



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE**  
**MATERIAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA A PARTIR DO RESÍDUO DE**  
**CMS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

**ALANNE TAMIZE DE MEDEIROS SALVIANO**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Itamara Farias Leite**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2021**

**ALANNE TAMIZE DE MEDEIROS SALVIANO**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA A PARTIR DO RESÍDUO DE  
CMS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba, como exigência à obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Itamara Farias Leite

JOÃO PESSOA - PB

2021

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S184e Salviano, Alanne Tamize de Medeiros.

Extração e caracterização de gelatina a partir do resíduo de CMS de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) / Alanne Tamize de Medeiros Salviano. - João Pessoa, 2021.

77 f. : il.

Orientação: Itamara Farias Leite.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Rã-touro - Pré-tratamento. 2. Propriedades físico-químicas. 3. Resíduo. 4. Sustentabilidade. I. Leite, Itamara Farias. II. Título.

UFPB/BC

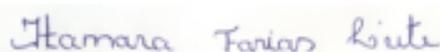
CDU 597.851(043)

ALANNE TAMIZE DE MEDEIROS SALVIANO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA A PARTIR DO RESÍDUO DE  
CMS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

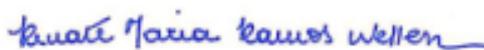
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba, como exigência à obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais.

Aprovado em: 24 de agosto de 2021



---

Profª. Dra. Itamara Farias Leite  
(DEMAT/CT/UFPB – Orientadora)



---

Profª. Dra. Renate Maria Ramos Wellen  
(DEMAT/CT/UFPB – Examinadora interna)



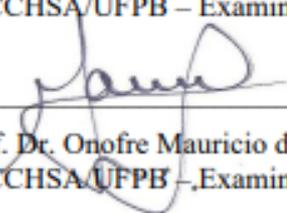
---

Profª. Dra. Suédina Maria de Lima Silva  
(UAEMa/CCT/UFCG – Examinadora Externa)



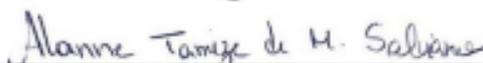
---

Prof. Dr. Alex Poeta Casali  
(DGTA/CCHSA/UFPB – Examinador Externo)



---

Prof. Dr. Onofre Mauricio de Moura  
(DGTA/CCHSA/UFPB – Examinador Externo)



---

Alanne Tamize de Medeiros Salviano  
(Discente)

## **DEDICATÓRIA**

As minhas raízes: José Salviano Filho e Edite de Medeiros Salviano e aos meus frutos: Dante Salviano Dantas, Ísis Salviano Dantas e Lis Salviano Dantas.

*“Quando perco o chão, Tu me levantas  
E quando não consigo encontrar solução  
Tu estás ali pra me estenderes a mão  
E quando a dor aperta o meu coração  
E fico sem resposta em meio à solidão  
Escuto a Sua voz me chamando para vencer  
Pra confiar e em Sua destra descansar  
E com Seu poder posso ir além das minhas forças  
A minha força está em Ti  
Meu Deus que nunca falha  
Meu Deus é minha muralha  
Sei que eu não vou cair e não vou desistir  
Pois Ele me sustenta e me faz vencer”*

(Léo Casper)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado constantemente me protegendo, capacitando e guiando pelas estradas da vida.

Aos meus pais, Edite de Medeiros Salviano e José Salviano Filho, pelos ensinamentos diários e principalmente por ter me ensinado a não desistir dos meus sonhos. À minha mãe, pelas orações constantes e vibrações positivas.

Aos meus filhos, Dante, Lis e Ísis por recarregarem minhas energias diariamente me dando forças para seguir em frente.

Aos meus irmãos: Arllyson, Alyne e Adriana e ao meu querido sobrinho Túlio Maranhão pelo apoio, companheirismo e incentivo durante este percurso.

À Leonardo Dantas da Silva, pela compreensão da minha ausência e cuidados com nossos filhos.

À minha orientadora, Professora Dra. Itamara Farias Leite por ter acreditado e incentivado à pesquisa, pela atenção e orientação. Deixo o meu eterno agradecimento pela dedicação, compreensão, profissionalismo e pelo tempo a mim dispensados para a realização deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, pela dedicação e contribuição de cada um neste trabalho.

A equipe do Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura do CCHSA/UFPB: Professor Dr. Onofre Mauricio de Moura, Prof. Dr. Alex Poeta Casali, Antônio Rosendo da Costa, Fabiano e Victor Porto, pela boa convivência, informações científicas, sugestões valiosas, apoio e suporte técnico para obtenção do material de estudo. Em especial, ao professor Onofre Maurício de Moura, pelas valiosas sugestões e parceria.

A equipe técnica do Laboratório de Análises Físico-Química de Alimentos do CCHSA, Campus III da UFPB, pela presteza dos serviços. Especialmente, Carlos Amaral pela solidariedade e dedicação nos momentos de entaves deste trabalho.

Aos estudantes do Curso de Engenharia de Materiais: Amanda, Pedro Henrique, e Renata, pelo suporte para realização de algumas etapas deste trabalho.

Aos servidores do Laboratório de Materiais Poliméricos do Departamento de Engenharia de Materiais da UFPB.

Aos servidores do Laboratório de Solidificação Rápida do Departamento de Engenharia Mecânica da UFPB.

Aos servidores do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTIBIO) da Universidade Federal de Campina Grande.

À Coordenação do PPECM ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPECM) pelo compartilhamento de conhecimentos.

Ao IFPE, Campus Afogados da Ingazeira, pela concessão do meu afastamento para conclusão deste trabalho.

A todos que emanaram energias positivas para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

## RESUMO

**SALVIANO, Alanne Tamize de Medeiros** Extração e caracterização de gelatina a partir do resíduo de CMS de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). 2021. Tese. Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

A procura por alimentos saudáveis tem proporcionado o aumento no consumo de carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no Brasil. Porém, seu beneficiamento gera uma grande quantidade de resíduos constituídos de ossos e cartilagens. Esses resíduos constituem matéria-prima de alta qualidade para obtenção de gelatina com ampla aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentos, cosméticos e fotográficas. A gelatina é um polímero natural formado pela mistura de peptídeos e proteínas biopoliméricas, obtida pela hidrólise parcial do colágeno. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo fazer a extração da gelatina a partir do aproveitamento de um resíduo da carne mecanicamente separada (RCMS) de rã-touro e sua devida caracterização. Para a extração das gelatinas foram utilizados dois métodos: 1. Pré-tratamento a base de desmineralização: tratamento com NaOH e acidificação com ácido clorídrico, seguido de extração da gelatina em água destilada sob aquecimento a 60 °C por 2h, denominada gelatina com pré-tratamento (GCPT); e 2. Extração da gelatina usando apenas água destilada sob aquecimento a 60 °C por 2h, denominada gelatina sem pré-tratamento (GSPT). As gelatinas extraídas foram caracterizadas quanto a quantidade de proteínas totais, cinzas, hidroxiprolina, força de gel, pH, cor, composição de aminoácidos, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). O método com pré-tratamento foi a que apresentou melhor condição de extração da gelatina em relação as propriedades físico-químicas e tecnológicas, sendo então, a escolhida para ser caracterizada em relação aos parâmetros de qualidade exigidos pelas legislações, nacional e internacional, aplicadas as gelatinas comerciais. Os resultados indicaram que a GCPT do RCMS de rã-touro foi isolada com maior sucesso, ou seja, com níveis de pureza mais elevados, devido ao menor teor de cinzas, maiores teores de proteínas e hidroxiprolina. O método de extração influenciou nas propriedades físico-químicas, estruturais e tecnológicas das gelatinas do RCMS de rã-touro, sendo estas propriedades melhores para a gelatina obtida com pré-tratamento (GCPT), com potencial de aplicação industrial, destacando principalmente o valor significativo da força de gel, baixo teor cinzas, cor próxima ao branco e boas propriedades térmicas para aplicações abaixo de 200 °C. A GCPT atende aos parâmetros de qualidade físico-químicos estabelecidos pela legislação vigente. No entanto, em termos de qualidade microbiológica sugere-se um maior controle higiênico-sanitário no processo de produção e armazenamento de modo a evitar contaminações e assegurar maior qualidade ao produto extraído.

**Palavras – chave:** Pré-tratamento. Propriedades físico-químicas. Resíduo. Sustentabilidade.

## ABSTRACT

**SALVIANO, Alanne Tamize de Medeiros.** Extraction and characterization of gelatin from the residue of CMS of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). 2021. Tese. From Materials Science and Engineering of Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2021.

The search for healthy foods has provided an increase in the consumption of american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. However, its processing generates a large amount of waste made up of bones and cartilage. These residues constitute high quality raw material for obtaining gelatine with wide application in the pharmaceutical, food, cosmetic and photographic industries. Gelatin is a natural polymer formed by a mixture of biopolymeric peptides and proteins, obtained by the partial hydrolysis of collagen. In this context, the present work aimed to extract gelatine from the use of a mechanically separated meat residue (RCMS) from bullfrogs and its proper characterization. For the extraction of gelatins were used two different methods: 1. Use of a pre-treatment, based on demineralization, treatment with NaOH and acidification with hydrochloric acid, followed by extraction of gelatin in distilled water under heating at 60 °C for two hours, called gelatin with pre-treatment (GCPT); and 2. use of only the extraction of gelatine in distilled water under heating at 60 °C for two hours, called gelatin without pretreatment (GSPT). The extracted gelatins were characterized for total protein, ash, hydroxyproline, gel strength, pH, color, amino acid composition, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC). The pre-treatment method was the one that presented the best gelatin extraction condition in relation to physicochemical and technological properties, being then chosen to be characterized in relation to the quality parameters required by national and international legislation, applied to commercial gelatins. The results indicated that GCPT from bullfrog RCMS was isolated with greater success, that is, with higher levels of purity, due to lower ash content, higher protein and hydroxyproline contents. The extraction method influenced the physical, chemical, structural and technological properties of the bullfrog RCMS gelatins, these properties being better for the gelatin obtained with pre-treatment (GCPT), with potential for industrial application, highlighting mainly the significant value of gel strength, low gray content, close to white color and good thermal properties for applications below 200°C. GCPT meets the physical-chemical quality parameters established by current legislation. However, in terms of microbiological quality, a greater hygienic-sanitary control in the production and storage process is suggested in order to avoid contamination and ensure greater quality to the extracted product.

**Keywords:** Pre-treatment. Properties Physicochemical. Residue. Sustainability.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Fluxograma simplificado do procedimento de obtenção do resíduo para extração das gelatinas.....	27
Figura 2 – Fluxograma resumido da obtenção de gelatina com pré-tratamento .....	29
Figura 3 – Fluxograma resumido da obtenção de gelatina sem pré-tratamento.....	31
Figura 4 – Cor da Gelatina em pó: a) GCPT- Gelatina Com Pré-Tratamento; b) GSPT- Gelatina Sem Pré-Tratamento. ....	46
Figura 5 – Espectro no infravermelho das gelatina do RCMS de rã obtidas por diferentes métodos: GSPT- Gelatina Sem Pré-Tratamento; GCPT - Gelatina Com Pré-Tratamento.....	49
Figura 6 – Termograma de calorimetria exploratória diferencial das gelatina extraídas do RCMS de rã-touro durante a segunda corrida. RCMS: Resíduo de Carne Mecanicamente Separada, GSPT- Gelatina Sem Pré-Tratamento; GCPT - Gelatina Com Pré-Tratamento.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da composição centesimal do RCMS de rã-touro com as matérias-primas de diferentes espécies de pescado.....	36
Tabela 2 – Rendimento e características físico-químicas das gelatinas obtidas do RCMS rã-touro.....	38
Tabela 3 – Trabalhos sobre condições de extração, rendimento e propriedades físico-químicas de gelatinas obtidas a partir de diferentes matérias-primas.....	40
Tabela 4 – Propriedades tecnológicas GCPT e GSPT do RCMS de rã-touro.....	44
Tabela 5 – Composição de aminoácidos de gelatinas extraídas de resíduo de CMS de rã-touro.....	47
Tabela 6 – Parâmetros de qualidade físico-químicos da GRCMSR e os limites estabelecidos pelas legislações nacional e internacional.....	55
Tabela 7 – Análises microbiológicas da GRCMSR e os limites máximos permitidos pela legislação nacional e internacional.....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATR	Refletância Total Atenuada
BVT	Bases Voláteis Totais
CCHSA	Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias
CCQA	Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos
CETEA	Centro de Tecnologia de Embalagem
CIE	<i>Comission Internationale de l'Eclairage</i>
CMS	Carne Mecanicamente Separada
DMS	Dorso Mecanicamente Separado
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GCPT	Gelatina Com Pré-Tratamento
GME	<i>Gelatin Manufacturers of Europe</i>
GMIA	<i>Gelatin Manufacturers Institute of America</i>
GSPT	Gelatina Sem Pré-Tratamento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LRPA	Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura
RCMS	Resíduo de Carne Mecanicamente Separada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>3.1 Rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)</b> .....	19
<b>3.2 Gelatina</b> .....	20
<b>3.3 Conversão de colágeno em gelatina</b> .....	23
<b>3.4 Aplicação de gelatina de pescado</b> .....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 Matéria-prima .....	27
4.2. Etapa I - Obtenção e caracterização das gelatinas.....	28
4.2.1 Obtenção da gelatina com pré-tratamento (GCPT) .....	28
4.2.2 Obtenção da gelatina sem pré-tratamento (GSPT) .....	30
4.2.3 Caracterização das amostras .....	31
4.2.3.1 Composição química do RCMS e das gelatinas .....	31
4.2.3.2 Caracterizações das gelatinas .....	32
4.2.3.3 Rendimento .....	32
4.2.3.4 Determinação do pH e da Atividade de água (Aa) .....	32
4.2.2.5 Determinação de cor .....	33
4.2.3.6 Força do gel .....	33
4.2.3.7 Perfil de aminoácidos .....	33
4.2.3.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	34
4.2.3.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	34
4.3 Metodologia Estatística .....	34
4.4 Etapa II - Padrões de qualidade da gelatina .....	34
4.4.1 Determinação de minerais (metais – pesados) .....	35
4.4.2 Análises microbiológicas .....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
5.1 Composição centesimal do resíduo da carne mecanicamente separada (RCMS) de rã-touro .....	36
5.2 Rendimento e composição físico-química de gelatinas .....	37
5.3 Propriedades tecnológicas das gelatinas .....	44

5.4 Perfil de aminoácidos das gelatinas .....	47
5.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das gelatinas .....	48
5.6 Calorimetria exploratória diferencial das gelatinas .....	51
5.7 Parâmetros de qualidade da gelatina .....	52
5.7.1 Parâmetros de qualidade microbiológica .....	58
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura (criação de organismos aquáticos para fins comerciais) é uma atividade de grande destaque mundial na produção de proteína animal para alimentação humana. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO a produção global de pescado atingiu 179 milhões de toneladas em 2018, tendo a aquicultura contribuído com 46 % deste total (FAO, 2020). O consumo aparente *per capita* de pescado cresceu em cerca de 1,5 % ao ano, passando de 9,0 kg/habitante/ano na década de 1960 para 20,5 kg/habitante/ano em 2018, chegando a representar 17 % da ingestão de proteínas animais da população global (FAO, 2020).

Dentre os organismos da aquicultura, a criação de rãs vem cada vez mais se firmando como uma atividade viável e de grande potencial. Isto se deve, entre outros fatores, à qualidade nutricional da carne de rã, que possui um adequado balanceamento de aminoácidos, baixo nível de gordura e colesterol, o que se apresenta como uma importante ferramenta de publicidade (CASALI; MOURA; LIMA, 2005; NÓBREGA *et al.*, 2007).

O Brasil detém uma das melhores tecnologias de criação em cativeiro da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), o Sistema Anfigranja, que lhe permitiu ocupar a segunda posição mundial de maior produtor até o ano de 2012, atrás apenas de Taiwan, segundo o banco de dados da FAO (2014). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016), no último censo agropecuário realizado, o país possuía 193 estabelecimentos de criação de rã, produzindo 160 toneladas da carne do animal.

No entanto, para uma melhor consolidação da cadeia produtiva da carne de rã no mercado, faz-se necessário aproveitar ao máximo seus subprodutos, uma vez que a principal forma de comercialização da carne de rã, tanto no mercado interno como no externo, consiste em coxas congeladas, que representa em torno de 52,7 % do peso da carcaça (MOURA, 2003). Estudos sobre a competitividade da cadeia produtiva da carne de rã-touro, no estado do Rio de Janeiro, constataram que um dos principais pontos negativos, relativos à sua competitividade, é a falta de tecnologia para o aproveitamento de subprodutos, gerando aumento nos custos de produção (CARVALHO, 2011).

Em estudos mais recentes, tem-se observado a utilização do dorso, composto do tórax e braços, que representam 47,3 % da carcaça como matéria-prima para obtenção de carne mecanicamente separada (CMS) e seu posterior uso na elaboração de produtos alimentícios (CONCEIÇÃO *et al.*, 2000; FURTADO *et al.*, 2005; GONÇALVES; OTTA, 2008; FRAGOSO *et al.*, 2013). No entanto, a obtenção da carne mecanicamente separada

(CMS) gera uma grande quantidade de resíduos constituído de ossos e cartilagens sem destino lucrativo para cadeia produtiva da carne de rã.

De acordo com dados da FAO (2016), do volume total de produtos oriundo da pesca e da aquicultura no ano de 2014, 20% corresponderam a resíduos sólidos gerados na cadeia produtiva. Trata-se, como resíduo, todo material que não é aproveitado durante a produção ou consumo, devido às limitações tecnológicas ou mercadológicas, que não apresenta valor de uso ou mercado, podendo resultar em danos ao meio ambiente quando não manejado de forma adequada (SUCASAS, 2011).

Para Gonçalves (2011), par o correto gerenciamento dos resíduos de pescado a aplicação de tecnologias viáveis e aplicáveis podem contribuir para uma maior oferta e diversificação de produtos para o mercado, com incremento na geração de emprego e renda, além da sustentabilidade da cadeia produtiva.

Dessa forma, o aproveitamento do resíduo da desossa mecânica da carne de rã, além de sanar com o problema de eliminação de resíduos orgânicos e materiais com potencial poluentes, proporciona ainda um retorno financeiro para os produtores, pois o seu aproveitamento tem a capacidade de agregar valor a um produto sem apelo comercial até o momento.

Como exemplo, tem-se a gelatina, polímero natural com ampla aplicação industrial, que pode ser produzida a partir de resíduos de pescado (KARIM; BHAT, 2009; OCAK, 2012). Alguns estudos têm demonstrado de forma promissora a extração da gelatina a partir de resíduos de abate de pescado, como ossos (BANDEIRA *et al.*, 2017; XIONG *et al.*, 2021;), pele (CASANOVA *et al.*, 2020; KARNJANAPRATUM *et al.*, 2017), escamas (CAO *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018) e cabeça (KUANG; MOHTAR, 2018; SILVA *et al.*, 2011), com aplicações em diferentes segmentos como revestimento comestível para armazenamento de pescado, microencapsulação na área de cosméticos, estabilizante de emulsão, desenvolvimento de filmes poliméricos, membranas eletrofiadas com propriedades antimicrobianas.

No entanto, o resíduo da carne mecanicamente separada (RCMS) da rã-touro ainda não foi estudado, podendo ser uma matéria-prima promissora para a produção de gelatina. Fato, que despertou o interesse de explorar esse tema como objeto de investigação desta Tese, visando extrair e avaliar as características e propriedades da gelatina oriunda do RCMS da rã-touro por diferentes métodos de extração.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo do aproveitamento de resíduos da carne mecanicamente separada (RCMS) de rã-touro (*L. catesbeianus*) para a obtenção de gelatina e sua devida caracterização.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do pré-tratamento de extração nas propriedades físico-químicas e tecnológicas de gelatinas do RCMS de rã-touro;
- Determinar as propriedades físico-químicas, microbiológicas, reológicas e estruturais da gelatina do RCMS de rã-touro;
- Comparar as propriedades físico-químicas e microbiológicas da gelatina do RCMS de rã-touro com a legislação vigente para as gelatinas comerciais.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

A rã-touro, pertencente à ordem *Anura* e a família *Ranidae*, *Rana catesbeiana*, se destaca entre as demais espécies de rã, por apresentar importante papel ecológico e alto valor econômico (WANG *et al.*, 2014). Em 2007, recebeu novo nome científico *Lithobates catesbeianus* deixando de ser chamada de *Rana catesbeiana* (IHDCA, 2007).

A rã-touro é uma espécie nativa da América do Norte que teve sua criação introduzida no Brasil na década de 30, do século passado, por empreendedores que enxergaram a oportunidade de mercado no cultivo comercial da espécie devido às condições climáticas propícias para seu cultivo. Essa espécie de pescado foi escolhida pelos criadores devido as suas características zootécnicas, tais como: precocidade (crescimento rápido), prolificidade (alto número de ovos por postura) e rusticidade (facilidade de manejo). Outras espécies de rãs, nativas do Brasil, como a rã pimenta, rã manteiga ou paulistinha, também podem ser criadas em cativeiro, mas apresentam, comparativamente com a rã-touro, menor desempenho produtivo e maiores dificuldades técnicas e burocráticas (FERREIRA; PIMENTA; PAIVANETO, 2002).

Foi na década de 80 que a ranicultura se firmou como uma atividade econômica no Brasil. Desde então, essa atividade vem passando por aperfeiçoamentos e, gradativamente, pode-se observar uma melhora significativa de produtividade (MOREIRA, 2011).

A produção média mundial do cultivo da carne de rã, durante o período de 1999-2008, foi em torno de 44.000 toneladas anuais, atingindo em 2008 uma produção recorde de 85.000 toneladas. O Brasil no mesmo período produziu apenas 600 toneladas anuais (FAO, 2010), sendo, praticamente, toda a produção brasileira absorvida pelo mercado interno. Ferreira (2006), ressalta que, se o País se preparar, tem condições de conquistar grande espaço no mercado externo.

O forte crescimento do consumo de carnes brancas, ditas como mais saudáveis, tem projetado a carne de *L. catesbeianus* como uma fonte alternativa de proteína, por apresentar um elevado teor proteico (16,5 %), um bom índice de digestibilidade (acima de 90 %), todos os aminoácidos essenciais, baixo teor de lipídeos (menos de 1 %) e de calorias (69 Kcal/100g) (NOLL; LINDAU, 1987). Mello *et al.* (2006), avaliando a composição química das carnes de

dorso e coxa de rã, encontraram valores médios de: pH (6,3 e 6,0); proteína (16 % e 15,7 %); lipídios (0,2 % e 0,2 %); umidade (79,2 % e 78,3 %); bases voláteis totais (BVT) (9,8 e 10,8 mg de N-BVT/100 g); cinzas (1,2 % e 0,9 %); cálcio (0,09 e 0,05 %). Fidelis (2004) concluiu que a carne de rã apresenta cálcio de boa biodisponibilidade, com absorção equivalente à encontrada para o leite e seus derivados, melhores fontes de cálcio atualmente conhecidas.

Segundo Moura (2003) a carne de rã possui características que a diferenciam das de animais de sangue quente. A rã não deposita gordura intracelular, o que confere à carne suavidade no sabor. Além do sabor delicado, a alta digestibilidade é outro fator que tem atraído a atenção dos consumidores (NÓBREGA *et al.*, 2007). Para Rodrigues *et al.* (2014), a carne de rã e produtos derivados são alternativas mercadológicas promissoras devido à crescente demanda mundial por alimentos que fornecem proteínas de alto valor nutricional.

No mercado interno, os produtos da ranicultura são a carne de rã fresca e/ou congelada, em carcaça inteira ou em partes, principalmente as coxas. Os demais produtos, como o dorso inteiro ou desossado e o dorso em pedaços são pouco explorados. Porém, estudos têm sido realizados por institutos tecnológicos e de pesquisa no que se refere à viabilidade de se aproveitar a carne do dorso da rã, utilizando desossadora mecânica para a obtenção de carne mecanicamente separada (CMS), denominada de dorso mecanicamente separado (DMS) em diferentes formulações alimentícias (CONCEIÇÃO *et al.*, 2000; FRAGOSO *et al.*, 2012; GONÇALVES; OTTA, 2008; MELLO *et al.*, 2006; MOURA, 2003).

No entanto, a obtenção do DMS gera uma grande quantidade de resíduos constituídos de ossos e cartilagens sem aplicação definida e sem fins lucrativos para a cadeia produtiva da carne de rã, sendo descartado como lixo. Esses resíduos constituem matéria-prima de alta qualidade para obtenção de conteúdo proteico e sua utilização de maneira mais eficaz e ecologicamente correta, contribuindo para minimizar os impactos ambientais e aumentar o retorno financeiro para os produtores. Como exemplo, tem a gelatina, polímero natural com ampla aplicação industrial, que pode ser produzida a partir de resíduos de pescado (KARIM; BHAT, 2009; OCAK, 2012).

### **3.2 Gelatina**

De acordo com a legislação brasileira, entende-se por gelatina o produto obtido por meio de hidrólise térmica, química ou enzimática, ou a combinação desses processos, da proteína colagênica presente nas cartilagens, nos tendões, nas peles, nas aparas ou nos ossos

das diferentes espécies animais, seguida de purificação, filtração e esterilização, concentrado e seco (BRASIL, 2017).

Considerada um hidrocoloide, a gelatina é uma mistura de peptídeos e proteínas biopoliméricas obtida pela hidrólise parcial do colágeno (SHAKILA *et al.*, 2012a). O colágeno pode ser encontrado na pele, nos ossos, nos tendões e na cartilagem, e consiste numa estrutura de hélice tripla composta por ligações de hidrogênio interligadas. O colágeno é o principal componente estrutural das proteínas do tecido conjuntivo com até 30% da proteína total no tecido corporal dos vertebrados e invertebrados; consistindo ainda dos aminoácidos glutamina, hidroxiprolina e prolina (DARMANTO *et al.*, 2014).

A composição de aminoácidos da gelatina é similar à do colágeno do qual foi obtida, e são responsáveis pelas propriedades da gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). A gelatina apresenta baixo teor de triptofano, em contrapartida, apresenta alto teor de hidroxiprolina, que é o maior responsável pela estabilidade dessa, devido à sua habilidade para formação de ligações de hidrogênio através da presença do grupamento –OH, embora a prolina também seja importante nesse aspecto (KARIM; BHAT, 2009).

Em função das propriedades estruturais, físicas e químicas o emprego das gelatinas tem se difundido ao longo dos anos nas indústrias farmacêuticas, alimentos, cosméticos e fotográficas (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2009). Na indústria alimentícia é utilizada para aumentar a elasticidade, consistência e estabilidade de produtos além de ser utilizada como clarificante de bebidas (CATALINA *et al.*, 2011; KITTIPHATTANABAWON *et al.*, 2010; GMIA, 2019). As gelatinas também contribuem para enriquecer o conteúdo de proteína dos alimentos e podem funcionar como um filme externo para a proteção contra desidratação, luz e oxigênio (CHOI; REGENSTEIN, 2000; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2000).

Comercialmente, a gelatina é produzida a partir de peles e esqueletos de mamíferos (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000), principalmente bovinos e suínos. Segundo Shakila *et al.* (2012a), 41% da produção mundial de gelatina tem como origem peles suínas, 29,5% ossos bovinos, 28,5% couros bovinos e apenas 1% peles e ossos de pescados. No entanto, alguns problemas de saúde relacionados ao surto de encefalopatia espongiforme bovina, febre aftosa, têm causado grande interesse em encontrar recursos alternativos de colágeno (LIU *et al.*, 2015).

A substituição da gelatina de mamíferos por outras fontes de origem animal tem-se tornado uma alternativa para uma parcela da população que não faz uso de produtos derivados de mamíferos como bovinos e suínos, seja por questões religiosas ou preocupação com saúde. Entre as alternativas, os subprodutos de pescado têm-se mostrado com grande potencial de

aplicação nos variados segmentos devido à alta disponibilidade, rendimento de colágeno relativamente adequado além de menores limitações religiosas (LI *et al.*, 2013). Nos últimos anos grande foco tem sido dado à extração de gelatina a partir de resíduos de pescado como pele (BUENO *et al.*, 2011; KOŁODZIEJSKA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014) ossos (KAEWRUANG *et al.*, 2013; SINTHUSAMRAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2014) e escamas (WENG; WU, 2015).

As gelatinas de mamíferos e de pescados diferem em algumas propriedades físicas e químicas, como na composição de aminoácidos, solubilidade, estabilidade térmica e força do gel (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2000).

Tradicionalmente conhecido como *Bloom*, a força de gel também pode ser expressa em gramas, e é definida como a força, avaliada através da carga em grama, necessária para penetrar em uma superfície de gel de gelatina por 4mm com um probe cilindro padrão de 0,5" de diâmetro. O *Bloom* está relacionado à elasticidade mecânica do gel e é usado para classificar os tipos de gelatina. As gelatinas comerciais podem ter força de gel que variam de baixo *Bloom* (<150), médio *Bloom* (150-220) e alto *Bloom* (>220) (NORZIAH; KEE; NORITA, 2014).

A força de gel (ou *Bloom*) é uma das propriedades funcionais mais importantes da gelatina, pois está diretamente relacionada com a resistência à degradação, sendo através dela possível determinar sua aplicabilidade (CHOI; REGENSTEIN, 2000; LIU; HAN; GUO, 2009).

A força de gel tem grande influência de aminoácidos como prolina e hidroxiprolina, encontradas em maiores quantidades em mamíferos (ALFARO; SILVA, 2010; ARNESEN; GILDBERG, 2007). Bueno *et al.* (2011), ao avaliarem a composição, propriedades físico-químicas e reológicas de gelatina extraída da pele de tilápia, verificaram menor força de gel e menor ponto de fusão para a gelatina de peixe em relação à suína, embora ambas tenham apresentado composição centesimal semelhantes. Kuang e Mohtar (2018) verificaram força de gel e ponto de fusão menores para gelatina extraída da cabeça de peixe (*Decapterus macrosoma*) comparada à gelatina comercial de bovino, bem como uma menor composição de aminoácidos.

Esforços têm sido realizados por pesquisadores com o objetivo de melhorar as características e propriedades físico-químicas de gelatinas de pescado com o intuito de substituir as gelatinas de mamíferos (CAO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2011; SINTHUSAMRAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2014;).

### 3.3 Conversão de colágeno em gelatina

O colágeno é um produto de alto valor proteico e tem sido fonte de investigação para uso industrial devido à sua abundância no tecido animal (bovinos, suínos, caprinos, ovinos, peixes, anfíbios, entre outros). Dentre os vários organismos utilizados para obtenção de colágeno destacam-se os peixes, especialmente devido a sua disponibilidade, ausência de risco de transmissão de doenças, barreiras religiosas, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O colágeno não pode ser utilizado na sua forma original por ser uma proteína insolúvel. No entanto, esta estrutura é capaz de intumescer e armazenar grandes quantidades de água (podendo chegar a 500%), sendo que esse inchaço reduz a adesão interna das fibrilas sem quebrar, no entanto, a estrutura em tripla-hélice, torna a molécula viscosa e passível de utilização (WOLF, 2003). O intumescimento é alcançado após um pré-tratamento químico, em que as ligações não-covalentes são quebradas, de modo a desorganizar a estrutura da proteína, produzindo então a solubilização do colágeno (CATALINA *et al.*, 2011).

Na obtenção de gelatina, o pré-tratamento ácido e/ou alcalino da matéria-prima é utilizado para remover componentes não colagenosos e intumescer o colágeno, desnaturando assim a molécula, e a extração é realizada com elevação da temperatura da água (KARIM; BHAT, 2009).

O aquecimento do colágeno na água leva à sua conversão em gelatina solúvel, formando soluções coloidais e gelificando a uma concentração e temperatura apropriadas. O tratamento térmico cliva as ligações de hidrogênio e ligações covalentes, desestabilizando a tripla-hélice, resultando em gelatina solúvel (CATALINA *et al.*, 2011; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

As etapas de fabricação da gelatina são determinadas em função da matéria-prima e do tipo de gelatina fabricada e, por esses motivos, podem sofrer variações. O processo básico consiste em três etapas: pré-tratamento da matéria-prima, extração da gelatina e purificação/secagem (KARIM; BHAT, 2009).

As propriedades físicas e químicas da gelatina dependem das espécies, matérias-primas, processamento e condições de extração da gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN, 2009). Os métodos empregados na preparação de gelatina de mamíferos são um pouco diferentes dos utilizados para extração de gelatina de peixe, devido à suas diferenças nas propriedades físicas e químicas (KOŁODZIEJSKA *et al.*, 2008).

Kaewruang *et al.* (2013) ao investigarem o efeito da temperatura de extração nas propriedades da gelatina do peixe unicórnio, relataram um aumento na força do gel com o aumento na temperatura de extração. Assim, foi observado que a gelatina extraída a 45 °C teve a menor força do gel (inferior a 100g) enquanto a gelatina extraída numa temperatura mais alta até 65°C apresentou uma maior força de gel (170g).

Sinthusamran, Benjakul e Kishimura (2014) ao estudarem as características e propriedades do gel a partir da gelatina da pele do robalo (*L. calcarifer*), influenciadas pelas condições de extração (temperatura e tempo de extração), verificaram que a força do gel das gelatinas diminuiu à medida que a temperatura de extração e o tempo aumentavam. Dessa forma, sugeriram uma temperatura de extração de 50 °C por um período de 3h para a espécie estudada.

Além dos pré-tratamentos ácidos e alcalinos, que são os métodos utilizados comercialmente para promover o intumescimento adequado e as clivagens de ligações não-covalentes intra e intermoleculares, alguns estudos a respeito do uso de métodos alternativos têm sido avaliados para obtenção de gelatinas de pescado.

Os efeitos da concentração alcalina (NaOH (3-4 mol L<sup>-1</sup>), o tempo de tratamento (45-105 min) e o uso de duas soluções alcalinas na etapa de tratamento para extração de gelatina das cabeças de carpa comum com o objetivo de rendimento em gelatina e força do gel, foram estudados por Silva *et al.* (2011), que concluíram que a condição mais adequada para se obter gelatina com bom rendimento (1,98 %) e alto valor de força do gel (240,3 g) foi utilizando solução alcalina de 3 mol L<sup>-1</sup>, tratamento térmico de 105min e com troca de solução de NaOH.

Jamilah *et al.* (2011) avaliaram o efeito da calagem utilizando solução de cal saturada [Ca (OH)<sub>2</sub>] por 14 dias como pré-tratamento para extração de gelatina a partir da pele de três espécies de peixes tilápia vermelha (*Oreochromis nilotica*), bagre ambulante (*Clarias batrachus*) e bagre listrado (*Pangasius sutchi*). O estudo demonstrou que o processo de calagem empregado é viável para a extração da gelatina da pele de peixes com maiores forças de gel. As características das gelatinas obtidas nesse processo indicam que elas têm boa aplicação comercial. A gelatina obtida da tilápia vermelha apresentou força de gel e ponto de fusão maiores do que as gelatinas obtidas das outras duas espécies estudadas.

Kaewdang *et al.* (2016) avaliaram o efeito do pré-tratamento alcalino utilizando misturas alcalinas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; NaOH) em diferentes proporções com uma concentração de 4% (m/v) na obtenção de gelatina da bexiga natatória do atum amarelo (*Thunnus albacores*). O maior rendimento e a força do gel foram obtidos quando a bexiga natatória foi pré-tratada na

mistura de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaOH}$  (7:3) a uma concentração de 4% (m/v) durante 12 h antes da extração.

Cao *et al.* (2017) ao investigarem o pré-tratamento com enzimas alcalases (pH 9,5-10) usando água eletroquimicamente ativada na extração de gelatina a partir de escamas de robalo (*Lates calcarifer*) e tainha (*Mugil cephalus*), obtiveram gelatinas com um alto teor de proteína, incluindo aminoácidos, compostas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  como componentes principais e exibiram valores relativamente elevados da resistência do gel ( $270,3 \pm 1,3$  g e  $249,1 \pm 0,7$ ) para gelatina das escamas de robalo e da tainha cinzenta, respectivamente.

### 3.4 Aplicação de gelatina de pescado

A qualidade da gelatina para uma determinada aplicação depende em grande parte das propriedades reológicas. Além das propriedades físico-químicas básicas, como parâmetros de composição, solubilidade, transparência, cor, odor e sabor, os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial geral da gelatina são a resistência do gel e a estabilidade térmica (CHO *et al.*, 2004).

Devido às suas propriedades funcionais e tecnológicas a gelatina tem um amplo campo de aplicação em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e áreas fotográficas (KARIM; BHAT, 2009; NHARI *et al.*, 2012; CEBI *et al.*, 2016).

A gelatina é também amplamente utilizada na produção de geleia e como emulsificantes, agentes microencapsulantes e estabilizadores coloidais em indústrias alimentícias. Nos campos, farmacêutico e médico, a gelatina tem também grande importância, sendo amplamente utilizada na fabricação de cápsulas duras e moles. Além disso, é usada como uma matriz para implantes, expansores de plasma em microesferas de liberação de drogas injetáveis e em infusões intravenosas. Na indústria cosmética, tem sido usada há muitos anos como proteína animal hidrolisada em shampoos, condicionadores, batons e fórmulas para unhas (KIM; WIJESEKARA, 2012).

Assim como a gelatina de mamíferos, a gelatina de pescado tem sido empregada na produção de sobremesas, filmes para produção de embalagens biodegradáveis, cápsulas e micropartículas, com a presença de gelatina de peixe na formação da parede desses produtos, através da técnica de microencapsulação utilizada para as várias finalidades (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2002; ZHOU; REGENSTEIN, 2007).

As gelatinas de pescado também possuem boas habilidades de formação de filme e são sugeridas como uma alternativa promissora aos plásticos sintéticos para preservação dos

produtos alimentícios (GOMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2007). Películas de gelatina de diferentes espécies de peixes também foram desenvolvidas em vários trabalhos (BAE *et al.*, 2009; HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011; LIMPISOPHON *et al.*, 2009). No entanto, esses filmes de gelatina de peixe apresentam algumas limitações, como baixa resistência à tração (TS) e maior solubilidade em água.

Shakila *et al.* (2012b) obtiveram filmes compósitos de gelatina de peixe, aplicando nanoargila e quitosana obtendo maior resistência à tração e menor permeabilidade ao vapor de água quando comparados a filmes puros de gelatina de peixe. O que indica que os filmes de gelatina de peixe apresentaram propriedades desejáveis para aplicação em produtos alimentícios.

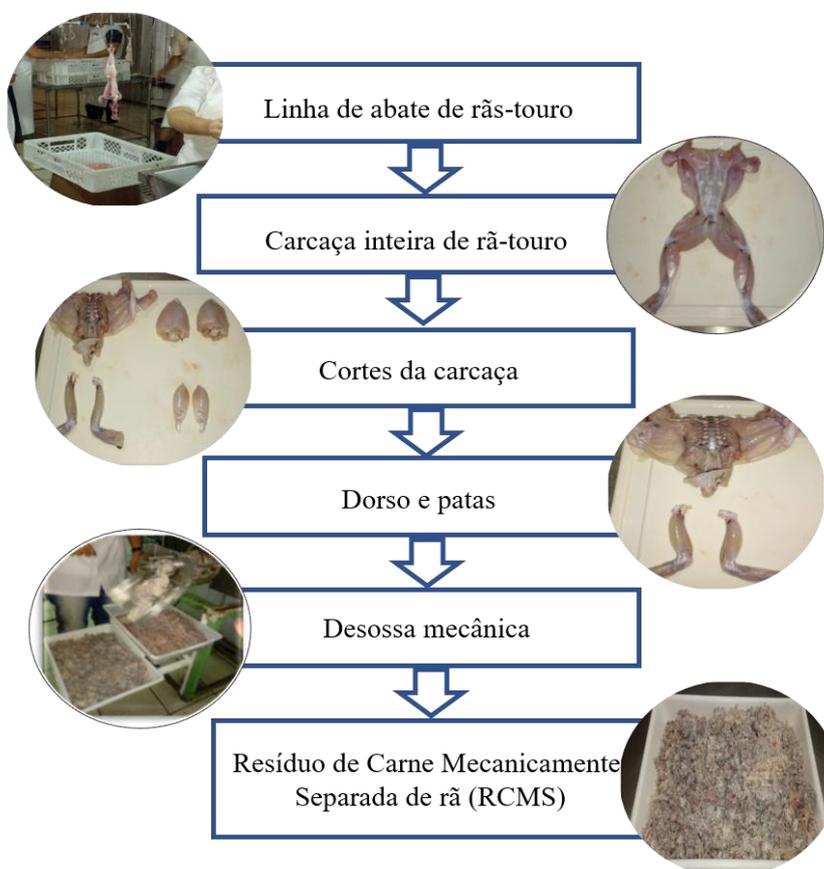
Com o intuito de melhorar as propriedades dos filmes à base de gelatina extraída da pele de corvina, Bandeira *et al.* (2015) investigaram os efeitos do pH e da concentração de glicerol (% , m/m) no desenvolvimento dos filmes. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que os filmes de gelatina adicionados de glicerol mostraram os valores adequados de resistência à tração ( $75,3 \pm 1,0$  MPa) e permeabilidade ao vapor de água ( $1,80 \pm 0,06$  g.mm/m<sup>2</sup>.dia<sup>-1</sup>.kPa<sup>-1</sup>), usando pH 4 e concentração de glicerol de 10 % (m/m).

Silva *et al.* (2018a), estudaram o efeito da adição do óleo de buriti e plastificante glicerol nas propriedades físicas, mecânicas e antioxidante de filmes a base de gelatina da pele da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e concluíram que os filmes preparados com 2,3 % de gelatina, 30 % de óleo de buriti e 13,18 % de glicerol apresentaram alta atividade antioxidante (24,77 µmol de TE/g), resistência mecânica (8,04 MPa) e baixa permeabilidade ao vapor de água (WVP;  $0,38 \times 10^{-10}$  m<sup>-2</sup>. S<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Matéria-prima

O colágeno utilizado para a obtenção de gelatina foi extraído dos resíduos ósseos e cartilagosos provenientes da desossa mecânica do dorso e das patas da rãs-touro (*L. catesbeianus*). Foram utilizadas rãs touro cedidas pelo Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura (LRPA) do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA), Campus III/ Bananeiras da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foram abatidas em média 5.000 rãs quando atingiram o peso vivo de aproximadamente 200g, no próprio LRPA, sendo o dorso e as patas das rãs separados das coxas na linha de abate (Figura 1).



**Figura 1** – Fluxograma simplificado do procedimento de obtenção do resíduo para extração das gelatinas

Fonte: Autoria própria.

Para a obtenção dos resíduos ósseos e cartilagosos foi utilizado um desossador mecânico desenvolvido e otimizado com patente MU-8200639-3/2002. Após a extração da carne, os resíduos foram embalados em sacos de polietileno e armazenados à temperatura de -18 °C, até o momento de extração da gelatina e realização das análises.

O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa constituiu em um estudo para verificar a influência do pré-tratamento do resíduo (desmineralização, alcalino, alcalino, ácido) antes da extração da gelatina por meio de aquecimento que foi comparada a extração da gelatina sem pré-tratamento utilizando apenas aquecimento. A melhor condição de extração foi avaliada em função do rendimento de gelatina obtida em relação à quantidade de hidroxiprolina, força do gel, quantidade de proteínas e cinzas, pH, composição de aminoácidos, cor, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Na segunda etapa, a gelatina que apresentou melhores propriedades físico-químicas e tecnológicas foi caracterizada em relação aos parâmetros de qualidade físico-químicas e microbiológicas e os resultados foram comparados com a legislação vigente para as gelatinas comerciais.

#### **4.2 Etapa I - Obtenção e caracterização das gelatinas**

As extrações das gelatinas foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Química de Alimentos do CCHSA, Campus III da UFPB.

##### **4.2.1 Obtenção da gelatina com pré-tratamento (GCPT)**

A Figura 2 mostra o fluxograma resumido do processo de obtenção da gelatina a partir do resíduo de rã, realizado segundo a metodologia descrita por Zhang, Xu e Wang (2011) e Silva *et al.* (2011), com algumas adaptações. O resíduo foi triturado utilizando moinho de facas. Em seguida, o material foi submetido ao processo de desmineralização.

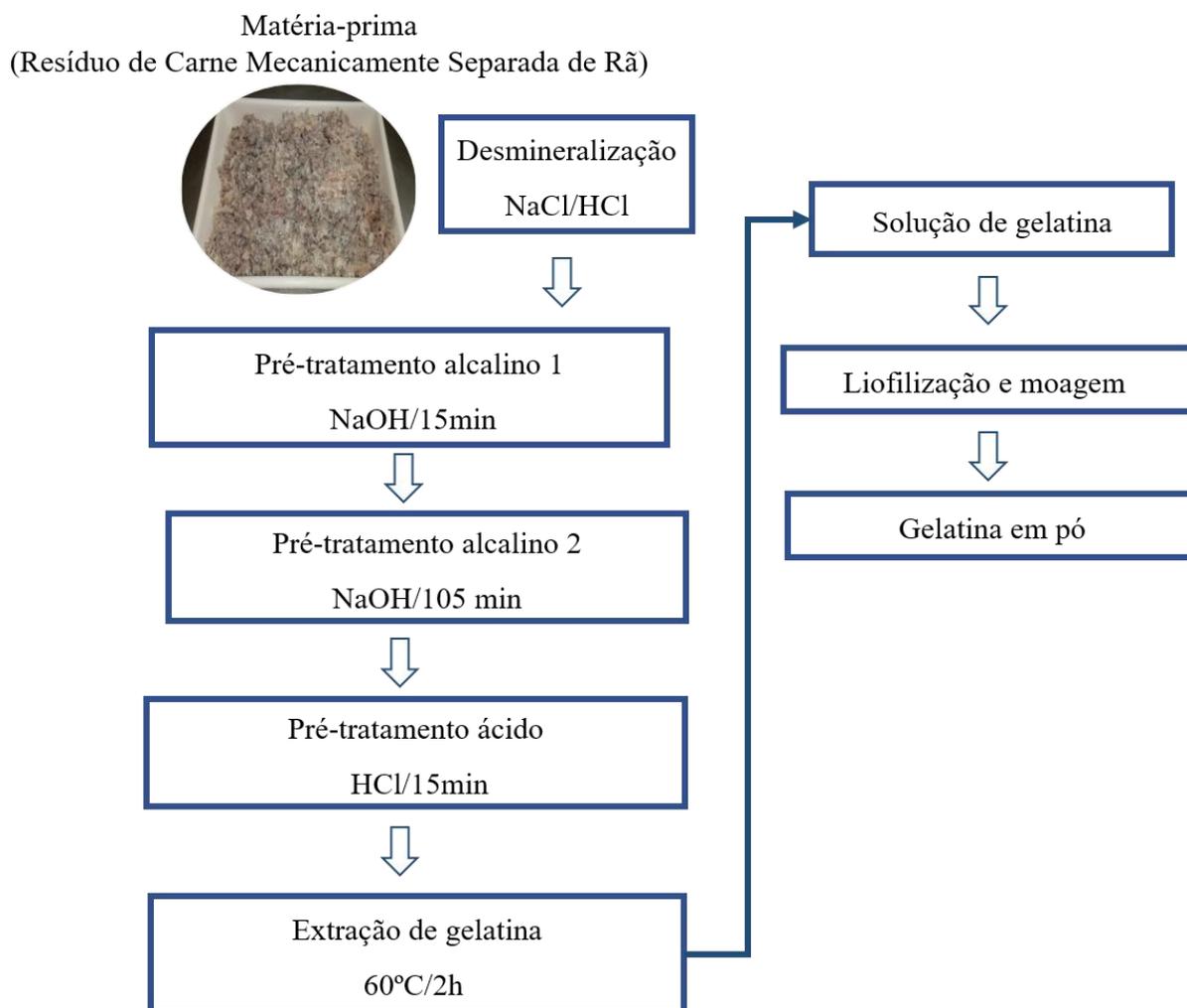


Figura 2 – Fluxograma resumido da obtenção de gelatina com pré-tratamento

Fonte: Autoria própria.

O processo de desmineralização consistiu em imergir o resíduo em uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 10% (m/v) na proporção 1:10 (m/v), ficando a mistura em repouso por 24 h. Em seguida, foi feita lavagem com água corrente, e o resíduo foi imerso em ácido clorídrico (HCl) a 0,4 mol/L na proporção 1:10 (m/v), deixando o material em repouso, durante 90 min. O resíduo foi lavado com água corrente até atingir pH próximo a neutralidade. A solução foi neutralizada para descarte.

O resíduo desmineralizado foi submetido ao intumescimento com pré-tratamentos alcalino, alcalino e ácido. No primeiro pré-tratamento alcalino (pré-tratamento 1) as amostras foram avolumadas com água destilada (1:1 m<sup>v-1</sup>), o pH ajustado em 11 com solução de NaOH 3 mol L<sup>-1</sup> e permanecendo por 15 min sob agitação constante em batedeira doméstica. Então o material foi drenado em peneira para em seguida se realizar o segundo pré-tratamento alcalino (pré-tratamento 2). Nessa etapa o resíduo foi tratado com uma nova solução em água

destilada (1:1 m v<sup>-1</sup>), ajustando novamente o pH para 11, com solução de NaOH a 3 mol L<sup>-1</sup>, sob agitação constante em batedeira doméstica, o material permaneceu em solução por 105 min. O resíduo foi retirado da solução alcalina e drenado em peneira com posterior lavagem com água corrente, até atingir pH próximo a neutralidade. Por fim, o tratamento ácido (pré-tratamento 3) foi realizado com a suspensão do resíduo em água destilada (1:1 m v<sup>-1</sup>), ajustando o pH em 2 com HCl a 3 mol L<sup>-1</sup> com agitação por 15 min. Após isso, a amostra foi drenada e lavada com água destilada (1:1 m v<sup>-1</sup>).

O processo de extração da gelatina da amostra pré-tratada foi realizado com adição de água destilada (1:1 p/v) a 60 °C, em banho termostático (Quimis 214 D 2, Brasil), por período de 2 h e pH ajustado em 4, com solução de HCl a 3 mol L<sup>-1</sup>. Foi realizada a drenagem do resíduo com peneira, recolhendo-se a solução de gelatina em bécker. A solução de gelatina foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro Whatman n° 4 a vácuo. A solução foi submetida à liofilização (Liotop, L108, Brasil) por 48 h à -54 °C e vácuo de 44 mmHg até a evaporação completa dos solventes. A gelatina foi triturada em moinho de facas obtendo-se um pó que foi armazenado sob congelamento a -18°C, até posteriores análises.

#### 4.2.2 Obtenção da gelatina sem pré-tratamento (GSPT)

A Figura 3 apresenta o fluxograma resumido do processo envolvido na obtenção de gelatina sem pré-tratamento.

O processo de extração da gelatina da amostra sem pré-tratamento foi realizado com adição de água destilada (1:3 p/v), adição de 1% de NaCl em relação ao peso do resíduo e a 60°C, em banho termostático (Quimis 214 D 2, Brasil), por um período de 2 h. Foi realizada a drenagem do resíduo em peneira, recolhendo-se a solução de gelatina em bécker. A solução foi submetida à liofilização (Liotop, L108, Brasil), por 48 h à -54 °C e vácuo de 44 mmHg até a evaporação completa dos solventes. A gelatina foi triturada em moinho de facas obtendo-se um pó que foi armazenado sob congelamento a -18°C, até posteriores análises.

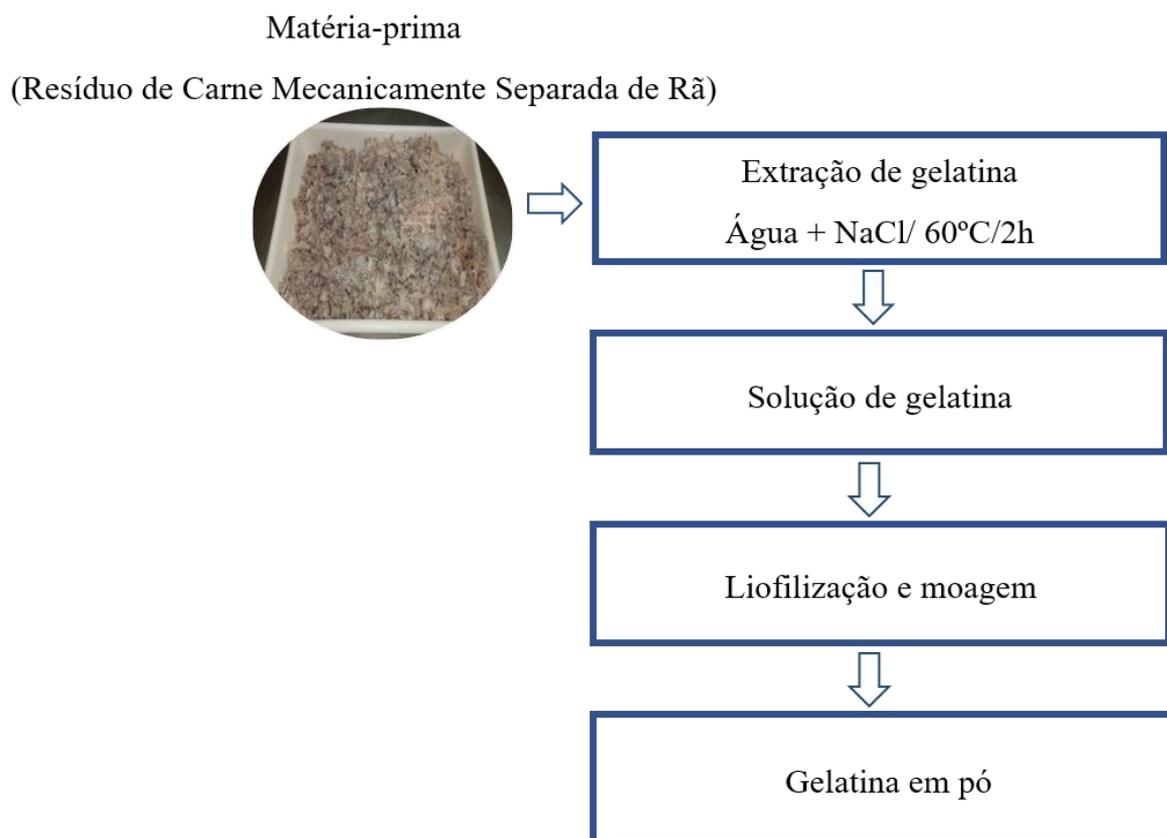


Figura 3 – Fluxograma resumido da obtenção de gelatina sem pré-tratamento

Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.3 Caracterização das amostras

##### 4.2.3.1 Composição química do RCMS e das gelatinas

As análises foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CT/UFPB. Os teores de umidade, gorduras totais e cinzas foram determinados conforme metodologia proposta pelo IAL (2005), em triplicata. A umidade foi determinada de acordo com o método gravimétrico (nº 012) em estufa a 105 °C. As gorduras totais foram determinadas segundo o método de Soxhlet (nº 034B). A quantidade de cinzas foi determinada pelo método gravimétrico (nº 018) em forno mufla a 500-600 °C. O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (nº 928.08), o teor de proteína bruta foi obtido através da multiplicação pelo fator 6,25 para resíduo e 5,55 para as gelatinas segundo metodologias AOAC (2012).

#### 4.2.3.2 Caracterizações das gelatinas

As gelatinas extraídas do RCMS de rã além da composição química, foram caracterizadas quanto ao rendimento em massa, rendimento em hidroxiprolina, força de gel, pH, cor, perfil de aminoácidos, FTIR e DSC.

#### 4.2.3.3 Rendimento

O rendimento em gelatina foi calculado conforme a Equação 1.

$$RG (\%) = \left( \frac{\text{massa de gelatina liofilizada}}{\text{massa de resíduo}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Sendo RG o rendimento em gelatina (gelatina liofilizada/100 g resíduo).

Foi avaliado também o rendimento em hidroxiprolina, o qual foi contabilizado pela relação entre os teores de hidroxiprolina presentes nas gelatinas após extração e no resíduo, calculado conforme a Equação 2:

$$RH = \left( \frac{\text{massa de hidroxiprolina na gelatina}}{\text{massa de hidroxiprolina no resíduo}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo RH o rendimento de hidroxiprolina (%).

Para a determinação de hidroxiprolina foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em colunas de fase reversa C-18- Luna – Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc, Torrence, CA USA), segundo metodologia proposta por White, Hart e Fry (1986).

#### 4.2.3.4 Determinação do pH e da Atividade de água (Aa)

As determinações de pH e Aa foram realizadas no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP), a determinação do pH foi baseada no método 017 do Instituto Adolfo Lutz (2005), utilizando o aparelho medidor de pH Analion (mod. PM 608).

A medição da Aa foi realizada com o auxílio de um analisador de atividade de água (Aqualab Series 3TE – Decagon), à temperatura de 25°C.

#### 4.2.2.5 Determinação de cor

A cor da superfície do pó de gelatina foi determinada em espectrofotômetro Konica Minolta CM-5, iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, no espaço CIE (*Comission Internationale de l'Eclairage*) L\*, a\*, b\*, em que L\* luminosidade; a\*: intensidade de cor vermelho / verde e b\*: intensidade de cor amarelo / azul (HUNTERLAB, 2008).

#### 4.2.3.6 Força do gel

A análise de força do gel foi realizada no CCQA/ITAL/SP, baseando-se na metodologia aplicada por Choi e Regenstein (2000).

Foram preparadas soluções de gelatina a 6,67 % (p/p) com água destilada, mantidas em temperatura ambiente por 2 h e posteriormente em banho-maria a 60 °C por 1 h. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente por 30 min. para serem distribuídas na quantidade de 30 ml em copos plásticos. Em seguida, os copos foram cobertos com papel alumínio e armazenados em estufa B.O.D. para maturação a 10 °C por 18 horas. A força de gel foi determinada num texturômetro TA-XT Plus, marca SMS, operando com o software *Exponent Lite* versão 5.1.1.1.0 e probe cilíndrico de acrílico P/0,5 (diâmetro de 12,7 mm) nas seguintes condições operacionais: medida de força em compressão; velocidade de teste 0,5 mm/s; e distância de penetração 4 mm.

#### 4.2.3.7 Perfil de aminoácidos

A análise de aminoácidos totais foi realizada no CCQA/ITAL/SP, segundo metodologia descrita por White, Hart e Kry (1986). A amostra de gelatina liofilizada foi derivatizada numa pré-coluna de aminoácidos liberados após a hidrólise ácida das proteínas (6 mol/L HCl), sob aquecimento (115 °C / 22 h). A análise de aminoácidos foi realizada em cromatógrafo líquido (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em colunas de fase reversa C-18- Luna – Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5µm; Phenomenex Inc, Torrence, CA USA). A identificação dos aminoácidos foi realizada conforme descrito por comparação com padrão externo (Pierce, PN 20088) e para a quantificação, foi utilizando o padrão interno ácido  $\alpha$ -aminobutírico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA).

#### 4.2.3.8 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas no Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA), ITAL, Campinas-SP. As análises foram executadas à temperatura ambiente usando um equipamento da Perkin Elmer modelo Spectrum 100 acoplado ao módulo ATR com varredura de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros no infravermelho foram obtidos com base nas normas ASTM E1252 e ASTM E573.

#### 4.2.3.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Essa análise foi realizada no CETEA/ITAL, Campinas-SP. O ensaio foi realizado num equipamento da TA *Instruments*, modelo *Discovery* DSC 250. Cerca de 5 mg da gelatina sob a forma de pó foi colocada em cadinho de alumínio hermético. Inicialmente, a amostra foi submetida a um aquecimento de 0 °C a 200 °C e resfriamento até - 90 °C. Em seguida, foi submetida a um segundo aquecimento de - 90 °C a 250 °C. Todas essas corridas aconteceram a uma taxa de 10 °C / min, atmosfera de nitrogênio e taxa de fluxo de gás de 50 mL.  $\text{min}^{-1}$ .

### 4.3 Metodologia Estatística

Para análise dos dados, foi usada estatística descritiva média  $\pm$  desvio padrão (DP), teste t de Student para comparação das médias, adotando-se nível de significância de  $p < 0,05$ , com o auxílio do *software* SPSS (SPSS 11.5 para Windows, SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA).

### 4.4 Etapa II - Padrões de qualidade da gelatina

Devido ao potencial para fabricação da GCPT, bem como das suas superiores propriedades físico-químicas, em relação à GSPT, a mesma foi avaliada quanto aos parâmetros de qualidade físico-químicos e microbiológicos e os resultados foram comparados com parâmetros da legislação vigente para gelatinas com aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

#### 4.4.1 Determinação de minerais (metais – pesados)

As análises foram realizadas no CCQA/ITAL/SP. Foram analisados os minerais Arsênio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo e Zinco de acordo com o método AOAC (2010), *Official Method* 999.10. A determinação de mercúrio foi baseada em Morgano, Milani e Perrone (2015).

#### 4.4.2 Análises microbiológicas

As análises foram realizadas no CCQA/ITAL/SP. Os microrganismos pesquisados foram *Salmonella*, Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, Contagem total de aeróbios mesófilos e contagem de bolores e leveduras.

Para verificar a presença de *Salmonella* na gelatina foi utilizado o BAX® *System* do fabricante Du Pont, baseado no método oficial AOAC 2003.09 (AOAC, 2012). Os resultados são qualitativos (presença/ausência).

A análise de Coliformes totais foi realizada segundo ISO 4831, (*International Organization for Standardization*, 2006), Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* segundo ISO 7251 (2005). Na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes foi utilizado o método dos tubos múltiplos, com série de três tubos. Esse método consiste em transferir 1,0 mL de cada diluição para três tubos contendo meio lauril sulfato triptose (LST) e tubo de Durham invertido, seguido de incubação a 35°C por 48 horas. Após este período, procedeu-se com a separação dos tubos cujo resultado foi identificado como positivo, ou seja, turvos e com presença de gás no interior do tubo de Durham, transferindo-se uma alçada de cada tubo positivo de caldo LST para outro tubo contendo caldo *Escherichia coli* (E.C) e uma nova incubação a 45°C durante 24 horas com posterior identificação dos tubos positivos. Para quantificação do NMP (Número Mais Provável de coliformes termotolerantes por grama de alimento) utilizou-se a respectiva tabela. Selecionando-se um dos tubos contendo caldo E.C cujo resultado positivo foi detectado, o conteúdo do mesmo foi semeado por estrias, de modo a obter colônias isoladas em ágar eosina azul de metileno (BEM), seguido de incubação a 35°C por 24 horas.

A Contagem total de aeróbios mesófilos e c de bolores e leveduras foram realizadas de acordo com o *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* – APHA (SALFINGER; TORTORELLO, 2015). A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada por meio do método de plaqueamento em profundidade, que consiste em

transferir 1,0 mL de cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) para placas de petri previamente esterilizadas e adição de cerca de 15,0 mL de meio de cultura PCA (Ágar Padrão para Contagem) as placas foram invertidas e incubadas a 35°C durante 24 horas. A contagem de bolores e leveduras foi realizada procedendo inoculação de alíquotas de cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose) acidificado com ácido tartárico, espalhando uniformemente o conteúdo com alça Drigalsky e realizando inversão das placas. Após esse procedimento, as placas foram incubadas a 25° C por cinco dias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição centesimal do resíduo da carne mecanicamente separada (RCMS) de rã-touro

O resíduo da carne mecanicamente separada (RCMS) de rã-touro apresentou a umidade como principal componente, seguida por proteína, cinzas e gordura como pode ser observado na Tabela 1. Esses resultados são semelhantes a valores encontrados em cabeças de corvina como reportados na literatura (BANDEIRA, 2009; SILVA *et al.*, 2011) e em ossos da carcaça de bacalhau (KOLODZIEZKA *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Comparação da composição centesimal do RCMS de rã-touro com as matérias-primas de diferentes espécies de pescado.

MATÉRIA-PRIMA	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (%)				REFERÊNCIAS
	Umidade	Proteína	Lipídios	Cinzas	
RCMS rã-touro	62,7 ± 0,0	25,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0	10,6 ± 0,1	Valores obtidos no estudo atual
Pele rã-touro asiática	72,9 ± 0,0	14,6 ± 0,4	6,1 ± 0,0	1,5 ± 0,2	Tümerkan <i>et al.</i> (2019)
Escama robalo	38,61 ± 1,2	29,4 ± 1,1	0,2 ± 0,0	30,9 ± 0,1	Cao <i>et al.</i> (2017)
Ossos carcaça corvina	25,2 ± 0,8	17,8 ± 1,1	4,7 ± 0,4	48,2 ± 1,0	Bandeira <i>et al.</i> (2017)
Pele cabeça de carpa	75,6 ± 1,6	9,9 ± 0,5	3,8 ± 0,6	9,1 ± 0,8	Silva <i>et al.</i> (2011)
Cabeça de carpa	75,3 ± 1,3	10,7 ± 1,0	3,7 ± 1,3	8,7 ± 1,5	Bandeira (2009)
Ossos carcaça bacalhau	22,0 ± 0,4	17,0 ± 0,8	0,2 ± 0,0	6,2 ± 0,3	Kolodziejoka <i>et al.</i> (2008)

O teor de umidade do RCMS de rã-touro foi 62,7 % (Tabela 1), sendo menor do que os valores encontrados por Silva *et al.* (2011), de 75,6 % de umidade em resíduo da carpa (cabeça moída), e por Tumerkan *et al.* (2019), de 72,9 % em pele de rã-touro asiática; porém, maior do que os valores encontrados por Bandeira *et al.* (2017), 25,2% em ossos de corvina, e por Kolodziejoka *et al.* (2008), cuja umidade foi de 22% em ossos da carcaça de bacalhau.

O teor de proteína, o qual representa a máxima produção possível de gelatina que pode ser extraída dos resíduos, foi de 25,9 % (Tabela 1). Desse modo, apresentou valor maior aos encontrados pelos autores mencionados no parágrafo anterior, e valor menor aos encontrados por Cao *et al.* (2017) em escamas de robalo (29,4 %) e de tainha (37,8 %).

Para o percentual de cinzas, o RCMS de rã apresentou valor médio de 10,6 % (Tabela 1), sendo menor do que os encontrados por Cao *et al.* (2017), em escamas de robalo (30,92 %) e por Bandeira *et al.* (2017) em ossos de carcaça de corvina (48,2 %); e valor maior aos encontrados por Bandeira (2009) para cabeças de carpa cabeça grande e Kołoziejska *et al.* (2008) para ossos de carcaça de bacalhau, que foram de 8,7 % e 6,2 %, respectivamente. A diferença entre os valores pode estar relacionada à elevada quantidade de minerais presentes na fração óssea do RCMS de rã em comparação com os demais resíduos.

Em relação ao teor de lipídeos no RCMS de rã, o valor foi de apenas 0,3 %, semelhante aos valores encontrados por Cao *et al.* (2017) em escamas de robalo e por Kolodziejoka *et al.* (2008) em ossos da carcaça de bacalhau, e menor aos valores encontrados para diferentes resíduos em estudos anteriores apresentados na Tabela 1. Com este resultado, não se fez necessário um processo de remoção de lipídios antes da extração da gelatina do RCMS da rã-touro.

A composição química da matéria-prima influi no rendimento e na composição química das gelatinas. De acordo com Songchotikunpan *et al.* (2008) um elevado teor de proteínas na matéria-prima é fundamental para se obter um maior rendimento na extração da gelatina.

## **5.2 Rendimento e composição físico-química de gelatinas**

O rendimento e as características físico-químicas da gelatina diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) em virtude do método de obtenção, ou seja, se a gelatina é obtida com ou sem o pré-tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento e características físico-químicas das gelatinas obtidas do RCMS rã-touro.

DETERMINAÇÕES (%)	AMOSTRA	
	GCPT <sup>1</sup>	GSPT <sup>2</sup>
RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO	1,2 <sup>a</sup> ± 0,20	2,23 <sup>b</sup> ± 0,15
HIDROXIPROLINA	6,81 <sup>a</sup> ± 0,03	5,55 <sup>b</sup> ± 0,03
PROTEÍNAS	88,35 <sup>a</sup> ± 1,29	67,88 <sup>b</sup> ± 0,50
CINZAS	1,23 <sup>a</sup> ± 0,31	9,91 <sup>b</sup> ± 0,12

**Nota:** 1: Gelatina com pré-tratamento, 2: Gelatina sem pré-tratamento. Os dados foram expressos como valor médio ± desvio padrão em triplicata.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ).

O rendimento de extração da gelatina bem como a recuperação de gelatina são parâmetros-chave devido à sua importância econômica para a indústria de gelatina (BORAN; REGENSTEIN, 2009). O rendimento de extração representa a quantidade de sólido liberado da matriz durante a extração enquanto a recuperação de gelatina corresponde a quantidade de colágeno desnaturado e convertido na gelatina amorfa (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2017). Como a hidroxiprolina é um aminoácido encontrado unicamente no colágeno, assim, o teor de hidroxiprolina no material determina o rendimento de gelatina (INTARASIRISAWAT *et al.*, 2007).

Em termos de rendimento de extração, em base úmida, observou-se um maior rendimento para a GSPT (2,23 %) em relação à GCPT (1,2 %). Contudo, o valor encontrado para a GCPT neste estudo foi similar aos encontrados por Biluca, Marquetti e Alfaro (2011) para a gelatina de ossos da carcaça de bagre africano (1,18 %) e menor do que os encontrados por Bandeira *et al.*, (2017), que obtiveram rendimento de 3,4 % na extração de ossos secos moídos da carcaça de Corvina. Porém, o rendimento foi calculado em relação à matéria-prima seca, levando a um aumento no rendimento em comparação com o resíduo úmido.

Na literatura são relatados diferentes rendimentos de extrações para diferentes matérias-primas de pescado em diferentes condições de pré-tratamento e extração (Tabela 3). Observa-se, por exemplo, que as gelatinas extraídas de resíduos ósseos independentemente do método de extração aplicado, apresentam um menor rendimento de extração quando comparado a gelatinas extraídas de peles de pescado.

De acordo com Ikoma *et al.* (2003) e Wang e Regenstein (2009), o menor rendimento de extração de gelatinas de resíduos ricos em minerais como escamas e ossos pode ser atribuída à estrutura densa desse material e a menor quantidade de colágeno em comparação com as peles. O rendimento das amostras de gelatina depende da matéria-prima (composição

química, composição de aminoácidos), dos métodos de extração usados (ácido e álcali usados em pré-tratamentos) e condições de extração aplicadas (ZHANG; REGENSTEIN, 2017).

Em termos de rendimento em gelatina (hidroxiprolina gelatina/gelatina matéria-prima), ou seja, quantidade de gelatina recuperada, observou-se que a GCPT obteve maior rendimento (27,8 %) em comparação com a GSPT (22,6 %). O conteúdo de hidroxiprolina no RCMS foi de 2,45 g / 100 g, enquanto o conteúdo de hidroxiprolina na GSPT e na GCPT foi de 5,55 e 6,81 g / 100g de gelatina, respectivamente. O maior conteúdo de hidroxiprolina na GCPT está relacionado à maior recuperação de colágeno da matriz do RCMS.

Os valores de hidroxiprolina encontrados neste estudo foram maiores do que os encontrados por Santos (2017), em gelatina de ossos de tilápia (4,3 %) e de carpa (4,1 %), por Bandeira *et al.* (2017) em gelatina de ossos da carcaça de corvina (4,1 %), e por Tümerkan *et al.* (2019) em gelatina de pele de rã-touro asiática (4,2 %).

A GCPT apresentou valores de hidroxiprolina similares aos encontrados por Tümerkan *et al.* 2019) em peles de frango (6,4 %) e de atum (6,3 %), e inferior aos encontrados por Casanova *et al.* (2020), que encontraram 7,3 % em gelatina de pele de escamudo, e por Martins *et al.* (2018) quando estudaram gelatina de escama de tilápia, em que os valores foram de 8,1 %.

Tabela 3 – Trabalhos sobre condições de extração, rendimento e propriedades físico-químicas de gelatinas obtidas a partir de diferentes matérias-primas.

MATÉRIA-PRIMA	CONDIÇÕES PRÉ-TRATAMENTO	CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	R	PB	CZ	HP	PH	REFERÊNCIA
PELE DE ESCAMUDO (POLLACHIUS VIRENS)	Neutraxe (0,5) UA-N / kg de pele), 30 min a 40 °C	Extração em água pH 2 80 °C - 35 – 40 min	5,8	71,33	27,6	7,3	NR	Casanova <i>et al.</i> (2020)
GELATINA COMERCIAL (PELE DE PEIXE)	NR	NR	NR	94,24	0,18	6,8	NR	Casanova <i>et al.</i> (2020)
RESÍDUO DE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPONUM)	NaOH	Água Ácido acético Ácido sulfúrico	NR	74,42 - 88,43	0,29	NR	6,92 6,41 3,78	Silva <i>et al.</i> (2018a)
CABEÇA DE CAVALINHA (DECAPTERUS MACROSOMA)	Alcalino/Ácido NaOH 0,2M – 1h Ác. Sulfúrico 0,05 M – 1h Ác cítrico 0,1 M -8h		1,7	15,25	41,0	NR	3,31	Kuang e Mohtar (2017)
ESCAMA DE TILÁPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS)	Desmineralização – Solução NaCl 10% 24h (HCl) 0,4 M a 1:10 (p/v) 1 h e 30 min Ácd. acético 0,1 M a 1:10 (p/v) durante 1h NaOH 0,1 M a 1: 3 (p/v) por 1 h H2SO4 0,1 M a 1: 3 (p/v) por 1 h	Extração 1h sob agitação a 60 °C, 1: 4 (p/v)	12,1	NR	NR	8,1	NR	Martins <i>et al.</i> (2018)
OSSOS SECOS MOÍDO DA CARÇAÇA DE	Ácido HCl 0,6 mol L <sup>-1</sup> por 20 h a 10 °C	Extração a 60 °C /2 h - pH 4	3,4	81,7	2	4,1	-	Bandeira <i>et al.</i> (2017)

**CORVINA  
(M. FURNIERI)**

Continua...

...CONTINUAÇÃO

<b>MATÉRIA-PRIMA</b>	<b>Condições Pré-Tratamento</b>	<b>Condições Extração</b>	<b>R</b>	<b>PB</b>	<b>CZ</b>	<b>HP</b>	<b>pH</b>	<b>Referência</b>
<b>PELE DE RÃ ASIÁTICA (RANA TIGERINA)</b>	<b>Alcalino-ácido NaOH 0,3 M, 1:10 (p/v) por 6 h ácido acético 0,15 M; 1:10 (p/v) 4 h</b>	<b>pH (6,5-7,0). Água destilada (1:10) 55 °C 12 h</b>	<b>12,41</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>8,9</b>	<b>NR</b>	<b>Karnjanapratum <i>et al.</i> (2017)</b>
<b>ESCAMA ROBALO (LTES CALCARIFER)</b>	<b>NaCl (5 %) Alcalase® (1 %), 6 h, 40 °C</b>	<b>2 extrações em água pH 2,0 -2,5/60 °C</b>	<b>14,1</b>	<b>90</b>	<b>1,43</b>	<b>9,6</b>	<b>5,33</b>	<b>Cao <i>et al.</i> (2017)</b>
<b>ESCAMA TAINHA CINZA (MUGIL CEPHALUS)</b>		<b>1ª extração – 6h 2ª extração 3h</b>	<b>15,2</b>	<b>88,6</b>	<b>1,55</b>	<b>9,3</b>	<b>5,41</b>	<b>Cao <i>et al.</i> (2017)</b>
<b>OSSOS DE TILÁPIA</b>			<b>5,8</b>	<b>86,45</b>	<b>0,92</b>	<b>4,3</b>	<b>NR</b>	<b>Santos (2017)</b>
<b>OSSOS DE CARPA</b>			<b>4,9</b>	<b>82,13</b>	<b>1,04</b>	<b>4,1</b>	<b>NR</b>	<b>Santos (2017)</b>
<b>PELE DE FILHOTE (BRACHYPLATHYSTOMA FILAMENTOSUM)</b>	<b>NaOH</b>	<b>Ácido acético 6 horas 58 °C</b>	<b>19,7</b>	<b>72,76</b>	<b>0,13</b>	<b>8,76</b>	<b>9,06</b>	<b>Silva (2016)</b>
<b>RESÍDUO CMS DE TILÁPIA</b>	<b>Ácido acético NaOH H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Neutralizado Água 45 °C 1 h</b>	<b>6</b>	<b>NR</b>	<b>21,7</b>	<b>NR</b>	<b>4,7</b>	<b>Nunes (2014)</b>
<b>PELE DE BOVINO (GELATINA COMERCIAL)</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>84,49</b>	<b>NR</b>	<b>1,95</b>	<b>NR</b>	<b>Prestes <i>et al.</i> (2013)</b>

<b>OSSOS DA CARCAÇA DE BAGRE AFRICANO (CLARIAS GARIEPINUS)</b>	<b>NaOH- 24 h - 8 °C (2x) HCl - 24 h - 8 °C (2x)</b>	<b>Duas extrações de 60 minutos pH 2 e 4 60 e 80 °C</b>	<b>1,18</b>	<b>NR</b>	<b>21,7</b>	<b>NR</b>	<b>2,98</b>	<b>Biluca, Marquetti e Alfaro (2011)</b>
<b>CABEÇA CARPA COMUM (CYPRINUS CARPIO)</b>	<b>Alcalino/Ácido NaOH ,15 min (agitação) NaOH ,105 min (agitação) pH 11 HCl 3M, 15 min, pH 2</b>	<b>52 °C / 2 h – pH 4</b>	<b>1,98</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>Silva et al. (2011)</b>
<b>CABEÇA DE CARPA ESPÉCIE CABEÇA GRANDE (ARISTICHTHYS MOBILIS)</b>	<b>Alcalino/Ácido 4 extrações NaOH 3M, 15 min, pH 11 NaOH 3M, 60 min, pH 11 HCl 3M, 15 min, pH 2</b>		<b>2,0</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>4,1</b>	<b>Bandeira (2009)</b>

**Nota:** CMS - carne mecanicamente separada; R - rendimento de extração; PB - proteína bruta; CZ - cinzas; HP - hidroxiprolina; NR - não relatado.

Um nível mais alto de hidroxiprolina na gelatina pode estar associado a níveis de pureza mais elevados (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004), o que pode levar a características desejáveis, como maior força de gel.

Embora a GSPT tenha apresentado um maior rendimento de extração, sua composição química apresentou uma quantidade significativamente maior de cinzas em relação à GCPT e uma menor quantidade de proteínas.

A legislação brasileira, através do regulamento técnico de identidade e qualidade da gelatina, da gelatina de peixe e da gelatina hidrolisada, fixa em 2 % a quantidade máxima de cinzas presentes em gelatinas ou colágeno. Dessa forma, a GSPT não está dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira em relação ao teor de cinzas presentes na amostra. Por outro lado, a GCPT apresentou valores de cinzas dentro dos limites estabelecidos pela legislação e similares a valores encontrados em outros estudos (Tabela 3).

O teor de proteína da GCPT foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que o teor encontrado na GSPT, porém, para aplicação comercial é desejável gelatinas com altos teores de proteínas. Gelatinas comerciais de pele de bovinos apresentam teores de proteínas que variam entre 83 e 90 %. Prestes *et al.* (2013), ao analisarem gelatina comercial de pele de bovino, verificaram um teor de proteína de 84,49 %. Casanova *et al.* (2020), obtiveram teores de proteína de 93 % em gelatina comercial de pele de peixes de água fria.

A GSPT apresentou teor de proteína (67,88 %) relativamente baixo quando comparado com gelatinas comerciais e de outros estudos, como mostrado na Tabela 3, enquanto a GCPT apresentou valores (88,35%) próximos aos reportados na literatura.

Observou-se que a recuperação das gelatinas, baseada em quantidade de proteínas e hidroxiprolina avaliadas neste estudo foi influenciada pelo processo de desmineralização e concentração das soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico utilizadas no tratamento preliminar da matéria-prima. Feng *et al.* (2015), verificaram que o processo de desmineralização foi a etapa responsável por aumentar a eficiência da extração da gelatina das escamas de carpa (*Cyprinus carpio haematopterus*).

A importância da desmineralização está relacionada ao fato das ligações cruzadas entre as cadeias de colágeno nos ossos, serem mais estáveis, pois a estrutura mineral fornece proteção física para a estrutura de colágeno nos ossos (ARNESEN; GILDBERG, 2007). Em comparação com a pele ou outro tecido conjuntivo mole, há necessidade de usar condições de extração mais severas para obter maior recuperação de gelatina.

Para Kuang e Mohtar (2018), o pré-tratamento é um fator importante que pode afetar o rendimento de gelatina e propriedades associadas. Isso pode ser devido ao ácido orgânico

solubilizar os colágenos não reticulados assim como promover a quebra de algumas das ligações cruzadas existentes entre as cadeias de colágenos, o que favorece maior solubilização de colágenos durante a extração (LIU *et al.*, 2015). Um número adequado de ligações cruzadas deve ser quebrado para converter o colágeno em uma forma adequada para extração (ZHOU; REGENSTEIN, 2005).

Os resultados deste estudo indicaram que a GCPT do RCMS de rã-touro foi isolada com mais sucesso, com níveis de pureza mais elevados, devido ao menor teor de cinzas, maiores teores de proteínas e hidroxiprolina. A diferença nos valores sugere que a qualidade da GCPT é superior à da GSPT.

### 5.3 Propriedades tecnológicas das gelatinas

Conforme mostrado na Tabela 4, houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) em relação a força de gel para as amostras de gelatinas estudadas. Uma maior força de gel foi alcançada na GCPT (284,5 g) quando comparada com a GSPT (88,0 g).

**Tabela 4** – Propriedades tecnológicas da GCPT e GSPT do RCMS de rã-touro.

DETERMINAÇÕES	AMOSTRA	
	GCPT <sup>1</sup>	GSPT <sup>2</sup>
<b>FORÇA DE GEL</b>	<b>284,5<sup>a</sup> ± 2,8</b>	<b>88,0<sup>b</sup> ± 3,1</b>
<b>PH</b>	<b>4,28<sup>a</sup> ± 0,01</b>	<b>7,26<sup>b</sup> ± 0,012</b>
<b>COR</b>		
<b>L*</b>	<b>87,70<sup>a</sup> ± 0,26</b>	<b>80,35<sup>b</sup> ± 0,11</b>
<b>A*</b>	<b>-0,59<sup>a</sup> ± 0,03</b>	<b>0,04<sup>b</sup> ± 0,01</b>
<b>B*</b>	<b>5,54<sup>a</sup> ± 0,20</b>	<b>15,49<sup>b</sup> ± 3,1</b>

**Nota:** 1: Gelatina com pré-tratamento, 2: Gelatina sem pré-tratamento.

Os dados em triplicatas foram expressos como valor médio ± desvio.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ).

A força do gel é uma importante propriedade tecnológica da gelatina que determina o seu valor comercial (ZHOU *et al.*, 2006). Para Yang *et al.* (2008), quanto maior os valores de força de gel, melhor a qualidade da gelatina.

Na literatura, diferentes valores foram relatados para gelatinas comerciais e para gelatinas extraídas de diferentes resíduos de pescados, como, por exemplo: o valor de 121,4 g em pele e escamas de cavala (MIRZAPOUR-KOUHDASHT *et al.*, 2020); de 363,0 g em pele

de rã-touro asiática (TÜMERKAN *et al.*, 2019); de 233,5 g escama de tilápia (MARTINS *et al.*, 2018); de 300,5 g gelatina comercial de bovino (KUANG; MOHTAR, 2017); de 138 g em ossos de carcaça de corvina (BANDEIRA *et al.*, 2017); valores, de 248,0 g, 215,0 g e 240,0 g em pele rã-touro asiática, pele comercial de peixe, pele comercial de bovino, respectivamente (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2017); de 147,5 g ossos de tilápia do Nilo (SANTOS, 2017); e de 323 g em resíduo de CMS de tilápia (NUNES, 2014).

Essas diferenças entre as espécies foram possivelmente devido a diferenças na composição da amostra, tamanho das cadeias proteicas, bem como interações complexas determinadas pela composição de aminoácidos (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004). Principalmente em relação ao teor de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) (DINÇER *et al.*, 2015). De acordo com Kasankala *et al.* (2007), a concentração da solução de gelatina, temperatura, tempo de envelhecimento e pH são fatores que influenciam a força de gel das gelatinas.

Desse modo, a força de gel na GSPT constatada neste estudo foi menor aos relatados na literatura enquanto o valor constatado na GCPT apresentou valor de força de gel maior aos da maioria dos estudos relatados anteriormente.

De acordo com Gómez-Guillén *et al.* (2011), o baixo teor de hidroxiprolina é a principal razão para as baixas propriedades reológicas, como força de gel. Para Chandra *et al.* (2015), a hidroxiprolina desempenha um papel importante na estabilidade do gel, devido à sua capacidade de ligação de hidrogênio através do grupo hidroxila, embora a prolina também tenha grande importância.

Segundo Cole (2000), o pH tem grande influência sobre as propriedades reológicas da gelatina. Gelatinas que apresentam pH próximos a 5,0, possuem viscosidade mínima e resistência do gel máxima, sendo então interessante para indústria fabricar gelatinas com este valor de pH.

Kuang e Mohtar (2018), verificaram uma redução na força do gel de gelatinas extraídas de cabeça de cavalinha em pH abaixo de 4,0. De acordo com Choi e Regenstein (2000), a força do gel de gelatinas diminuem em pH abaixo de 4,0 e ligeiramente acima de 8,0.

Os valores de pHs encontrados neste estudo foram de 4,28 para GCPT e 7,27 para GSPT. As diferenças nos valores de pH da gelatina podem refletir as diferenças no pré-tratamento empregado durante a extração.

Neste estudo, os valores encontrados estão dentro da faixa comumente observada em gelatinas de pescados que tiveram as mesmas condições de pré-tratamento e de extração

(Tabela 3). A legislação brasileira através da Minuta do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da gelatina e colágeno, determina para gelatina comestível um pH entre 4,5 e 6,5. De acordo com os critérios do *Gelatin Manufacturers Institute of America* (GMIA), para gelatina comestível a GCPT é definida como tipo A (pH entre 3,5 e 5,5) e a GSPT como tipo B (pH entre 5,0 e 7,5). Para aplicação farmacêutica a gelatina tipo A deve apresentar pH entre 4,5 e 5,5 e a gelatina tipo B pH entre 5,3 e 6,5 (GMIA, 2019).

Com relação aos atributos de cor (Tabela 4), todos os parâmetros foram estatisticamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ). Os resultados indicaram um aumento expressivo no atributo  $b^*$  na GSPT com coloração tendendo ao amarelo enquanto a GCPT apresentou cor mais clara e brilhante com valores do atributo  $L^*$  (luminosidade) maiores ao da GSPT. Resultados semelhantes foram relatados para gelatina de pele de peixe escamudo (CASANOVA *et al.*, 2020).

De acordo com Songchotikunpan, Tattiyakul e Supaphol (2008) a cor das gelatinas depende das matérias-primas e, em geral, a cor não influencia suas propriedades funcionais. No entanto, a GCPT devido ao seu menor valor de  $b^*$  e maior luminosidade ( $L^*$ ) pode ter sua aplicação facilitada em diferentes áreas (indústria de alimentos e farmacêutica) devido aos menores riscos de interferência na coloração dos produtos.

Os resultados indicaram que o pré-tratamento antes da extração influenciaram positivamente na cor da gelatina do resíduo de rã. A Figura 4 mostra o aspecto das gelatinas estudadas.

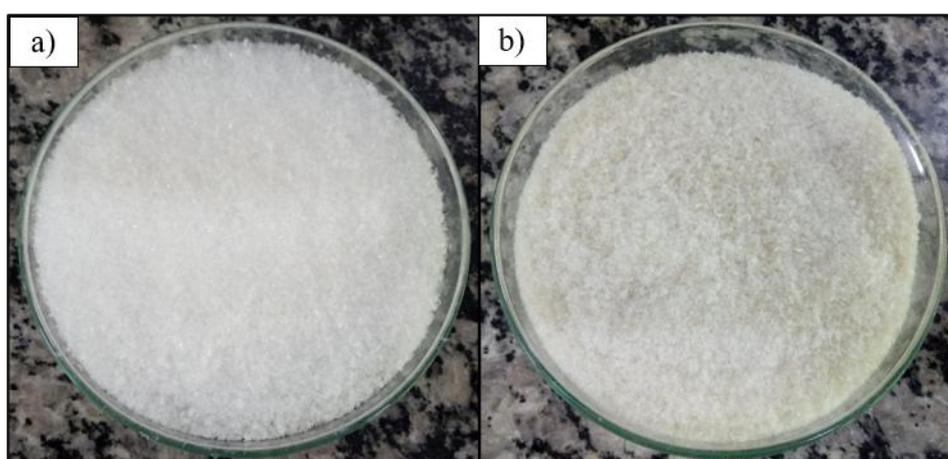


Figura 4 – Gelatina em pó: a) GCPT- Gelatina Com Pré-Tratamento; b) GSPT- Gelatina Sem Pré-Tratamento.

#### 5.4 Perfil de aminoácidos das gelatinas

Ambas as amostras de gelatina apresentaram glicina como o aminoácido principal, sendo constatadas 16,29 g de glicina/100 g de GSPT e 22,54 g /100 g de GCPT (Tabela 5). De acordo com Duan *et al.* (2011), a glicina é o aminoácido dominante na gelatina. Geralmente, a glicina ocorre a cada terceira posição na cadeia  $\alpha$  e representa quase um terço dos resíduos totais (BENJAKUL *et al.*, 2009). A GCPT exibiu maior conteúdo de glicina do que a GSPT.

Tabela 5 – Composição de aminoácidos de gelatinas extraídas de resíduo de CMS de rã-touro.

<b>Aminoácidos</b>	<b>GCPT<sup>1</sup></b> <b>(g/100g)</b>	<b>GSPT<sup>2</sup></b> <b>(g/100g)</b>
Ácido Aspártico	6,35	5,15
Ácido Glutâmico	10,62	8,35
Serina	4,71	3,98
Glicina	22,54	16,29
Histidina	1,02	1,55
Arginina	8,14	6,18
Treonina	1,99	2,02
Alanina	8,36	6,07
Prolina	12,69	10,97
Tirosina	0,50	0,92
Valina	1,60	1,88
Metionina	1,00	1,10
Cistina	0,21	0,23
Isoleucina	1,19	1,46
Leucina	2,26	2,63
Fenilalanina	1,95	2,13
Lisina	3,20	3,03
Hidroxiprolina	6,81	5,55
<b>Iminoácidos (Pro + Hyp)</b>	<b>19,5</b>	<b>16,52</b>

**Nota:** 1:Gelatina com pré-tratamento, 2: Gelatina sem pré-tratamento. Valores expressos em gramas de aminoácidos por 100 gramas de proteína.

Para os iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), a GCPT apresentou maior teor (19,5 %) do que a GSPT (16,5 %). Uma baixa quantidade de iminoácidos pode indicar propriedades de geleificação pobres e possuir uma rede de gel mais fraca (SANAEI *et al.*, 2013). O maior conteúdo de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) na GCPT contribuiu para suas maiores propriedades de força de gel devido à formação de hélice tripla e estabilização da molécula de gelatina. A maior quantidade dos aminoácidos prolina, glicina e hidroxiprolina, se deve à

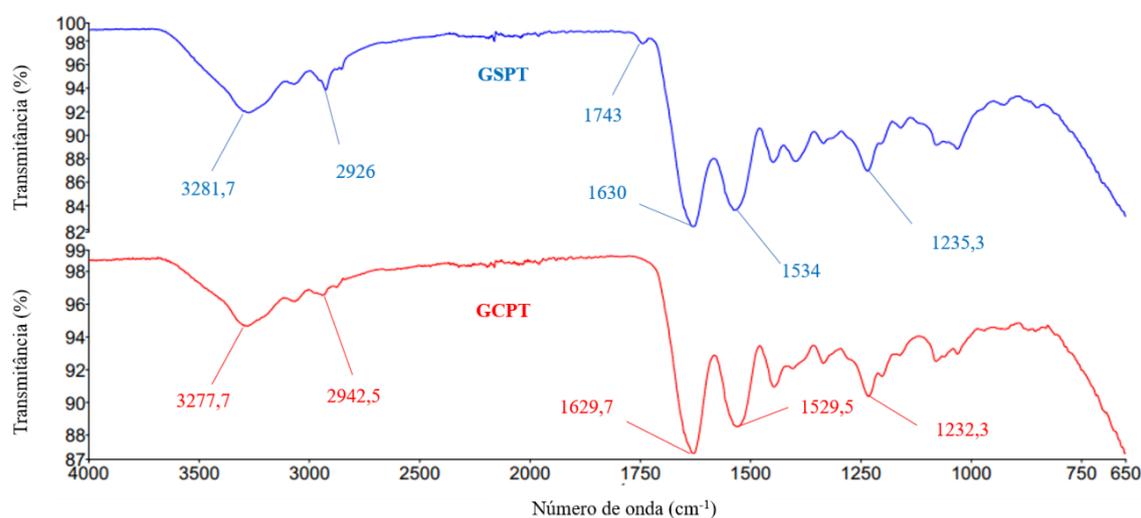
característica (Gly-Pro-Y) n, a repetição helicoidal tripla de todos os colágenos (CAO *et al.*, 2017). Para regiões ricas em prolina e seu análogo hidroxilado, essas constituem zonas de nucleação, que fornecem estabilidade à hélice tripla da gelatina (MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2000). Combinados com a alanina, eles formam regiões apolares, com predominância da sequência Gly-Pro-Y.

O conteúdo total de iminoácidos (19,5 %) da GCPT de RCMS de rã-touro foi maior aos encontrados para as gelatinas de outras espécies de pescados, assim como aos encontrados em pele de peixe filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) (14,4 %) (SILVA, 2016), em ossos da carcaça de Corvina (17,8 %) (BANDEIRA *et al.*, 2017) e em pele de peixe escamudo (17,8 %) (CASANOVA *et al.*, 2020). Porém, numericamente próximos aos valores de iminoácidos obtidos em escama de Tainha cinza (19,7 %) (CAO *et al.*, 2017) e em escamas de tilápia (20,02 %) (MARTINS *et al.*, 2018). No entanto, Karnjanapratum *et al.* (2017) encontraram um teor numericamente maior de iminoácidos na gelatina da pele de rã-touro asiática (21,5 %).

Além disso, a composição de aminoácidos de ambas as gelatinas apresentou baixo teor de resíduos de histidina, tirosina e cisteína; embora a cisteína não esteja tipicamente presente na estrutura do colágeno tipo I. A presença de cisteína na composição de aminoácidos pode indicar que a gelatina contém uma pequena quantidade de proteína do estroma (BOUGATEF *et al.*, 2012; DUAN *et al.*, 2011).

### **5.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das gelatinas**

A espectroscopia no infravermelho foi usada com o objetivo de se verificar eventuais diferenças de alterações macromoleculares causadas pelo pré-tratamento realizado na gelatina quando comparada com a amostra sem tratamento. Na Figura 5, estão apresentados os espectros no infravermelho das amostras de gelatinas.



**Figura 5** – Espectros no infravermelho das gelatinas do RCMS de rã obtidas por diferentes métodos: GSPT- Gelatina Sem Pré-Tratamento; GCPT - Gelatina Com Pré-Tratamento

Fonte: Autoria própria.

As gelatinas do RCMS de rã apresentaram cinco bandas principais características das amidas A ( $3278$  e  $3282\text{ cm}^{-1}$ ), B ( $2943\text{ cm}^{-1}$  e  $2926\text{ cm}^{-1}$ ), I ( $1630\text{ cm}^{-1}$  e  $1631\text{ cm}^{-1}$ ), II ( $1530\text{ cm}^{-1}$  e  $1534\text{ cm}^{-1}$ ) e III ( $1235$  e  $1232\text{ cm}^{-1}$ ) para a GCPT e GSPT, respectivamente.

As gelatinas apresentaram espectros semelhantes, diferenciando-as apenas na amplitude e no número de onda, que apresentou uma diminuição em todas as bandas, exceto na banda amida B. Para Sinthusamran, Benjakul e Kishimura (2014), todos os tipos de gelatina apresentam espectros mais ou menos semelhantes. A banda da amida A ( $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada às vibrações de alongamento N-H, a banda da amida I ( $1600\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ ) está associada às vibrações de alongamento de grupos carbonilas em peptídeos, a amida II ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ) está associada à flexão NH e ao alongamento CN, e a banda da amida III ( $1220\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada ao alongamento C-N e N-H e envolvida com a integridade da estrutura helicoidal tripla de colágeno (JAKOBSEN *et al.*, 1983; TIAN *et al.*, 2015).

A banda amida A para as amostras estudadas apareceu em  $3278$  e  $3282\text{ cm}^{-1}$  para GCPT e GSPT, respectivamente. Esta banda foi relacionada por Doyle *et al.* (1975) ao estiramento N-H. Para os autores uma vibração de alongamento N-H livre ocorre na faixa de  $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$ , porém quando o grupo N-H de um peptídeo está envolvido em uma ligação de hidrogênio, a banda da amida A pode ser deslocada para frequências mais baixas. Esses resultados sugerem que pode haver fortes interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre as moléculas das gelatinas de RCMS de rã.

A banda de absorção da amida B foi observada em  $2943\text{ cm}^{-1}$  e  $2926\text{ cm}^{-1}$  para GCPT e GSPT, respectivamente. A banda da amida B se dividiu em dois picos para as duas amostras. Esses dois valores de números de onda representam o alongamento assimétrico e simétrico de C–H bem como de  $\text{NH}_3^+$  (NAGARAJAN *et al.*, 2012). A GSPT apresentou o menor número de onda para o pico da amida B, sugerindo interação de grupos  $-\text{NH}_3$  entre cadeias de peptídeos. Comportamento semelhante foi reportado por Casanova *et al.* (2020) para a gelatina de pele de peixe escamudo. Karnjanapratum *et al.* (2017) identificaram comprimentos de bandas de absorção para esta banda entre  $3076$  e  $3078\text{ cm}^{-1}$  para gelatinas de pele de rã-touro asiática.

Martins *et al.* (2018) relataram que na região de  $2145\text{ cm}^{-1}$ , a ausência de bandas está relacionada à ausência do grupamento S-H presente no colágeno, devido a sua degradação durante a extração e concomitante transformação de colágeno em gelatina. A ausência de pico nessa região foi observada para as duas gelatinas.

Na região de  $1743\text{ cm}^{-1}$  para a GSPT pode ser visualizada a banda causada pelo estiramento da carbonila (C=O) (URIARTE-MONTOYA *et al.*, 2011). Silva (2013) verificou a presença de bandas de absorção semelhantes para as gelatinas das peles de corvina e de bijupirá, respectivamente na região de  $1773\text{ cm}^{-1}$  e  $1723\text{ cm}^{-1}$ .

O grau de degradação molecular das gelatinas também foi verificado a partir das bandas de absorção referentes às amidas I, II e III as quais são responsáveis pelo grau de ordem molecular encontrado no colágeno e envolvidas na formação da estrutura helicoidal tripla devido ao alongamento C=O, flexão N-H e alongamento C-H (MUYONGA *et al.*, 2004).

De acordo com Muyonga, Cole e Duodu (2004), a banda da amida I, entre  $1600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , é a mais importante para a análise espectroscópica de infravermelho da estrutura secundária das proteínas. Amida-I representa estiramento de ligações duplas de C=N e C=O presente em aminoácidos. Para as gelatinas estudadas as bandas de absorção na amida I foram observadas em  $1630\text{ cm}^{-1}$  e  $1631\text{ cm}^{-1}$  para GCPT e GSPT, respectivamente. De acordo com Yakimets *et al.* (2005) picos encontrados nessa região são característicos da estrutura em espiral da gelatina.

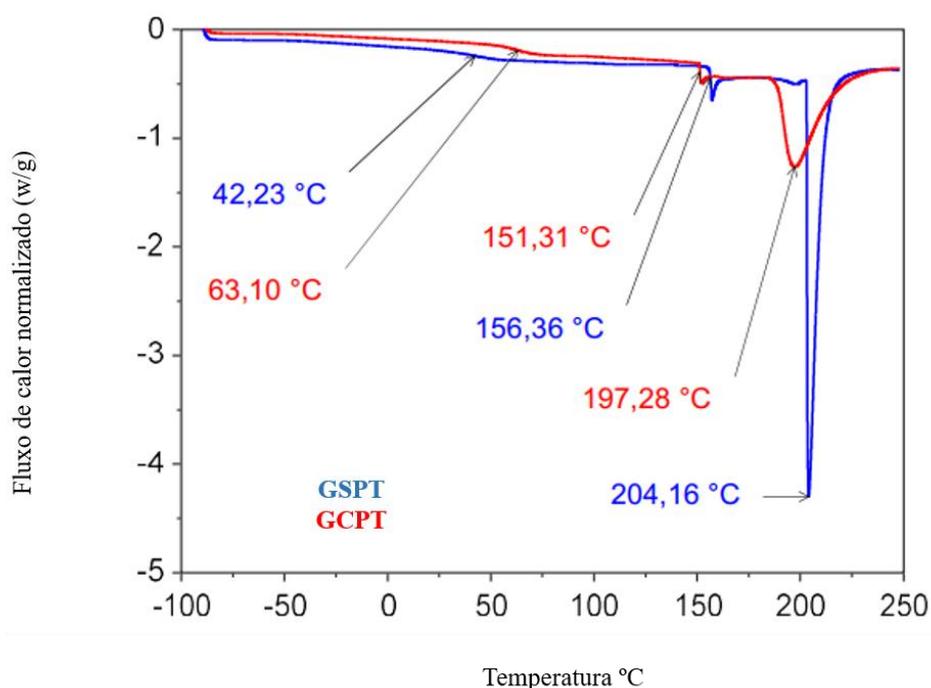
As bandas de absorção na amida II foram observadas em  $1530\text{ cm}^{-1}$  para GCPT e de  $1534\text{ cm}^{-1}$  para GSPT. A amida II foi relacionada por Barth (2007) como uma combinação da deformação angular simétrica da ligação N-H e a vibração do estiramento C-N.

A banda da amida III foi detectada em  $1232$  e  $1235\text{ cm}^{-1}$ , para as amostras GCPT e GSPT, respectivamente. De acordo com Nagarajan *et al.* (2012), a amida III representa as

bandas de combinação entre o alongamento C-N vibrações e deformação N-H de ligações amida, bem como absorções decorrentes de vibrações oscilantes de grupos CH<sub>2</sub> da estrutura da glicina e das cadeias laterais de prolina. Os resultados mostraram que a GCPT apresentou amplitude menor em relação à GSPT, sugerindo a maior desordem da GCPT associada a maior degradação. De acordo com Muyonga, Cole e Duodu (2004), esta perda de estrutura é resultado da desnaturação do colágeno em gelatina.

### 5.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das gelatinas

Os termogramas das gelatinas do RCMS de rã estão apresentados na Figura 6. Foram observados três eventos endotérmicos para ambas as gelatinas.



**Figura 6** – Termogramas de DSC para as gelatinas extraídas do RCMS de rã-touro durante a segunda corrida. RCMS: Resíduo de Carne Mecanicamente Separada, GSPT- Gelatina Sem Pré-Tratamento; GCPT - Gelatina Com Pré-Tratamento.

Fonte: Autoria própria.

O primeiro evento aconteceu em 42 °C e 63 °C para a GSPT e GCPT, respectivamente.

Para ambas as gelatinas esse evento pode estar associado a diversos processos, tais como à temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) dos blocos de  $\alpha$ -aminoácidos, recristalização de

pequenos cristalitos de gelatina, evaporação de água ligada quimicamente remanescente do processo de liofilização, à adsorção de água durante o armazenamento ou alterações conformacionais na estrutura da proteína (CORREIA *et al.*, 2013; DAI *et al.*, 2006).

Martins *et al.* (2018) relataram uma temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) da gelatina de escama de tilápia entre 65 e 75 °C.

O segundo evento aconteceu em 156 °C para GSPT e em 151 °C para GCPT. Casanova *et al.* (2020), verificaram três eventos, similares ao deste estudo, em gelatinas extraídas de pele de peixe escamudo, os autores associaram o evento, encontrado entre 146 °C e 156 °C à temperatura de desnaturação de proteínas de baixa massa molar.

O terceiro evento aconteceu em 204,16 °C para GSPT e em 197,28 °C para GCPT possuindo como característica um pico estreito relacionado à fusão das estruturas proteicas, tal característica de pico também foi identificado por Oliveira *et al.* (2017) em seus estudos sobre as características térmicas de gelatina extraída de pele de tilápia.

A maior temperatura de fusão da GSPT provavelmente está relacionada ao protocolo de tratamento prévio à extração. Casanova *et al.* (2020) verificaram uma redução na temperatura de fusão para gelatina extraída de pele de peixe escamudo tratada com HCl em comparação com a amostra tratada com ácido cítrico. Segundo Giménez *et al.* (2005) e Rivero *et al.* (2010), a gelatina é uma molécula muito complexa e suas características térmicas estão associadas a muitos fatores, como tipo de colágeno, tecido, espécie animal, método de extração realizado, composição química da matéria-prima e a distribuição de resíduos de aminoácidos.

A GCPT apresentou propriedades físico-químicas e tecnológicas superiores à GSPT, desta forma, a GCPT além das determinações físico-químicas realizadas na Etapa I, foi avaliada quanto a presença de contaminantes químicos (metais pesados) e microbiológicos e os resultados foram comparados com parâmetros da legislação vigente para gelatinas com aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

### **5.7 Parâmetros de qualidade da gelatina**

Para que a gelatina seja usada como ingrediente alimentar ou farmacêutico, ela deve estar em conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação vigente. A maioria das regulamentações nacionais e internacionais estabelecem limites para as características físico-químicas e microbiológicas de gelatinas.

No Brasil, a produção de gelatina deve cumprir os requisitos estabelecidos pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 que regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA) e detalha as regras de higiene específicas para obtenção da gelatina desde a matéria-prima até a entrega do produto acabado.

Em 2018 a Secretaria de Defesa Agropecuária publicou uma minuta do regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) de gelatinas que estabelece os padrões de identidade e qualidade das gelatinas, tendo em vista que no novo RIISPOA não foi incluído tais parâmetros (BRASIL, 2018).

Em relação à qualidade microbiológica, até dezembro de 2020 as gelatinas atendiam aos limites microbiológicos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) através da Resolução - RDC, nº 12 do dia 2 de janeiro de 2001, que regulamentava os padrões microbiológicos dos produtos alimentícios. No entanto, essa RDC foi revogada pela Resolução - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019 e pela Instrução Normativa (IN) nº 60 de 23 de dezembro de 2019, que entraram em vigor em dezembro de 2020. A RDC 331/2019 abrange toda cadeia produtiva dos alimentos, tratando dos padrões microbiológicos dos alimentos e a aplicação desses. Já a IN 60/2019, que complementa a RDC 331/2019, apresenta as listas com os padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. No entanto, os ingredientes alimentares, categoria na qual a gelatina é classificada, não foram inclusos nessas legislações.

De acordo com a Anvisa (2020), as gelatinas devem atender os limites estabelecidos em especificações publicadas em monografias de referências internacionais, como *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA, 2006), *Food Chemical Codex* (FCC) e farmacopeias oficiais. No entanto, a Anvisa (2020) estabeleceu que os produtos que eram regulamentados pela RDC nº 12/2001 fabricados até 26 de dezembro de 2020 devem cumprir os padrões microbiológicos estabelecidos na resolução até o fim de sua validade.

Nos Estados Unidos, o FCC regulamenta os padrões de identidade, qualidade e pureza da gelatina além de, juntamente com a JECFA (2006), especificarem os limites máximos para metais pesados e microrganismos.

Na União Europeia, a gelatina comestível deve cumprir os requisitos estabelecidos pelo Regulamento de Higiene Alimentar (CE) nº 853/2004 também regulamentado (UE) 355/2016 da Comissão de 11 de março de 2016 que altera o Anexo III do Regulamento (CE) nº 853/2004). A seção XIV do Anexo III do Regulamento (CE) nº 853/2004, atualizado no Regulamento (CE) nº 1243/2007, detalha as regras de higiene específicas para obtenção da gelatina desde a matéria-prima até a entrega do produto acabado. Já outros parâmetros, como

níveis de metais pesados e segurança microbiológica, são abrangidos pelo regulamento (CE) Nº 1441/2007.

A gelatina para aplicação farmacêutica, além dos requisitos mencionados, também deve cumprir os rigorosos requisitos das farmacopeias. As farmacopeias estrangeiras incluem monografias que regulam a qualidade da gelatina usada para a produção de medicamentos. No entanto, no Brasil, apesar do amplo uso da gelatina em vários setores farmacêuticos e médicos, não há especificações do uso de gelatina na farmacopeia brasileira.

Em 1989 foi formado o Grupo de Discussão Farmacopeia (PDG) formado pela farmacopeia americana (USP) e pelas farmacopeias europeia (EP) e japonesa (JP). O grupo preparou uma monografia sobre gelatina como parte de um programa de harmonização (PDG, 2016). Alguns dos parâmetros de qualidade da gelatina regulados na monografia da PDG são: perda de massa na secagem (cinzas), força do gel, pH, presença de metais pesados e qualidade microbiológica (número total de microrganismos aeróbios, <1.000 UFC/g; número total de leveduras e fungos <100 UFC / g) e ausência de *Escherichia coli* e *Salmonella*.

Em alguns países, além dos parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação vigente, os fabricantes de gelatinas devem atender aos parâmetros de qualidade estabelecidos pelas associações de fabricantes de gelatinas. Nos Estados Unidos os fabricantes de gelatinas são representados pela *Gelatin Manufacturers Institute of America* (GMIA) e na União Europeia pela *Gelatin Manufacturers of Europe* (GME).

Os parâmetros de qualidade físico-químicos e microbiológicos da GCPT e os limites estabelecidos para gelatinas alimentícias e farmacêuticas pelas legislações brasileira e internacional são mostrados nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6** – Parâmetros de qualidade físico-químicos da GCPT e os limites estabelecidos pelas legislações nacional e internacional.

<i>Conteúdo</i>	<i>GCPT</i>	<i>RTIQ /2018</i>	<i>FCC /2011</i>	<i>JECFA</i>	<i>CE/853/2004CE /1243/2007</i>	<i>Farmacopeias Internacional (PDG)</i>	<i>GME</i>	<i>GMIA</i>
-----------------	-------------	-----------------------	------------------	--------------	-------------------------------------	---	------------	-------------

Nota: ND = Não detectado; GCPT: gelatina com pré-tratamento; RTIQ /2018: regulamento técnico de identidade e qualidade (BRASIL, 2018); FCC /2011: *Food Chemical Codex* (JECFA, 2006) *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*; Farmacopeias Internacional; PDG: Grupo de Discussão Farmacopeia; GME: União Europeia pela *Gelatin Manufacturers of Europe*; GMIA: Gelatine Manufacturers Institute of America

							Alimentos	Farmacêutica	
<i>Umidade (%)</i>	<b>9,65</b>	-	≤ 15	≤ 18	-	≤ 15	≤ 15	-	-
<i>Aa (25°C)</i>	<b>0,408</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lipídeos (%)</i>	<b>0,10</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteína (%)</i>	<b>88,35</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nitrogênio (%)</i>	<b>15,91</b>	≥15	≥ 15	-	-	-	-	-	-
<i>Cinzas (%)</i>	<b>1,23</b>	≤ 2,0	≤ 3,0	≤ 2,0	-	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0	-
<i>pH</i>	<b>4,28</b>	4,5 – 6,5	4,5 – 6,5	-	-	3,8 – 7,6	-	3,5 - 7,5	4,5 – 6,5
<i>Arsênio (ppm)</i>	<b>ND</b>	≤ 1	-	≤ 1	≤ 1	-	≤ 1	-	-
<i>Cádmio (ppm)</i>	<b>ND</b>	≤ 0,5	-	≤ 0,5	≤ 0,5	-	≤ 0,5	-	-
<i>Chumbo (ppm)</i>	<b>3,55</b>	≤ 5	-	≤ 1,5	≤ 5	-	≤ 5	-	-
<i>Cobre (ppm)</i>	<b>2,06</b>	≤ 30	-	-	≤ 30	-	≤ 30	-	-
<i>Cromo (ppm)</i>	<b>0,71</b>	≤ 10	-	-	≤ 10	≤ 10	≤ 10	-	-
<i>Zinco (ppm)</i>	<b>3,81</b>	≤ 50	-	-	≤ 50	≤ 30	≤ 50	-	-
<i>Mercúrio (ppm)</i>	<b>ND</b>	≤ 0,15	-	≤ 0,15	≤ 0,15	-	≤ 0,15	-	-

A gelatina na sua forma seca é considerada estável (USP, 2016) e é um material “Reconhecidos como Seguro” (GRAS) pelo *Federal Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para uso humano (FDA, 2004). De acordo com a GME (2020), a gelatina geralmente é reconhecida como estável por pelo menos 5 anos, quando adequadamente armazenada em embalagens hermeticamente fechadas para evitar a entrada ou perda de umidade.

Para Bordignon *et al.* (2012), a gelatina mantém um equilíbrio de 13 % de umidade quando mantida em temperatura média de 25 °C e umidade relativa de 46 % (COLE, 2000).

A legislação brasileira não estabelece um limite para o teor de umidade das gelatinas. Já os regulamentos internacionais como do FCC, PDG bem como a GME estabelecem um valor máximo de umidade de 15 %. A GCPT de rã apresentou umidade de 9,6 %, atendendo, portanto, o que preconiza a legislação internacional para gelatinas comestíveis e de uso farmacêutico. De acordo com Almeida e Lannes (2013), a umidade ideal para gelatina é entre 8 a 12 %, sendo, dessa forma, um teor de umidade acima de 16 % não considerado desejável devido ao risco de crescimento microbiano; enquanto gelatinas com teor de umidade entre 6 e 8 % são consideradas muito higroscópicas, o que pode dificultar a determinação de seus atributos físicos (COLE, 2000).

Embora as legislações nacional e internacional não estabeleçam limites para a atividade de água (Aa) e lipídeos, esses parâmetros, juntamente com o teor de umidade, exercem grande importância na estabilidade da gelatina, uma vez que a Aa de um produto reflete a capacidade termodinâmica (estado energético) ou a concentração efetiva de água em que pode realmente participar como um agente químico em vários processos biológicos e químicos (DAMODARAN; PARKIN, 2019). Já a presença de lipídios em gelatinas pode provocar uma redução na sua qualidade devido à possibilidade de oxidação lipídica. Já baixos teores de lipídeos em gelatinas é desejável, pois melhoram suas características estruturais com reduzida possibilidade de oxidação lipídica (WOLF, 2009). Dessa forma, apenas o conhecimento do teor de umidade isolado não é suficiente para prever a estabilidade de um produto.

A Aa e o teor de lipídeos da GCPT do RCMS de rã foram em média 0,408 e 0,100 %, respectivamente, o que sugere uma boa estabilidade da gelatina, tendo em vista que produtos com Aa entre 0,2 e 0,4 tem uma boa estabilidade microbiológica quanto lipídica (BARBOSA- CÁNOVAS *et al.*, 2007).

Apesar das legislações nacional e internacional não fixarem diretamente a quantidade mínima de proteína que uma gelatina deve apresentar, a minuta do RTIQ/2018 do MAPA e o

compêndio do FCC/2011 estabelecem a quantidade mínima de nitrogênio total em base seca que as gelatinas comestíveis devem apresentar, fixando em 15 %. Desta forma, a GCPT de rã atende aos requisitos de nitrogênio estabelecidos por estas legislações.

De acordo com a minuta do RTIQ de gelatinas, o teor máximo de cinzas permitido em gelatinas comestíveis é de 2,0 %; já para o FCC/10, o teor máximo permitido é de 3,0 %. Para as gelatinas com aplicação farmacêutica, as farmacopeias internacionais estabelecem um valor máximo de cinzas de 2,0 %. No presente trabalho, a GCPT de rã apresentou um teor de cinzas abaixo de 2,0 %, estando, portanto, em concordância com limite máximo permitido tanto pela legislação nacional quanto internacional para aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêuticas.

A presença de teor elevado de cinzas em gelatinas pode prejudicar sua aplicação na indústria de alimentos devido a possibilidade de precipitação dessas cinzas comprometendo a qualidade do produto (COLE, 2000).

A solução de GCPT apresentou pH de 4,28, o que atende aos padrões de pH para gelatinas comerciais estabelecidos pelas farmacopeias internacionais, que estabelece limites entre 3,8 e 7,6. No entanto, encontra-se um pouco abaixo dos limites estabelecidos pelas legislações brasileira, através do RTIQ/2018, e americana, através do FCC/11, para gelatinas comestíveis. Porém, o pH das gelatinas podem variar de acordo com os tratamentos (ácido, alcalino ou a mistura dos dois) aplicados à matéria-prima durante o processo de obtenção das gelatinas (GME, 2020; WIDYASARI; RAWDKUEN, 2014).

Em relação a presença de metais pesados, na GCPT alguns metais não foram detectados (arsênio, cádmio e mercúrio) ou foram detectados em quantidades abaixo dos limites estabelecidos pela legislação vigente tanto em nível nacional quanto internacional, demonstrando a segurança do produto para uso nas indústrias de alimentos e farmacêuticas.

Dessa forma, pode-se afirmar que a GCPT satisfaz os parâmetros físico-químicos de qualidade esperadas para aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

### **5.7.1 Parâmetros de qualidade microbiológica**

A gelatina é um produto excipiente, alimentar e farmacêutico, sujeito a exigências rigorosas no que diz respeito à contaminação microbiológica. Assim, antes da comercialização, a gelatina deve ser submetida a um rigoroso controle de qualidade para assegurar a ausência de microrganismos ou uma contagem microbiana segura (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Por ser um excelente nutriente para a maioria dos microrganismos, a gelatina deve ser produzida seguindo os padrões higiênico-sanitários para evitar possíveis contaminações (COLE, 2006). A Tabela 7 apresenta os resultados das análises microbiológicas da GCPT e os limites máximos permitidos pela legislação nacional e internacional.

**Tabela 7** – Análises microbiológicas da GCPT e os limites máximos permitidos pela legislação nacional e internacional.

<i>Microrganismo</i>	<i>Resultado</i>	<i>RDC 12/2001</i>	<i>FCC</i>	<i>JECFA</i>	<i>CE/1441/2007</i>	<i>Farmacopeia Internacional (PDG)</i>	<i>GME 2020</i>	<i>GMIA 2019</i>
<i>Salmonella (em 25g)</i>	<b>Ausente</b>	Ausente	Ausente	-	Ausente	Ausente (10g)	Ausente	Ausente
<i>Coliformes totais (NMP/g)</i>	<b>&lt; 3</b>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coliformes termotolerantes (NMP/g)</i>	<b>&lt; 3</b>	< 10,0	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli (NMP/g)</i>	<b>&lt; 3</b>	-	Ausente	< 10	-	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)</i>	<b>2,8 x 10<sup>3</sup></b>	-	Máx. 10 <sup>3</sup>	Máx. 10 <sup>4</sup>	-	Máx. 10 <sup>3</sup>	Máx. 10 <sup>3</sup>	Máx. 10 <sup>3</sup>
<i>Contagem de bolors (UFC/g)</i>	<b>1,9 x 10<sup>3</sup></b>	-	Máx. 10 <sup>3</sup>	-	-	Máx.10 <sup>2</sup>	Máx.10 <sup>2</sup>	Máx. 10 <sup>3</sup>
<i>Contagem de</i>						Máx.10 <sup>2</sup>	Máx.10 <sup>2</sup>	Máx. 10 <sup>3</sup>

<i>leveduras</i> (UFC/g)	< 10 <sup>2</sup>	-	Máx. 10 <sup>3</sup>	-	-
-----------------------------	-------------------	---	----------------------	---	---

Nota: ND = Não detectado; RDC/2001: resolução de diretoria colegiada (BRASIL, 2001); FCC /2011: *Food Chemical Codex* (JECFA, 2006) *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*; Farmacopeias Internacional; PDG: Grupo de Discussão Farmacopeia; GME: União Europeia pela *Gelatin Manufacturers of Europe*; GMIA: *Gelatin Manufacturers Institute of America*

De acordo com a RDC nº 12/2001, a quantidade permitida de microrganismo presente na gelatina não pode ultrapassar 10 NMP/mL para coliformes termotolerantes, enquanto a *Salmonella* tem que estar ausente em 25 g.

O regulamento da União Europeia CE/1441/2007 estabelece apenas a ausência de *Salmonella* em 25 g para gelatina de qualidade alimentar. A JECFA (2006) estabelece limites inferiores a 10 NMP/g para *E. coli* e no máximo 104 UFC/g para contagem total de aeróbios mesófilos.

Observou-se que a GCPT se encontra em conformidade com os limites estabelecidos pela RDC nº 12/2001, CE/ 1441/2007 e pela JECFA para gelatina alimentícia, uma vez que a *Salmonella* mostrou-se ausente e a presença dos coliformes termotolerantes, *E. coli* e a contagem total de aeróbios mesófilos foram abaixo dos limites estabelecidos para estas regulamentações (Tabela 7).

No entanto, os resultados microbiológicos não estão satisfatórios e em conformidade frente aos parâmetros mais rigorosos exigidos pela FCC, PDG, GME e GMIA, não atendendo aos requisitos para ausência de *E. coli* e ultrapassou os limites máximos estabelecidos para contagem total de aeróbios mesófilos ( $2,8 \times 10^3$  UFC/g) e bolores ( $1,9 \times 10^3$  UFC/g) (Tabela 7). Tais resultados indicam uma possível contaminação durante e/ou após o processo de extração da gelatina, uma vez que a presença de *E. coli* e populações mais elevadas de microrganismos aeróbios podem ser indicativos de falhas higiênicas durante o processo e/ou armazenamento (FOODS, I.C.O.M.S. F, 2015).

Provavelmente, essas falhas de processo resultaram devido à utilização de equipamentos compartilhados para realização de atividades de pesquisas com diferentes matérias-primas no laboratório da instituição, podendo o problema de contaminação ser facilmente resolvido seguindo as condutas higiênicas em processos realizados em escala industrial específicas para obtenção de gelatina. Além disso, a esterilização do material pode compor uma das etapas finais de produção, eliminando facilmente microrganismos como a *E. coli*.

Dessa forma, é importante destacar que, embora a gelatina seja considerada um produto estável, devido aos seus baixos valores de Aa e pH, é crucial seguir condições rigorosas de higiene durante o processo de extração, armazenamento e distribuição para evitar ação microbiana, garantindo assim a qualidade e segurança do produto.

## 6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que:

A GSPT não apresentou propriedades físico-químicas e tecnológicas adequadas para aplicação nos segmentos alimentícios e farmacêuticos;

O tratamento prévio à extração da gelatina do RCMS de rã-touro mostrou-se promissor na obtenção de gelatina (GCPT) com propriedades físico-químicas e tecnológicas adequadas para aplicação em diferentes segmentos alimentícios e farmacêuticos conforme legislação vigente;

A GCPT apresentou baixo teor de cinzas e altos teores de proteínas e de iminoácidos; elevada força de gel; cor próxima ao branco e boas propriedades térmicas para aplicações abaixo de 200°C;

A GCPT atendeu aos parâmetros de qualidade físico-químicos estabelecidos pela legislação vigente. Por outro lado, no quesito de qualidade microbiológica ficou a desejar. Recomenda-se, nesse caso, um maior controle higiênico no processo de produção e armazenamento para evitar contaminações e assegurar maior qualidade ao produto;

O aproveitamento do resíduo da carne mecanicamente separada (RCMS) de rã-touro revela-se como uma alternativa tecnologicamente viável para extração de gelatina com alto valor agregado;

A agregação de valor aos resíduos gerados na obtenção da CMS de rã contribuirá para um leque mais diversificado de produtos derivados da rã-touro contribuindo para a sustentabilidade da cadeia produtiva de extração da gelatina.

## 7 REFERÊNCIAS

ALFARO, E. T. SILVA, E. F. Propriedades reológicas da gelatina obtida de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, vol.69 no.4 2010. Disponível em: [http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-98552010000400017&lng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552010000400017&lng=pt). Acesso em: 18 jun. 2021

ALMEIDA, P. F.; LANNES, S. C. D. S Lannes: Extraction and physicochemical characterization of gelatin for chicken by-product. **Journal Food Process. Engin**, n. 36, p.824-833, (2013). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfpe.12051>. Acesso em: 06 jul. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padrões Microbiológicos. Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia de Alimentos** Gerência-geral de alimentos. 2ª edição Brasília, julho de 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas/padroes-microbiologicos.pdf/view>. Acesso em: 17 jun.2021

ARNESEN, J. A.; GILDBERG, A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 53-57, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240500547X>. Acesso em:10 jun. 2021.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **AOAC 2003.09. BAX Automated System for Screening Salmonella in Foods - AOAC 2003.09**. DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND WATER RESOURCES (DAWR): Canberra, Australia, 2012. Disponível em: <https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/aqis/exporting/meat/elmer3/approved-methods-manual/Salmonella-BAX-Automated-System-AOAC-2003.09.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2021.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC International, and George W. Latimer. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2012. Disponível em: <http://etcad.net/np/upfile/file/bokuso.pdf> Acesso em: 02 ago. 2021

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC, 999.10 Official methods of analysis of AOAC International**. 15.ed Edition. Washington, DC, USA.: AOAC International, 2010. Disponível em: <https://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285281.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2021.

BAE, H. J. *et al.* Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 6, p. 1179-1186, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643808003204>. Acesso em: 8 jun. 2021.

BANDEIRA, S. F. *et al.* Characterization and Film-Forming Properties of Gelatins from Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Skin and Bones. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 447-456, 11 jul. 2017. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2016.1210268>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2016.1210268>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BANDEIRA, S. F. **Extração e caracterização da gelatina obtida de cabeças de carpa (*Aristichthys mobilis*)**. 2009, 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2009. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/2450>. Acesso em: 24 mar. 2021.

BANDEIRA, SIDNEY FERNANDES BANDEIRA, S. F. *et al.* Characterization and Film-Forming Properties of Gelatins from Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Skin and Bones. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 447-456, 11 jul. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2016.1210268>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2016.1210268>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BANDEIRA, SIDNEY FERNANDES *et al.* Modified Gelatin Films from Croaker Skins: effects of pH, and addition of glycerol and chitosan. **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken, v. 38, n. 6, p. 613-620, 28 jan. 2015. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12191>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1111%2Fjfpe.12191>. Acesso em: 26 mar. 2021.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FONTANA JÚNIOR, A. J.; SCHMIDT, S. J.; LABUZA, T. P. **Water activity in foods – Fundamentals and Applications**. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272807001375>. Acesso em: 10 jun. 2021.

BENJAKUL, S.ootawat *et al.* Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 445-451, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.063>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814609002489>. Acesso em: 1 abr. 2021.

BILUCA, F. C.; MARQUETTI, C.; ALFARO, A. T. Produção de gelatina de pele e ossos de bagre (*Clarias gariepinus*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 418-426, 5 dez. 2011. Universidade Tecnológica Federal do ParanáParaná (UTFPR). DOI: <http://dx.doi.org/10.3895/s1981-36862011000100005s1>. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/947>. Acesso em: 3 jun. 2021.

BORAN, GOKHANG.; REGENSTEIN, JOE J. M. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. **Journal of Food Science** [s. l.], v. 74, n. 8, p. 432 - 441, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2009.01328.x>. Acesso em: 8 jun. 2021.

BORDIGNON C. A, FRANCO S. D. R. L, GASPARINO E., YANJIMA M. E., DEL VESCO P. A., VISENTAINER V. J, MIKCHA G. M. J (2012) Utilization of frozen and salted Nile tilapia skin for batch-processed gelatin extraction. **Revista Brasileira de Zootecnia** v 41, (n.3), p.: 473–478, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/8MvX7XpSkVLdgH5qTGBK4yR/abstract/?lang=en>. Acesso em: 07 jul. 2021.

BOUGATEF, A. *et al.* Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*Mustelus mustelus*) skin gelatin. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 48, n. 2, p. 248-254, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812001442>. Acesso em: 8 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. 2017, 76 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/decreto-no-9-013-de-29-03-2017.pdf/view>. Acesso em: 29 mar. 2021.

BUENO, C. M; ALVIM, I. D; KOBERSTEIN, T. C. R. D; PORTELLA, M. C; GROSSO, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 65-73, 2011. DOI: <http://doi.org/10.4260/BJFT2011140100009>. Disponível em: <http://bjft.ital.sp.gov.br/arquivos/artigos/v14n1446a.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2021.

CAO, T. H. *et al.* Characteristics and Physicochemical Properties of Gelatin Extracted from Scales of Seabass (*Lates calcarifer*) and Grey Mullet (*Mugil cephalus*) in Vietnam. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [s. l.] v. 26, n. 10, p.1293–1302, 2017. DOI: 10.1080/10498850.2017.1390026.

CARVALHO, L. T. **Diagnóstico da competitividade na cadeia produtiva de carne de rã-touro no Estado do Rio de Janeiro**. 2011, 114f., Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/453>. Acesso em: 21 mar. 2021.

CASALI, A. P; MOURA, O. M; LIMA, S. L. Rações comerciais e o rendimento de carcaça e subprodutos de rã-touro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p.1172-1178, set-out, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000500029>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/yG8ZydjjXfhJMxY56GGDfFK/?lang=pt>. Acesso em: 21 mar. 2021.

CASANOVA, F. *et al.* Physico-chemical, structural and techno-functional properties of gelatin from saithe (*Pollachius virens*) skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 156, p. 918-927, ago. 2020. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.047>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32283110/>. Acesso em: 7 jun. 2021.

CATALINA, M. *et al.* Influence of crosslinkers and crosslinking method on the properties of gelatin films extracted from leather solid waste. **Journal Applied Polymer Science**, New York. v. 119, n. 4, p. 2105-2111, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.32932>. Acesso em: 29 mar. 2021.

CEBI, N. *et al.* An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine porcine and fish gelatins. **Revista Food Chemistry**, Istanbul, v. 190, 2016. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615009577>. Acesso em: 8 set. 2020.

CHANDRA, M. V.; SHAMASUNDAR, B. A. Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of freshwater fish (*Catla catla*). **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 48, p. 47-54, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X15000387>. Acesso em: 7 jun. 2021.

CHO, S. M. *et al.* Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 18, n. 4, p. 575-579, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X03001681>. Acesso em: 8 jun. 2021.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 194-199, mar. 2000. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15978.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15978.x>. Acesso em: 2 maio 2021.

CLAUDINO, R. L. Gelatina e astaxantina de resíduo do salmão (*salmo salar* L.): extração, caracterização e aplicação para a produção de filmes antioxidantes. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/39356>. Acesso em: 25 mar. 2021.

COLE, C. G. B. **Gelatin In: Encyclopedia of food science and technology**, F. J. Francis (Ed.), v. 2, n. 2, p. 1183-1188, 2000. Disponível em: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=earth.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008443>. Acesso em: 4 jun. 2021.

COLE, C.G.B. **Gelatin Food Science**, 2006. Disponível em: <http://www.gelatin.com>. Acesso em: 5 jun. 2021.

CONCEIÇÃO, C *et al.* Patê de carne de rã (*Rana catesbeiana*) formulação e aceitabilidade. *In: XVII Congresso Brasileiro em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais [...]* (vol. 3), Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2000, p. 11-75.

CORREIA, Daniela M. et al. Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatin membranes. **Polymer Testing**, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 995-1000, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2013.05.004>. Acesso em: 10 jun. 2021

DAI, C. A.; CHEN, Y.F.; LIU, M.W. Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 99, p. 1795–1801, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.22711>. Acesso em: 10 jun. 2021.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo, Grupo A, 2019. 9788582715468. Disponível em:

DARMANTO, Y. S., *et al.* T.W. AGUSTINI, F. SWASTAWATI; I. AL BULUSHI. The effect of fish bone collagens in improving food quality. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 21, n. 3, p. 891-896, 2014. Disponível em: [http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20\(03\)%202014/7%20IFRJ%2021%20\(03\)%202014%20Tri%20124.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20(03)%202014/7%20IFRJ%2021%20(03)%202014%20Tri%20124.pdf). Acesso em: 28 mar. 2021.

DINCERDINÇER, M. T. *et al.* Functional properties of gelatin recovered from scales of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, [s. l] v. 39, n. 1, p. 102-109, 2015. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/abstract.htm?id=15635>. Acesso em: 8 jun. 2021.

DOYLE, B.B.; BENDIT, E.G.; BLOUT, E.R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. **Biopolymers** 14, 937-957. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140505>. Acesso em: 5 jun. 2021.

DUAN, R. *et al.* Study on the properties of gelatins from skin of carp (*Cyprinus carpio*) caught in winter and summer season. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 25, n. 3, p. 368-373, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X10001402>. Acesso em: 8 jun. 2021.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture – 2010**. Fisheries and Aquaculture Department, Rome Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **Global Aquaculture Production 1986-2008**. FAOSTAT: Departamento de Pesca e Aquicultura, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i1820e/i1820e00.htm>. Acesso em: 17 nov. 2018.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The state of world fisheries and aquaculture – 2014**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3720e/i3720e.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2021.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Fishery and Aquaculture Statistics – 2016**. 2016. Disponível em: [http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2016\\_USBcard/navigation/index\\_intro\\_e.htm](http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2016_USBcard/navigation/index_intro_e.htm). Acesso em: 02 jun. 2021.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2018**. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **Global Aquaculture Production 1986-2008**. FAOSTAT: Departamento de Pesca e Aquicultura, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/figis/servlet/>. Acesso em: 17 nov. 2018.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2018**. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES 2004 - **Regulations for food additives in 21 Code of Federal Regulations**. CHAPTER I -, 2004. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS>. Acesso em: 06. jul. 2021.

FENG, X. *et al.*. Optimization of demineralization on *Cyprinus carpio haematopterus* scale by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 1684–1690, 2015. DOI: 10.1007/s13197-013-1164-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-013-1164-y>. Acesso em: 13 jun. 2021.

FERREIRA, C. M. **Ranicultura**. 2006, [blog]. Disponível em: <http://www.aquicultura.br/ranicultura.htm>. Acesso em: 25 mar. 2021.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. **Introdução à Ranicultura**. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo. n. 33, 2002, 15 p. Disponível em: [https://www.pesca.sp.gov.br/boletim\\_tec\\_33.pdf](https://www.pesca.sp.gov.br/boletim_tec_33.pdf). Acesso em: 25 mar. 2021.

FIDELIS, I. C. **Qualidade protéica e biodisponibilidade de ferro e cálcio em carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004. Disponível em: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=114842](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=114842). Acesso em: 12 mar. 2021.

FOODS, I.C.O.M.S. F. International Commission on Microbiological Specifications for Foods **Microrganismos em alimentos**. [Digite o Local da Editora]: Editora Blucher, 2015. 9788521208587. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521208587/>. Acesso em: 05 ago. 2021 ago. 05.

FRAGOSO, S. P. *et al.* Características físico-químicas da carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) liofilizada. In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, **Anais [...]**, Campinas – SP, 2012.

FRAGOSO, S. P.; FERREIRA, V. C. S.; ARAUJO, I. B. S.; OLIVEIRA, E. N.; SILVA, F. A. P.; MOURA, O. M. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DE DIFERENTES CORTES DA CARNE LIOFILIZADA DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) PIGMENTADA E ALBINA. **Higiene Alimentar**, [s. l.] São Paulo.: v. 27, p. 951-955, 2013.

FURTADO, A. A. L *et al.* **Processamento de salsicha de carne de rã**. Comunicado Técnico 90. MAPA. ISSN 0103-5231. Rio de Janeiro. dez. 2005.

GMIA, G. H. **Gelatin Manufacturers Institute of America**; New York, 2019. Disponível em: [http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia\\_gelatin\\_manual\\_2019.pdf](http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_gelatin_manual_2019.pdf). Acesso em: 11 mar. 2021.

GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Viscoelasticity of thermoreversible gelatin gels from mammalian and piscine collagens. **Journal of Rheology**, San José, v. 44, n. 4, p. 871–883, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1122/1.551118>. Disponível em: <https://sor.scitation.org/doi/10.1122/1.551118>. Acesso em: 12 mar. 2021.

GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. The role of salt washing of fish skins in 693 chemical and rheological properties of gelatin extracted. **Food Hydrocolloids**, Washington, 19, 951–957, 2005. Disponível em: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-8738d52c-3156-3bc9-88b6-5bf07d6653b6>. Acesso em: 15 mar. 2021.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 21, n. 7, p. 1133-1143, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X06001809>. Acesso em: 3 jun. 2021.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends In Food Science & Technology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 3-16, jan. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224408002471>. Acesso em: 16 abr. 2021.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. **Food Hydrocolloids**, Washington[s. l.], v. 25, n. 8, p. 1813-1827, dez. 2011. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11000427>. Acesso em: 13 abr. 2021.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 16, n. 1, p. 25-34, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X01000352>. Acesso em: 5 jun. 2021.

GONÇALVES, A. A. *Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação*. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. 608 p.

GONÇALVES, A. A.; OTTA, M. C. M. Aproveitamento da carne da carcaça de rã-touro gigante no desenvolvimento de hambúrguer. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. São Luís. V. 3, n. 2, p. 2-15, 2008. DOI: <https://doi.org/10.18817/repesca.v3i2.69>. Disponível em: <https://ppg.revistas.uema.br/index.php/REPESCA/article/view/69/68>. Acesso em: 23 mar. 2020.

GME, **GELATINE MONOGRAPH**. Version 15 – October 2020 Disponível em: <https://www.gelatine.org/en/gelatine/safety.html?redirect=1>. Acesso em 3 jun. 2021.

GMIA, G. H. **Gelatin Manufacturers Institute of America**; New York, 2019. Disponível em: [http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia\\_gelatin\\_manual\\_2019.pdf](http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_gelatin_manual_2019.pdf). Acesso em: 11 mar. 2021.

HOQUE, M. D. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 25, n. 5, p. 1085-1097, 2011. Disponível em

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X10002481>. Acesso em: 3 jun. 2021.

HUNTERLAB INC. **Applications Note: CIE L \* a \* b \* Color Scale**. V. 8 p. 1 – 4, 2008. Disponível em: <https://studylib.net/doc/8432176/hunter-l--a--b-color-scale>. Acesso em 12 mar. 2021

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4ª Edição, 2005, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados da Pesquisa Pecuária Municipal de 2016. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf) Acesso em: 17 nov. 2018.

IHDA – Instituto Hórus de Desenvolvimento de Conservação Ambiental (The Nature Conservancy), 02. Mar. 2007. IHDC. INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. **The Nature Conservancy**, Mar. 2007. Disponível em: <http://www.institutohorus.org.br>. Acesso em: 28 mar. 2021.

IKOMA, T. *et al.* Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l], v. 32, n. 3-5, p. 199-204, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813003000540>. Acesso em: 2 jun. 2021.

INTARASIRISAWAT, R. *et al.* Autolysis study of big eye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin and its effect on gelatin. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 21, p. 537-544, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. **ISO 4831. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms** -- Most probable number technique, 3rd Ed. The International Organization for Standardization, 2006. Disponível em: <https://www.sis.se/api/document/preview/907757/>. Acesso em: 28 mar. 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. ISO 7251, Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique. 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2005. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/34568.html>. Acesso em: 28 mar. 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. ISO 7251, Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique. 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2005. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/34568.html>. Acesso em: 28 mar. 2021.

JAMILAH, B. *et al.* Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. **Food hydrocolloids**, Washington, v. 25, n. 5, p. 1256-1260, 2011. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X1000278X>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X1000278X>. Acesso em: 16 mar. 2021.

JECFA. **Edible Gelatin**: Edição online: "**Compêndio de especificações para aditivos alimentares**" Monograph 1. (2006). Número CAS 9000-70-8, 2006.. Codex GSFA Online. Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/Monograph1/Additive-171.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-171.pdf). Acesso em: 06 jul. 2021.

KAEWDANG, O. *et al.* Characteristics of gelatin extracted from the swim bladder of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) as affected by alkaline pretreatments. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [s. l.] v. 25, n. 8, p. 1190-1201, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2015.1043418>. Acesso em: 2 jun. 2021.

KAEWRUANG, P; BENJAKUL, S; PRODPRAN, T. Molecular and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket as affected by extracting temperatures. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 138, n. 2-3, p. 1431–1437, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.114>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814612015750>. Acesso em: 25 mar. 2021.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, Washington. v. 23, n. 3, p. 563-576, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X08001446>. Acesso em: 24 mar. 2021.

KARNJANAPRATUM, S. *et al.* Characteristics and Gel Properties of Gelatin from Skin of Asian Bullfrog (*Rana tigrina*). **Food Biophysics**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 289-298, 15 mai. 2017. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-017-9485-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11483-017-9485-4>. Acesso em: 3 jun. 2021.

KASANKALA, L. M., *et al.* Optimization of gelatin extraction from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. **Bioresource Technology**, [s. l.] v. 98, n. 17, p. 3338–3343, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.019>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17451944/>. Acesso em: 3 jun. 2021.

KIM, S.; WIJESEKARA, I. Industry perspectives and commercial trends for food proteins and biopeptides. *In: Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization*, Chapter 16, p. 409-420, 2012. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=h8UEImN7SAC&oi=fnd&pg=PA409&dq=Industry+perspectives+and+commercial+trends+for+food+proteins+and+biopeptides.+&ots=P3cWAM7NcZ&sig=J6sOpfvStPA2jDIN607r1kTo\\_d4](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=h8UEImN7SAC&oi=fnd&pg=PA409&dq=Industry+perspectives+and+commercial+trends+for+food+proteins+and+biopeptides.+&ots=P3cWAM7NcZ&sig=J6sOpfvStPA2jDIN607r1kTo_d4). Acesso em: 2 jun. 2021.

KITTIPHATTANABAWON, P. *et al.* Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 24, n. 2-3, p. 164-171, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.001>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X09001805>. Acesso em: 16 mar. 2021.

KOŁODZIEJSKA, ILONA *et al.* Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 700-706, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.071>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/getaccess/pii/S0308814607008928>. Acesso em: 12 mar. 2021.

KUANG, C. Y.; MOHTAR, N. F.; Effects of different soaking time on the extraction of gelatin from shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) heads. **Journal of Environmental Biology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 888-894, 15 set. 2018. Triveni Enterprises. DOI: [http://dx.doi.org/10.22438/jeb/39/5\(si\)/11](http://dx.doi.org/10.22438/jeb/39/5(si)/11). Disponível em:  
[https://www.medsci.cn/sci/show\\_paper.asp?id=5e0be11683a5399a](https://www.medsci.cn/sci/show_paper.asp?id=5e0be11683a5399a). Acesso em: 5 jun. 2021.

LI, Z. *et al.* Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 31, n. 1, p. 103-113, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.001>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X12002147?via%3Dihub>. Acesso em: 16 mar. 2021.

LIMPISOPHON, K. *et al.* Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 23, n. 7, p. 1993-2000, 2009. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X09000666>. Acesso em: 1 jun. 2021.

LIU, Dasong *et al.* Collagen and gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 6, p. 527-557, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>. Acesso em: 12 jun. 2021.

LIU, H. Y.; HAN, J.; GUO, S. D. Characteristics of the gelatin extracted from Channel Catfish (*Ictalurus Punctatuspunctatus*) head bones. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 2, p. 540-544, mar. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.013>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643808001837>. Acesso em: 9 abr. 2021.

MARTINS, M. E. O. *et al.* Thermal and Chemical Properties of Gelatin from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Scale. *Journal Of Aquatic Food Product Technology*, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 1120-1133, 23 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2018.1535530>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2018.1535530>. Acesso em: 29 maio 2021.

MELLO, S. C. R. P. *et al.* Avaliação Bacteriológica e físico-química da polpa e dorso de rã obtido por separação mecânica. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 39-48, 2006. DOI: <http://doi.org/10.4322/rbcv.2014.289>.

MIRZAPOUR-KOUHDASHT, A. *et al.* Optimization of gelatin production from Barred mackerel by-products: Characterization and hydrolysis using native and commercial

proteases. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 108, p. 105970, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1932106X>. Acesso em: 1 jun. 2021.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 434-438, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16022.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16022.x>. Acesso em: 12 mar. 2021.

MOREIRA, C. R. **Análise econômica da ranicultura: viabilidade individual, integrada de operações**. São Paulo, 2011. 56 f. Dissertação (Mestre em Aquicultura e Pesca). Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. São Paulo – SP, 2011. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/educacao/pos-graduacao/dissertacoes-defendidas/category/10-ano-2011?download=92:analise-economica-da-ranicultura-viabilidade-individual-e-integrada-de-operacoes>. Acesso em: 15 mar. 2021.

MORGANO, M. A.; MILANI, R. F.; PERRONE, A. A. M. Determination of total mercury in sushi samples employing direct mercury analyzer. **Food Analytical Methods**, [s. l.] v. 8, n. 9, p. 2301-2307, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-015-0117-7>. Acesso em: 2 maio. 2021.

MOURA, O. M. A carne de rã como matéria-prima e seu uso em produtos derivados. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, p. 68-73, 2003.

MOURA, ONOFRE MAURÍCIO DE; DIAS, GUTEMBERG PEREIRA. **Desossador Mecânico para Carnes de Animais de Pequeno Porte**. BR n. MU8200639-32002. Déposito: 2002.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 18, n. 4, p. 581-592, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X03001528>. Acesso em: 1 maio. 2021.

NHARI, R.; ISMAIL, A.; CHE MAN, Y. Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. **Journal of Food Science**, Selangor v. 77, 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2011.02514>. Acesso em: 8 set. 2020.

NÓBREGA, I. C. C. *et al.* Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 186-191, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.047>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606003943>. Acesso em: 20 mar. 2021.

NOLL, I. B; LINDAU, C. F. Aspectos da composição em nutrientes da carne de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana*). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v.3, n.1/2, p. 29-36, 1987. Disponível em:

<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/19232/000016259.pdf?sequence=1>.  
Acesso em: 13 abr. 2021.

NORZIAH, M. H.; KEE, H. Y.; NORITA, M. Response surface optimization of bromelain-assisted gelatin extraction from surimi processing wastes. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 5, p. 9-18, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429213000655>. Acesso em: 2 maio. 2021.

NUNES, Y. L. **Preparação e Caracterização de Bioblendas Poliméricas a partir de gelatina bovina e de tilápia com amido de milho**. 2014, 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal – RN. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/12848>. Acesso em: 28 mar. 2021.

OCAK, BUĞRA. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. **Journal of environmental management**, United States, n. 1, v. 100, p. 22-28, 2012. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712000345>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712000345>. Acesso em: 12 mar. 2021.

OLIVEIRA, V. M. *et al.* Colágeno: função, classificação e produção de peptídeos bioativos a partir da pele de peixes. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, São Cristóvão, v. 5, n. 2, p. 56-68, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2312/Actafish.2017.5.2.70-82>. Disponível em: <https://seer.ufs.br/index.php/ActaFish/article/view/5833>. Acesso em: 13 mar. 2021.

PRESTES, R. C. *et al.* Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.4, p.375-382, 2013. Disponível em: <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev154/Art1547.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2021.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** [s. l.], v. 11, p. 369–375, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.005>. Acesso em: 18 mai. 2020.

RODRIGUES, E. *et al.* Frog meat microbiota (*Lithobates catesbeianus*) used in infant food. **Food Science and Technology**, London, v. 34, n. 1, p. 51-54, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/GcXR3fNcdGfCbzC8qqFskQb/?lang=en>. Acesso em: 17 mar. 2021.

SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. New York: American Public Health Association, 2015. Disponível em: <https://ajph.aphapublications.org/doi/book/10.2105/MBEF.0222>. Acesso em: 1 abr. 2021.

SANAEL, A. V. *et al.* Optimization of gelatin extraction and physico-chemical properties of catfish (*Clarias gariepinus*) bone gelatin. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 20, n. 1, p. 423, 2013. Disponível em:

[http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20\(01\)%202013/59%20IFRJ%2020%20\(01\)%202013%20Yusop%20\(393\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(01)%202013/59%20IFRJ%2020%20(01)%202013%20Yusop%20(393).pdf) . Acesso em: 3 maio. 2021.

SANTOS, J. P. **Efeito da reticulação química nas gelatinas de peles e ossos de tilápia e de carpa e na produção de filmes biopoliméricos.** 2017, 113 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS. 2017. Disponível em: <http://www.repositorio.furg.br/handle/1/8498>. Acesso em: 28 mar. 2021.

SHAKILA, R. Jeya *et al.* Comparison of the properties of multi-composite fish gelatin films with that of mammalian gelatin films. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 135, n. 4, p. 2260-2267, dez. 2012b. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.069>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814612011831>. Acesso em: 1 abr. 2021.

SHAKILA, R. Jeya *et al.* Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 48, n. 1, p. 30-36, set. 2012a. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643812001144>. Acesso em: 01 mar. 2021.

SILVA, E. V. C. **Otimização das condições de extração da gelatina de pele de peixes amazônicos por diferentes métodos.** Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, 2016, p. 106. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/8910>. Acesso em: 4 maio 2021.

SILVA, G. C. O. *et al.* Obtenção e caracterização físico-química e microbiológica da gelatina de resíduos de matrinxã (*Brycon amazonicus*) e tambaqui (*Colossoma macroponum*). **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**. v. 6, p.74-84. 2018b. Disponível em: <https://seer.ufs.br/index.php/ActaFish/article/view/8633>. Acesso em: 8 maio 2021.

SILVA, N. S. *et al.* Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. **Cyta - Journal Of Food**, Oxfordshire, v. 16, n. 1, p. 340-349, jan. 2018a. Informa UK Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2017.1406005>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2017.1406005>. Acesso em: 3 abr. 2021.

SILVA, R. S. G *et al.* Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 57, n. 2, p. 580-585, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814001029>. Acesso em: 16 mar. 2021.

SILVA, R. S. G. *et al.* Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.904-909, mai, 2011. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/4584>. Acesso em: 4 maio 2021.

SILVA, R. S. G. **Obtenção de gelatina de peles de bijupirá (*Rachycentron canadum*), modificação e produção de filme.** Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em

Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2013, p. 184.

SINTHUSAMRAN, S; BENJAKUL, S; KISHIMURA, H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 152, p. 276–284, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.109>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814613017974>. Acesso em: 26 mar. 2021.

SONGCHOTIKUNPAN, P.; TATTIYAKUL, J.; SUPAPHOL, P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 247-255, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.11.005>. Disponível em: [sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813007002942](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813007002942). Acesso em: 19 abr. 2021.

SUCASAS, L. F. A. Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade da cadeia produtiva. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. p.166. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-03082011-145355>. Acesso em: 13 mai. 2021.

TÜMERKAN, E. T. A. et al. Physiochemical and Functional Properties of Gelatin Obtained from Tuna, Frog and Chicken Skins. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 287, p. 273–279, jul. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.088>. Acesso em: 13 mai. 2021.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP. 39th Ed. **United States Pharmacopeial Convention**. 2016. Disponível em: <https://www.uspnf.com/official-text/proposal-statuscommentary/usp-39-nf-34>. Acesso em: 16 jun.2021.

URIARTE-MONTOYA, M.H.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; CINCO-MOROYOQUI, F.J.; ROUZAUD-SÁNDEZ, O.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; EZQUERRA-BRAUER, J.M. Giant squid skin gelatin: chemical composition and biophysical characterization. **Food Research International**. v.44, p. 3243-3249, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911005126>. Acesso em: 15 mai. 2021

WANG, H. *et al.* Identification and localization of gastrointestinal hormones in the skin of the bullfrog *Rana catesbeiana* during periods of activity and hibernation. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 116, n. 8, p. 1418-1426, out. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2014.09.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S006512811400244X>. Acesso em: 5 maio 2021.

WANG, H. *et al.* Identification and localization of gastrointestinal hormones in the skin of the bullfrog *Rana catesbeiana* during periods of activity and hibernation. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 116, n. 8, p. 1418-1426, out. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2014.09.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S006512811400244X>. Acesso em: 5 mai. 2021.

WANG, Y.; REGENSTEIN, J. M. Effect of EDTA, HCl, and citric acid on Ca salt removal from Asian (silver) carp scales prior to gelatin extraction. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 426-431, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2009.01202.x>. Acesso em: 7 mai. 2021.

WENG W, WU F. Water resistance and mechanical property improvement of tilapia (*Tilapia zillii*) scale gelatin films by dehydrated thermal treatment. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 52 n. 6 p. 3358-66, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1401-z>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26028716/>. Acesso em: 14 mar. 2021.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986. DOI: 10.1155/S1463924686000330. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2547673/>. Acesso em: 13 mai. 2021.

WIDYASARI, R.; RAWDKUEN, S. Extraction and characterization of gelatin from chicken feet by acid and ultrasound assisted extraction. **Food and Applied Bioscience Journal**, Chiang Mai, v. 2, n. 1, p. 85-97, 2014. Disponível em: <https://li01.tcithaijo.org/index.php/fabjournal/article/view/77404>. Acesso em: 5 jun. 2021.

WOLF, F. A. Chapter V Collagen and gelatin. *In: Progress in biotechnology*. Elsevier, 2003. V. 23, n. 1, p. 133-218, 2003. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0921-0423\(03\)80005-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0921-0423(03)80005-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921042303800059>. Acesso em: 16 mar. 2021.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, Washington, v. 23, n. 7, p. 1886-1894, Oxford: Elsevier B. V., 2009.

XIONG, Y.; KAMBOJ, M.; AJLOUNI, S.; FANG, Z. Incorporation of salmon bone gelatine with chitosan, gallic acid and clove oil as edible coating for the cold storage of fresh salmon fillet. **Food Control**, v. 125, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713521001328>.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; FARHAT, I. MITCHELL, J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, Guildford, v. 46, n. 26, p. 12577-12585, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/polymer>. Acesso em: 12 jun. 2021.

YANG, H.; WANG, Y.; JIANG, M.; OH, J. H.; HERRING, J.; ZHOU, P. 2-step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. **Journal of Food Science**, v. 72, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00319.x>. Acesso em: 4 maio. 2021.

ZHANG, F.; XU, S.; WANG, Z. Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 185-193, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308510000660>. Acesso em: 4 maio. 2021.

ZHANG, Junjie; DUAN, Rui. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from frog (*Rana nigromaculata*) skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l], v. 101, p. 638-642, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017304002>. Acesso em: 5 maio. 2021.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Comparison of water gel desserts from fish skin and pork gelatins using instrumental measurements. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 4, p. 196 - 201, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2007.00320.x>. Acesso em: 5 maio. 2021.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*, Champaign, v. 70, n. 6, p. c392-c396, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11435.x>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ZHOU, P; MULVANEY, S. J; REGENSTEIN, J. M. Properties of Alaska pollock skin gelatin: A comparison with tilapia and pork skin gelatins. **Journal of Food Science**, v. 71, 2006. Disponível em: <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1750-3841.2006.00065.x> Acesso em: 18 fev. 2020.