é dividida em dois grupos: pesca extrativa e a aquicultura. Enquanto a pesca extrativa baseia–se na retirada de recursos pesqueiros do ambiente natural, a aquicultura refere–se ao cultivo destes em um espaço confinado e controlado. A diferença é o fato de que a pesca extrativa não atende as premissas de um mercado competitivo, enquanto a aquicultura consegue fornecer produtos mais homogêneos e rastreabilidade de toda a cadeia, ou seja, um produto de maior qualidade e com maior segurança alimentar (BAPTISTA et al., 2018).

Em 2018 no Brasil, a piscicultura, principal atividade da aquicultura, cresceu 4,5%, produzindo mais de 722 mil toneladas (PEIXEBR, 2019). O constante crescimento da piscicultura brasileira nos últimos anos se deve aos recursos hídricos do país, suas dimensões continentais, o clima propício e ao empreendedorismo dos produtores (BAPTISTA et al., 2018; PEIXEBR, 2019).

Apesar de muitos pescados serem comercializados inteiros, as indústrias de processamento ainda são as principais comercializadoras dos piscicultores. Dessa forma, elas se tornam grandes geradoras de resíduos pesqueiros durante as etapas do descasque (camarões) e da evisceração (peixes) (CHAVES; VINK, 2017). Os resíduos orgânicos do pescado, como casca, cabeça, vísceras, nadadeiras, coluna vertebral, escamas e restos de carne, podem chegar a totalizar 70% em peso, dependendo do tipo de pescado, do produto desejado e da técnica empregada (AMIRKOLAIE, 2011). O problema maior se dá em relação a eliminação destes pois, devido a elevada atividade de água e altos níveis de atividade enzimática, sua oxidação e deterioração ocorrem de forma muito rápida, sobrecarregando os depósitos de lixo urbano (JASOUR et al., 2015).

A carpa comum (*Cyprinus carpio*) é um dos pescados mais comercializados e processados globalmente (FAO, 2018; SEBBEN et al., 2000). Entretanto, os resíduos de seu processamento podem totalizar 60% da matéria–prima (SILVA, 2011). Os subprodutos gerados

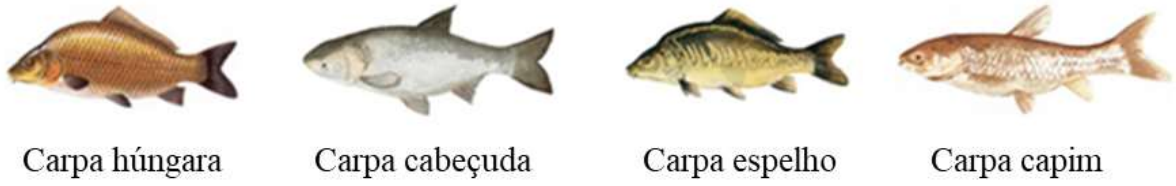
durante o processamento de pescado são matérias–primas adequadas para o desenvolvimento de alimentos de alto valor proteico, possibilitando com o seu aproveitamento alternativo, a redução dos custos e o aumento da produtividade industrial, com minimização de problemas de poluição ambiental (GÓMEZ–GUILLÉN, 2011).

3.2 IMPORTÂNCIA DA CARPA COMUM

Considerada entre as espécies domesticadas a mais antiga, a carpa comum (*Cyprinus carpio*), pertencente à família dos Ciprinídeos, é cultivada em toda a Ásia, América do Norte, Austrália e em alguns países da África e da América Latina. Existem diferentes tipos de carpa, as duas mais comercializadas são a carpa prateada e a carpa espelho (MELO; STIP, 2001). Estas são resistentes em uma ampla faixa de temperatura, tem seu crescimento ideal na faixa de 28 °C e sua temperatura mínima limite em 15 °C (BAPTISTA et al., 2018).

Dentre todas as carpas usadas em aquicultura, somente a carpa comum desova naturalmente nos tanques, pois nos demais tipos a reprodução só é possível de forma induzida. Vários fatores podem afetar a produtividade e o custo, tais como: taxa de estocagem, quantidade e qualidade de alimento natural produzido por fertilização ou da ração no caso de alimentação artificial; temperatura da água; quantidade e disponibilidade de oxigênio dissolvido na água e linhagem do peixe estocado (SEBRAE–MG, 2006). Essa espécie tem hábito alimentar bentófago e onívoro, com crescimento rápido, atingindo facilmente 1,5 kg em um ano (FRACOLOSSI; CIRYNO, 2012). No Brasil, os Estados do Sul são os seus maiores produtores (BAPTISTA et al., 2018). A Figura 1 apresenta os principais tipos de carpa produzidas no Brasil.

Figura 1 – Principais variedades de carpa comum (*Cyprinus carpio*)



Fonte: Adaptado de Baptista et al. (2018)

3.3 FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO COLÁGENO

O colágeno é uma proteína de origem animal que, no organismo em que está presente, contribui com integridade estrutural dos tecidos (SILVA; PENNA, 2012). Constituindo, aproximadamente, 30% das proteínas totais em organismos multicelulares, é

considerada a maior proteína estrutural e a única proteína fibrosa e insolúvel em água. Além disso, possui elevada resistência à tração e uma grande estabilidade (NALINANON et al., 2011; ZENG et al., 2012). Encontrado nos tecidos conjuntivos de animais, em ossos, tendões, cartilagens, peles, dentes, assim como nos músculos e na camada córnea dos olhos, o colágeno desenvolve–se até pouco antes da fase adulta. Após, sua produção é diminuída tornando perceptível sua deficiência e sendo necessária sua suplementação. Por este motivo, há um crescente interesse em seu processo de extração e de seus derivados para aplicação industrial, seja em suplementos alimentares ou em produtos alimentícios, tais como iogurtes, embutidos (salsicha e presunto), chás, sucos e em sobremesas de fácil preparo, como gelatina, pudins e maria–mole (SILVA; PENNA, 2012).

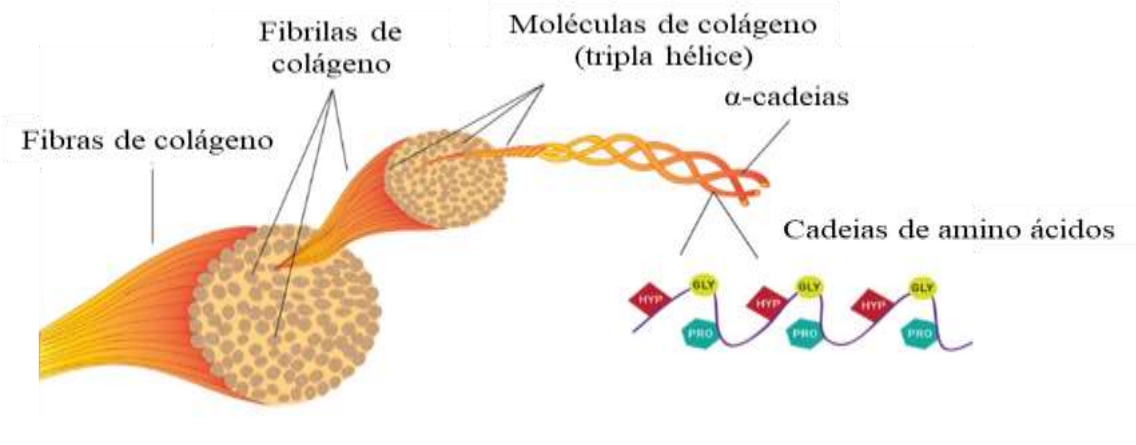
Por se localizar em diferentes partes do corpo animal, é possível encontrar colágenos geneticamente distintos em um mesmo animal (SILVA, 2013). O colágeno mais abundante é o tipo I, sendo este o maior constituinte de peles (80% da matéria seca adulta), tendões (90% da matéria seca), ligamentos e ossos (90% da matéria seca) (WOLF, 2007). O colágeno é formado por cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, organizadas paralelas a um eixo, proporcionando resistência e elasticidade à estrutura e, assim, formando as fibras de colágeno (SILVA; PENNA, 2012). Sua sequência de aminoácidos é, em geral, baseada em uma cadeia polipeptídica originada pela repetição de um triplete: glicina–X–prolina ou glicina–X–hidroxiprolina, sendo o X qualquer um dos 20 aminoácidos padrão (NALINANON et al., 2011).

Cada molécula de colágeno pode ter até três cadeias polipeptídicas diferentes, que se unem e formam uma molécula trifilamentar denominada tripla–hélice (SILVA; PENNA, 2012). Por ter ligações de hidrogênio ausentes na tripla–hélice, cada uma das três hélices é estabilizada pela repulsão estérica dos anéis de pirrolidona das cadeias laterais de prolina e hidroxiprolina (KARIM; BHAT, 2009). As três fitas unem–se formando um cabo helicoidal (SILVA; PENNA, 2012). Dessa forma, as pontes de hidrogênio são formadas por esse entrelaçamento, um com o outro, dos três filamentos (KARIM; BHAT, 2009). Assim, a superposição de várias tripla–hélices é que produz as fibras de colágeno, estabilizadas por ligações cruzadas hidrofóbicas e eletrostáticas, dando origem a uma estrutura de rede tridimensional (SILVA, 2013) resistente às forças de tensão, sem nenhuma capacidade para o estriamento (SILVA; PENNA, 2012). A Figura 2 ilustra a estrutura da molécula de colágeno.

Presente em aproximadamente 14% do colágeno, a hidroxiprolina é o aminoácido utilizado como referência para determinar a presença de colágeno em produtos alimentícios

(DELLA TORRE; LICHTIG; BERAQUET, 2004; SWAN; TORLEY, 1991). Segundo a AOAC (1995), a hidroxiprolina é a medida quantitativa representativa do material colagenoso em carnes e produtos cárneos. Segundo Poppe (1997), em ossos e peles de peixes, o teor de hidroxiprolina no colágeno difere conforme a espécie, o que interfere na temperatura de retração ou encolhimento, podendo ocorrer a ruptura das pontes de hidrogênio da cadeia de forma irreversível.

Figura 2 – Estrutura da fibra de colágeno



Fonte: Adaptado de March (2019)

3.4 GELATINA

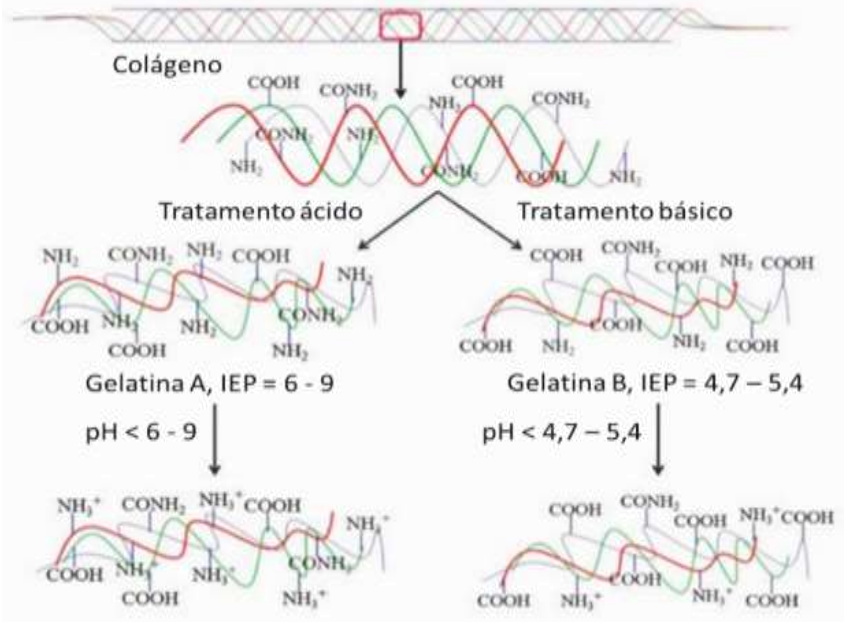
A gelatina é considerada um hidrocolóide, composta por uma mistura de polipeptídios, obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno (SHAKILA et al., 2012), em que, após ser aquecida acima da temperatura de transição hélice–bobina, a estrutura helicoidal da molécula se contrai e, na sequência, o desenrolamento das cadeias moleculares causa a lenta diminuição da massa molar (ALFARO; FONSECA; PRENTICE–HÉRNANDEZ, 2012). Segundo o Art. 313 do RIISPOA (1997), entende–se por gelatina o produto obtido por hidrólise térmica, química ou enzimática (ou a combinação de ambas), da proteína colagênica de cartilagens, tendões, peles, aparas ou de ossos de diferentes espécies de animais, purificado, filtrado, esterilizado, concentrado e seco. Conforme a Associação Brasileira das Indústrias Alimentícias – ABIA (2017), em 2017 foram produzidas 450 mil toneladas de gelatina no mundo, sendo a maior parte (43%) extraída de proteína suína, seguida da proteína bovina (32%) e, em terceiro lugar de ossos (23%), gerando um faturamento superior a US$ 1,2 bilhões.

Físico–quimicamente, a gelatina é determinada pela sequência de aminoácidos das moléculas, pela estrutura espacial resultante e, também, pelas condições do ambiente (pH, força

iônica e reações) (KOLODZIEJSKA et al., 2008; PAPIN, 2011). De forma simplificada, o processo industrial para obtenção da gelatina ocorre em três etapas: pré–tratamento da matéria–prima (para remover os componentes não colagenosos e intumescer o colágeno, desnaturando assim a molécula), extração da gelatina (elevação da temperatura da solução) e purificação/secagem (BANDEIRA et al., 2017; KARIM; BHAT, 2009; SANTOS et al., 2018). Com a desnaturação há o desenrolamento da estrutura em tripla–hélice em cadeias individuais solúveis, ou pequenos polímeros ou fragmentos (WOLF, 2003). O tratamento térmico cliva as pontes de hidrogênio e ligações covalentes, desestabilizando a tripla–hélice, resultando na conversão em gelatina solúvel (CATALINA et al., 2010; GÓMEZ–GUILLÉN et al., 2011). A gelatina ao resfriar–se, as cadeias podem retroceder à novas estruturas de tripla–hélice, não necessariamente na conformação exata da estrutura do colágeno nativo, o que limita a reorganização da molécula helicoidal, mas que é essencial para que ocorra a gelificação (WOLF, 2003). Apesar da cinética de gelificação ser complexa, as triplas–hélices tendem a se agrupar e alinhar–se paralelamente para formar regiões microcristalinas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Conforme o tipo de preparo e a fonte de matéria–prima, a gelatina pode classificada em dois tipos: Tipo A, obtidas a partir de uma hidrólise ácida (ponto isoelétrico entre 6,0 – 9,5); ou Tipo B, obtidas por hidrólise básica (ponto isoelétrico entre 4,5 – 5,6) (CHÁVEZ; HELLSTRAND; HALLE, 2006), como mostra a Figura 3 que elucida o processo de extração de ambas as gelatinas.

Figura 3 – Processo de extração de gelatina do Tipo A e Tipo B



Fonte: Adaptado de Moreira (2018).

No Tipo B, durante a desnaturação a tripla hélice do colágeno é hidrolisada nos pontos em que as ligações cruzadas covalente se unem aos três peptídeos, quebrando uma das ligações iniciais (piridinolina), resultando na desnaturação em solução das cadeias α do colágeno, quando há o aquecimento. Nas gelatinas do Tipo A, a desnaturação do colágeno limita–se a hidrólise térmica das ligações peptídicas, tendo apenas uma pequena quantidade do material da cadeia α solúvel em solução ácida (CHÁVEZ; HELLSTRAND; HALLE, 2006).

3.4.1 Fontes de gelatina

A gelatina, por ser extraída a partir matérias-primas de tecido conjuntivos de animais, pode ser obtida de diferentes tipos de animais, como por exemplo mamíferos, répteis e pescados.

Entre as fontes de matérias-primas mais utilizadas pelas indústrias para a extração de gelatina encontram-se os bovinos e suínos, devido ao fato de estes obterem maiores propriedades mecânicas, maiores temperaturas de fusão e de gelificação (CHIOU et al., 2006; GUDMUNDSSON, 2002; PANG et al., 2017; SHAKILA et al., 2012). As fontes de tecidos conjuntivos desses animais mais utilizadas são peles e ossos e, apesar do processo de extração possuir diferenças para peles e ossos, devido a composição de aminoácidos dessas fontes fazer com que cada proteína tenha uma distribuição diferente de carga dependente do pH, o tipo mais produzido é o Tipo A. Isso ocorre porque, apesar de a gelatina ser muito utilizada como matéria-prima na indústria farmacêutica, a indústria alimentícia, para panificação e confeitaria, ainda tem um maior percentual de consumo. Sendo assim, as gelatinas, principalmente bovinas, do Tipo A são as mais indicadas para a formação de espuma, aeração e emulsificação. Esse comportamento acontece pelas diferentes cargas de superfície em função do pH, levando a uma maior ou menor desconvolução das moléculas, também conhecido como comportamento anfoérico (GELITA, 2020).

Apesar de as fontes de matérias-primas de mamíferos serem as mais utilizadas para obtenção de gelatina, mercados consumidores religiosos, como judeus e muçulmanos, não consomem produtos procedentes destes animais (KARIM; BHAT, 2009). Desse modo, a procura por fontes alternativas para a extração de gelatina se torna extremamente necessária, já que se trata de uma comunidade com 30 milhões de pessoas: 27 milhões sendo muçulmanos, com 16% deles não abrindo mão do abate halal tradicional, e os outros 3 milhões correspondendo a judeus (MARONI, 2019).

3.4.2 Gelatina de pescado

Projetando a crescente demanda dos consumidores halal e kosher, assim como o aumento das doenças oriundas de mamíferos, como bovinos e suínos, e no intuito de fornecer um maior destino para os resíduos gerados durante suas etapas de produção, as indústrias de processamento pesqueiro tem investido na fabricação de gelatina a partir de tecidos conjuntivos de pescado (NIU et al., 2013). Dessa forma, ao invés de conseguir um aproveitamento de no máximo 40% em massa do seu produto, as indústrias de beneficiamento conseguem aumentar esse percentual e agregar valor à cadeia produtiva do pescado, produzindo um sub-produto consolidado no mercado consumidor, como a gelatina (HUANG et al., 2017; KOLODZIEJSKA et al. 2008; LV et al., 2019).

Segundo Kolodziejska et al. (2008), devido às diferenças nas propriedades físicas e químicas dos resíduos de bovinos e suínos em relação aos resíduos de pescados, o método de extração do colágeno para elaboração de gelatina de pescado com boas propriedades reológicas (viscosidade), força de gel e ponto de fusão deve ser diferente. Pois, além da temperatura de extração ser mais moderada, deve–se considerar a espécie de peixe e a sua origem (águas frias ou quentes), para depois definir, quais os pré–tratamentos aplicar e em quais condições. Essas diferenças estruturais ocorrem de acordo com o conteúdo elevado de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) presente na estrutura do tecido animal. Avena-Bustillos et al. (2011) relatam que peixes de águas tropicais apesar de apresentarem menores conteúdos de hidroxiprolina e prolina, compensam com altas concentrações de serina e treonina; e que as soluções de gelatina de peixes de água fria são desejáveis para aplicações em sorvetes, iogurtes, géis de sobremesa, confeitos, entre outros, por serem líquidos viscosos à temperatura ambiente.

Os procedimentos utilizados para o preparo de gelatina de pescado envolvem, tipicamente, um pré–tratamento químico suave da matéria–prima, e as condições de temperatura durante o processo de extração são mais brandas que as utilizadas na extração de gelatina de mamíferos (KARIM; BHAT, 2009). Apesar de diferentes métodos de extração utilizados para a obtenção de gelatina de pescado, estas vem apresentando valores satisfatórios de rendimento em proteínas e de força de gel, quando comparados com extrações de gelatina de mamífero, como apresenta a Quadro 1.

Através do Quadro 1 é possível identificar que Bandeira et al. (2017) ao extrair gelatina de peles e ossos de corvina encontrou resultados superiores de rendimento de proteína quando comparados com os resultados encontrados por Rojas e Gozzo (2017) na extração de

gelatina de pés e couros suínos. Apesar de seus valores de força de gel terem sido inferiores, os mesmos não diferem muito dos resultados de Rojas e Gozzo (2017). Já Silva et al. (2011), apesar de terem obtido rendimentos inferiores aos de Rojas e Gozzo (2017), produziram uma gelatina com força de gel satisfatória. Estes estudos evidenciam que as gelatinas oriundas de pescado apresentam propriedades satisfatórias quando comparadas as gelatinas oriundas de mamíferos.

Quadro 1 – Métodos de extração de gelatinas de diferentes fontes animais

Autor	Objetivo	Avaliação	Resultado
Silva et al. (2011)	Extração de gelatina a partir de cabeças de carpa	Efeito da concentração alcalina (3–4 mol L^{-1}), tempo de tratamento (45–105 min), troca de solução alcalina	Rendimento: 1,5 a 2,3% Força de gel: 183 g a 199 g
Bandeira et al. (2017)	Extração de gelatina a partir de peles e ossos de corvina	Peles – 2 pré–tratamentos alcalinos e 1 ácido, 52 °C, pH 4, 120 min Ossos – moagem, 1 tratamento ácido, 20 h, 10 °C, banho 60 °C, pH 4, 120 min	Rendimento: Peles – 8,1% Ossos – 3,4% Força de gel: Peles – 219 g Ossos – 138 g
Rojas e Gozzo (2017)	2 métodos de extração de gelatina a partir de pés e couros suínos	Método 1 – imersão em ácido clorídrico 0,3% por 24 h, banho 60 °C, pH 6, 4–6 h Método 2 – imersão em ácido acético 4,5 % por 4 h, banho 65 °C, 6 h	Rendimento: Pés – 2,07% Couro – 4,11% Força de gel: Pés – 243,67 g Couro – 231,33 g
Ahmad et al. (2018)	Extração de gelatina a partir de peles bovinas	Pré–tratamento alcalino com NaOH 0,1 M, 25 °C, 6 h, pré–tratamento ácido com HCL 1%, 25 °C, 20 h e incubação com bromelina (20 unid. g^{-1} pele), 35 °C, pH 6,0 e banho 90 °C, 15 min. Extração com banho ultrassônico (53 kHz, 500 W), 60 °C, 2, 4 e 6 h	Rendimento: 2 h – 7,09% 4 h –15,65% 6 h – 19,71% Força de gel: 2 h – 475,26 g 4 h – 631,90 g 6 h – 595,51 g

3.4.3 Gelatina modificada

Com o intuito de melhorar as propriedades funcionais de gelatinas de pescado em relação as de mamífero, estudos vêm sendo realizados com foco na reticulação química de

gelatinas de pescado (SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2011; URUNGA et al. 2019). A estabilidade de uma rede de gel frente às forças térmicas e mecânicas é dependente do número e dos tipos de ligações cruzadas formadas por cadeia de monômero (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A reticulação se caracteriza pela incorporação de ligações covalentes cruzadas inter e intramoleculares, que atuam na estabilização da rede do gel, dificultando a transição molecular (YAN et al., 2011). Estas ligações podem estabilizar as regiões em tripla–hélice, melhorando a resistência mecânica. O mecanismo inter–helicoidal é formado entre duas cadeias polipeptídicas de hélices adjacentes, o que faz a massa molar aumentar, influenciando nas propriedades de intumescimento e flexibilidade da gelatina (CATALINA et al., 2010). Inicialmente os métodos químicos de reticulação faziam uso de compostos tóxicos, como formaldeído e glutaraldeído, o que acabava limitando sua aplicação. Em função disto, estudos têm sido focados para o uso de compostos naturais atóxicos, como por exemplo sais (ALFARO; FONSECA; PRENTICE–HÉRNANDEZ, 2012), compostos fenólicos (YAN et al., 2011), além de enzimas (KOLI et al., 2011).

Alfaro, Fonseca e Prentice–Hérnandez (2012) estudaram vários agentes de reticulação, na gelatina a partir de tilápia *(Oreochromis urolepis hornorum)* em duas diferentes concentrações (sacarose a 4% e 8%, glicerol 5% e 10%, NaCl a 0,3 e 0,8 mol L^{-1}, $MgCl_2$ a 0,3 e 0,8 mol L^{-1}, $MgSO_4$ a 0,3 e 0,8 mol L^{-1}, KCl a 0,3 e 0,8 mol L^{-1} e transglutaminase a 10 e 15 mg mL^{-1}). Os autores concluíram que houve aumento na viscosidade em qualquer das concentrações utilizadas, e que melhorias das propriedades reológicas ocorreram dependendo da concentração utilizada para cada sal, com a maior força do gel encontrada após adição de $MgSO_4$ 0,8 mol L^{-1}.

Santos et al. (2018) avaliaram o efeito da reticulação química nas gelatinas de ossos e peles de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para produção de filmes biopoliméricos. As gelatinas, concentradas a 66,7 g L^{-1}, foram reticuladas com $MgSO_4$ (0,8 mol L^{-1}), NaCl (0,3 mol L^{-1}), ácido gálico (0,02 mol L^{-1}) e ácido cítrico (0,03 mol L^{-1}), em banho a 45 °C, por 30 min. Os filmes foram obtidos pela técnica *casting*, com concentração de 2% de gelatina e 0,20 g de glicerol. A gelatina obtida a partir de peles apresentou rendimentos em massa e em hidroxiprolina, propriedades físico–químicas e reológicas superiores quando comparada a gelatina obtida de ossos, sendo que as oriundas de tilápia se sobressaíram sobre as de carpa. Com a reticulação, o ácido gálico apresentou–se como o melhor agente reticulante quanto as propriedades de gel, ponto de fusão, temperatura de gelificação e viscosidade.

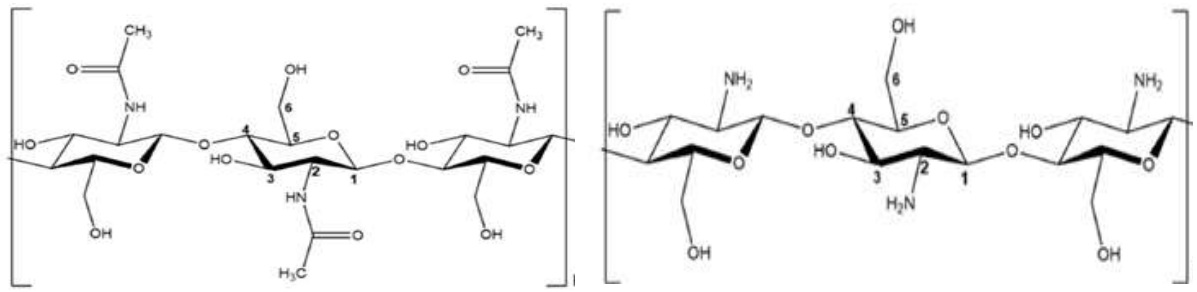
3.5 QUITOSANA

Obtida pela desacetilação alcalina de α-quitina, a quitosana é extraída a partir de carapaças de crustáceos e parede fúngica (MAJETI; KUMAR, 2000; PONTONI; FABBRICINO, 2012). Quando o número médio de unidades N-acetil-D-glucosamina por 100 monômeros é inferior a 50%, a quitina torna-se solúvel em soluções aquosas, com pH inferior a 6,0, sendo então chamada de quitosana (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Assim, a solubilização ocorre devido a protonação de grupos $–NH_2$ ao longo da cadeia polimérica, permitindo a interação eletrostática entre o polissacarídeo e as espécies aniônicas, devido a formação de $–NH_3$ (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007). Além disso, como os grupamentos hidroxilas dos carbonos 3 e 6 podem ser protonados, ela torna-se mais reativa (CRINI; BADOT, 2008). A Figura 4 apresenta a estrutura química da quitina e da quitosana.

A quitosana possui um alto valor econômico, por ser biocompatível com diversos polímeros, além de ser biodegradável e não tóxica. Suas propriedades e características físico-químicas estão relacionadas a sua massa molar média e ao teor de grupos amino primários contidos nos resíduos de glucosamina (ARANAZ et al., 2009).

Devido a presença dos grupamentos amino e hidroxila, em pH ácido apresentam boas propriedades antimicrobianas e de formação de filmes (QUIU et al., 2014). Apesar disso, a inserção de quitosana em filmes à base de gelatina pode ocasionar o aumento da permeação ao vapor d'água dos filmes, tornando-se necessária a incorporação de compostos lipídicos à matriz filmogênica com o intuito de agregar uma característica de hidrofobicidade a esta (BENTTAÏEB et al., 2014; BANDEIRA et al., 2015).

Figura 4 – Estrutura química (a) quitina e (b) quitosana



(a) Quitina **(b) Quitosana**

Fonte: Moura (2018).

3.6 COMPONENTES LIPÍDICOS

Um componente lipídico é definido como um produto natural, amplamente distribuído na natureza como, por exemplo, em animais e vegetais, que inclui ácidos graxos, esteroides, terpenos, carotenoides e hidrocarbonetos em suas moléculas. São insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos não polares, como éster dietílico, benzenos, hexanos, metanol ou clorofórmio. Dentre os compostos lipídicos mais conhecidos, encontram-se as ceras, as gorduras e os óleos (SOLOMONS; FRYLE, 2006).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), óleos e gorduras são constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos, que podem conter fosfolipídios, constituintes insaponificáveis, ácidos graxos livres ou outros lipídios, desde que presentes em pequenas quantidades.

Dependendo das condições ambientes de temperatura e pressão, podem possuir consistência líquida viscosa, apresentando-se como óleos, ou sólida, sendo chamados de gorduras (SOLOMONS; FRYLE, 2006). Devido ao seu grande uso pela indústria alimentícia, doméstica e por alguns tipos apresentarem diversos benefícios à saúde humana, como atividade cardioprotetora e antioxidante, os óleos possuem um maior valor econômico e interesse de produção (ENGELMANN et al., 2018).

De maneira análoga, os óleos possuem de uma a quatro insaturações na cadeia carbônica com ponto de fusão menor, o que faz com que haja uma diminuição da atração de Van der Waals entre as moléculas, e assim são líquidos à 25 °C (SOLOMONS; FRYLE, 2006). Os óleos são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água), formadas em maior parte por ésteres de triacilgliceróis, resultante da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos, podendo ser extraídos tanto de matéria-prima animal (cabeças e vísceras), ou vegetal (CRÉXI et al., 2012; ENGELMANN et al., 2018).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, livres ou esterificados. Os saturados apresentam apenas ligações simples entre os carbonos, com pouca reatividade química. Enquanto, os insaturados dispõem de uma ou mais ligações duplas, sendo mais reativos e suscetíveis a termo-oxidação. Podem ser mono, di ou triacilgliceróis (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

3.6.1 Compostos lipídicos de pescado

Apesar de serem importantes fontes de nutrição no desenvolvimento da saúde humana, muitos lipídios apresentam baixa taxa de conversão, tornando-se necessária uma reposição externa (SILVA; MIRANDA JÚNIOR; SOARES, 2007).

Dentre os tipos de lipídios, os ácidos graxos (AG), constituintes estruturais de membranas celulares, com funções de reserva metabólica e energéticas, possuem uma classe denominada de ácidos graxos essenciais (AGE). Os AGE de maior interesse são os ácidos da família ômega 3 (ω-3) e ômega 6 (ω-3) (SILVA; MIRANDA JÚNIOR; SOARES, 2007). Sendo estes, precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa: ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). (FELTES et al., 2009; SILVA; MIRANDA JÚNIOR; SOARES, 2007).

No meio científico, os ácidos ω-3 possuem maior interesse de estudo, devido aos benefícios que proporcionam à saúde humana, como ação anti-inflamatória, propriedades anticoagulantes, anti-hipertensivas, regulações do metabolismo lipídico e apoio ao funcionamento do sistema nervoso central e à visão (KAYZER et al., 2010; SOKOLA-WYSOCZANSKA et al., 2018).

Os ácidos ω-3 são comumente encontrados em peixes de água fria, como por exemplo salmão, bacalhau, sardinha e atum, em sementes e em alguns tipos de vegetais (MORAES; COLLA, 2006). Assim, produtos e subprodutos obtidos a partir de pescados, como por exemplo óleo, ácidos graxos livres e concentrados, irão conter um grande percentual desses ácidos, dependendo da espécie, origem e alimentação do mesmo (ENGELMANN et al., 2018; FELTES et al., 2009).

Como os ácidos ômega 3 são considerados essenciais para o desenvolvimento e funcionalidade de certos órgãos, bem como para diversos processos bioquímicos e fisiológicos do organismo humano, as indústrias alimentícias e farmacêuticas tem investido na produção de diferentes produtos, como cápsulas de óleo de pescado contendo ω-3, cremes, margarinas, entre outros produtos (ENGELMANN et al., 2018; LIU et al., 2006; NAVARRO et al., 2004). Desse modo, o mercado apresenta-se favorável e receptível à inserção de novos produtos que incorporem os ácidos da família ω-3, como por exemplo na produção de filmes biopoliméricos para produção de embalagens ativas, onde esta fração lipídica poderia ter não só um papel como barreira ao vapor d’água, mas também fornecendo propriedades funcionais ao alimento que estiver em contato (CAI et al., 2019; MOURA, 2018).

3.7 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE GELATINA

Os filmes biopoliméricos são utilizados para melhorar a qualidade ou estender a vida útil de alimentos, atuando como barreira à umidade, ou no controle de mudanças fisiológicas, microbiológicas e/ou físico–químicas, ou, ainda, como veículo para aditivos,

enriquecendo e protegendo alimentos. Assim, os filmes biopoliméricos, tornam–se cada vez mais, as melhores alternativas para tentar reduzir o impacto ambiental provocado pela lenta degradação das embalagens de polímeros sintéticos (FERNANDES et al., 2015).

A formulação dos filmes biodegradáveis implica na utilização de pelo menos um componente capaz de formar uma matriz, tendo coesão e continuidade suficiente. De acordo com a literatura, esses filmes são comumente elaborados a partir de polissacarídeos, proteínas e lipídios (BERTAN, 2003; FERNANDES et al., 2015). Na formação de filmes, o uso de gelatina torna–se uma grande alternativa pois, além de seu baixo custo de aquisição, ela é biodegradável, biocompatível, e a sua estrutura permite múltiplas combinações de interações moleculares, proporcionando razoável estabilidade (BRANDALISE, 2017; CATALINA et al., 2010). Os filmes à base de gelatina são formados quando as ligações das cadeias peptídicas, parcialmente desnaturadas, complementam ligações hidrofílicas e de hidrogênio, resultando na formação da matriz polimérica que, incorporadas com plastificantes, demonstram suficiente estabilidade, resistência e flexibilidade, permitindo sua utilização como materiais de embalagens (FENG et al., 2017; HANANI et al., 2012).

Baseada na secagem ou dispersão da solução filme–formadora, a técnica *casting* é a mais amplamente utilizada na elaboração deste tipo de filmes. Nesta técnica existe a solubilização da macromolécula em um solvente, ao qual podem ser incorporados aditivos, como plastificantes, agentes reticulantes e biomateriais com o intuito de melhorar, por exemplo, propriedades mecânicas ou de permeação. Após a solução formadora do filme é vertida em um suporte (placas de *Petri*) e levada à estufa para evaporação do solvente (DENAVI et al., 2009).

3.7.1 Filmes à base de gelatina de pescado incorporados com quitosana

Devido à natureza higroscópica e ao caráter hidrofílico da gelatina, os seus filmes tendem a inchar ou dissolver quando em contato com alimentos. Além disso, podem apresentar atividade microbiana ou fúngica e menor resistência mecânica que filmes sintéticos. Para que isso seja evitado, pode–se adicionar diferentes substâncias, como polímeros, plastificantes, compostos antifúngicos, antimicrobianos e antioxidantes (BRANDALISE, 2017; CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1998).

A quitosana é um polissacarídeo não tóxico, biodegradável, biocompatível e biofuncional, que apresenta propriedades antifúngica e antimicrobiana (LI et al., 2013). Ao ser aplicada em filmes, apresenta boa resistência mecânica, porém com propriedades de permeação e transferência de água inferiores à dos filmes de gelatina puro (HOSSEINI et al., 2013). A

presença dos grupamentos amina e hidroxila é a característica que fornece à quitosana propriedades antimicrobianas. Entretanto, o grau de sua ação irá depender de seu grau de desacetilação, da sua massa molar e do tipo de organismo alvo, relacionados ao pH do meio e a presença de solutos. Caso estes reajam com a quitosana por interações eletrostáticas e/ou ligação covalente, a reatividade dos grupamentos amina e hidroxila poderá ser limitada (NO et al., 2007).

Na literatura, poucos são os estudos a respeito de filmes compostos de gelatina e quitosana; e ainda menos, quando se trata da influência das características químicas da quitosana nas propriedades físico–químicas de filmes à base de gelatina de pescado. Segundo estudos de Bandeira et al. (2015), Benttaieb et al. (2014) e Pereda et al. (2011), a adição de quitosana aos filmes à base de gelatina promove melhorias na sua tensão de ruptura. Entretanto, também aumentam a permeação ao vapor de água. No entanto, esta característica pode ser melhorada com a adição de agentes hidrofóbicos, aos filmes de gelatina/quitosana.

3.7.2 Filmes emulsionados

Apesar de filmes à base de gelatina de pescado e incorporados com quitosana apresentarem melhores propriedades de barreira microbiana, barreira ao oxigênio (O_2) e ao dióxido de carbono (CO_2) em baixa umidade relativa, devida a sua estrutura ordenada, compactada e de alta hidrofilicidade, esses filmes ainda apresentam o problema de serem barreiras pouco eficientes ao vapor de água (TONGNUANCHAN et al., 2015). Uma alternativa para esse problema é a incorporação de um componente lipídico para a formação de filmes emulsionados, devido ao seu caráter hidrofóbico.

Filmes emulsionados consistem na dispersão de fração lipídica na matriz filmogênica, por meio de uma homogeneização, formando uma emulsão que posteriormente é submetida à secagem para remoção do solvente (THE et al., 2009). Devido a sua natureza apolar, o uso de lipídios tem sido mais explorado em filmes multicomponentes para embalagens ativas, pois além de reduzirem o transporte ao vapor de água, tem propriedades antibactericidas (MOURA, 2018). Aditivos poliméricos, são boas alternativas para estabilizar e formar a emulsão por um efeito eletro–estérico. Isso porque são substâncias anfifílicas que interagem com a fase descontínua (lipídios) e com a contínua (carboidratos, proteínas, etc), simultaneamente (NARSIMHAN, 2009; TONGNUANCHAN et al., 2015; VARGAS et al., 2009; WANG et al., 2014).

A obtenção de óleo a partir de resíduos gerados pelo beneficiamento de pescados representa uma alternativa para utilização da fração lipídica, evitando o desperdício e diminuindo o impacto ambiental causado pelos mesmos. Por constituir uma importante fonte de ácidos graxos insaturados, o óleo de pescado é usado preferencialmente como matéria–prima para obtenção destes ácidos graxos (PAIM et al., 2012). Além disso, os resíduos gerados no processamento de pescado (até 60% m/m da matéria prima) podem ser reaproveitados para a extração deste óleo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS–PRIMAS

O colágeno utilizado como matéria–prima para obtenção da gelatina de pescado, foi extraído de peles de carpa comum (*Cyprinus carpio*), obtido em piscicultura localizada no município de Teutônia/RS. A quitosana foi obtida utilizando como matéria–prima os resíduos de camarão (cascas e cabeças) (*Farfantepenaeus brasiliensis*). O óleo branqueado e, consequentemente, os ácidos graxos livres, foram obtidos de cabeças de atum (*Thunnus thynnus*). Esses resíduos foram obtidos de indústria localizada no município de Rio Grande–RS. Todos materiais foram acondicionados em caixas térmicas com gelo, e transportados até o Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI) da Escola de Química e Alimentos (EQA), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde permaneceram armazenados em *freezer*, dentro de embalagens plásticas, à temperatura de –18 °C, até sua utilização.

A gelatina bovina tipo A foi obtida comercialmente da Vetec, Brasil. Para o processo de modificação das gelatinas, foi utilizado o agente reticulante não–eletrólito ácido gálico, da Vetec, Brasil. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e todos os resíduos gerados foram descartados conforme normas da universidade.

4.2 PRODUÇÃO DE GELATINAS

4.2.1 Obtenção de gelatina de peles de carpa

A obtenção da gelatina a partir de peles de carpa comum (*Cyprinus carpio*) foi realizada conforme estudos prévios de Santos et al. (2018) e Silva et al. (2014). Após os três pré–tratamentos apresentados no Quadro 2, o material (peles intumescidas) foi submergido em água destilada (1:1 m/v), com pH ajustado a 4,0 com solução de HCl 3 mol L^{-1}, e iniciou–se o processo de extração da gelatina, com um banho termostatizado à 52 °C, por 2 h. A solução final foi filtrada em funil de Bücher com papel filtro Whatman n° 4, à vácuo. A Figura 5 apresenta o fluxograma do processo de extração das gelatinas.

Quadro 2 – Pré–tratamentos para obtenção de gelatina de peles de carpa.

Pré–tratamento alcalino 1	Pré–tratamento alcalino 2	Pré–tratamento ácido
• 100 g de peles de carpa cortadas em quadrados de 1 × 1 cm; • Intumescimento das peles com água destilada (1:1 m/v), pH ajustado para 11 com solução de NaOH 3 mol L^{-1}, sob agitação constante por 15 min; • O material foi drenado com peneira e lavado em água corrente até pH neutro.	• Intumescimento do material com nova solução em água destilada (1:1 m/v), pH ajustado novamente até 11 com solução de NaOH 3 mol L^{-1}, sob agitação constante por 60 min; • O material foi então drenado novamente com peneira e lavado em água corrente até pH neutro.	• Suspensão do material em água destilada (1:1 m/v), com pH ajustado a 2, com solução de HCl 3 mol L^{-1} por 15 min; • Drenagem do material com peneira e, na sequência, lavagem com água destilada (1:1 m/v).

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2018); Silva et al. (2014).

Figura 5 – Fluxograma do processo de extração de gelatina a partir de peles de pescado

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2018); Silva et al. (2014)

4.2.2 Clarificação das gelatinas

A etapa de clarificação, para remoção de impurezas presentes nas soluções de gelatinas de peles, foi realizada de acordo com estudos prévios (SANTOS et al., 2018; SILVA, 2013). As soluções foram clarificadas com carvão ativado (1 g de carvão por kg de solução de gelatina). Após a adição deste à solução, a mistura permaneceu sob agitação constante durante 120 min, a 35 °C. A mistura foi então centrifugada (Sigma 6–15, D–37520, Alemanha) a 6600×g, por 20 min, para maior separação do agente clarificante (carvão ativado). Após, foi preparada uma pré–capa de terra diatomácea (500 g m^{-2} de filtro), para remoção do agente clarificante que ainda estava presente na solução de gelatina. A adição da terra diatomácea ao volume de água destilada, para formar a suspensão de pré–capa, foi na proporção de 0,4 g/100 mL^{-1}. A filtração ocorreu com um funil de Bücher à vácuo e papel filtro Whatman n° 4 como base para a pré–capa.

4.2.3 Modificação das gelatinas

A modificação das gelatinas de peles de carpa comum ocorreu com uma solução de gelatina concentrada em 66,7 g L^{-1} e adição do agente reticulante orgânico não–eletrólito, ácido gálico, na concentração de 20 mg g^{-1} de gelatina. A solução foi mantida em agitação constante, à temperatura de 45 °C por 30 min em banho termostatizado, a fim de que ocorresse a completa homogeneização da mesma (SANTOS et al. 2018; TAVASSOLI-KAFRANI; GOLI; FATHI, 2017; XU; XUC; YANG, 2015).

4.2.4 Liofilização das gelatinas

As soluções de gelatina, controle e reticulada, foram depositadas separadamente em placas de *petry* de acrílico, cobertas com filme plástico e submetidas ao congelamento à –80°C durante 72 h. Ao término, os filmes plásticos foram furados e as placas foram rapidamente colocadas nas prateleiras do liofilizador (Liobras, L108), que operou a uma pressão entre 40 e 50 µHg, na temperatura de –54 °C, durante 72 h. Ao término, as amostras foram retiradas, colocadas dentro de potes de vidro com tampas herméticas e armazenados em dessecador, com 10% U.R., a 25 °C até o uso para as posteriores análises.

4.3 PRODUÇÃO DE QUITOSANA

Para a produção de quitosana, uma massa de 7 kg de resíduos de camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*) foi utilizada para extração de quitina pelas etapas de desmineralização, desproteinização e desodorização (WESKA et al., 2007). A produção de quitosana foi realizada a partir da desacetilação da quitina (diâmetro médio de1 mm), com solução de NaOH 45% (m/v), à temperatura de 135±1 °C, durante 240 min. Utilizou–se a relação em massa de solução (NaOH:quitina) de 20:1, conforme estudos prévios de Moura et al. (2015). A quitosana obtida foi purificada e seca, em secador tipo leito de jorro, à 95 °C com vazão de alimentação de 0,18 $kg_{pasta}kg^{-1}_{inerte}h^{-1}$, até a umidade comercial de 10% (base úmida) (DOTTO; PINTO, 2011).

4.4 PRODUÇÃO DE ÓLEO DE CARPA BRANQUEADO

A extração termomecânica do óleo de cabeça de atum (*Thunnus thynnus*) e as etapas do refino (degomagem, neutralização e branqueamento) foram realizadas conforme Créxi et al. (2010).

As cabeças de atum, descongeladas sob refrigeração durante 24 h, foram trituradas com o auxílio de uma extrusora alimentícia e submetidas a cocção em autoclave (Rochedo – modelo Idealclave, Brasil), durante 30 min a 100 °C. Após, o material foi prensado e o licor de prensa foi centrifugado (Sigma 6–15, D–37520, Alemanha), com rotação de 7000 × g, a 40 °C, durante 20 min. O óleo que ficou no sobrenadante foi então retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em vidros âmbar. Após, o óleo branqueado foi obtido a partir das etapas de degomagem, neutralização e branqueamento, como a Figura 1A no Apêndice 1.

4.5 OBTENÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Os ácidos graxos livres (AGL) foram obtidos a partir de uma hidrólise química do óleo branqueado de cabeça de atum (*Thunnus thynnus*), realizado em um reator, com aquecimento, à vácuo, sob constante agitação, de acordo com a metodologia de Créxi et al. (2012). Ao óleo foi adicionado o antioxidante di–terc–butil metil fenol (BHT), na proporção de 800 mg kg^{-1} de óleo, juntamente com uma solução alcoólica de KOH em álcool etílico anidro (39:1 v/v). A mistura saponificável foi separada da insaponificável pela adição de água destilada (2:1 v/v) e hexano (4:1 v/v). A matéria saponificável separada foi acidificada com HCl 3 mol

L^{-1} e transferida para um funil de separação, e com a adição novamente de hexano (2:1 v/v), os AGL foram extraídos e secos com sulfato de sódio anidro. O material excedente foi removido sob aquecimento a 40 °C, com vácuo de 700 mm Hg, com o intuito de recuperar os AGL.

4.6 DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS

Todos os filmes biopoliméricos foram obtidos em triplicata, utilizando–se, separadamente, gelatina bovina e gelatina de peles de carpa reticulada e não–reticulada.

4.6.1 Filmes de gelatina e gelatina reticulada

Os filmes biopoliméricos foram elaborados conforme Bandeira et al. (2015) seguindo a técnica *casting*. Uma massa de 1,8 g de gelatina ou gelatina modificada e 0,20 g de glicerol foram adicionados a 100 mL de água destilada em um béquer, sob aquecimento à 35 °C. O pH da solução foi ajustado para 4,0, utilizando NaOH 0,10 mol L^{-1}, sob agitação magnética de 600 rpm, durante 30 min. Então, 17 mL das soluções filmogênicas foram vertidas em placas de *Petri* de acrílico, com 90 mm de diâmetro, e secas em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C durante 24 h. Para remoção dos filmes e realização das análises, primeiramente as placas, após a etapa de secagem, foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C e 75 % de umidade relativa (UR), durante 48 h.

4.6.2 Filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana

Os filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana, foram obtidas conforme estudos de Bandeira et al. (2015) e Moura (2018). Inicialmente 0,2 g de quitosana foram dissolvidas em 20 mL de solução de ácido acético (0,1 mol L^{-1}), sob agitação constante de 300 rpm, durante 2 h. Em seguida, foram adicionados 30 mL de solução de gelatina ou gelatina reticulada (5,3% m/v) e 0,2 g de glicerol, com pH ajustado para 4,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}, sob agitação magnética constante de 300 rpm, por 2 h. Então, 17 mL das soluções filmogênicas foram vertidas em placas de *Petri*, com 90 mm de diâmetro, e secas em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C, por 24 h. Para remoção dos filmes e realização das análises, primeiramente as placas, após a etapa de secagem, foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C e 75 % de umidade relativa (UR), durante 48 h.

4.6.3 Filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana e óleo de atum

Os filmes à base de gelatina e gelatina reticulada incorporando quitosana e óleo de pescado foram obtidos conforme Bandeira et al. (2015), Moura (2018) e Santos et al. (2018). Inicialmente 0,2 g de quitosana foram dissolvidas em 20 mL de solução de ácido acético (0,1 mol L^{-1}), sob agitação constante de 300 rpm, durante 2 h. Em seguida, foram adicionados 30 mL de solução de gelatina ou gelatina reticulada (4,7% m/v) e 0,2 g de glicerol, com pH ajustado para 4,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}, sob agitação magnética constante de 300 rpm, por 2 h. Após, foram adicionados 0,10 g de Tween 80 e 10% de óleo de pescado, em relação a massa total dos sólidos secos. A emulsão foi formada por agitação à 25000 × g, por 10 min. Então, 17 mL das soluções filmogênicas foram vertidas em placas de *Petri*, com 90 mm de diâmetro, e colocadas em secador com circulação de ar forçada a 40 °C, por 24 h. Para remoção dos filmes e realização das análises, primeiramente as placas, após a etapa de secagem, foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C e 75 % de umidade relativa (UR), durante 48 h.

4.6.4 Filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana e ácidos graxos livres (AGL)

Os filmes à base de gelatina e gelatina reticulada, incorporando quitosana e AGL foram obtidos conforme Bandeira, et al. (2015), Moura, (2018) e Santos et al. (2018). Inicialmente 0,2 g de quitosana foram dissolvidas em 20 mL de solução de ácido acético (0,1 mol L^{-1}), sob agitação constante de 300 rpm, durante 2 h. Em seguida, foram adicionados 30 mL de solução de gelatina ou gelatina reticulada (4,7% m/v) e 0,2 g de glicerol, com pH ajustado para 4,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}, sob agitação magnética constante de 300 rpm, por 2 h. Após, foram adicionados 0,10 g de Tween 80 e 10% de AGL, em relação a massa total dos sólidos secos. A emulsão foi formada por agitação à 25000 × g, por 10 min. Então, 17 mL das soluções filmogênicas foram vertidas em placas de *Petri*, com 90 mm de diâmetro, e colocadas em secador com circulação de ar forçada a 40 °C, por 24 h. Para remoção dos filmes e realização das análises, primeiramente as placas, após a etapa de secagem, foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C e 75 % de umidade relativa (UR), durante 48 h.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

4.7.1 Caracterização das soluções de gelatina

4.7.1.1 Composição centesimal

As composições proximais das peles *in natura* e das gelatinas foram determinadas seguindo metodologias oficiais AOAC (1995), em triplicata, conforme o Quadro 3.

Quadro 3 – Metodologias oficiais AOAC para determinação das composições proximais das peles *in natura* de carpa comum e das gelatinas obtidas

Análise	Identificação	Observação
Umidade	n° 950.46	Estufa à 105 °C
Cinzas	n° 920.153	Mufla à 500 °C
Lipídios	Bligh–Dyer (1959)	Mistura clorofórmio/metanol
Nitrogênio total	Kjeldahl n° 928.08	Fator 6,25 de proteína bruta

4.7.1.2 Rendimento em massa

O rendimento em massa das gelatinas foi realizado conforme Yang et al. (2008), calculado pela Equação 1.

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

sendo RG o rendimento em gelatina ($g_{gelatina}\ 100\ g^{-1}_{amostra}$), $C_{gelatina}$ a concentração de gelatina ($g\ mL^{-1}$), $V_{solução}$ o volume da solução de gelatina extraída (mL) e $m_{amostra}$ a massa da amostra (g).

4.7.1.3 Rendimento em hidroxiprolina

Determinado conforme a AOAC n° 990.26 (AOAC, 1995), o teor de hidroxiprolina foi obtido por espectrofotometria a 560 nm, utilizando como padrão L–hidroxiprolina (Sigma–Aldrich, EUA).

Uma massa de 4 g da gelatina controle em pó foi hidrolisada com ácido sulfúrico, em estufa, a 105 °C, durante 16 h. Após, foram filtradas, diluídas e oxidadas com Cloramina–T (sigma–Aldrich, EUA), como reagente para pirrole. Para leitura no espectro, adicionou–se 4–dimetilaminobenzaldeído, resultando em uma coloração púrpura para a amostra. Com o valor da absorbância, calculou–se o teor de hidroxiprolina conforme Equação 2.

$$H=\frac{2,5h}{mV} \quad (2)$$

sendo H o teor de hidroxiprolina (g kg^{-1}), h a absorbância obtida no espectrofotômetro, m a massa da amostra (g) e V o volume do filtrado para diluição em balão de 100 mL. A recuperação de gelatina foi calculada com base na massa da matéria–prima.

4.7.1.4 Força de gel

A consistência de gel foi realizada conforme a norma British Standard, método BS 757 (BSI, 1975). Incialmente, 7,5 g de gelatina em pó (bovina, controle ou reticulada) foram transferidos para béqueres de 150 mL e adicionados com 105 mL de água destilada. Estes permaneceram por 2 h, a 25 °C sem agitação, para então serem aquecidos a 55 °C, durante 30 min, com agitação leve a cada 2 min, com o auxílio de um bastão de vidro. Após, o béquer contendo a solução foi tampado com plástico filme e transferido para um banho à 10 °C, por, aproximadamente, 17 h. A força de gel (em graus Bloom) foi então medida com um analisador de textura (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Reino Unido), utilizando uma sonda teflon com 12,5 mm de diâmetro, com velocidade 1 mm s^{-1}, penetrando a gelatina em 4 mm.

4.7.1.5 Viscosidade

A determinação da viscosidade das gelatinas foi baseada no método utilizado por Silva et al. (2014), utilizando como instrumento de medição um viscosímetro capilar Cannon–Fensk (Schott Gerate, GMBH – D65719, Alemanha). Um volume de 10 mL de solução de gelatina (bovina, controle ou reticulada), concentrada a 66,7 g L^{-1}, foi adicionada ao capilar, este aferido em um banho a 25 °C, e o tempo de escoamento foi contabilizado com o auxílio de um cronômetro digital. Os tempos foram utilizados para calcular a viscosidade, conforme a Equação 3.

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

sendo μ a viscosidade (g cm^{-1} s^{-1}), K a constante do viscosímetro determinada experimentalmente com um fluido de viscosidade cinemática conhecida (cm^2 s^{-2}), t o tempo (s) e ρ a massa específica da solução na temperatura do teste (g cm^{-3}), determinada por picnometria.

4.7.1.6 Temperatura de fusão

A temperatura de fusão (T_f) das gelatinas foi determinada pelo método BS 755 (BSI, 1975). Alíquotas contendo 10 mL de gelatina (bovina, controle e reticulada) foram transferidas para tubos de ensaio com tampa e inseridos em banho termostatizado à 7 °C, durante 17 h. Após, foram adicionados a cada tubo 5 gotas do indicador azul de metileno 1% e a temperatura do banho começou a ser elevada, 0,1 °C min^{-1}. A T_f foi registrada como a média entre a temperatura em que é possível visualizar o início da penetração das gotas do indicador nos géis, e a temperatura em que as soluções se encontraram completamente coradas.

4.7.1.7 Determinação do ponto de gelificação

O ponto de gelificação foi determinado conforme Muyonga, Cole e Duodu (2004). Um volume de 100 mL de solução de gelatina 66,7 g L^{-1} (bovina, controle e reticulada) foram transferidos para béqueres de 150 mL e submetidos a um banho termostático a 40 °C. Em seguida, foi adicionado em cada frasco um capilar, mantido manualmente na vertical, e iniciou–se o resfriamento, a uma taxa de 0,1 °C, a cada 2 min. A temperatura de gelificação foi registrada no momento em que o capilar permaneceu na vertical, sem o apoio manual.

4.7.1.8 Grau de reticulação

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

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

4.7.2 Caracterização da quitosana

A quitosana obtida teve sua massa molar viscosimétrica média (Mv) determinada a partir do cálculo de sua viscosidade intrínseca, utilizando como instrumento de medição um viscosímetro capilar Cannon–Fensk (Schott Gerate, GMBH – D65719, Alemanha). Cinco

concentrações de quitosana (entre 0,1 e 1,2 g L^{-1}) foram dissolvidos separadamente em um sistema solvente composto por ácido acético 0,1 mol L^{-1}, cloreto de sódio 0,2 mol L^{-1} e água destilada. Então, 10 mL de cada amostra foi adicionado, separadamente, ao capilar, este foi introduzido em um banho a 25 °C, e o tempo de escoamento de cada amostra foi contabilizado com o auxílio de um cronômetro digital. Os tempos foram utilizados para calcular a viscosidade cinemática, conforme a Equação 5. A partir da Equação 5, foi determinada a viscosidade específica (ηsp), conforme a Equação 6.

$$\nu = \frac{\mu}{\rho} = K\ t \tag{5}$$

$$\eta sp = \frac{\mu_{solução} - \mu_{solvente}}{\mu_{solvente}} \tag{6}$$

sendo ν a viscosidade cinemática ($cm^2\ s^{-1}$), μ a viscosidade dinâmica (g $cm^{-1}s^{-1}$), ρ a densidade (g cm^{-3}), K a constante do capilar ($cm^2\ s^{-2}$) e t o tempo de escoamento da amostra (s).

A partir da viscosidade específica foi estimada a viscosidade intrínseca pela equação de Huggins, segundo Weska et al. (2007), conforme a Equação 7.

$$\frac{\eta sp}{c} = [\eta] + k\,[\eta]^2 c \tag{7}$$

sendo (ηsp/c) a viscosidade reduzida ($cm^3\ g^{-1}$), k a constante de Huggins (adimensional), c a concentração das soluções (g cm^{-3}) e [η] a viscosidade intrínseca ($cm^3\ g^{-1}$) (ALSARRA et al., 2002).

A massa molar viscosimétrica média (Mv) da quitosana foi então calculada a partir do valor da viscosidade intrínseca usando a equação de Mark–Houwink–Sakurada, conforme a Equação 8.

$$[\eta] = k_V\ M_v^{\ \alpha} \tag{8}$$

sendo $k_V = 1{,}81 \times 10^{-3}$ e $\alpha = 0{,}93$, constantes estas dependentes do sistema solvente–polímero.

O grau de desacetilação das amostras de quitosana foi determinado através do método de titulação potenciométrica linear (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003; TAN et al., 1998).

4.7.3 Caracterização da fração lipídica

A fração lipídica, composta pelo óleo branqueado de cabeças de atum e ácidos graxos livres, foi realizada com a determinação dos percentuais de ácidos por análise do perfil

graxo. Para isso, utilizou–se cromatografia gasosa (Shimadzu, GCMSQP2010PLUS, EUA), com injetor *split/splitless* acoplado ao detector de massas. A interface possuiu temperatura de 280 °C e a fonte com temperatura de 230 °C. A detecção foi feita no modo *full scan*, com varredura de m/z 30 até m/z 500, com tempo de 0,2 s e modo de ionização de impacto de elétrons a 70 *e*V. As condições de operação do cromatógrafo foram injetor a 250 °C; coluna a 80 °C (temperatura inicial, 0 min); seguido de gradiente de 10 °C min^{-1} até 180 °C, e, depois 7 °C min^{-1} até a 95 °C, com temperatura final de 330 °C. O fluxo de gás He foi de 1,3 mL min^{-1}, pressão de 88,5 kPa, velocidade linear média de 42 cm s^{-1} e volume de injeção de 1 µL, com razão de *split* de 1.100. A coluna utilizada foi a *Crossbond*, com 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 um, Restek), com os compostos sendo identificados pelo tempo de retenção. O preparo das amostras foi realizado conforme o método de derivatização para amostras contendo alto percentual de ácidos graxos livres (MOURA, 2018).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.8.1 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi medida utilizando um micrômetro digital (INSITE IP54, série 3103–25, Brasil), com 1 µm de resolução. A média da espessura foi calculada utilizando–se dez medições em diferentes regiões dos filmes (HANANI et al., 2012).

4.8.2 Propriedades mecânicas

A tensão na ruptura (TR) e o alongamento na ruptura (AR) dos filmes à base de gelatina bovina ou gelatina de carpa, com ou sem reticulação, foram determinados de acordo com o método oficial D00882–00 (ASTM, 2000a), utilizando texturômetro (Stable Microsystems, SMD TA.XP2i, Reino Unido) com uma célula intercambiável de 5 kg. A distância inicial entre as garras foi de 50 mm, a uma taxa de operação de 50 mm min^{-1}. Para o preparo das amostras, estas foram cortadas com 100 mm de comprimento e 25 mm de largura. A TR (MPa) foi calculada pela Equação 9 e o AR (%) pela Equação 10.

$$TR = \left(\frac{F_{max}}{A}\right) \quad (9)$$

$$AR(\%) = \left(\frac{E}{50}\right) 100 \quad (10)$$

sendo F_{max} a carga máxima (N) necessária para puxar a amostra, A a área da secção transversal (m^2) do filme, E o alongamento do filme (mm) no momento da ruptura e 50 o comprimento inicial do filme (mm).

4.8.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor d'água dos filmes (PVA) foi determinada gravimetricamente pelo método E96 / E96M–05 (ASTM, 2000b). As películas foram seladas em células de permeação (diâmetro de 50 mm), contendo cloreto de cálcio anidro até a metade e colocadas em dessecadores a 25 °C e 75 % de umidade relativa. Pelo período de 7 dias, a cada 24 h, as amostras foram pesadas e suas massas anotadas. A PVA (g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1}) foi então calculada de acordo com a Equação 11.

$$PVA = \frac{m_{ab}}{t}\frac{L}{A \times \Delta P} \tag{11}$$

sendo PVA a permeabilidade ao vapor d'água (g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1}), m_{ab} a massa de água absorvida pelo $CaCl_2$ (g), t o tempo (s), L a média de espessura do filme (m), A área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP a diferença de pressão parcial de vapor através do filme (Pa).

4.8.4 Propriedades ópticas

As caracterizações quanto à cor e opacidade foram realizadas conforme metodologia aplicada por Rocha et al. (2013), determinadas com um colorímetro (CR 400, Minolta, EUA) por diagrama tridimensional de cores (*L*–*a*–*b*), previamente calibrado com um branco padrão; sendo os parâmetros: L = luminosidade, *a* = cromaticidade que varia de verde – vermelho), e *b* = cromaticidade que varia do azul – amarelo. O valor total da diferença de cor (ΔE) das amostras foi calculado utilizando a Equação 12 e o ângulo Hue pela Equação 13 (NÚÑEZ–FLORES et al., 2013).

$$\Delta E = \left[\left(\Delta L^{\circ}\right)^2 + \left(\Delta b^{\circ}\right)^2 + \left(\Delta a^{\circ}\right)^2\right]^{0,5} \tag{12}$$

$$H_{ab} = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \tag{13}$$

4.8.5 Transmitância UV e luz visível dos filmes

As propriedades de barreira à luz ultravioleta e luz visível dos filmes de gelatina foram medidas a um comprimento de onda entre 200 a 800 nm, com um espectrofotômetro UV–Visível (Shimadzu UV–2550, Japão) (ARFAT et al., 2017). Quanto ao valor de transparência dos filmes (VT), este foi calculado pela Equação 14, conforme metodologia de Han e Floros (1997).

$$VT = \frac{-\log(T_{600})}{L} \quad (14)$$

sendo T_{600} a transmitância fracionada a 600 nm e L é a espessura da película (mm).

4.8.6 Microscopia de eletrônica de varredura

As micrografias das superfícies dos filmes foram visualizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6010LV, Japão), com tensão de aceleração de 10 kV, conforme metodologia proposta por Goldstein et al. (1992). O preparo das amostras ocorreu por metalização destas com ouro, em câmara à vácuo (Denton Vacuum Desk Sputtering V, EUA), para que houvesse condução de energia quando fossem micrografadas.

4.8.7 Espectroscopia de infravermelho (FT–IR)

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT–IR) foi realizada com um espectrômetro PRESTIGE 21 (210,045, Japão), a uma faixa de resolução de 4500–450 cm^{-1}. A análise dos dados espectrais dos filmes produzidos foi realizada utilizando os dados de coleta no programa OriginPro 8 SR0 (V8.0724 B724, OriginLab, EUA).

4.8.8 Propriedades térmicas dos filmes

As propriedades de degradação térmica dos filmes foram realizadas utilizando calorimetria de varredura diferencial – DSC (DSC–60 Shimadzu, Japão) e um analisador termogravimétrico – TGA (modelo DTG 60, Shimadzu, Japão).

O preparo das amostras para o DSC ocorreu com a pesagem da massa destas (3–10 mg), em panelas de alumínio, próprias para análise. As panelas foram então seladas hermeticamente e digitalizadas na gama de temperatura entre 22 °C e 230 °C, com uma taxa de

base de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera com taxa de fluxo de gás nitrogênio de 50 mL min^{-1}. Como referência, utilizou–se uma panela de alumínio vazia (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010).

Para o preparo das amostras para a análise termogravimétrica (TGA) dos filmes, amostras com, aproximadamente, 5 mg de massa foram aquecidas no equipamento até 450 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera de nitrogênio com fluxo constante de 50 mL min^{-1}.

4.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Em alguns resultados, foi aplicado o teste de Tukey com uma análise de variância de comparações múltiplas para determinar as diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$), utilizando o software Estatística 7.0 (Statsoft, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

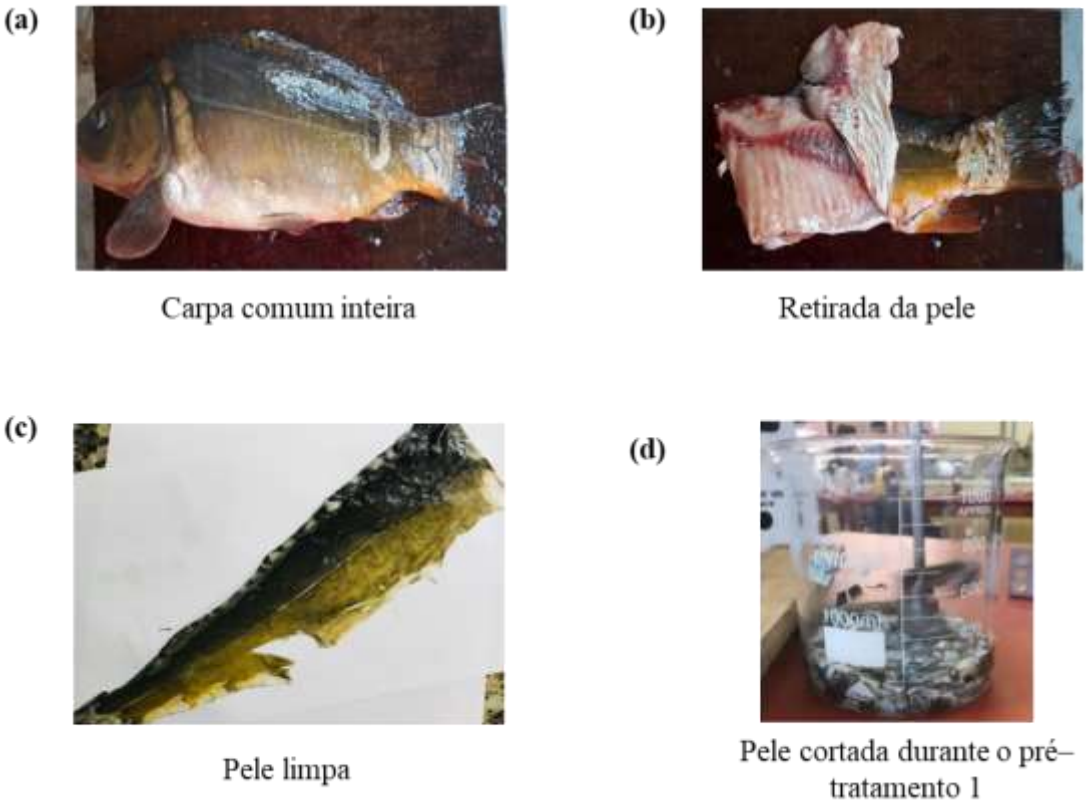
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

5.1.1 Caracterização das gelatinas

5.1.1.1 Composição proximal

A Figura 6 ilustra imagens fotográficas das matérias–prima utilizadas para extração da gelatina.

Figura 6 – Matérias–primas utilizadas para extração da gelatina de pele de carpa comum



Observa–se na Figura 6 (b) que durante a retirada da pele, pouco material cárneo ficou aderido à mesma. Mesmo assim, o excedente foi retirado manualmente pelo processo chamado descarne (Figura 6 (c)), que objetiva a retirada de materiais aderidos a pele, como carne e gordura, com o intuito de facilitar a penetração dos agentes químicos durante os pré–tratamentos posteriores, para extração da gelatina (HOINACKI; KIEFER; MOREIRA, 1994).

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de composição centesimal das peles e da gelatina obtida.

Tabela 1 – Composição centesimal das peles e gelatina extraída clarificada.

Análise	Peles *in natura*	Gelatina
Umidade (%, m m^{-1})	66,37 ± 0,20	11,02 ± 0,01
Cinzas (%, m m^{-1})	0,72 ± 0,04	1,3 ± 0,04
Proteínas (%, m m^{-1})	31,91 ± 0,5	87,67 ± 0,5
Lipídios (%, m m^{-1})	1,00 ± 0,03	0,01 ± 0,01

*Médias ± desvio padrão (para três repetições)

A composição centesimal das peles identificou que o descarne foi efetuado satisfatoriamente, com um percentual de lipídios em torno de 1%. Este valor foi inferior ao encontrado por Santos et al. (2018) e Sai–Ut, Jongjareonrak e Rawdkuen (2010), que obtiveram, 4,53 % de lipídios em peles de carpa comum e 1,60 % em peles de bagre gigante, respectivamente.

Os baixos percentuais de lipídios e cinzas encontrados nas peles evidência não somente um descarne eficiente, mas também justifica o valor de 87,67 % de proteínas encontrado na gelatina extraída. Pois, segundo Roslan et al. (2014), um maior conteúdo de proteínas solubilizada é indiretamente proporcional ao conteúdo de lipídios encontrado na matéria–prima. Isso porque quando as peles possuem um alto percentual de lipídios, uma oxidação mais rápida das proteínas pode ocorrer, afetando negativamente a qualidade final da gelatina (ROSMAWATI et al., 2018). Esse valor foi semelhante ao de Santos et al. (2018), que encontrou 87,5 % de proteínas, e inferior ao de Dinçer et al. (2016), que encontrou 95,05 % para proteínas, ambos para gelatina de pele de carpa comum.

5.1.1.2 Rendimentos em massa e hidroxiprolina

A Figura 7, apresenta imagens fotográficas da gelatina obtida após a extração, clarificação e liofilização. A Tabela 2 apresenta os valores encontrados após a extração, os rendimentos em massa e em hidroxiprolina.

Em relação ao rendimento em massa úmida da gelatina extraída das peles carpa, pode–se observar este foi bastante satisfatório, visto que Bandeira et al. (2017), obtiveram um rendimento de extração em torno de 8,1 g 100 g^{-1} para a mesma espécie de pescado. Já em relação ao rendimento em massa seca, esse foi próximo ao encontrado por Tinrat e Sila–Asna (2017), que obtiveram 62,63 % na extração de gelatina a partir de peles de tilápia do Nilo, durante 2 h de extração. Segundo Chandra e Shamasundar (2015), o tipo de processo de

extração utilizado, as condições de operação (temperatura, pH, tempo, pré–tratamento) e o teor de colágeno presente na matéria–prima, são cruciais para o rendimento da gelatina obtida.

Figura 7 – Gelatinas de pele de carpa: (a) filtrada, (b) clarificada e (c) liofilizada

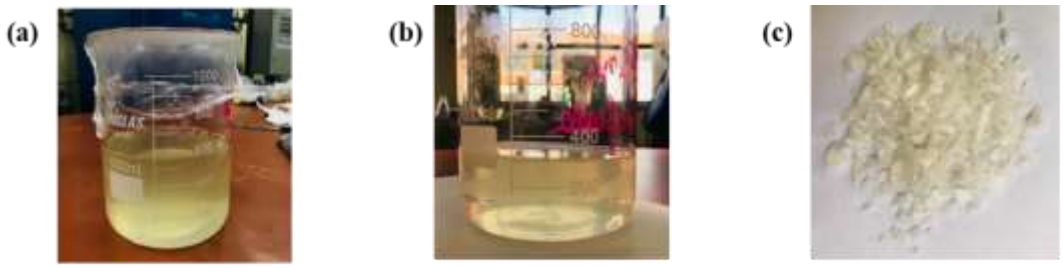


Tabela 2 – Rendimentos do processo de extração da gelatina de peles de carpa comum

Análise	Valor
Massa de pele de carpa comum (g)	100,11 ± 1,49
Volume de solução de gelatina extraída e filtrada (mL)	481,75 ± 29,73
Concentração de gelatina extraída (g 100 mL^{-1})	4,32 ± 0,22
Rendimento em massa úmida (g 100 g^{-1})	20,41 ± 0,82
Rendimento em massa seca (%)	60,16 ± 3,11
Rendimento em hidroxiprolina (g 100 g^{-1})	13,84 ± 0,68

Médias ± desvio padrão (para quatro repetições).

Apesar da glicina ser o aminoácido em maior quantidade presente no colágeno, seu percentual varia muito dependendo da fonte de matéria–prima animal (SILVA; PENNA, 2012). Assim, o teor de hidroxiprolina presente em produtos derivados de matéria–prima animal é utilizado para quantificar o colágeno, pois a hidroxiprolina é o único aminoácido presente no colágeno que tem seu teor fixado entre 13 e 14%, independente da fonte animal (WOESSNER, 1961). O rendimento de 13,84 g 100 g^{-1} em hidroxiprolina encontrado pode ser justificado pelos 60% de rendimento em massa seca de gelatina extraída. Isso demonstra que o processo de extração solubilizou um alto percentual de proteínas colagênicas e fragmentou grande parte de sua estrutura, gerando um alto rendimento de gelatina (GÓMEZ–GUILLÉN et al, 2012).

5.1.1.3 Propriedades reológicas e físico–químicas

A Tabela 3 apresenta as propriedades reológicas e físico–químicas obtidas para a gelatina controle, extraída das peles de carpa comum, para a gelatina reticulada com ácido gálico e para a gelatina bovina pura.

Tabela 3 – Propriedades reológicas e físico–químicas das gelatinas controle, reticulada e bovina

Propriedade	Gelatina controle	Gelatina reticulada	Gelatina bovina
Viscosidade (mPa s)	$6,94 \pm 0,13^{b}$	$7,27 \pm 0,11^{a}$	$7,18 \pm 0,13^{ab}$
Força de gel (g)	227 ± 2^{c}	284 ± 4^{a}	245 ± 3^{b}
Temperatura de fusão (°C)	$25,81 \pm 0,22^{c}$	$28,24 \pm 0,43^{a}$	$26,72 \pm 0,61^{b}$
Temperatura de gelificação (°C)	$19,40 \pm 0,12^{b}$	$22,21 \pm 0,83^{a}$	$21,60 \pm 0,21^{a}$

Médias ± desvio padrão (para três repetições). Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p<0,05$).

Em ordem de importância comercial, a viscosidade encontra–se em segundo lugar, sendo um item crítico para o manuseio adequado no processo industrial (JOANNA et al., 2018). Pode–se observar na Tabela 3, que as viscosidades da gelatina reticulada e da gelatina bovina comercial, apresentaram valores estatisticamente iguais, no entanto observou–se um menor valor para a gelatina extraída de pele de carpa. O valor de 6,94 mPa s encontrado foi semelhante ao encontrado por Alfaro et al. (2014) para gelatina de pele de tilápia (6,12 mPa s), e superior ao de Bandeira et al. (2017) para gelatina de pele de corvina (3,5 mPa s). Todos os valores encontrados estão de acordo com a literatura, que prevê uma faixa de 2,0 a 7,0 mPa s para gelatinas comerciais (NORZIAH; KEE; NORITA, 2014). Segundo Karayannakidis e Zotos (2016), soluções de gelatina com valores altos de viscosidade produzem géis mais rígidos e extensíveis, enquanto soluções com viscosidade baixa formam géis mais frágeis. Esta observação pode ser comprovada neste trabalho devido ao alto valor de força de gel encontrado para a gelatina reticulada.

A força de gel, ou Bloom, é característica comercial de maior importância para determinar a qualidade de uma gelatina, e está relacionada diretamente com a resistência a degradação, podendo–se assim determinar a aplicabilidade da gelatina (CHOI; REGENSTEIN, 2000; KARAYANNAKIDIS; ZOLOS, 2016; LIU; HAN; GUO, 2009). Os altos valores de Bloom encontrados para a gelatina controle (227 g) e para a reticulada (284 g) são justificados pelo alto teor de hidroxiprolina encontrado (13,84 g 100 g^{-1}), pois um alto teor de aminoácidos com grupos hidroxilas livres favorece o aumento de ligações de hidrogênio, o que implica em uma maior força de gel (JOANNA et al., 2018). Segundo Karim e Bath (2009), a força de gel das gelatinas comerciais variarem de 100 a 300 g, e valores de Bloom entre 240 e 260 g, considerados médios, são mais desejáveis.

Quanto aos valores de temperatura de fusão e gelificação para a gelatina controle e para a reticulada, observou–se um aumento quando a gelatina foi reticulada com o ácido gálico. Sendo assim, esse comportamento pode ser atribuído a reticulação das ligações peptídicas do agente reticulante, que propiciou um aumento na estabilidade da rede da gelatina (JOANNA et al, 2018; SANTOS et al., 2018). Segundo Al–Ruqaie et al. (1997), Huang et al. (2017) e Joanna et al. (2018), a baixa temperatura durante o processo de maturação à frio da gelatina se torna favorável para criação de associações paralelas das cadeias de aminoácidos, o que aprimorou as ligações de hidrogênio e fortaleceu a rede de gel.

5.1.1.4 Grau de reticulação

O grau de reticulação indica a quantidade de aminas livres que não reagiram durante a reticulação química com o agente reticulante (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013). Utiliza–se o ensaio com ninidrina, por esta ser um potente agente oxidante na detecção de aminoácidos, por apresentar função amino primária. Durante o aquecimento da solução com ninidrina, os grupamentos amino livres presentes reagem formando uma coloração roxo–azulada, conhecida como Púrpura de Rüehmann, o que indica a presença de proteínas, aminoácidos ou peptídeos na solução (RETINGER, 1917). Desse modo, foi possível determinar a eficiência da reação de reticulação entre a gelatina e o ácido gálico, que foi de 95,89 ± 0,62 %. A eficiência do ácido gálico como agente reticulante se torna nítida quando compara–se a eficiência encontrada por Zhao e Sun (2018) de 82,2 %, ao utilizarem polifenóis como agentes reticulantes de hidrogéis de gelatina.

5.1.2 Caracterização da quitosana

A quitosana obtida apresentou uma massa molar viscosimétrica média (Mv) de 158,9 ± 4,0 kDa, com grau de desacetilação (GD) de 85,9 ± 0,9 %. Moura et al. (2011) ao estudarem a influência da reação de desacetilação da quitina, através da Mv e o GD da quitosana para produção de biofilmes, evidenciaram que quitosanas com valor médio de GD e elevadas Mv, apresentaram melhores propriedades mecânicas. Assim, a quitosana obtida caracteriza–se como um polímero com alto valor agregado, sugerindo que sua incorporação em filmes à base de gelatina de pescado melhoria as propriedades mecânicas dos filmes.

5.1.3 Caracterização da fração lipídica

A Tabela 4 apresenta o perfil dos ácidos graxos encontrados no óleo branqueado de atum e nos ácidos graxos livres (AGL).

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos do óleo branqueado de cabeça de atum e dos AGL

Simbologia	Nomenclatura ácidos graxos	Atum branqueado (%)	Atum AGL (%)
C14:0	ácido mirístico	2,58 ± 0,01	2,54 ± 0,01
C16:0	ácido palmítico	18,89 ± 0,31	18,76 ± 0,31
C18:0	ácido esteárico	4,00 ± 0,02	3,96 ± 0,02
C20:0	ácido eicosanóico	2,73 ± 0,02	2,77 ± 0,02
C24:0	ácido tetracosanóico	1,01 ± 0,01	1,04 ± 0,01
C16:1	ácido palmitoleico ω–7	4,16 ± 0,01	4,23 ± 0,01
C18:1	ácido oleico ω–9	25,02 ± 0,11	25,21 ± 0,11
C20:1	ácido eicosenóico ω–9	1,07 ± 0,03	1,06 ± 0,03
C18:2	ácido α–linoleico ω–3	8,74 ± 0,02	8,79 ± 0,02
C18:3	ácido α–linolênico ω–3	0,42 ± 0,01	0,4 ± 0,01
C20:5	ácido eicosapentaenóico (EPA) ω–3	8,73 ± 0,02	8,86 ± 0,02
C22:6	ácido docosahexaenóico (DHA) ω–3	20,06 ± 0,65	20,12 ± 0,64
NI	ácidos não identificados	2,58 ± 0,01	2,26 ± 0,01
	∑ AGS (saturados)	29,21 ± 0,33	29,07 ± 0,31
	∑ AGSI (insaturados)	68,20 ± 0,20	68,67 ± 0,22
	∑ AGMI (monoinsaturados)	30,25 ± 0,01	30,52 ± 0,01
	∑ AGPI (poliinsaturados)	37,95 ± 0,42	38,17 ± 0,42
	∑ EPA+DHA (insaturados essenciais)	28,79 ± 0,02	28,98 ± 0,02

Legenda: AGL – ácidos graxos livres; AGS – ácidos graxos saturados; AGSI – ácidos graxos insaturados; AGMI – ácidos graxos monoinsaturados; AGPI – ácidos graxos poli–insaturados.

A partir dos dados da Tabela 4 é possível destacar que os ácidos C16:1, C18:1, C18:2, C20:5 e C22:6 foram os encontrados em maior quantidade, tanto no óleo branqueado quanto nos ácidos graxos livres, indicando que ambos os produtos são fontes ricas de ácidos graxos insaturados. Observa–se também que ambos os produtos, apresentam elevadas concentrações do EPA (8,73%) e DHA (20,06%). Quando comparados com os valores encontrados por Créxi et al. (2012) no óleo branqueado de carpa, que foram de 2,62 % e 2,50

% para EPA e DHA, respectivamente, justifica–se a utilização do atum como matéria–prima para obtenção do óleo e dos AGL. Estes são os principais ácidos ômega 3, considerados como alimentos funcionais, pois agem no organismo ajudando a prevenir doenças coronárias, evitam a formação de trombos, além de reduzirem o colesterol total, sendo encontrados principalmente em animais marinhos (VAZ et al., 2014).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

5.2.1 Espessura, propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor d'água

Com o intuito de serem utilizados como material para a embalagem de alimentos, os filmes biopoliméricos necessitam apresentar características específicas, como por exemplo, alta resistência a ruptura, elevada extensibilidade, baixa permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e espessura que não comprometa a visão do alimento. A Tabela 5 apresenta os valores de espessura, propriedades mecânicas (tensão de ruptura e alongamento na ruptura) e PVA para os filmes biopoliméricos produzidos a partir de gelatina de pele bovina, gelatina de pele carpa pura (controle), gelatina de pele de carpa reticulada, ou não, com ácido gálico, e incorporada, ou não, com quitosana e fração lipídica de óleo de atum ou ácidos graxos livres.

Quanto as propriedades mecânicas, observa–se que em relação a TR o filme de gelatina de pescado apresentou um valor 4 vezes superior ao filme elaborado com gelatina comercial de mamífero, o AR apresentou um valor em torno de 3,6 vezes menor e a PVA aproximadamente 2,3 vezes superior. No entanto, quando a gelatina de pescado foi reticulada com ácido gálico (CAG) o valor de TR, se mostrou 6,3 vezes superior ao filme de gelatina de mamífero, aproximadamente 1,6 vezes superior ao filme de gelatina de pescado sem reticulação e a PVA diminuiu cerca de 30%. Em relação ao AR, observou–se que este não foi influenciado pela reticulação da gelatina de pescado e a PVA foi diminuída em 30%. Esses resultados corroboram com os valores encontrados para força do gel da gelatina bovina (245 g), gelatina de pescado (227 g) e gelatina de pescado reticulada (284 g), visto que a força do gel é uma das característica que está intimamente ligada as propriedades mecânicas de filmes biopoliméricos à base de gelatina.

Com a adição de quitosana às soluções filmogênicas, pode–se observar na Tabela 5 que em ambos os filmes de gelatina de pescado (com (CAGQ) e sem reticulação (CQ)), esta promoveu um aumento da TR. No entanto, em relação ao AR, a adição de quitosana no filme sem reticulação (CQ) provocou uma diminuição de 70% quando comparado ao filme de

gelatina controle (C). Já no filme de gelatina reticulado com ácido gálico (CAGQ), a quitosana promoveu um aumento de aproximadamente 10% no TR e 30% no AR, em relação ao filme de gelatina reticulado sem a adição de quitosana (CAG).

Tabela 5 – Valores de propriedades mecânicas, espessura e PVA dos filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou reticulada com ácido gálico e incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum

Filme	Espessura (mm)	Tensão de ruptura, TR (MPa)	Alongamento, AR (%)	PVA ($g\ m^{-1}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$) $\times 10^{11}$
B	$0,061 \pm 0,010^{a}$	$3,82 \pm 0,03^{a}$	$32,16 \pm 0,17^{a}$	$1,08 \pm 0,01^{a}$
C	$0,062 \pm 0,010^{a}$	$15,28 \pm 0,16^{b}$	$8,73 \pm 0,56^{b}$	$2,46 \pm 0,01^{b}$
CAG	$0,062 \pm 0,010^{a}$	$23,89 \pm 0,01^{c}$	$9,96 \pm 0,76^{b}$	$1,71 \pm 0,01^{c}$
CQ	$0,060 \pm 0,010^{a}$	$19,78 \pm 0,69^{d}$	$2,68 \pm 0,03^{c}$	$1,41 \pm 0,01^{d}$
CAGQ	$0,061 \pm 0,010^{a}$	$26,72 \pm 0,14^{e}$	$12,93 \pm 0,04^{d}$	$1,37 \pm 0,01^{e}$
CQO	$0,063 \pm 0,020^{a}$	$8,70 \pm 0,39^{f}$	$140,70 \pm 1,23^{e}$	$1,10 \pm 0,01^{f}$
CQAGL	$0,061 \pm 0,010^{a}$	$10,85 \pm 0,12^{g}$	$164,5 \pm 1,11^{f}$	$1,05 \pm 0,01^{g}$
CAGQO	$0,063 \pm 0,020^{a}$	$8,00 \pm 0,58^{f}$	$225,17 \pm 1,86^{g}$	$1,08 \pm 0,01^{h}$
CAGQAGL	$0,060 \pm 0,010^{a}$	$11,32 \pm 0,21^{h}$	$332,10 \pm 2,14^{h}$	$1,04 \pm 0,01^{i}$

Médias ± desvio padrão (para três repetições). Letras sobrescritas distintas na mesma coluna, são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).
Legenda:
B – filme de gelatina bovina;
C – filme de gelatina controle;
CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico;
CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana;
CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum;
CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum;
CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana;
CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado. de atum;
CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulada com ácidos gálico com quitosana e ácidos graxos livres.

Já a PVA apresentou uma redução de 20% em relação ao filme CQ. Estes resultados indicam que a quitosana favorece as interações intermoleculares em filmes de gelatina de pescado reticulada com ácido gálico, visto que ambos os filmes reticulados apresentaram valores superiores de TR e AR, bem como provocaram uma diminuição na PVA, quando comparados com o filme controle. Estes comportamentos em relação as propriedades mecânicas e de permeação, podem ser atribuídos aos tipos de ligações e interações que ocorrem entre a gelatina, gelatina/glicerol, gelatina/glicerol/ácido gálico e gelatina/glicerol/ácido gálico/quitosana.

Para melhor compreensão, um esquema das interações entre os componentes dos filmes está representado na Figura 2A no Apêndice 2.

Pode–se observar na Figura 2A (b), que as interações entre a gelatina e o glicerol apresentam apenas ligações de hidrogênio. Porém, quando a gelatina é reticulada com ácido gálico, devido aos seus grupamentos hidroxila (OH), é provável que ocorra um aumento na quantidade de ligações e uma consequente aproximação das cadeias proteicas da gelatina, fato esse que explica o comportamento da TR, do AR e da PVA nos filmes reticulados. Quando a quitosana é adicionada, além do aumento da quantidade de interações de hidrogênio, ocorre a formação de interações eletrostáticas entre as cadeias da gelatina e da quitosana, conforme sugerido por Moura (2018) e apresentado na Figura 2A (d).

Os resultados obtidos neste estudo, corroboram com os resultados encontrados por Moura (2018), que incorporou quitosana com diferentes massas molares em filmes à base de gelatina de pele de corvina, e aos de Hosseini et al. (2015), que produziram filmes nanoparticulados de gelatina de pescado incorporado com nanopartículas de quitosana. De acordo com Moura (2018), a melhora nas propriedades mecânicas e na PVA dos filmes à base de gelatina de pescado que são incorporados com quitosana, ocorre devido a ocorrência de ligações de hidrogênio entre a gelatina e o agente plastificante e pela formação de interações eletrostáticas entre os ácidos carboxílicos da quitosana e os grupos amino protonados da gelatina. Dessa forma, ocorre uma maior aproximação entre as cadeias dos polímeros, fazendo com que a tensão na ruptura e o alongamento aumentem, enquanto a PVA diminua, pois a formação de dutos de permeação é dificultada.

Em relação aos filmes à base de gelatina sem reticulação, e que foram incorporados quitosana (CQ) e a fração lipídica (óleo branqueado de atum (CQO) e ácidos graxos livres (CQAGL)), pode–se observar que os filmes, CQO e CQAGL, apresentaram uma redução na TR de 56 e 45 %, respectivamente, em relação ao filme sem lipídio (CQ). Quanto ao AR, este, aumentou significativamente nos filmes onde foram adicionados os lipídios, pois o filme CQO aumentou 53 vezes e o filme CQAGL 61 vezes, em relação ao filme CQ. Esse comportamento ocorreu porque, quando adicionados de outros aditivos em soluções filmogênicas à base de gelatina, estes tendem a provocar uma diminuição nas interações naturais das cadeias proteicas, provocando um aumento na flexibilidade e movimentação do filme (CAGRI, USTUNOL, RYSER, 2001; FABRA, TALENS, CHIRALT, 2008; MOURA, 2018; WANG et al., 2009). Já a PVA foi reduzida para ambos os filmes onde foram adicionadas as frações lipídicas, provavelmente devido a porção hidrofóbica adicionada a solução filmogênica.

Quando comparados os filmes à base de gelatina reticulados com ácido gálico, que foram incorporados com quitosana (CAGQ) e fração lipídica (óleo branqueado de atum (CAGQO) e ácidos graxos livres (CAGQAGL)), observa–se um comportamento semelhante ao dos filmes onde não foi realizada a reticulação, isto é, os filmes CAGQO e CAGQAGL. Sendo apresentada reduções na TR de 70 e 42 %, respectivamente, em relação ao filme sem lipídio (CAGQ). O AR também aumentou significativamente nos filmes onde foram adicionados os lipídios, pois o filme CAGQO aumentou, aproximadamente, 14 vezes e o filme CQAGL aproximadamente 26 vezes, em relação ao filme CAGQ. Em relação a PVA, em ambos os filmes CAGQO e CAGQAGL esta diminuiu em, aproximadamente, 23 % com relação ao filme CAGQ. Esta de redução de PVA foi inferior aos 32,7 % reduzidos por Limpisophon, Tanaka e Osaka (2011), em filmes de gelatina de pele de tubarão azul, adicionados de emulsão de ácidos graxos esteárico e, superior aos 18,35% reduzidos por Chiou et al. (2008) ao adicionar 0,50 % de glutaraldeído como reticulante em filmes a base de gelatina de pele de salmão.

Ao serem comparados filmes de gelatina de pescado sem reticulação (CQ, CQO e CQOAGL) e os filmes de gelatina de pescado reticulado com ácido gálico (CAGQ, CAGQO e CAGQAGL), observa–se que todos os filmes reticulados apresentaram melhores valores de TR, AR e PVA. Isso provavelmente ocorreu porque, com o aumento das interações (ligações de hidrogênio) entre os componentes do filme (gelatina, glicerol, ácido gálico e quitosana), como mostra a Figura 2A (d), ocorre uma diminuição dos espaços inter e intra moleculares dos componentes da solução, produzindo filmes mais resistentes, com maior alongamento e menor permeabilidade ao vapor de água. Chiou et al. (2008), ao reticularem filmes à base de pele de salmão com 0,50% de glutaraldeído aumentaram a TR dos filmes em 17,8 %.

Em relação a adição de frações lipídicas com diferentes perfis de ácidos graxos, pode–se observar que nos filmes onde foram adicionados os AGL (maior percentual de insaturados), CQAGL e CAGQAGL, estes apresentaram valores superiores de TR e AR, e valores inferiores de PVA, quando comparados com os filmes onde foi adicionado óleo branqueado (menor percentual de insaturados) (CQO e CAGQO). Yao et al. (2017), ao adicionarem 1,0% de D–limoneno em filmes à base de gelatina de pescado e quitosana, reduziram a PVA em 35,77 % e aumentaram a AR em 2,3 vezes, quando comparado com o controle. Entretanto, a TR diminuiu em 39,58 %. Hosseini et al. (2016) encontraram um comportamento parecido, com a TR diminuindo cerca de 68,97% ao adicionarem 1,2% de óleo essencial de orégano aos filmes de gelatina/quitosana, enquanto o AR aumentou 95,03 % e a PVA diminuiu, aproximadamente, 4,74 %.

5.2.2 Atributos de cor e transmitância UV-VIS

A Figura 8 apresenta os filmes elaborados a partir das gelatinas de pele bovina, pele de carpa, reticuladas, ou não com ácido gálico e incorporadas, ou não, com quitosana e fração lipídica.

A Tabela 6 apresenta os valores de cor instrumental encontrados para os filmes obtidos a partir de gelatina de pele bovina, gelatina de pele de carpa com e sem reticulação, com o agente de reticulação ácido gálico e incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de óleo branqueado de atum ou de ácidos graxos livres de atum.

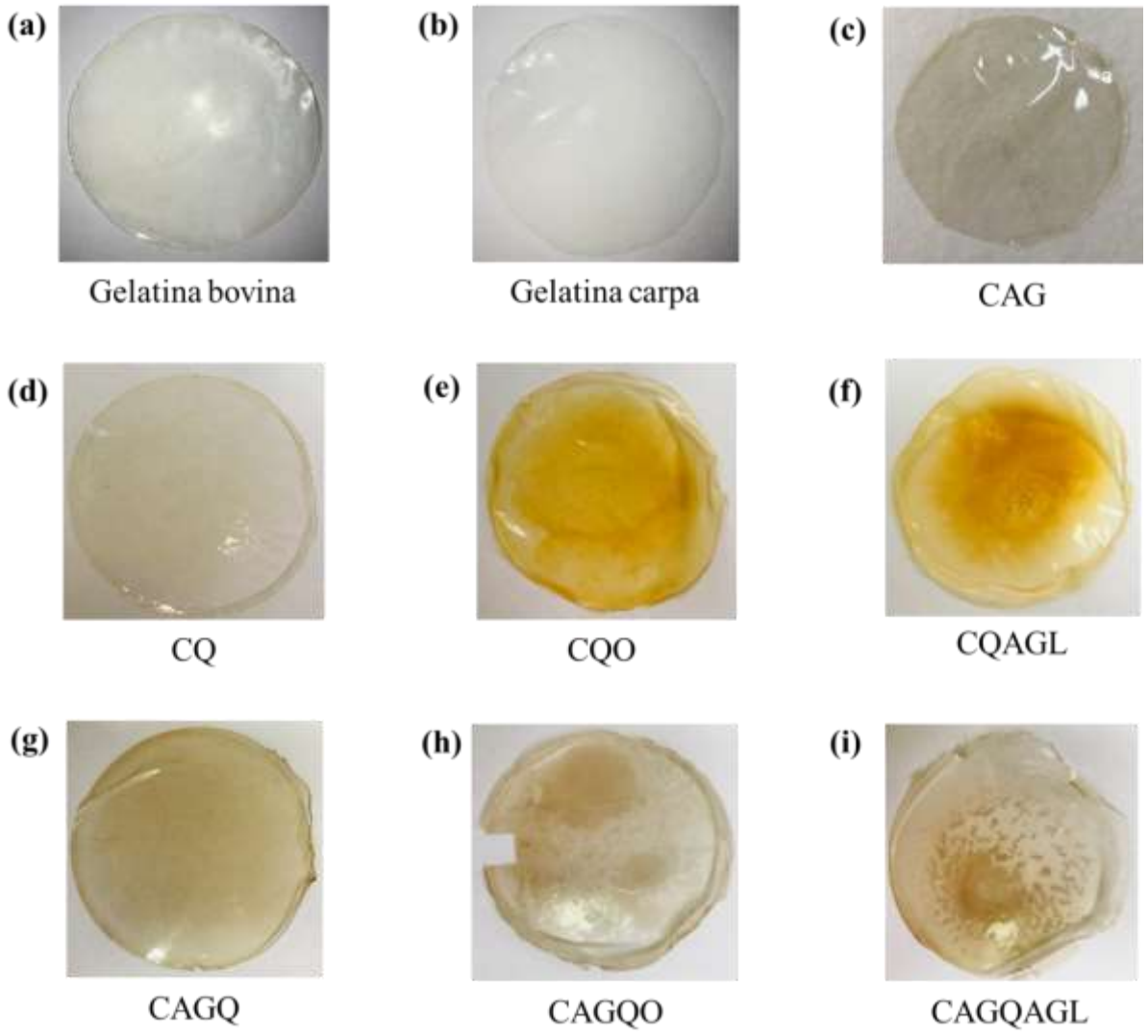
Conforme apresentado na Tabela 6, pode–se observar que a luminosidade (*L*) dos filmes diminuiu com a reticulação da gelatina, com a incorporações de quitosana e, principalmente, com a incorporação da fração lipídica, tornando os filmes mais opacos. No caso do filme CAGQAGL, que obteve a maior opacidade, provavelmente essa alta diminuição na luminosidade se deve tanto a presença de quitosana quanto do AGL. Pelissari et al. (2009), ao analisar filmes de mandioca incorporados com quitosana, sugeriram que a presença deste biopolímero foi a responsável pela maior opacidade e escuridez devido a sua coloração amarela. Já Gallo et al. (2000), ao estudarem o efeito da adição de misturas lipídicas em filmes de metilcelulose, concluíram que independentemente do tipo de lipídio incorporado, este sempre irá tornar o filme mais opaco.

Tabela 6 – Parâmetros de cor (ângulo Hue – ° H) e diferença total de cor (ΔE) dos filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum

Filme	L	*a*	*b*	Hue	ΔE
B	$89,35 \pm 0,33^{b}$	$0,37 \pm 0,04^{c,d}$	$-2,25 \pm 0,63^{e}$	$99,80 \pm 2,03^{a}$	——
C	$94,16 \pm 0,28^{a}$	$0,33 \pm 0,07^{d}$	$-5,58 \pm 0,36^{f}$	$93,38 \pm 0,52^{b}$	——
CAG	$93,19 \pm 0,20^{a,b}$	$-0,28 \pm 0,01^{d}$	$0,35 \pm 0,02^{e}$	$73,96 \pm 2,08^{d}$	$6,49 \pm 0,03^{e}$
CQ	$92,07 \pm 0,15^{a,b}$	$-1,08 \pm 0,03^{d}$	$6,50 \pm 0,20^{d}$	$99,47 \pm 0,11^{a}$	$2,32 \pm 0,14^{f}$
CAGQ	$90,18 \pm 0,18^{a,b}$	$-0,72 \pm 0,14^{d}$	$8,55 \pm 0,74^{d}$	$94,94 \pm 1,25^{b}$	$4,46 \pm 0,04^{g}$
CQO	$78,96 \pm 0,74^{c}$	$2,47 \pm 0,58^{b,c}$	$36,11 \pm 1,84^{b}$	$86,12 \pm 0,70^{c}$	$33,15 \pm 2,02^{b}$
CQAGL	$64,74 \pm 0,21^{d}$	$14,24 \pm 1,68^{a}$	$48,81 \pm 0,81^{a}$	$73,77 \pm 1,60^{d}$	$53,31 \pm 2,21^{a}$
CAGQO	$78,05 \pm 0,23^{c}$	$2,39 \pm 0,47^{b,c}$	$7,69 \pm 1,85^{d}$	$72,55 \pm 0,68^{d}$	$16,41 \pm 0,50^{d}$
CAGQAGL	$67,35 \pm 0,12^{d}$	$4,29 \pm 0,30^{b}$	$16,2 \pm 0,93^{c}$	$75,17 \pm 0,19^{d}$	$28,77 \pm 0,50^{c}$

Médias±desvio padrão (para três repetições). Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).
Legenda: B – filme de gelatina bovina;
C – filme de gelatina controle;
CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico;
CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana;
CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum;
CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum;
CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana;
CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum;
CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

Figura 8 – Filmes biopoliméricos elaborados à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum



Legenda:
(a) Filme de gelatina bovina;
(b) Filme de gelatina controle;
(c) CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico;

(d) CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana;
(e) CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum;
(f) CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum;
(g) CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana;
(h) CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum;
(i) CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

A maior opacidade dos filmes reticulados e incorporados com quitosana e fração lipídica pode ser visualizada pela Figura 8, principalmente nos filmes CQO, CQAGL, CAGQ, CAGQO e CAGQAGL.

Os valores encontrados de ângulo Hue, apresentaram resultados típicos de filmes de pescado, com uma média de 88,54° para os não reticulados e 77,56° para os reticulados. As cores dos filmes obtidos aproximaram–se da cor amarela, corroborando estudos de Santos et al. (2018) e Bandeira et al. (2017). Voss (1992) mostrou que o ângulo de Hue quantifica a cor, sendo que, valores próximos de 0° referem–se a proximidade com vermelho–arroxeado, valores próximos de 90° a amarelo, valores próximos de 180° ao verde–azulado e valores próximos de 270° a cor azul.

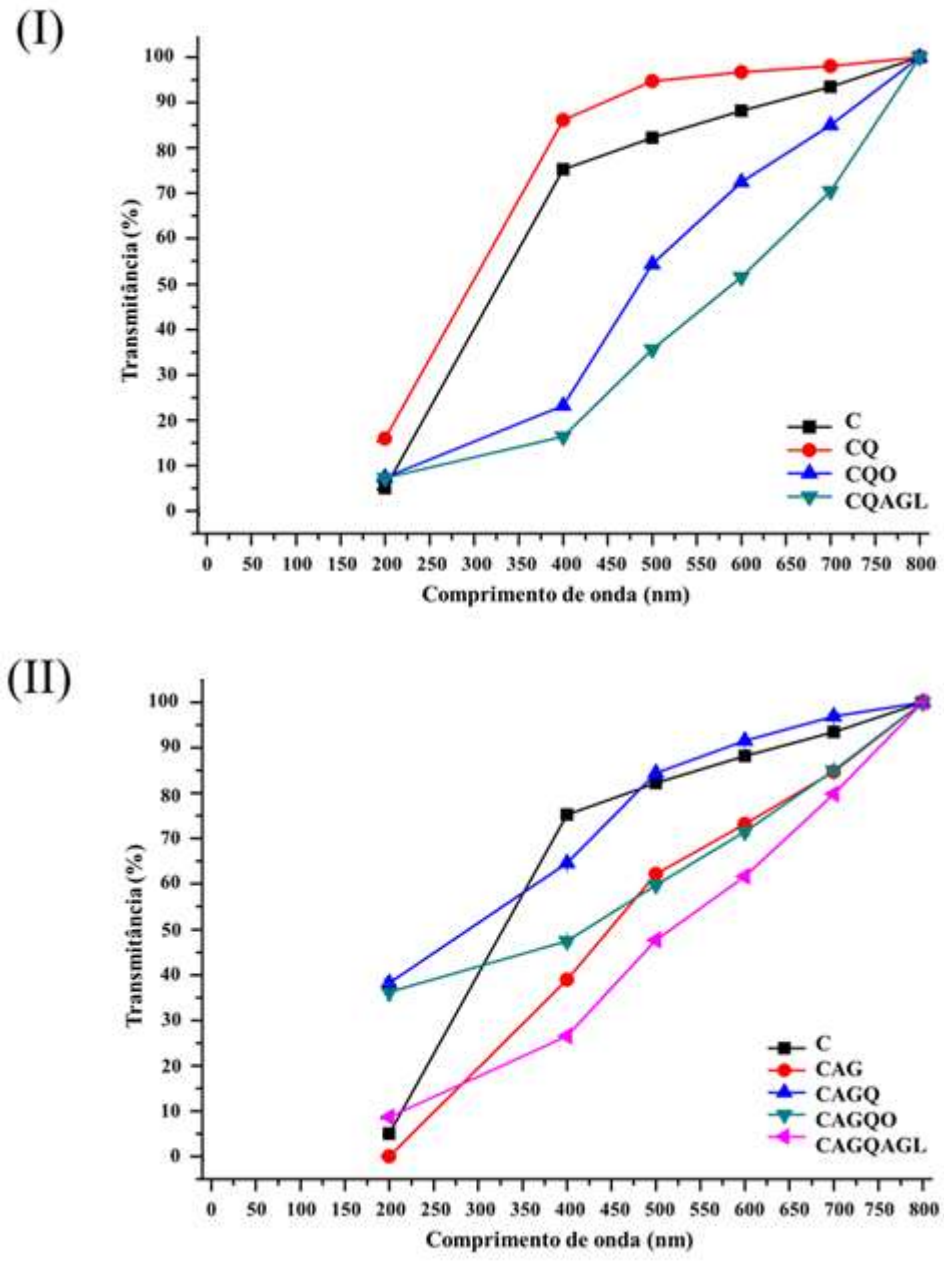
Quanto aos valores encontrados para a variação de cor total (ΔE), pode–se observar que os filmes de gelatina com adição de quitosana e fração lipídica sem reticulação apresentaram valores bastante altos (CQO de 33% e CQAGL de 53%), indicando que não houve uma boa miscibilidade entre os constituintes do filme (BERTAN et al., 2005). Por outro lado, os filmes à base de gelatina reticulada com ácido gálico, com adição de quitosana e fração lipídica apresentaram menor variação de cor (CAGQO de 16% e CAGQAGL de 28%) em relação ao filme controle. Esses resultados indicam que a gelatina, quando reticulada com ácido gálico, provoca uma melhor interação com a quitosana e o lipídio do que a gelatina pura. Esses resultados corroboram com os valores de TR e AR que se mostraram superiores na mistura com gelatina reticulada.

A Figura 9 apresenta a transmitância UV-Vis para os filmes à base de pele de carpa, com ou sem reticulação, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica.

É possível identificar que, para os filmes sem reticulação, apenas o filme incorporado com quitosana apresentou uma transmitância maior em todos os comprimentos de onda, quando comparado com o filme controle. Assim como, quando reticulado, o filme que continha incorporação apenas quitosana foi o único que apresentou maior transmitância nos comprimentos de onda a partir de 500 nm. Isso corrobora com os valores encontrados para o ângulo Hue, que foram maiores para estes dois filmes. Ao se comparar os filmes CQO,

CQAGL, CAG, CAGQO e CAGQAGL com os outros, percebe–se que eles foram os únicos que, na faixa visível da luz (400 a 600 nm), apresentaram transmitância abaixo do controle. Apesar destes valores serem baixos, os mesmos influenciam na aparência dos filmes e na sua aplicação no mercado alimentício, além disso, indicam que estes apresentam excelentes propriedades de barreira a luz UV (AHMAD et al., 2012).

Figura 9 – Transmitância UV-Vis dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum



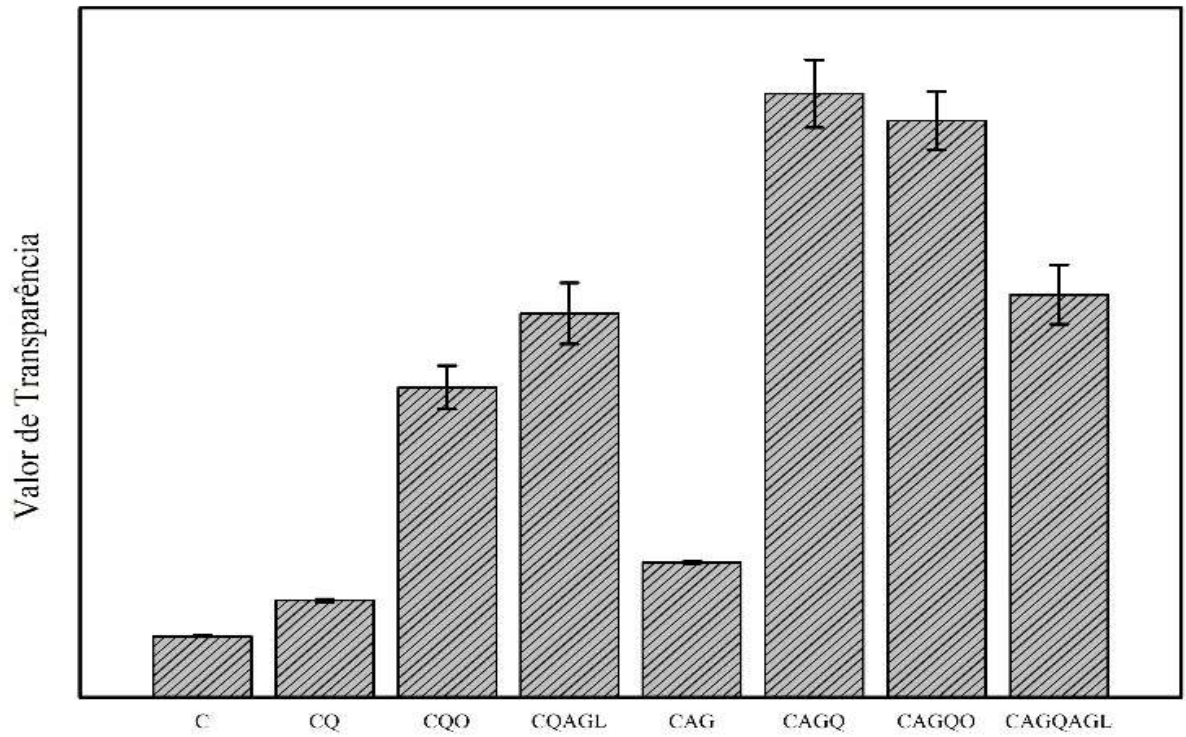
Legenda: (I) Transmitância filmes sem agente reticulantes; (II) Transmitância filmes com agente reticulante; C – filme à base de gelatina controle; CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana; CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa

reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum

A Figura 10 apresenta o gráfico em barras dos valores médios com desvios padrões para as transparências calculadas. É possível identificar que os filmes reticulados foram os que obtiveram os maiores valores de transparência, o que, segundo Cai et al. (2019), indica que estes foram os filmes mais transparentes.

A maior opacidade, menor transmitância e transparência encontrados nos filmes que foram incorporados com quitosana e fração lipídica, reticulados ou não, indica que estes podem retardar a oxidação lipídica em alimentos, causada pela luz UV, emergindo como invólucros potenciais para alimentos (AHMAD et al., 2012; SANTOS et al., 2018; YAO et al., 2017).

Figura 10 – Transparência dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum

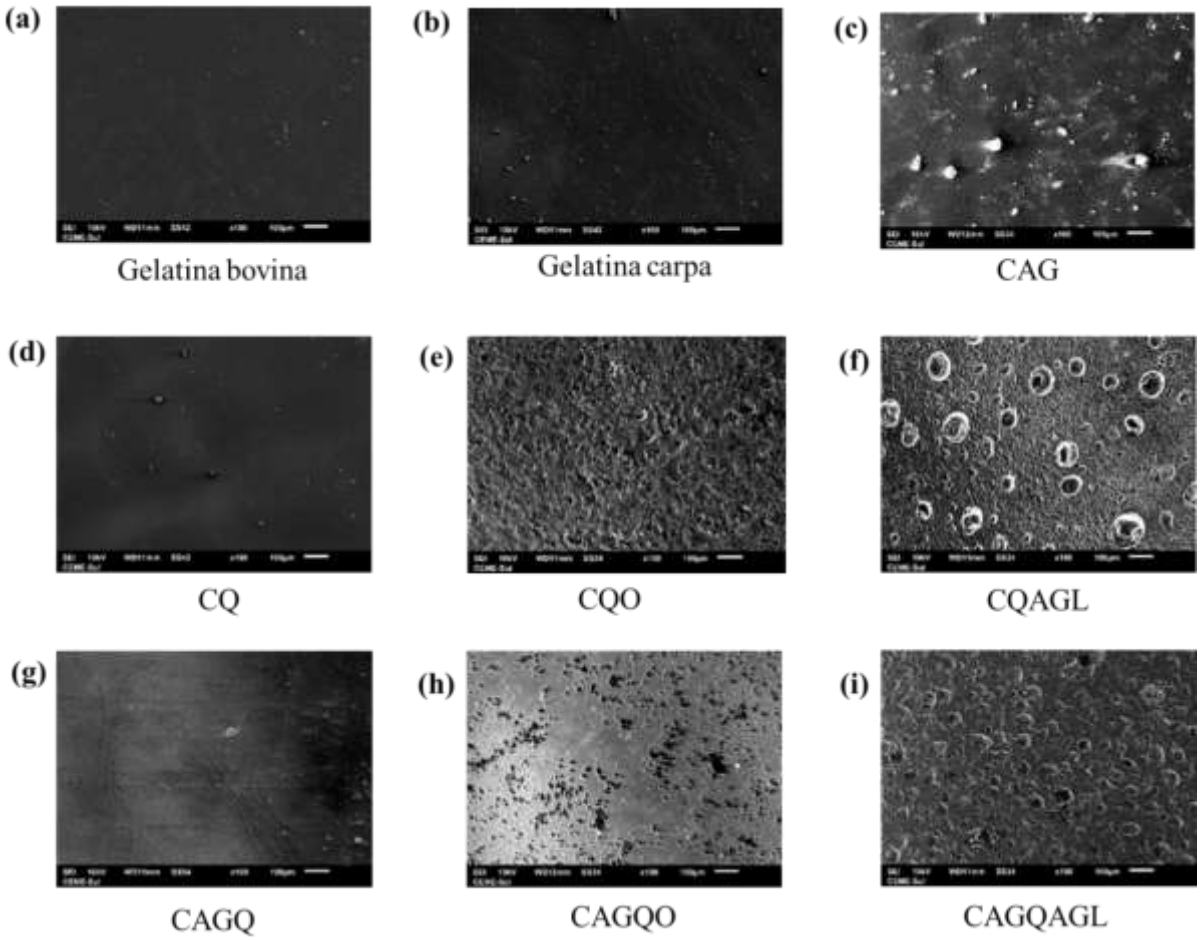


Médias±desvio padrão (para cinco repetições). Legenda: CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.
.

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 11 apresentam as micrografias dos filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle, gelatina reticulada, ou não, com ácidos gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum.

Figura 11 – Micrografias MEV de filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele bovina, gelatina controle ou gelatina reticulada com ácidos gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum



Legenda:
(a) Filme de gelatina bovina;
(b) Filme de gelatina controle;
(c) CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico;
(d) CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana;
(e) CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum;
(f) CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum;
(g) CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana;
(h) CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum;
(i) CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

Ao se incorporar o óleo branqueado de atum aos filmes, é possível detectar grandes diferenças entre os filmes reticulados dos não reticulados, apesar de ambos possuírem superfícies desiguais. Enquanto o filme CQO (Figura 11 (e)) apresentou estruturas fibrosas, emaranhadas entre si, mas relativamente regulares, com aberturas uniformes específicas da evaporação da água durante a secagem do filme, o filme CAGQO (Figura 11 (h)) mostrou em sua superfície esferas irregulares, e com uma distribuição desigual entre si. Segundo Hosseini et al. (2016), conteúdo lipídico acima de 1% tende a aumentar a frequência de colisão entre as gotículas, aumentando assim a taxa de floculação e coalescência. Essa disparidade, unida das imagens reais dos filmes (na Figura 8) indica que não houve uma boa miscibilidade do óleo no filme CAGQO, provavelmente causada pela reticulação com o ácido gálico, pois essa foi a única diferença entre ambos os filmes. Resultados semelhantes foram encontrados por Cai et al. (2019) e Kwak et al. (2019).

Em relação aos filmes que tiveram AGL incorporados, apesar de na Figura 8 haver uma maior diferença visual, sua micrografia se mostrou correspondente. A maior diferença se encontra no encapsulamento do óleo que exteriorizou no filme CQAGL (Figura 11 (f)) gotículas esféricas homogêneas, características para o encapsulamento com Tween 80. Já o filme CAGQAGL (Figura 11 (i)) exibiu um encapsulamento mais desforme, como se essas gotículas estivessem presas pela base na superfície do filme. Apesar dessas diferenças, ambos os filmes apresentaram excelentes valores de alongamento e tensões na ruptura satisfatórias, quando comparadas a trabalhos semelhantes (CAI et al., 2019; HOSSEINI et al., 2016; MOURA, 2018; SANTOS et al., 2018; YAO et al., 2017).

5.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT–IR)

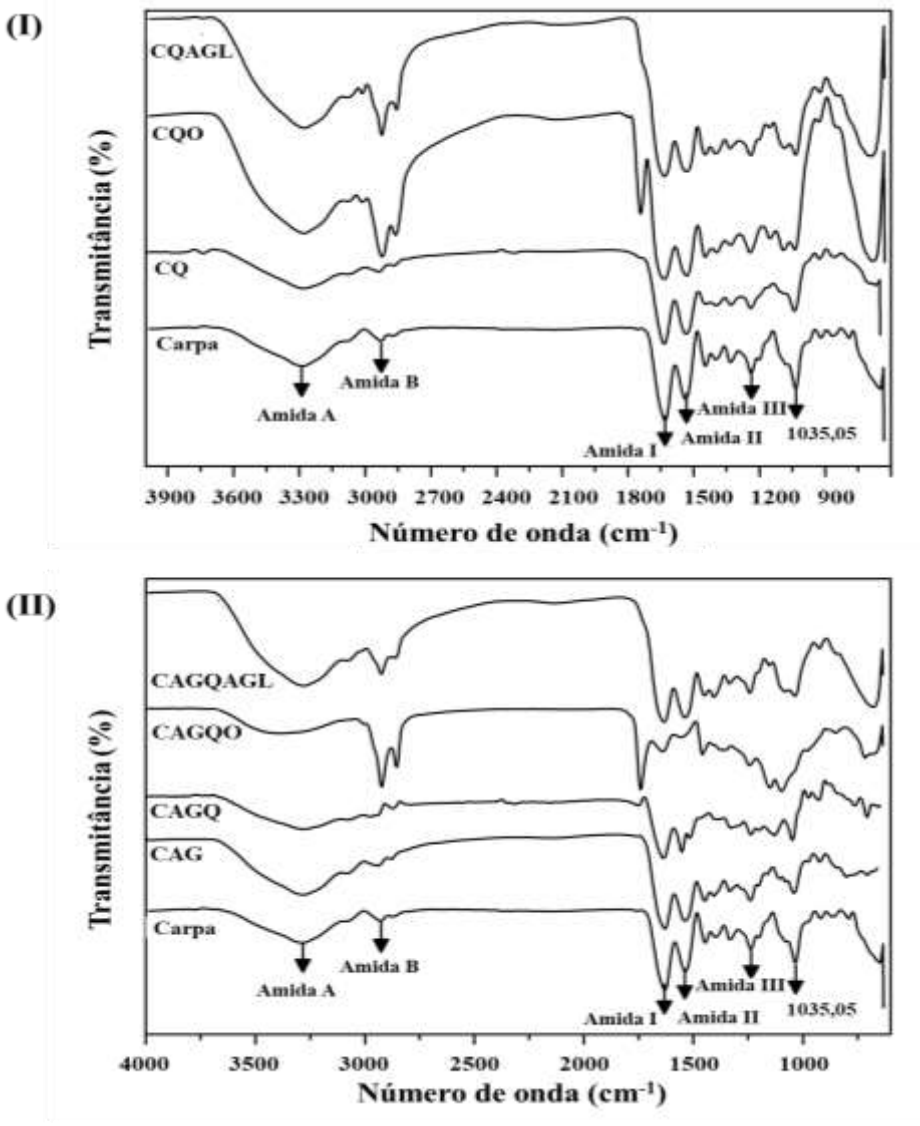
A análise de FT–IR dos filmes biopoliméricos foi realizada com o intuito de caracterizar as alterações provocadas pelo agente reticulante, pela incorporação da quitosana e da fração lipídica, devido ao fato destas alterações estarem relacionadas às interações químicas na matriz dos filmes. A Figura 12 ilustra os espectros de FT–IR obtidos na avaliação dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle, gelatina reticulada, ou não, com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum e o Quadro 4 apresenta a descrição dos grupos funcionais referentes aos picos amida evidenciados na Figura 12.

Quadro 4 – Grupos funcionais referentes as estruturas da gelatina, encontrados no filme controle (C)

Amida	Grupos funcionais	Número de onda (cm^{-1})
A	alongamento da ligação NH– acoplado à ligação de hidrogênio	3292
B	vibração de alongamento assimétrico de C–H (sp^3) e NH_3^+	2929
I	alongamento de C=O, ligação de hidrogênio acoplada a COO	1635
II	decorrente da dobra de grupos N–H e alongamento de vibrações de grupos C–N	1536
III	vibrações de estiramento no plano de ligações C–N, CH de vibrações da amina ligada ou de ligações CH_2 da glicina	1239

Fonte: Arfat et al. (2017), He et al. (2015), Hosseini, Javidi e Rezaei (2016).

Figura 12– Espectros FT–IR dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum



Legenda: (I) Transmitância filmes sem agente reticulantes; (II) Transmitância filmes com agente reticulante; CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana; CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum

Observa–se na Figura 12 (I) que a reticulação com ácido gálico, incorporado com a quitosana provocou nos filmes uma diminuição das bandas nas amidas II e III, referindo–se a alterações estruturais nas cadeias polipeptídicas da gelatina, levando a uma redução na quantidade de estruturas em α hélice (MOURA, 2018). A banda em 1035 cm^{-1}, observada em todos os espectros, corresponde à ligação –OH oriunda do plastificante glicerol que foi utilizado em todos os filmes (BANDEIRA et al., 2017; MOURA, 2018; SANTOS et al, 2018).

5.2.5 Análises térmicas

Os termogramas DSC para os filmes biopoliméricos à base de gelatina controle, de gelatina reticulada, ou não, com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum são apresentados na Figura 13.

Os termogramas evidenciam que, com exceção do filme controle (C), todos os outros filmes sofreram eventos térmicos de absorção de calor, ilustrado pelos picos endotérmicos que indicaram uma diminuição no fluxo de calor, atributo este típico de fusão do material (BANNACH et al., 2011). Segundo Hosseini et al. (2015), a fusão é uma característica de materiais cristalinos, polímeros semicristalinos e metais, sendo que quanto mais estreito o pico, maior a cristalinidade da amostra. O ponto de fusão é dito como a temperatura na qual toda a cristalinidade desaparece, podendo ocorrer a uma temperatura determinada (pico) ou em uma faixa de distribuição de tamanho das regiões cristalinas (BANNACH et al., 2011; HOSSEINI et al., 2015). Desta forma, determinou–se os pontos de fusão (T_f) dos filmes a partir do pico máximo dos termogramas, sendo estas fortemente dependentes do grau de ligação cruzada da estrutura dos polímeros (MOURA, 2018).

Os resultados mostraram que todos os filmes à base de gelatina modificada, ou não, com o ácido gálico (Figura 13 (II)), incorporados com quitosana e fração lipídica tiveram aumento no valor de T_f quando comparados com o filme controle (C), sendo o maior aumento observado no filme de gelatina reticulada com ácido gálico, incorporado quitosana (CAGQ). Os resultados sugerem que os agentes reticulantes não eletrólitos diminuíram a mobilidade molecular da gelatina, como evidenciado pelo aumento de T_f. Segundo Santos et al. (2018), o

ácido gálico quando incluído à matriz de gelatina pode ampliar a interação por meio de ligações de aminas livres elevando a rigidez da matriz de gelatina, corroborando com os resultados apresentados na Tabela 5 através do aumento das propriedades mecânicas deste filme. Entretanto, os termogramas que tiveram incorporados a fração lipídica (CQO, CQAGL, CAGQO e CAGQAGL) sofreram uma diminuição da T_f, quando comparados com os filmes que tiveram apenas a quitosana incorporada.

Observa–se também que os filmes reticulados CAG, CAGQ e CAGQO apresentaram mais de um pico endotérmico, 144, 5 °C e 155,5 °C; 153, 8 °C e 160, 5 °C; 143,6 °C e 151,4 °C, respectivamente. Este fato indica que estes filmes possuem mais de um ponto de fusão, assim como duas estruturas cristalinas diferentes. Segundo Hosseini et al. (2016), os picos com as temperaturas mais baixas referem–se a desvitrificação de blocos ricos em α–aminoácidos, enquanto os picos com as temperaturas mais elevadas referem–se a desvitrificação de blocos ricos em iminoácidos, como prolina e hidroxiprolina. Além disso, esta particularidade também indica que não houve uma boa miscibilidade na matriz filmogênica (SANTOS et al., 2018).

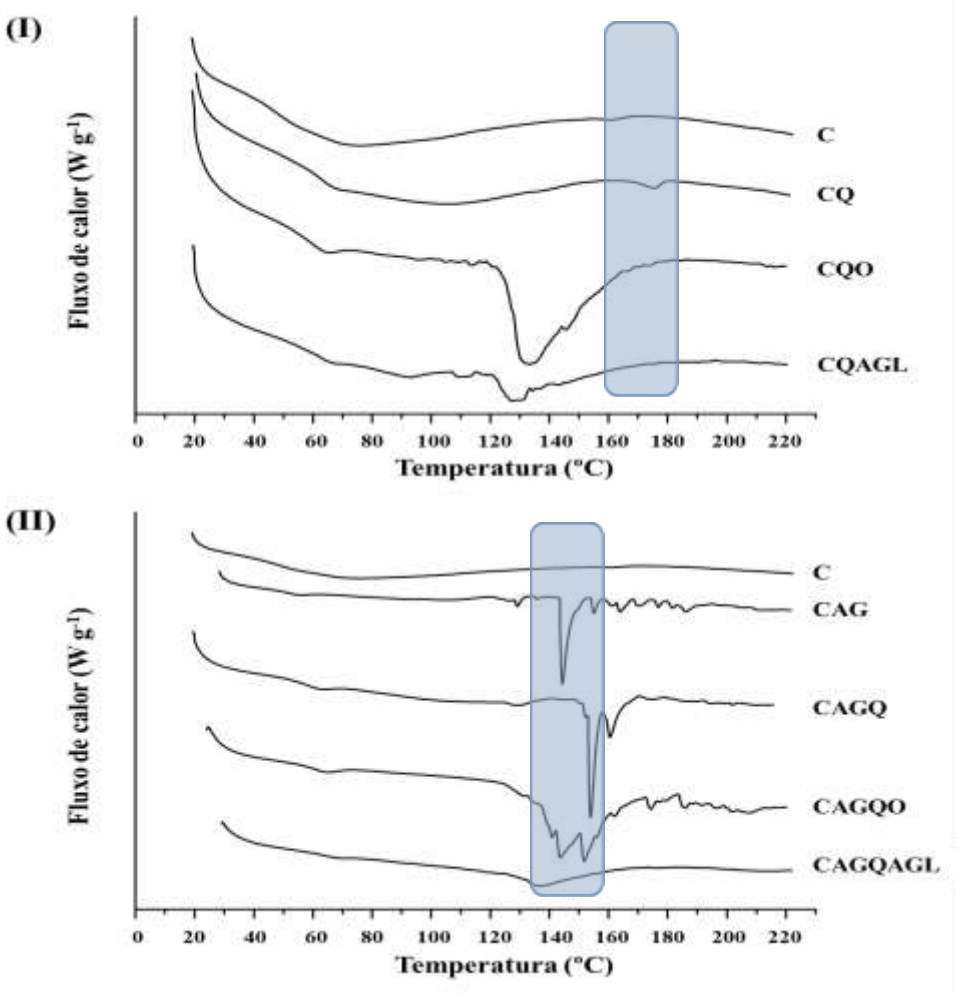
Conforme observado nos termogramas DTG na Figura 15 (I) e (II), as perdas iniciais de massa ocorreram por uma série de pequenas reações secundárias à reação principal. A temperatura de início (T_0) ocorreu em, aproximadamente, 95,8 °C e a perda de massa foi de, aproximadamente, 7,2 %. Segundo Arfat et al. (2016) essa perda inicial está relacionada as perdas de água livre e água ligada adsorvidas no filme. Como este valor inicial foi muito baixo, sinaliza que houve uma baixa dessorção de água na matriz filmogênica de todos os filmes (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011). A segunda etapa de perda de massa, identificada como temperatura de degradação térmica (T_d), iniciou em 197,7 °C e terminou em 443,4 °C, tendo sua maior de perda de massa, 53,8 %, em 345,9 °C para o filme controle. Conforme estudos de Ahmad et al. (2011), esta transição pode ocorrer devida a degradação ou decomposição de frações de proteína de baixa massa molar e por componentes de glicerol na matriz filmogênica. Como evidenciado pelos termogramas DTG, os filmes sofreram diferentes etapas de degradação térmica.

Nos filmes sem reticulação (Figura 15 (I)), o controle (C) teve sua degradação máxima ocorrendo em duas reações parcialmente sobrepostas. Já no filme incorporado com quitosana (CQ) a degradação ocorreu com uma primeira reação a 332,9 °C, seguida de uma segunda reação mais rápida em 342,4 °C. Já os filmes incorporados com a fração lipídica (CQO

e CQAGL), apesar de não terem picos de degradação bem evidentes, seus termogramas DTG indicam que houve apenas uma reação, na faixa de 338,0 °C.

Quanto aos filmes reticulados (Figura 15 (II)), o filme que teve apenas gelatina de pele de carpa reticulada ácido gálico (CAG), houve o mesmo processo que o filme sem reticulação incorporado com quitosana, com uma primeira reação ocorrendo em 247,60°C e uma segunda a 335,8 °C. A primeira relacionada ao ácido gálico e a segunda a gelatina. Os filmes CAGQ e CAGQO tiveram comportamentos semelhantes, com duas reações parcialmente sobrepostas ocorrendo em 253,4 °C e em 336,8 °C, comportamento semelhante ao filme CAG, o que favorece a indicativa de que a primeira temperatura deva ser relacionada a degradação do agente reticulante. Quanto ao filme CAGQAL, assim como o filme não reticulado, teve sua degradação em apenas uma etapa, ocorrendo a 330,7 °C. Comparando–se todas as T_d é possível inferir que, apesar das pequenas diferenças encontradas, o processo de reticulação não altera a degradação dos filmes.

Figura 13 – Termogramas DSC dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum

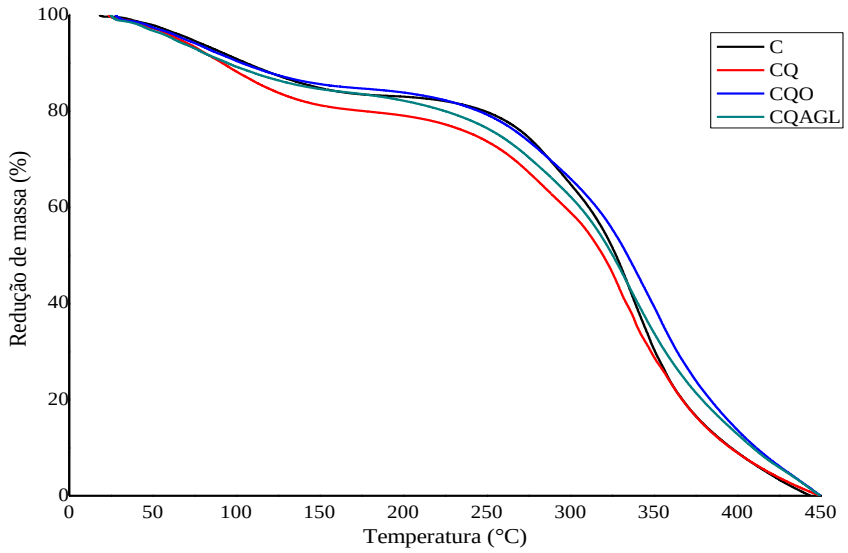


Legenda: : (I) Transmitância filmes sem agente reticulantes; (II) Transmitância filmes com agente reticulante; C – filme à base de gelatina conrole; CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana; CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

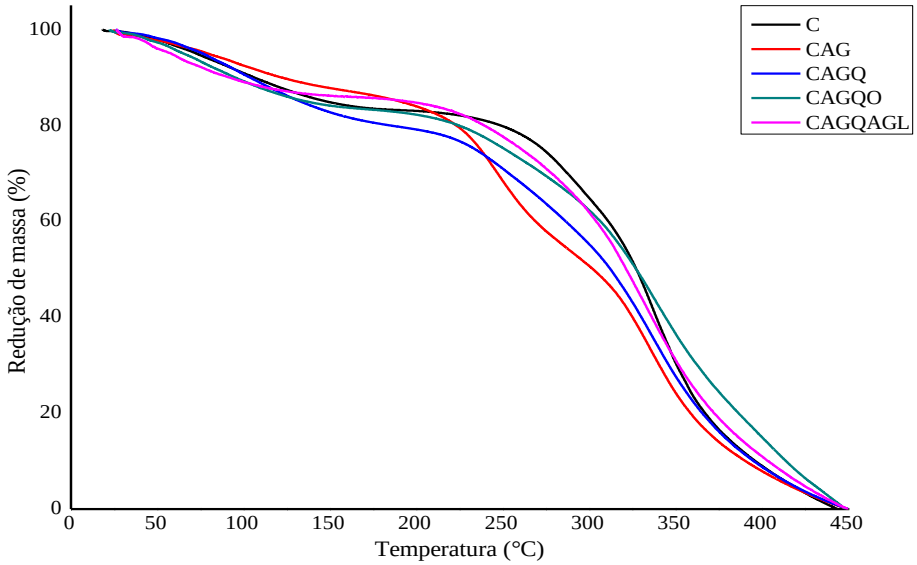
Os termogramas TGA e DTG para os filmes biopoliméricos à base de gelatina controle, gelatina reticulada, ou não, com ácido gálico, incorporados, ou não, com quitosana e fração lipídica de atum são apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14 – Termogramas TGA dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incoporados com quitosana e fração lipídica de atum

(I)



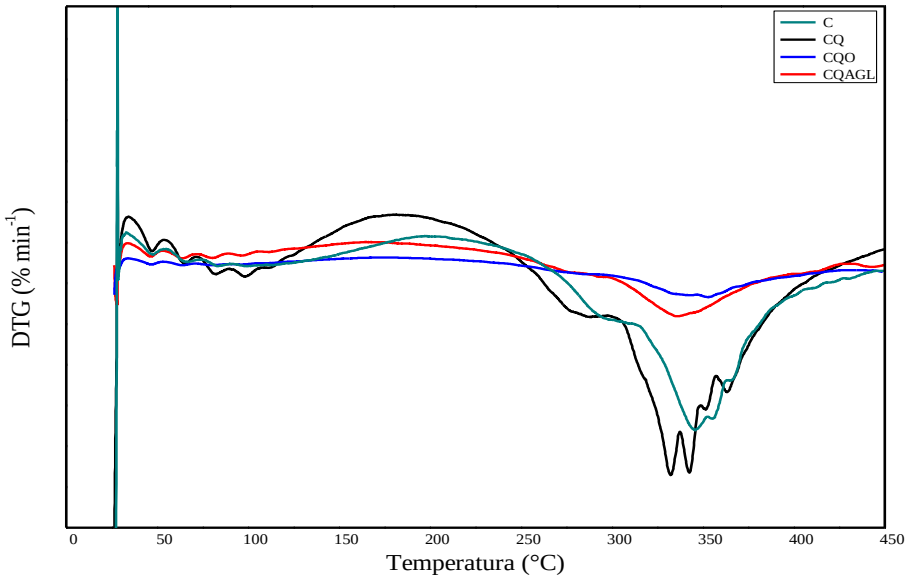
(II)



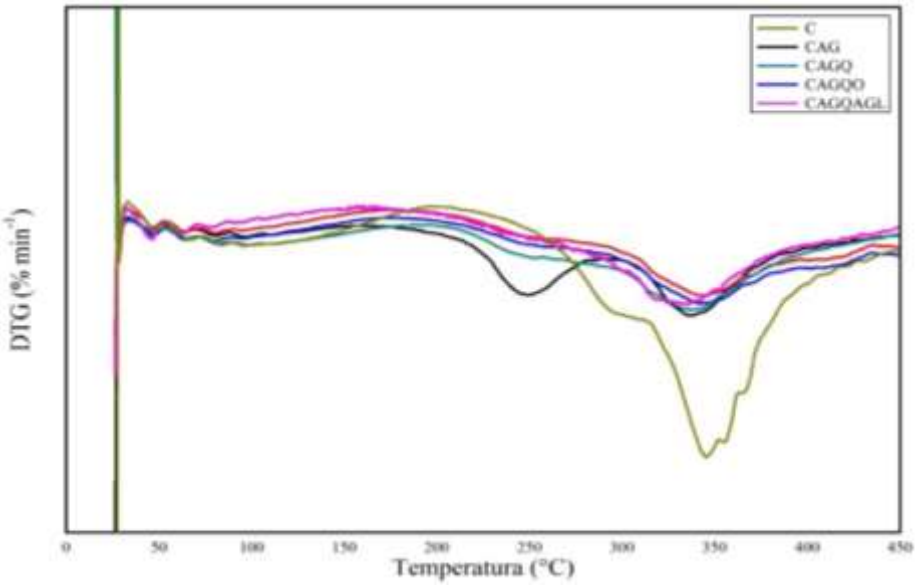
Legenda: : (I) Transmitância filmes sem agente reticulantes; (II) Transmitância filmes com agente reticulante; C – filme à base de gelatina controle; CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana; CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

Figura 15 – Termogramas DTG dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum

(I)



(II)



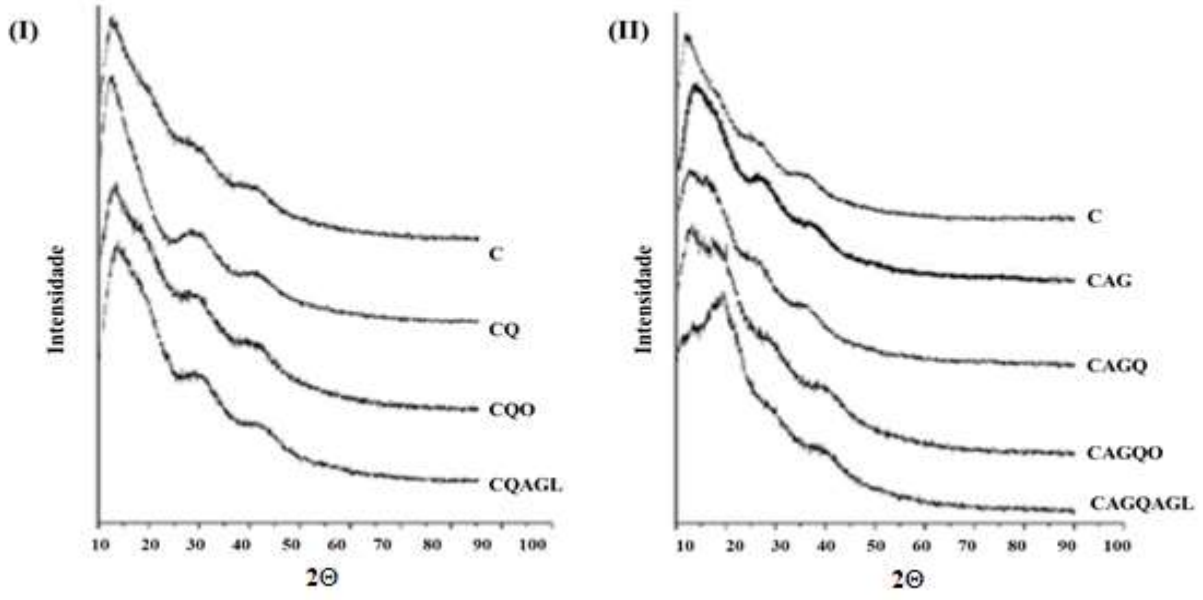
Legenda: : (I) Transmitância filmes sem agente reticulantes; (II) Transmitância filmes com agente reticulante; C – filme à base de gelatina controle; CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana; CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo

branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

5.2.6 Análise de difração de raio–X

A Figuras 16 ((I) e (II)) apresenta os difratogramas para os filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele de carpa, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum e os filmes biopoliméricos à base de gelatina de pele de carpa reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum, respectivamente. É possível identificar que todos os filmes tiveram um comportamento amorfo, semelhantes ao controle (C), com picos principais de difração em torno de 2θ = 13. Segundo Benbettaieb et al. (2016), esse desempenho é característico de polímeros com baixa cristalinidade, oriundo da desnaturação da tripla hélice de colágeno durante o processo de extração da gelatina. Quanto aos filmes que tiveram a gelatina reticulada com o agente reticulante, as diferenças de intensidade dos picos foram pouco perceptíveis, quando comparadas com os não reticulados, sinalizando que houve apenas alteração na fase amorfa da matriz de gelatina.

Figura 16 – Difratogramas de raio-X dos filmes biopoliméricos à base de gelatina controle ou reticulada com ácido gálico, incorporados com quitosana e fração lipídica de atum



Legenda: (I) Transmitância filmes sem agente reticulantes; (II) Transmitância filmes com agente reticulante; C – filme à base de gelatina controle; CQ – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana; CQO – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e óleo branqueado de atum; CQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa com quitosana e ácidos graxos livres de atum; CAG – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico; CAGQ – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana; CAGQO – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e óleo branqueado de atum; CAGQAGL – filme à base de gelatina de pele de carpa reticulado com ácido gálico com quitosana e ácidos graxos livres de atum.

6 CONCLUSÃO

Os resíduos da indústria pesqueira apresentaram–se como excelentes fontes de matérias–primas para substituição de materiais sintéticos, auxiliando assim na diminuição do impacto ambiental pelo uso e descarte destes na natureza. A gelatina obtida das peles *in natura* de carpa comum (*Ciprinus carpio*) apresentou um rendimento de 20,41 % em base úmida e 13,84 g 100 g^{-1} em hidroxiprolina, uma força de gel em 227 g, controle, e de 287 g quando reticulada, resultados estes superiores a outras extrações de gelatina de carpa citados na literatura. A quitosana produzida, apresentou GD de 85% e Mv de 159 kDa e o óleo branqueado e os AGL de atum (*Thunnus thynnus*) apresentaram 68,2 % de insaturados, valores que foram satisfatórios.

Quanto aos filmes, estes apresentaram espessura, cor e transparências características para gelatinas de pescado. Os filmes reticulados que foram incorporados com quitosana e com as frações lipídicas exibiram tensão na ruptura e alongamento superiores aos outros filmes, assim como melhores valores de permeabilidade ao vapor d'água. Esses resultados indicam que a qualidade dos biomateriais extraídos, assim como que a adição destes foi satisfatória para elaboração de filmes. A análise de MEV mostrou superfícies desiguais, apresentando distribuição mais homogênea nos filmes não reticulados. No entanto, nos filmes onde a gelatina foi reticulada com ácido gálico, estes apresentaram melhores atributos mecânicos e de permeabilidade, bem como de variação de cor, indicando que a incorporação da quitosana e da fração lipídica, serviu como facilitadora na miscibilidade dos componentes do filme. A análise FT–IR indicou que a reticulação causou uma diminuição das amidas II e III, resultando em uma redução das estruturas α–hélice e maior preenchimento dos espaços vazios, atributo típico em filmes com baixa permeabilidade ao vapor d'água. A análise DSC evidenciou que todos os filmes apresentaram maiores temperaturas de fusão, indicando menor degradação térmica e melhor qualidade em relação ao filme controle. Quanto aos difratogramas DRX, estes expressaram que, independente da reticulação com o ácido gálico, todos os filmes apresentam estruturas amorfas. Desta forma, os resultados mostraram que a incorporação dos biopolímeros quitosana, óleo branqueado e AGL de atum são alternativas promissoras na elaboração dos filmes à base de gelatina de pescado.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No que tange a aplicação de gelatinas de pescado como fontes de matéria–prima para produção de embalagens, pôde-se constatar que a gelatina de pescado, a quitosana e óleos oriundos, também de resíduos de pescado, são promissores para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. No entanto, alguns estudos ainda são necessários para que estes possam ser comercializados e efetivamente cheguem ao consumidor. Sendo assim, algumas possíveis linhas de pesquisa são sugeridas, para que se possa dar continuidade ao que foi desenvolvido no presente trabalho, como por exemplo:

- Estudo microbiológico das embalagens em alimentos, com o intuito de avaliar os efeitos da incorporação do agente reticulante, da quitosana e da fração lipídica, nesta característica;
- Estudo de biodegradabilidade das embalagens, para fornecer maiores parâmetros de consumo e aplicação das mesmas;
- Estudo do tamanho da massa molar da gelatina, a fim de investigar os efeitos nas propriedades de solução polimérica que interferem na formação do filme;
- Estudo de novos agentes reticulantes, que possibilitem uma melhor interação com a incorporação de aditivos como a quitosana e lipídios;
- Estudo da incorporação de novas frações lipídicas e de oxidação do alimento, possibilitando uma maior aplicação para os lipídios;
- Estudo de outras formas de produção dos filmes, como por eletrofiação e ceras, a fim de estudar as diferenças nas propriedades mecânicas, de permeação ao vapor d’água e óticas, assim como se interferem na biodegradabilidade e aplicação no alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; OVISSIPOUR, M.; PRODPRAN; T. Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. **Food Chemistry**, v. 127, p. 508–515, 2011.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; AGUSTINI, T. W. Physico–mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 189–199, 2012.

AHMAD, T.; ISMAIL, A.; AHMAD, S. A.; KHALIL, K. A.; AWAD, E. A.; LEO, T. K.; IMLAN, J. C.; SAZILI, A. Q. Characterization of gelatin from bovine skin extracted using ultrasound subsequent to bromelain pretreatment. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 264–273, 2018.

AL-RUQAIE, I. M.; KASAPIS, S.; ABEYSEKERA, R. Structural properties of pectin-gelatin gels. Part II: effect of sucrose/glucose syrup. **Carbohyd Polymers,** v. 34(4), p. 309–321, 1997.

ALFARO, A. T.; FONSECA, G. G.; PRENTICE–HÉRNANDEZ, C. Enhancement of functional properties of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin at different pH values. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2118–217, 2012.

ALFARO, A. T.; FONSECA, G. G.; BALBINOT, E.; MACHADO, A.; PRENTICE, C.; ALFARO, A. D. T.; FONSECA, G. G.; BALBINOT, E.; MACHADO, A.; PRENTICE, C. Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. **Food Science and Technology, Campinas**, v. 33, p. 592–595, 2013.

ALFARO, A. T.; FONSECA, G. G.; BALBINOT, E.; DE SOUZA, N. E.; PRENTICE, C. Yield, viscosity, and gel strength of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin: Optimization of the extraction process. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, p. 765–773, 2014

ALSARRA, I. A.; BETIGERI, S. S.; ZHANG, H.; EVANS, B. A.; NEAU, S. H. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase–loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v. 23, p. 3637–3644, 2002.

AMIRKOLAIE, A. K. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, p. 19–26, 2011.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED., G; HERAS, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203–230, 2009.

ARFAT, A. Y.; AHMED, J.; HIREMATH, N.; AURAS, R.; JOSEPH, A. Properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver–copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 191–202, 2017.

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SUMPAVAPOL, P.; SONGTIPYA, P. Physico–mechanical characterization and antimicrobial properties of fish protein isolate/fish

skin gelatin–zinc oxide (ZnO) nanocomposite films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 101–112, 2016.

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

ASTM. Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting. Method: D00882–02. In. In **ASTM annual book of ASTM standards** (p. 160–168). Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 2000a.

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials. Method: E00996–00. In: **ASTM annual book of ASTM standartds** (p. 907–914). Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2000b.

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; CHIOU, B.; OLSEN, C. W.; BECHTEL, P. J.; OLSON, D. A.; MCHUGH, T. H. Gelation, oxygen permeability, and mechanical properties of mammalian and fish gelatin films. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. 519–524, 2011.

BAILEY, A. J., LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. New York**:** Elsevier Applied Science, 1989.

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

BANDEIRA, S. F.; SILVA, R. S. G.; MOURA, J. M.; PINTO, L. A. A. Characterization and film–forming properties of gelatins from whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) skin and bones. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, p. 447–456, 2017.

BANNACH, G.; PERPÉTUO, G. L.; CAVALHEIRO, É. T. G.; CAVALHEIRO, C. C. S.; ROCHA, R. R. Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero pet: Um experimento para ensino de análise térmica. **Quimica Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825–1829, 2011.

BAPTISTA, C.; DELLOVA, D.; DONATI, G.; CEZÁRIO, G.; REAL, J.; LINO, J.; ALBUQUERQUE, L.; SANTOS, M.; OLIVEIRA, M.; VIEIRA, R. Anuário peixe BR da piscicultura 2018. **Associação Brasileira da Piscicultura**, p. 71, 2018.

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

BENBETTAÏEB, N.; KUREZ, M.; BORNAZ, S.; DEBEAUFORT, F. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 94(12), p. 2409-2419, 2014.

BERTAN, L. C.; TANADA–PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and Brazilian elemi on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 73–82. 2005.

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

BRANDALISE, E. B. **Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis de gelatina recuperada de resíduo do couro curtido ao cromo (III) com tratamento enzimático**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade de Caxias do Sul, 2017.

BRITISH STANDARD INSTITUTION. Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods). London, UK: **BSI Standard**, 1975.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low ph whey protein–based edible films containing p–aminobenzoic or sorbic acids. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 865–870, 2001.

CAI, L.; SHI, H.; CAO, A.; JIA, J. Characterization of gelatin/chitosan ploymer films integrated with docosahexaenoic acids fabricated by different methods. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–11, 2019.

CANEVALORO, S. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**, Artliber Editora, 2004.

CATALINA, M.; ATTENBURROW, G. E.; COT, J.; COVINGTON, A. D.; ANTUNES, A. P. M. Influence of crosslinkers and crosslinking nethod on the properties of gelatin films extracted from leather solid waste. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 2105–2011, 2010.

CHANDRA, M. V.; SHAMASUNDAR, B. A. Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of freshwater fish (*Catla catla*). **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 47–54, 2015.

CHAVES, P. T.; VINK, J. M. Rejeitos da atividade pesqueira no litoral do Paraná: gestão atual e potencial para destinação alternativa. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, v. 6, p. 1-10, 2017.

CHÁVEZ, F. V.; HELLSTRAND, E.; HALLE, B. Hydrogen exchange and hydration dynamics in Gelatin gels. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 43, p. 21551–21559, 2006.

CHIOU, B. S.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BECHTEL, P. J.; JAFRI, H.; NARAYAN, R.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Cold water fish gelatin films: effects of cross-linking on thermal mechanical, barrier and biodegradation properties. **European Polymer Journal.** v. 44, p. 3748-3753, 2008.

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

CRÉXI, V. T.; MONTE, M. L.; SOUZA–SOARES, L. A.; PINTO, L. A. A. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. **Food Chemistry**, v. 119, p. 945–950, 2010.

CRÉXI, V. T.; MONTE, MAURÍCIO L.; MONTE, MICHELI L.; PINTO, L. A. A. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: chemical hydrolysis and urea complexation. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 89, p. 329–334, 2012.

CRINI, G.; BADOT, P. M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies. A review of recent literature. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33(4), p. 399–447, 2008.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Protein as agricultural polymers for packaging production. **Cereal Chemistry Journal**, 75, p. 1–9, 1998.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**, Artmed, 2010.

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

DELLA TORRE, LICHTIG. J.; BERAQUET, N.J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, 2004.

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

DINÇER, M. T.; ERDEM, Ö. A.; KALKAN, H.; ÜÇOK, M. Ç. Comparison of recovered carp scales (*Cyprinus carpio*) gelatin and commercial calf and pork skin gelatins. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 33, p. 335–341, 2016.

DOTTO, G.; PINTO, L. A. A. Adsorption of food dyes acid blue 9 and food yellow 3 onto chitosan: Stirring rate effect in kinetics and mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 164–170, 2011.

ENGELMANN, J. I.; SILVA, P. P.; IGANSI, A. V.; POHNDORF, R. S.; CADAVAL, T. R. S.; CREXI, V. T.; PINTO, L. A. A. Structured lipids by swine lard interesterification with oil and esters from common carp viscera. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 4, p. 1–9, 2018.

FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 393–400, 2008.

FELTES, M. M. C.; PITOL, L. O.; CORREIA, J. F. G.; GRIMALDI, R.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L. Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil triglycerides by chemical and enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 168-176, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2016.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Estatísticas de produção de peixes e pesca**, 2018. Disponível em: http://www.fao.org/fi/statist/. Acesso em: 15/10/2018.

FENG, X.; NG, V. K.; MIKS–KRAJNIK, M.; YANG, H. Effects of fish gelatin and tea polyphenol coating on the spoilage and degradation of myofibril in fish fillet during cold storage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, p. 89–102, 2017.

FERNANDES, A. P. S.; COSTA, J. B.; SOARES, D. S. B.; DE MOURA, C. J.; DE SOUZA, A. R. M. Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 192–199, 2015.

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

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

HANANI, Z. A.; BEATTY, E.; ROOS, Y. H.; MORRIS, M. A.; KERRY, J. P. Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 606–614, 2012.

HE, S.; YIN, T.; ZHEN, J.; XU, X. Cross–linking of gelatin by chlorine dioxide steam. **Food Hydrocolloids,** v. 45, p. 63–71, 2015.

HOINACKI, E.; KIEFER, C.; MOREIRA, M. **Manual básico de processamento do couro**. Porto Alegre: SENAI, 1994.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 82-90, 2011.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1490–1495, 2013.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Fabrication of bio–nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 172–182, 2015.

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

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1266–1274, 2016.

HUANG, T.; TU, Z. C.; WANG, H.; LIU, W.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; SHANGGUAN, X. C. Comparison of rheological behaviors and nanostructure of bighead carp scales gelatin modified by different modification methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1256–1265, 2017.

JASOUR, M. S.; EHSANI, A.; MEHRYAR, L.; NAGHIBI, S. S. Chitosan coating incorporated with the lactoperoxidase system: An active edible coating for fish preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1373–1378, 2015.

JOANNA, T.; MAŁGORZATA, M.; PIOTR, K.; MARZENA, Z. Characterization of carp (*Cyprinus carpio*) skin gelatin extracted using different pretreatments method. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 169–179, 2018.

KARAYANNAKIDIS, P. D.; ZOTOS, A. Fish processing by–products as a potential source of gelatin: a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, p. 65–92, 2016.

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

KAYSER, C. G. R.; KREPSKY, L. H.; OLIVEIRA, M. R.; LIBERALI, R.; COUTINHO, V. Benefícios da Ingestão de Ômega 3 e a Prevenção de Doenças Crônico Degenerativas. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 4, n. 21, p. 137–146, 2010.

KOLI, J. M.; BASU, S.; NAYAK, B. B.; KANNUCHAMY, N.; GUDIPATI, V. Improvement of gel strength and melting point of fish gelatin by addition of coenhancers using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 503–509, 2011.

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

KWAK, H. W.; LEE, H.; PARK, S.; LEE, M. E.; JIN, H.J. Chemical and physical reinforcement of hydrophilic gelatin film with di–aldehyde nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

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

LI, T.; LI, J.; HU, W.; L, X. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservaties. **Food Chemistry**, v. 138, p. 821–826, 2013.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1095–1101, 2011.

LIU, H. Y.; HAN, J.; GUO, S. D. Characteristics of the gelatin extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) head bones. **Lebensmittel–Wissenchaft Technologie**, v. 42, p. 540–544, 2009.

LIU, S.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. **Journal of Food Engineering**, n. 73, p. 203-209, 2006.

LV, L. C.; HUANG, Q. Y.; DING, W.; XIAO, X. H.; ZHANG, H. Y.; XIONG, L. X. Fish gelatin: The novel potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 63, n. January, 2019.

MAJETI, N. V.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosans applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

MARCH, B. Os suplementos de colágeno UC2 são úteis para a artrite? **Revista Brasileira de Educação de Jovens e Adultos**, ISSN 2317-6571, 2019. Disponível em: http://www.revistas.uneb.br/index.php/educajovenseadultos/comment/view/5692/0/125205. Acesso em: 02 mar. 2019.

MARONI, J. R. Polêmica entre bem-estar animal e religião cria oportunidade para o Brasil Disponível em: https://www.gazetadopovo.com.br/agronegocio/polemica-entre-bem-estar-animal-e-religiao-vira-oportunidade-para-o-brasil/, **Gazeta do Povo**, 2020.

MELO, A. R.; STIPP, N. A. F. A piscicultura em cativeiro como alternativa econômica para as áreas rurais. **Geografia**, Londrina, v. 10, p. 175–193, 2001.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects. Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90(9), p. 759– 769, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. RDC n° 270, 22 de setembro de 2005, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** – ANVISA, 2005.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOREIRA, C. D. F. **Hidrogéis injetáveis a base de quitosana / gelatina / nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea : estudo *in vitro* e *in vivo***. 2018. 149p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2018.

MOURA, J. M. **Desenvolvimento de filmes e blendas produzidas a partir de biomateriais para aplicação em embalagens ativas**. 2018. 166p. Tese (Doutorado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 2018.

MOURA, J. M.; FARIAS, B. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MOURA, C. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. **Journal Polymer Environment**, v. 23, p. 470–477, 2015.

MOURA, C. M.; MOURA, J. M.; SOARES, N. M.; PINTO, L. A. A. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. **Chemical Engineering and Processing**, v. 50, p 351–355, 2011.

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

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

NAVARRO, G. G.; PACHECO, A. R.; ALVARADO, L. B.; GARCIA, J. O. Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oil of Dasyatis brevis and Gymnura marmorata rays. **Food Chemistry**, n. 87, p. 89-96, 2004.

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

NO, H. K.; MEYERS, S. P.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU, Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of food: A review. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, 2007.

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

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

PAIM, R.M.; MONTE, M. L.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus carpio*) utilizando o método da complexação com uréia. **Revista Vetor**, v. 22, p. 18–37, 2012.

PANG, Z.; DEETH, H.; YANG, H.; PRAKASH, S.; BANSAL, N. Evaluation of tilapia skin gelatin as a mammalian gelatin replacer in acid milk gels and low–fat stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 3436–3447, 2017.

PAPIN, D. a Gelatina e seus benefícios para a saúde humana. **Food Ingredients Brasil**, 2011.

PEIXEBR. Anunário PEIXEBR da piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, p. 138, 2019

PELISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch–chitosan films incorporated with orégano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7499–7504, 2009.

PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCCI, J. F. Chitosan–gelatin composites and bi–layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1372–1381, 2011.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers. Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34(7), p. 641–678, 2009.

PONTONI, L.; FABBRICINO, M. Use of chitosan and chitosan–derivatives to remove arsenic from aqueous solutions–a mini review. **Carbohydrate Research**, v. 356, n. 1, p. 86–92, 2012.

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

PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. Chitin/ chitosan: modifications and their unlimited application potential–an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n.1, p. 117–131, 2007.

QIU, X.; CHEN, S.; LIU, G.; YANG, Q. Quality enhancement in the Japanese sea bass (Lateolabrax japonicas) fillets stored at by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. **Food Chemistry**, v. 162, p. 156–160, 2014.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Quimica**, v. 5, n. 1, p. 2–15, 2013.

RETINGER, J. M. The mechanism of the ninhydrin reaction: a contribution to the theory of color of salts of alloxantine–like compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 39, p. 1059–1066, 1917.

RIISPOA – **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Seção VI – Conservas, Artigo 433, 1997.

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

ROCHA, M.; LOIKO, M. R.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 213–220, 2013.

ROJAS, V. M.; GOZZO, A. M. Extração e caracterização de gelatina de subprodutos suínos. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, 2017.

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

ROSMAWATI; ABUSTAM, E.; TAWALI, A. B.; SAID, M. I.; SARI, D. K. Effect of body weight on the chemical composition and collagen content of snakehead fish *Channa striata* skin. **Japanese Society of Fisheries Science**. [S.I.:s. n.], 2018.

SAI–UT, S.; JONGJAREONRAK, A.; RAWKUEN, S. Re–extraction, recovery, and characteristics of skin gelatin from farmed giant Catfish. **Food Bioprocess Technologies**, v. 5, p. 1197–1205, 2012.

SANTOS, J. P.; ESQUERDO, V. M.; MOURA, C. M.; PINTO, L. A. A. Crosslinking agents effect on gelatins from carp and tilapia skins and in their biopolymeric films. **Colloids and Surfaces A**, v. 539, p. 184–191, 2018.

SEBBEN, C. L.; BEIRÃO, L. H.; MEINERT, E. M.; TEIXEIRA, E.; DAMIAN, C. Rendimento e avaliação sensorial de hambúrgueres de carpa (*Cyprinus carpio*) com diferentes condições de processamento e armazenagem sob congelamento. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, 2000.

SEBRAE–MG. **Criação de peixes.** Belo Horizonte, 2006. Disponível em www.sebraemg.com.br. Acessado em 02/10/2018.

SHAKILA, R. J.; JEEVITHAN, E.; VARATHARAJAKUMAR, A.; JEYASEKARAN, G.; SUKUMAR, D. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 30–36, 2012.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução da pscicultura no Brasil: Diagnósticos e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilapia. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA**, p. 35, 2017.

SILVA, D. R. B. DA; MIRANDA, P. F.; SOARES, E. D. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saude Materno Infantil**, v. 7, n. 2, p. 123–133, 2007.

SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PINTO, L. A. A. Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 580–585, 2014.

SILVA, R. S. G. **Obtenção de gelatina de peles de bijupirá (*Rachycentron canadum*), modificação e produção de filmes.** 2013. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 2013.

SILVA, R. S. G; BANDEIRA, S. F; PETRY, F. C; PINTO, L. A. A. Extração de gelatina a partir das peles de cabeça de carpa comum. **Ciência Rural**, v. 41, p. 904–909, 2011.

SILVA, T. F. da.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, p. 530–9, 2012.

SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, E.; WYSOCZAŃSKI, T.; WAGNER, J.; CZYŻ, K.; BODKOWSKI, R.; LOCHYŃSKI, S.; PATKOWSKA-SOKOŁA, B. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders—a review.

Nutrients, v. 10, n. 10, p. 1–21, 2018.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. Química Orgânica 2, v. 2, 8º edição, **Editora LTC**, 2006.

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

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; GOLI, S. A. H.; FATHI, M. Fabrication and characterization of electrospun gelatin nanofibers crosslinked with oxidized phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1062-1068, 2017.

THE, P. D.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A.; LUU, D. Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 691–699, 2009.

TINRAT, S.; SILA–ASNA, M. Optimization of gelatin extraction and physico–chemical properties of fish skin and bone gelatin: its application to panna cotta formulas. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 5, p. 263–73, 2017.

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

URUNGA, J.; PUERTA, A. I.; ETXABIDE, A.; DUEÑAS, M. T.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Citric acid–incorporated fish gelatin/chitosan composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 86, p. 95–103, 2019.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L.; TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 531–537, 2013.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ–MARTÍNEZ, C. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 536–547, 2009.

VAZ, D. S. S.; GUERRA, F. M. R. M.; GOMES, C. F.; SIMÃO, A. N. C.; JUNIOR, J. M. a Importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, p. 48–54, 2014.

VOSS, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society colour chart. **HortiScience**, v. 27, p. 1256–1260, 1992.

WANG, L.; AUTY, M.A.E.; RAU, A.; KERRY, J.F.; KERRY, J.P. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin–based biopolymer films. **Journal Food Engineering**, v. 90, p. 11–19, 2009.

WANG, Z.; ZHOU, J.; WANG, X.; ZHANG, N.; SUN, X.; MA, Z. S. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soubean

protein isolate–based oleic acid/stearic acid blend edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 51–58, 2014.

WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodoly. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 749-753, 2007.

WOESSNER, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, n° 2, p. 440—47, 1961.

WOLF, K. L. **Propriedades físico–químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, 2007.

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

WU, J. C.; CHEN, C. C.; CHEN, K. H.; CHANG, Y. C. Controlled growth of aligned α–helical–polypeptide brushes for tunable electrical conductivity. **Applied Physics Lett**ers, v. 98, p. 133–304, 2011.

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

YAO, Y.; DING, D.; SHAO, H.; PENG, Q.; HUANG, Y. Antibacterial activity and physical properties of fish gelatin–chitosan edible films supplemented with d–limonene. **International Journal of Polymer Science**, p. 1–9, 2017

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

YANG, H.; WANG, Y.; ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1541–1550, 2008.

ZHAO, Y.; SUN, Z. Effects of gelatin–polyphenol and gelatin–genipin cross–linking on the structure of gelatin hydrogels. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. S2822–S2832, 2018.

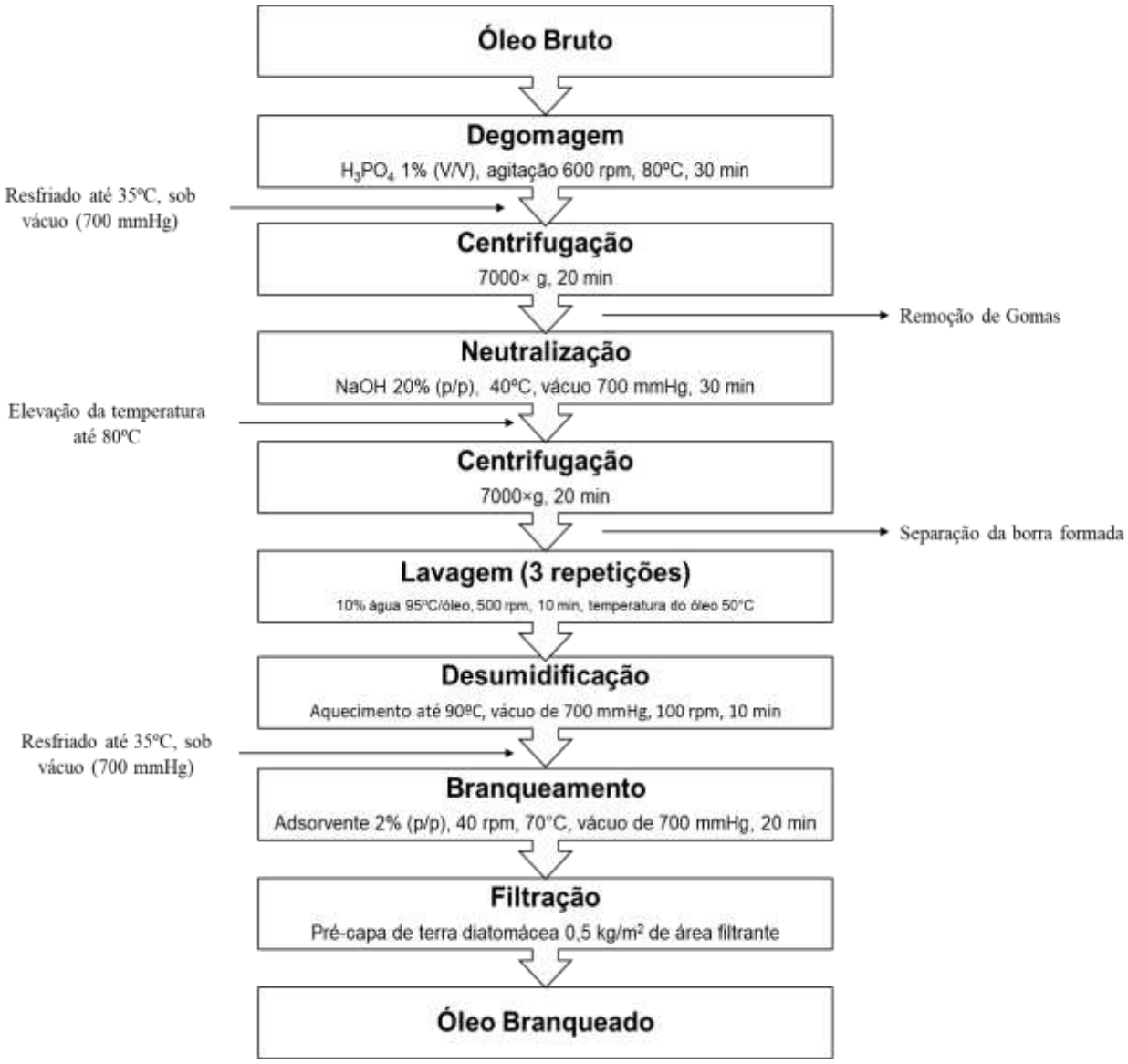
ZENG, S.; YIN, J.; YANG, S.; ZHANG, C.; YANG, P.; WU, W. Structure and characteristics of acid and pepsin–solubilized colagens from skin of cobia (*Rachycentron canadum*). **Food Chemistry**, v. 29, p. 100–105, 2012.

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Obtenção do óleo branqueado

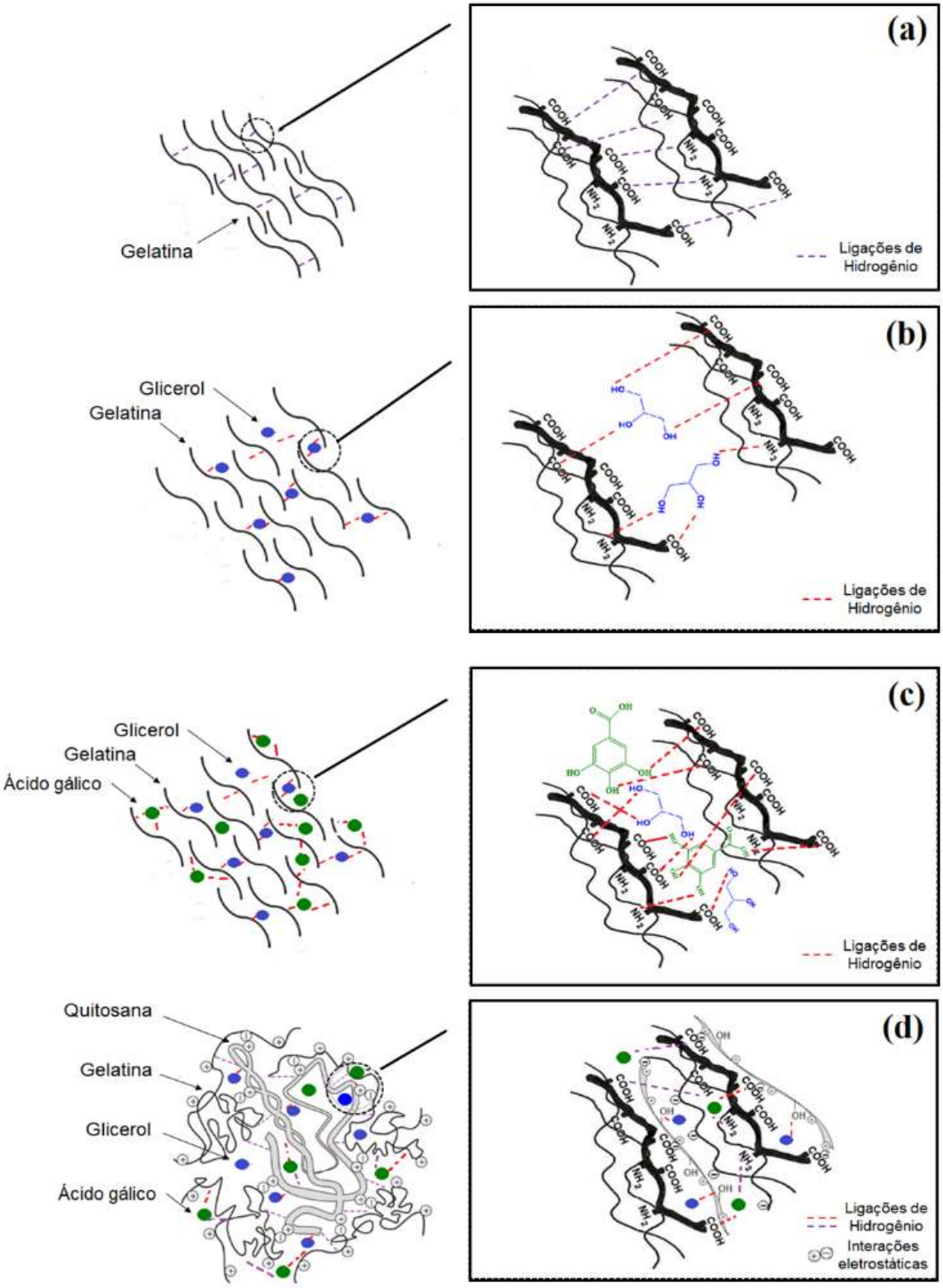
Figura 1A – Fluxograma para obtenção do óleo branqueado de cabeça de atum



Fonte: Adaptado de Crexi et al. (2010)

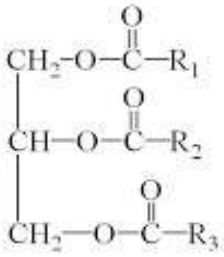
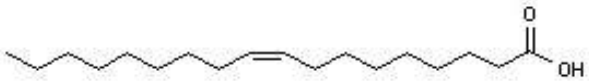
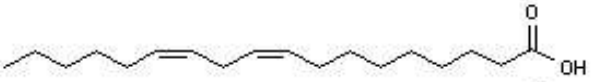
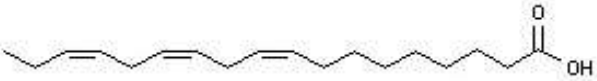
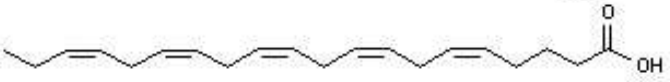
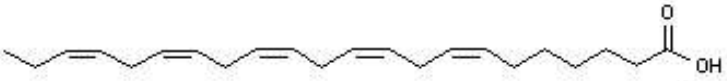
APÊNDICE 2 – Interações intermoleculares nos filmes à base de gelatina

Figura 2A – Interações intermoleculares nos filmes de (a) gelatina, (b) gelatina/glicerol, (c) gelatina reticulada com ácido gálico e glicerol e (d) gelatina reticulada com ácido gálico, glicerol e incorporada com quitosana



APÊNDICE 3 – Estruturas químicas do triacilglicerol e de ácidos graxos

Figura 3A – Estrutura química do triacilglicerol e dos principais ácidos graxos encontrados nos óleos

Nomenclatura abreviada	Estrutura química
Triacilglicerol	
Ácidos graxos saturados	
14:0	
16:0	
18:0	
Ácidos graxos monoinsaturados	
16:1n-7	
18:1n-9	
Ácidos graxos polinsaturados	
18:2n-6	
18:3n-3	
20:5n-3	
22:5n-3	
22:6n-3	