Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Obtenção de hidrolisados proteicos de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), atividade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para bioprocessos

Elizângela Falcão do Vale Nepomuceno

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Elizângela Falcão do Vale Nepomuceno
Médica Veterinária

Obtenção de hidrolisados proteicos de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), atividade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para bioprocessos

Orientadora:
Profa. Dra. **MARÍLIA OETTERER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Nepomuceno, Elizângela Falcão do Vale

Obtenção de hidrolisados proteicos de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), atividade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para bioprocessos / Elizângela Falcão do Vale Nepomuceno. - - Piracicaba, 2018.

62 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Tilápia vermelha 2. Co-produtos 3. Peptona 4. Neutrase 5. Papaína 6. Grau de hidrólise 6. Atividade antioxidante 7. Crescimento microbiano I. Título

À minha amada mãe Francisca (*in memoriam*) pelos valores passados
e pela oportunidade da vida e, ao meu querido filho Miguel por me
proporcionar sentir o amor incondicional.

DEDICO

Ao meu companheiro desta existência, Fernando, pelo apoio e amor.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar aqui e ter vivenciado toda esta experiência enriquecedora.

À minha família, pais e irmãos, pelo exemplo de perseverança, honestidade, fraternidade e superação.

Ao meu marido Fernando e ao meu filho Miguel, pelo amor, paciência e apoio incondicional.

À professora Dra Marília Oetterer, pelo exemplo de profissional sempre à frente do seu tempo e, por me aceitar como sua orientada.

Ao Dr Daniel Vázquez Sanchez e à Dra Juliana Antunes Galvão por serem meus tutores, amigos e por compartilharem tantos ensinamentos e conhecimentos, gratidão por tudo.

Às queridas “getepianas” e “esalqfoodianas” Jéssica, Renata, Marina Mazine, Bianca, Aninha, Samara, Raquel e Camila, pela ajuda, pelas risadas, desabafos e por compartilharem suas experiências.

À professora Dra. Thais Vieira, à professora Dra. Sandra Cruz e ao professor Dr Ricardo Antunes pelo apoio, incentivo e pelos conhecimentos passados.

Ao Mauro Tadashi Nakata, proprietário da Piscicultura Cristalina (Fartura-SP), que gentilmente doou a matéria prima e demais informações, indispensável para que este experimento acontecesse.

Ao Luis Felipe, Pedrinho e Salete Gaziola pela presteza e dedicação oferecidas no decorrer das minhas análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Enfim, minha gratidão a todos que me ajudaram direta ou indiretamente, e que estiveram ao meu lado durante toda esta trajetória até chegar a este momento, a realização de um sonho.

EPÍGRAFE

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”.

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Produção pesqueira.....	15
3.2. Tilápia vermelha (<i>Oreochromis niloticus</i> var.).....	15
3.3. Resíduos e co-produtos da indústria pesqueira	16
3.4. Obtenção de hidrolisados proteicos de pescado	17
3.5. Aplicações industriais dos hidrolisados	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Processamento e caracterização dos resíduos sólidos	23
4.2. Otimização das condições de hidrólise proteica.....	24
4.3. Quantificação e caracterização das proteínas no hidrolisado	28
4.4. Determinação da atividade antioxidante	29
4.5. Avaliação da eficiência dos hidrolisados proteicos para uso em bioprocessos	30
4.6. Análise estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Características dos resíduos sólidos de tilápia vermelha.....	33
5.2. Otimização das condições do processo proteolítico para obtenção de peptonas	34
5.3. Características moleculares dos hidrolisado proteicos	42
5.4. Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos.....	43
5.5. Eficiência das peptonas para bioprocessos com bactérias.....	44
5.6. Eficiência das peptonas para bioprocessos com leveduras	47
6. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52

RESUMO

Obtenção de hidrolisados proteicos de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), atividade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para bioprocessos

Os resíduos de pescado são descartados, em sua maioria, gerando um alto impacto ao ambiente; ou subutilizados em co-produtos de baixo valor agregado. O presente estudo objetivou a obtenção de hidrolisados proteicos a partir de resíduos sólidos oriundos do processamento industrial de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), avaliando sua capacidade antioxidante e eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para o crescimento de bactérias e leveduras. Um total de 30 carcaças inteiras não evisceradas, sem filé e pele, com peso médio de 741,53 g, foram mecanicamente homogeneizadas. A composição centesimal apresentou $54,34 \pm 0,31$ g/100 g de umidade, $8,46 \pm 0,72$ g/100 g de cinza, $27,03 \pm 2,94$ g/100 g de proteína e $10,17 \pm 0,65$ g/100 g de lipídeos, assim como a carga microbiana do homogeneizado estava dentro dos limites de tolerância preconizados pela legislação vigente para consumo humano. Foram otimizadas as condições de hidrólise proteica quanto à concentração de substrato, enzima e tempo de hidrólise, dos resíduos sólidos de tilápia vermelha, resultando na obtenção de modelos preditivos para o grau de hidrólise (GH) produzido tanto pelas enzimas endógenas como pelas enzimas comerciais neutrase e papaína. O GH diminuiu significativamente ($p < 0,05$) com o incremento da concentração de substrato, exceto na hidrólise produzida pelas enzimas endógenas sob condições ótimas para papaína. Não obstante, o GH produzido pelas enzimas endógenas aumentou significativamente ($p < 0,05$) com o incremento do tempo de hidrólise, enquanto que o incremento na concentração de papaína também aumentou significativamente ($p < 0,05$) o GH nos resíduos. Rendimento de $80,95 \pm 3,12\%$, e GH de 45,33 % foram alcançados sob condições ótimas para neutrase (22 g substrato/100 mL e 0,277 g enzima/100 g proteína durante 3 min), enquanto que a papaína teve um rendimento de $82 \pm 2,21\%$ e GH de 42,37% sob condições ótimas (18,5 g substrato/100 mL e 0,570 g enzima/100 g proteína durante 3 min). As peptonas produzidas apresentaram atividade antioxidante quanto à capacidade de sequestro dos radicais livres ABTS e DPPH, sendo esta incrementada significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de peptona. As peptonas também foram altamente eficientes para o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo similares ou mesmo superiores quando comparadas às três peptonas comerciais. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram, portanto, que os hidrolisados proteicos obtidos a partir de resíduos sólidos de tilápia vermelha podem ser uma fonte alternativa de antioxidantes e de nitrogênio para crescimento de microrganismos.

Palavra-chave: Tilápia vermelha; Co-produtos; Peptona; Neutrase; Papaína; Grau de hidrólise; Atividade antioxidante; Crescimento microbiano

ABSTRACT

Production of red tilapia (*Oreochromis niloticus* var.) protein hydrolyzates and evaluation of their antioxidant activity and efficiency as a supplementary source of nitrogen for bioprocesses

Fish wastes are mostly discarded in Brazil, causing a high environmental impact, or underused in low-valuable coproducts. The present study aimed to obtain protein hydrolysates from solid wastes of red tilapia (*Oreochromis niloticus* var.), evaluating their antioxidant activity as well as their efficiency as supplemental source of nitrogen for the growth of bacteria and yeasts. Thirty carcasses with viscera of red tilapia (i.e. tilapia without fillet and skin), with an average weight of 741.53 g, were mechanically homogenized. Proximate composition and microbial quality were determined, containing 54.34 ± 0.31 g/100 g of moisture, of ash, 27.03 ± 2.94 g/100 g of protein and 10.17 ± 0.65 g/100 g of lipids, as well as microbial levels in concordance with the legal limits in force. Conditions for the proteolysis of solid wastes of red tilapia (concentration of substrate, concentration of enzyme and time of hydrolysis) were optimized. Predictive models for the degree of hydrolysis (DH) generated by both endogen enzymes and the commercial enzymes neutrase and papain were obtained. DH decreased significantly ($p < 0.05$) with the increase of the concentration of substrate, except in the hydrolysis caused by the endogen enzymes under optimal conditions for papain. However, DH produced by the endogen enzymes increased significantly ($p < 0.05$) with the increment of the time of hydrolysis. Meanwhile, DH increase significantly ($p < 0.05$) with the increase of the concentration of papain. A yield of $80.95 \pm 3.12\%$ and a DH of 45.33 % were achieved under optimized conditions for neutrase (i.e. 22 g substrate/100 mL and 0.277 g enzyme/100 g protein for 3 min). Moreover, proteolysis with papain reached a yield of $82 \pm 2.21\%$ and a DH of 42.37% under optimized conditions (i.e. 18.5 g substrate/100 mL and 0.570 g enzyme/100 g protein for 3 min). Obtained peptones showed antioxidant activity in terms of inhibition of free radicals of ABTS and DPPH, being increased significantly ($p < 0.05$) with the increment of the concentration of peptone. Peptones also had a high efficiency for the growth of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*, being comparatively similar or higher than commercial peptones. Therefore, results obtained in the present study demonstrated that protein hydrolysates from solid wastes of red tilapia could be an alternative source of antioxidants and nitrogen for the use in bioprocess.

Keywords: Red tilapia; Fish wastes; Peptone; Neutrase; Papain; Degree of hydrolysis; Antioxidant activity; Microbial growth

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resíduos sólidos de tilápia vermelha, filetada, com vísceras (A) e resíduos triturados (B).	23
Figura 2. Fluxograma de obtenção dos hidrolisados proteicos.	27
Figura 3. Hidrolisados de resíduos sólidos de tilápia vermelha preparados com as enzimas neutrase (A) e papaína (B).	34
Figura 4. Efeito no rendimento da hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha da interação entre a concentração de substrato e tempo sob condições recomendadas para neutrase (A) e papaína (B).	35
Figura 5. Efeito no grau de hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha da interação entre a concentração de substrato e tempo sob condições recomendadas para neutrase (A) e papaína (B).	37
Figura 6. Efeito no rendimento da hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha das interações entre a concentração de neutrase e a concentração de substrato (A) ou tempo (B), e entre a concentração de papaína e a concentração de substrato (C) ou tempo (D).	38
Figura 7. Efeito no grau de hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha das interações entre a concentração de neutrase e a concentração de substrato (A) ou tempo (B), e entre a concentração de papaína e a concentração de substrato (C) ou tempo (D).	41
Figura 8. Liofilizados contendo os hidrolisados proteicos à base de resíduos sólidos de tilápia vermelha produzidos com as enzimas neutrase (A) e papaína (B).	42
Figura 9. Perfis SDS-PAGE dos resíduos sólidos de tilápia vermelha sem hidrolisar (2), da fração aquosa de PHT-N (3) e PHT-P (4), do liofilizado de PHT-N (5) e PHT-P (6), e das peptonas comerciais BD Bacto (7), Kasvi (8) e Himedia (9). O padrão BenchMark Protein Ladder (10-220 kDa, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, São Paulo/SP, Brasil) é apresentado na corrida 1.	43
Figura 10. Atividade antioxidante do PHT-P e PHT-N em termos de sequestro do radical livre ABTS (A) e DPPH (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os hidrolisados para uma concentração determinada.	44
Figura 11. Cinéticas de crescimento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> com as peptonas BD Bacto (A, B, C, respectivamente), Himedia (D, E, F), Kasvi (G, H, I), PHT-N (J, K, L) e PHT-P (M, N, O). Valores experimentais são representados por símbolos, enquanto os valores esperados são mostrados como linhas sólidas, segundo a equação de <i>Gompertz</i> (vide item 4.5.3.).	45
Figura 12. Cinéticas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as peptonas BD Bacto (A), Kasvi (B), Himedia (C), PHT-N (D) e PHT-P (E). Valores experimentais são representados por símbolos, enquanto os valores esperados são mostrados como linhas sólidas, segundo a equação de <i>Gompertz</i> (vide item 4.5.3.).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores naturais e codificados das variáveis independentes usadas no delineamento composto central rotacional de terceira ordem (substrato, enzima e tempo).....	25
Tabela 2. Valores naturais e codificados das variáveis independentes usadas no delineamento composto central rotacional de segunda ordem (substrato e tempo)	26
Tabela 3. Composição centesimal dos resíduos sólidos de tilápia vermelha, em base úmida.	33
Tabela 4. Qualidade microbiológica (UFC/g) dos resíduos sólidos de tilápia vermelha	34
Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para valores de grau de hidrólise das enzimas endógenas nos resíduos sólidos de tilápia vermelha sob as condições de temperatura e pH recomendadas para neutrase (EN) e papaína (EP)	36
Tabela 6. Efeito da concentração de substrato (S) e tempo (t) e a sua interação no grau de hidrólise produzido pelas enzimas endógenas de resíduos sólidos de tilápia vermelha sob condições ótimas para neutrase (EN) e papaína (EP)	36
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para valores de grau de hidrólise nos resíduos sólidos de tilápia vermelha com as enzimas neutrase e papaína	39
Tabela 8. Efeito da concentração de substrato (S), concentração de enzima (E) e tempo (t) e suas interações no grau de hidrólise de resíduos sólidos de tilápia vermelha utilizando as enzimas neutrase (PHT-N) e papaína (PHT-P).....	39
Tabela 9. Tempo de latência (λ), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$), tempo de geração (g) e assíntota (A) das bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> crescidas em peptonas comerciais (BD Bacto, Kasvi e Himedia) e hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha (PHT-N e PHT-P)	46
Tabela 10. Tempo de latência (λ), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$), tempo de geração (g) e assíntota (A) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> crescida em peptonas comerciais (BD Bacto, Kasvi, Himedia) e hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha (PHT-N, PHT-P).	47

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado vem aumentando significativamente, com destaque para a tilápia (FAO, 2017). Em particular, o Brasil passou a produzir de 95.091 t de tilápia em 2007 para 239.091 t em 2016, um aumento de 251% (IBAMA, 2009; IBGE, 2017). Entretanto, 62,5-66,5% da produção é considerado resíduo industrial oriundo do beneficiamento da tilápia, sendo geralmente descartado de forma inadequada ou subutilizado em produtos de baixo valor agregado (SHIRAHIGUE et al., 2016; ARRUDA et al., 2007; VIDAL et al., 2011). Desse modo, justifica-se a necessidade de intensificar e especificar pesquisas que visem o melhor aproveitamento e racionalização dos nutrientes intrínsecos a estes resíduos, buscando a otimização das metodologias utilizadas para obtenção de co-produtos com melhores propriedades funcionais e de maior valor agregado.

A obtenção de co-produtos de resíduos representa uma alternativa sustentável e lucrativa para a indústria de alimentos (ANBE et al., 2015; SILVA et al., 2014; VIDAL, et al., 2011). Entre as diversas formas de aproveitamento dos resíduos gerados pelo setor, destacam-se a elaboração de silagem e suas várias formas e aplicações (ANBE et al., 2015; ARRUDA, et al 2006; ARRUDA et al., 2009; SHIRAHIGUE et al., 2016) e a obtenção de peptona através de processo proteolítico (ASPMO et al., 2005a; DUFOSSÉ et al., 2001; FALLAH et al., 2015; GILDBERG et al., 2010; HERPANDI et al., 2011; HUSIN et al., 2015; KLOMPONG et al., 2012; VIEIRA et al., 2005). Porém, um percentual pequeno de empresas do setor consegue aproveitar seus resíduos de forma responsável, sendo a conscientização ambiental ainda vista em segundo plano na cadeia produtiva aquícola (VALENTI et al., 2018), implementando apenas tecnologias tradicionais que agregam pouco valor econômico a estes co-produtos (VILLAMIL et al., 2017).

Com o presente estudo, pretende-se aproximar as empresas processadoras de pescado à ciência e inovação, visando estimulá-las a reciclar os resíduos sólidos e diversificar a produção com co-produtos que possam minimizar os custos de obtenção do produto principal, além de aumentar a receita e torná-las mais qualificadas e ecoeficientes; requisitos fundamentais para as empresas que pretendem exportar os seus produtos. Pretende-se demonstrar que a biomassa oriunda dos resíduos sólidos de pescado, rica em proteínas, ômega-3, vitaminas solúveis e fosfolípídeos, pode gerar co-produtos de elevado valor comercial, como compostos com propriedades antioxidantes ou fontes de nitrogênio para o desenvolvimento de bactérias e leveduras.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo elaborar e caracterizar hidrolisados proteicos (peptonas) a partir de resíduos sólidos oriundos do processamento industrial de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.), com foco na atividade antioxidante de peptídeos bioativos e aminoácidos livres, e na eficiência como fonte suplementar de nitrogênio para o crescimento de bactérias e leveduras.

O objetivo geral subdivide-se nos seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar os resíduos sólidos de tilápias vermelhas, determinando a sua composição centesimal e qualidade microbiológica.
- Otimizar as condições de hidrólise proteica, através da obtenção de modelos preditivos para as variáveis, concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de hidrólise, e verificar o efeito das enzimas endógenas no processo proteolítico.
- Determinar a capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos procedentes dos resíduos sólidos de tilápia vermelha.
- Avaliar a eficiência das peptonas como fonte suplementar de nitrogênio para o crescimento de bactérias e leveduras em relação às peptonas comerciais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção pesqueira

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial pesqueira atingirá 195,9 milhões de toneladas em 2025, um incremento de 17,4% em relação à produção média de 2013-2015 (FAO, 2016). No Brasil, a piscicultura cresceu 8% em 2017 comparado ao ano passado, uma produção de 691.700 t, com um consumo interno de 9,5 Kg/hab/ano (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA PEIXE BR, 2018). A tilápia foi a espécie mais cultivada, representando 51,7% na produção nacional, atingindo uma produção de 357.639 t em 2017, com destaque para os Estados do Paraná (105.392 t), São Paulo (66.101 t), Santa Catarina (32.930 t), Minas Gerais (27.579 t) e Bahia (22.220 t). O Brasil tornou-se o quarto maior produtor mundial desta espécie, atrás da China, Indonésia e Egito (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA PEIXE BR, 2018). Estima-se um crescimento de 104% na produção pesqueira brasileira até 2025, superando o México e a Argentina (FAO, 2016). Com uma costa litorânea de 8,4 mil km, 5,5 milhões de hectares de reservatórios de água continental, clima favorável, terras disponíveis, mão de obra relativamente de baixo custo e crescente mercado interno e externo, o setor pesqueiro brasileiro deverá ter um futuro promissor.

No entanto, o setor tem um grande desafio a ser enfrentado quanto ao gerenciamento dos resíduos gerados durante a produção, o que constitui parâmetro indicativo da eficiência do sistema (ARRUDA et al., 2007; ROSLAN et al., 2015). O termo resíduo é utilizado não somente para descartes sólidos, mas também para efluentes líquidos e gases emitidos na atmosfera. Os resíduos possuem valor econômico agregado por possibilitarem seu reaproveitamento, sendo 30% deles subutilizados para produção de co-produtos de baixo valor econômico, tais como, ração animal, fertilizantes e silagem (HE et al., 2013; VILLAMIL et al., 2017).

Os resíduos procedentes do processamento do pescado, como as partes do músculo com alto teor de mioglobina, portanto mais escuras e os resíduos oriundos da filetagem, tais como, cabeça, vísceras e carcaça, são em sua maioria descartados, representando sérios problemas de poluição ambiental, além de perdas de matéria prima e energia, pela falta de destino adequado deste material (VIDAL et al., 2011; VILLAMIL et al., 2017). O grande volume de resíduos gerados aliado à falta de escoamento adequado, constituem-se em entrave para a certificação da cadeia produtiva do pescado cultivado; várias são as consequências, dentre elas, a acelerada degradação bacteriana que inviabiliza a elaboração de co-produtos, além do considerável risco de contaminação ambiental (ANBE et al., 2015). Diante disso, é fundamental que sejam tomadas medidas para reestruturar o sistema de produção do pescado, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e buscar novas estratégias para agregar valor aos subprodutos.

3.2. Tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus* var.)

A tilápia foi introduzida no Brasil na década de 1950. Em 1971, a espécie *Oreochromis niloticus* passou a ser criada nos açudes públicos do Nordeste brasileiro com o objetivo de prover proteína de alto valor biológico à população local (BOSCARDIN, 2008). Aproximadamente 70 espécies de tilápia já foram catalogadas, em sua maioria de origem africana, com maior destaque na aquicultura mundial para a espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida como tilápia do Nilo (KUBITZA, 2000).

Diante de um mercado consumidor cada vez mais exigente, pesquisas avançam para o melhoramento de espécies com maior potencial zootécnico para cultivo. A produção de híbridos de tilápia do Nilo com outras linhagens tem sido desenvolvida, com o objetivo de criar espécimens mais resistentes a doenças, bem como mais atrativas para o mercado consumidor (HILSDORF, 2016). A tilápia vermelha, conhecida também como “Saint Peter”, é o resultado do cruzamento entre as variedades Red-Stirling (vermelha, de origem escocesa) e a Chitralada (preta, tailandesa), gerando a linhagem brasileira “Royal Fish” (HILSDORF, 1995; HILSDORF, 2016). Trata-se de uma variedade que obteve um excelente desenvolvimento no cultivo, com maior tamanho que a Red-Stirling (+30%) e a Chitralada (+6%), e maior aceitabilidade pelos consumidores devido à coloração avermelhada de seu filé (SANTOS, 2006). A tilápia é considerada um dos peixes com maior índice de produção, em função de características relativas à rusticidade, precocidade, rápido crescimento, adequada conversão alimentar, capacidade em adaptar-se a diversificados ambientes e modos de produção, resistente a patologias e elevadas estocagens, tolerando a níveis baixos de oxigênio dissolvido e a condições adversas de qualidade da água e flutuações de salinidade, custo relativamente baixo de produção, apresentando baixo teor de lipídeos (0,9 g/100g de músculo), calorias da ordem de 117 kcal/100g de músculo, rendimento em filé da ordem de 35 a 40%, ausência de ossos em forma de “Y” fato que a torna apropriada para industrialização, e alto valor comercial, principalmente nos países desenvolvidos (CYRINO & CONTE, 2006; MOREIRA et al., 2011).

3.3. Resíduos e co-produtos da indústria pesqueira

Os consumidores estão, a cada dia, mais conscientes quanto às questões ambientais e aos impactos que os resíduos industriais tem gerado no nosso planeta. Portanto, a indústria pesqueira, além de produzir um produto seguro e de qualidade, também deve adotar políticas de “produção mais limpa” para satisfazer ao consumidor, minimizando racionalmente a geração de resíduos, criando alternativas para a confecção de novos produtos, com consequente aumento da receita, e preservação preventiva do meio ambiente (ANBE et al., 2015). O desenvolvimento de um sistema de produção sustentável é, portanto, necessário para atingir um alto nível de aproveitamento da matéria prima, assim como baixos índices de poluição e redução do consumo de água para melhorar a preservação do meio ambiente e seus recursos naturais (ANBE et al., 2015; FELTES et al., 2010).

No Brasil, a tilápia é comumente beneficiada e comercializada na forma de filé, gerando quantidades consideráveis de resíduos sólidos (62,5-66,5%), incluindo cabeça, vísceras, nadadeiras, coluna vertebral, barbatana, escamas, água de lavagem, pele e recorte de postas e/ou filés (ANBE et al., 2015; FELTES et al., 2010). A produção desses resíduos cria um grave problema ambiental, sem contar com os descartes dos espécimes que não conseguiram atingir o tamanho padrão para comercialização ou não tem valor de mercado, sendo estes classificados como resíduos de produção, o que acarreta maior desvalorização econômica de um produto nutricionalmente valorizado (ANBE et al., 2015; CABRAL et al., 2013; SANTOS et al., 2009; DOS SANTOS et al. 2011; VEIT et al., 2013; VILAMILL et al., 2017). Os co-produtos oriundos dessa matéria prima de elevado valor nutricional, baixo custo, e elevada perecibilidade, quando manipulada e conservada adequadamente, pode-se tornar uma grande fonte de recursos para o setor pesqueiro (FELTES et al., 2010; VILLAMIL et al., 2017). Esta prática, quando bem executada, tornará o setor sustentável ao longo da cadeia produtiva, com melhorias não só para as áreas ambientais como também para as sociais e econômicas (ANBE et al., 2015; SHIRAHIGUE et al., 2016; VALENTI et al., 2018). O ato

de disponibilizar, caracterizar e otimizar os co-produtos, pelo uso de seu fracionamento, objetivando verticalizá-los, possibilita a obtenção de novas matérias primas diferenciadas para diversos segmentos industriais.

Aproximadamente 50% dos resíduos de pescado são descartados, e somente 30% são utilizados para a produção de subprodutos (FELTES et al., 2010; HE et al., 2013; VILAMILL et al., 2017), principalmente farinha de pescado (BOSCOLO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2016), silagem e óleo de pescado (ARRUDA et al., 2006; ARRUDA et al., 2007; FELTES et al., 2010), sendo destinados à nutrição animal (ARRUDA et al., 2009; BORGHESI et al., 2007; SILVA et al., 2014), porém a maioria destes produtos apresentam baixo valor econômico.

O rendimento em filés no processamento varia de acordo a espécie, fase de desenvolvimento, alimentação recebida pelos peixes, técnicas de filetagem e experiência do manipulador. Em relação à tilápia, o rendimento do filé está em torno de 30-38%, representando a cabeça, carcaça e vísceras 54% dos resíduos, pele 10%, escamas 1% e as aparas dorsais, ventrais e do corte em “V” do filé 5% (CINTRA, 2014; VIDOTTI, 2009).

Pesquisas apontam diversas maneiras de aproveitamento de resíduos de tilápia, diretamente relacionadas com a quantidade em que são gerados (VILLAMIL et al., 2017), incluindo vários co-produtos de alto valor econômico gerados a partir de resíduos sólidos, como a extração de óleo, minerais, colágeno, gelatina e enzimas, destacando a obtenção de hidrolisados proteicos (HERPANDI et al., 2011; PASUPULETI; BRAUN, 2010). Esses hidrolisados podem ser produzidos através de processo hidrolítico enzimático, químico, térmico ou autólise, com destaque para a hidrólise enzimática por ser a mais eficiente em relação à recuperação proteica e com melhor aplicabilidade (NGUYEN et al., 2011). Essas técnicas visam a recuperação dos nutrientes, desenvolvendo produtos com valor nutricional e propriedades funcionais adequadas que podem auxiliar na manutenção da saúde humana (HALIM et al., 2016).

3.4. Obtenção de hidrolisados proteicos de pescado

3.4.1. Enzimas proteolíticas

As enzimas são cada vez mais utilizadas na tecnologia de alimentos, assim como na indústria farmacêutica e têxtil, por serem um produto natural e biodegradável com alta especificidade, aumentando a velocidade dos processos e proporcionando uma diminuição da energia de ativação (MONTEIRO & SILVA, 2009; TAVANO, 2013). Principalmente são utilizadas as proteases, também denominadas de peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas, enzimas de estrutura específica capazes de clivar proteínas e seus fragmentos (BARRETT et al., 2001), sendo oriundas de organismos vegetais, animais e de microrganismos (fungos e bactérias). Entre as proteases disponíveis comercialmente, estão a papaína, a neutrase, a pepsina, a tripsina, a quimiotripsina, a pancreatina, a alcalase, a bromelina, a pronase, a crotina F, a protease N, a protease A e a flavourzyme (CHALAMAIAH et al., 2012; GALLA et al., 2012). As proteases são classificadas, de acordo com seu mecanismo de hidrólise ou com base no seu sítio catalítico, em enzimas endoproteases, geralmente muito específicas, responsáveis por clivar as ligações no interior das proteínas, produzindo pequenos peptídeos e poucos aminoácidos livres (BENÍTEZ et al., 2008); e enzimas exoproteases, que hidrolisam as ligações peptídicas terminais, resultando em grandes frações peptídicas e aminoácidos livres, sendo divididas em aminopeptidases e carbonopeptidases dependendo dos sítios de remoção dos aminoácidos, se regiões de nitrogênio terminal ou de carbono terminal (COELHO et al., 2008; SANROMÁN, 2017). Para a obtenção do hidrolisado proteico de grau alimentício, as enzimas mais aplicadas são as endoproteases, em sua maioria de origem microbiana, tendo como vantagem na sua produção a diversidade genética, o fácil

manuseio e o curto tempo de produção. Eventualmente, para um processo mais pleno, são feitas combinações de endo com exoproteases (KRISTINSSON; RASCO, 2000; NILSANG et al., 2005).

A grande variedade de proteases, assim como a sua elevada especificidade e capacidade para atuar a baixas concentrações ou sob condições brandas de temperatura e pH, tornam mais atraente o seu uso em processos proteolíticos, resultando em produtos de melhor qualidade (SHARIDI et al., 2001). No presente estudo foram utilizadas as enzimas comerciais Protamax NP 800, uma endoprotease neutra com alta especificidade e capacidade para diminuir a viscosidade em géis de proteínas, produzida por cepas não geneticamente modificadas de *Bacillus amyloliquefaciens*; e a Brauzyn 100, à base da endoprotease vegetal papaína extraída do látex do mamão papaia, ativa a diferentes valores de pH e graus de temperatura, com alta solubilidade em água e alta eficiência de hidrólise de diferentes fontes de proteína, tais como caseína, hemoglobina, gelatina, proteína de soja e proteína de pescado.

A literatura relata a caracterização de diversas enzimas endógenas em resíduos de pescado, sendo identificadas proteases tais como pepsina, tripsina, quimiotripsina, elastase, calpaína e collagenase (KLOMKLAO et al., 2007; SHAHIDI & KAMIL, 2001). Na tilápia, enzimas como tripsina, quimiotripsina, leucina amilopeptidase e protease alcalina foram isoladas das vísceras e demonstraram ter elevada atividade proteolítica, representando, portanto, uma fonte promissora de proteases para a biotecnologia (BEZERRA et al., 2005; MICHAIL et al., 2006; SILVA et al., 2014).

3.4.2. Processo hidrolítico enzimático e grau de hidrólise

Os hidrolisados podem ser obtidos por diferentes metodologias, desde extração por solvente, hidrólise enzimática (*in vivo* ou *in vitro*) e fermentação microbiana, entretanto, o enzimático é o mais utilizado pela indústria tanto de alimentos como farmacêutica por não deixar resíduos de solventes orgânicos ou de produtos químicos nos produtos (KITTS & WEILER, 2003). Ademais, o método enzimático possui elevada especificidade com o tipo de substrato, bom controle do grau de hidrólise e da ação da atividade enzimática (FURLAN & OETTERER, 2002; ZAVARESE, et al., 2009), assim como notório desempenho em baixas concentrações, dispensando a sua remoção ao final do processo, além de proporcionar a liberação de peptídeos biologicamente ativos (TAVANO, 2013). Entretanto, os processos químicos, sejam sob condições ácidas ou alcalinas, possuem limitações quanto ao seu uso na indústria alimentícia, por serem mais lentos e de difícil controle, além da necessidade do uso de neutralizantes para a inativação hidrolítica. Além disso, é possível que durante o processo químico ocorra a destruição de aminoácidos essenciais como tripsina, metionina, cistina e cisteína, comprometendo a qualidade nutricional do produto e diminuindo a funcionalidade do mesmo (KRISTINSSON & RASCO, 2000; TAVANO, 2013).

A hidrólise enzimática acelera o processo de clivagem das proteínas, resultando na liberação de aminoácidos livres e peptídeos de diferentes tamanhos e consumindo uma molécula de água para cada ligação quebrada (FURLAN & OETTERER, 2002; OETTERER, 2006; RUTHERFURD & GILANI, 2009). Para que este processo ocorra em condições ideais, alguns parâmetros devem ser controlados, tais como o pH, temperatura, proporção enzima-substrato e o tempo de reação, variando conforme a especificidade da enzima catalizadora escolhida (FURLAN & OETTERER, 2002; KRISTINSSON & RASCO, 2000; SANTOS et al., 2009). Em particular, a temperatura e o pH podem afetar consideravelmente o perfil de peptídeos do produto final, devido a influência que exercem na cinética de reação (PAIVA et al., 2015; SILVA et al., 2014). A otimização destas condições é, portanto, primordial para o desenvolvimento de produtos economicamente viáveis, padronizados e que

mantenham a qualidade nutricional com perfil peptídico determinado, reprodutível e com propriedades funcionais desejáveis para aplicação industrial (HE et al., 2013; SILVA et al., 2014).

A hidrólise das proteínas deve aumentar a biodisponibilidade de nutrientes, tornando o produto elaborado de maior interesse econômico (NILSANG et al., 2005). A finalização do processo hidrolítico pode ser por alteração de pH, acidificação do meio ou por inativação térmica. Algumas pesquisas também recomendam a aplicação de um pré-tratamento térmico visando a inativação das enzimas endógenas próprias dos resíduos, porém esta prática pode desnaturar as proteínas, comprometendo a atividade das enzimas adicionadas (GUERARD et al., 2001; NGUYEN et al., 2011).

O grau de hidrólise é definido como o número de aminoácidos livres formados durante a clivagem das ligações peptídicas em relação ao número total de aminoácidos existentes na amostra, ou seja, a porcentagem de ligações peptídicas das proteínas quebradas ao longo do processo em relação ao total de ligações (BENITEZ et al., 2008), sendo o parâmetro bioquímico mais relevante da proteólise, o qual mensura a extensão da clivagem proteica, sendo relacionado com a qualidade do hidrolisado, pois altera as propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais (BENITEZ et al., 2008; NGUYEN et al., 2011).

De acordo com o grau de hidrólise, os hidrolisados são selecionados para a sua aplicação em diferentes segmentos da indústria alimentícia. Níveis baixos de grau de hidrólise (1-10%) são indicados para melhoramento das propriedades funcionais, hidrolisados com diferentes níveis percentuais são recomendados para uso como aromatizantes, enquanto que graus de hidrólise superiores a 10% são usados para dietas enterais e alimentos infantis (BENITEZ et al., 2008; PAIVA et al., 2015). Os métodos para determinar o grau de hidrólise baseiam-se na verificação do nitrogênio solúvel, com o uso do TCA (ácido tricloroacético) com consequente precipitação da proteína, ou na determinação dos aminoácidos ou de prótons livres após clivagem das ligações peptídicas de acordo com o pH (SILVA et al., 2014).

3.5. Aplicações industriais dos hidrolisados

Em 1940, pioneiramente, o uso de hidrolisado proteico foi indicado para pacientes que necessitavam de dietas especiais (PACHECO et al., 2005). Desde então, os hidrolisados tem sido estudados e difundidos por serem ricos em peptídeos de baixo peso molecular, apresentarem baixa osmolaridade e excelente absorção gastrointestinal, sendo indicados na alimentação de indivíduos que não tem a capacidade de digerir a proteína dos alimentos (NEVES et al., 2004).

Os hidrolisados proteicos tem sido amplamente utilizados como fonte de aminoácidos e de pequenos peptídeos em diversos setores industriais, como na elaboração de cosméticos (HOU et al., 2011; PAIVA et al., 2015; SARMADI & ISMAIL, 2010; SILVA et al., 2014), produtos farmacêuticos, nutragênicos e alimentares (GUERARD et al., 2010; KRISTINSSON & RASCO, 2000; VILLAMIL et al., 2017), ou como fonte suplementar de nitrogênio para o crescimento de microrganismos (DERAZ, et al., 2011; DUFOSSÉ et al., 2001; FALLAH et al., 2015; GUERARD et al., 2001; PASUPULETI & BRAUN, 2010; VIEIRA, et al., 2005; VILLAMIL et al., 2017). Não obstante, a aplicabilidade desses hidrolisados depende do peso molecular dos peptídeos, sendo os menores de 5 kDa sinalizados para formulações hipoalergênicas, enquanto que os de tamanho entre 5 e 20 kDa são indicados para suplementação na dieta de adultos e na alimentação para fins especiais, sendo considerados excelentes fontes de nitrogênio (NEVES et al., 2004).

A produção de hidrolisados proteicos é considerada também uma das formas mais promissoras e sustentáveis para o aproveitamento dos resíduos de pescado (CHALAMAIAH et al., 2012; FALLAH et al., 2015; SILVA et al., 2014; ROSLAN et al., 2014; ROSLAN et al., 2015; ROSLAN et al., 2017). Estes hidrolisados são conhecidos mundialmente pela sigla FPH (Fish Protein Hydrolysated), termo proposto pela FAO (FURLAN & OETTERER, 2002). Os mais estudados são os oriundos das proteínas musculares do pescado (FALLAH et al., 2015; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008; SANTOS et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2011; YARNPAKDEE et al., 2012; SHAMLOO et al., 2012), principalmente de espécies de baixo valor comercial por serem inadequadas para a filetagem, por possuir elevada sensibilidade à hidrólise e composição de aminoácidos balanceada, com destaque para a metionina e cisteína (BÁRZANA & GARIBAY-GARCÍA; 1994; NEVES et al., 2004).

Os resíduos de pescado, além de se constituírem em excelente matéria prima para hidrolisados proteicos, são também fonte de enzimas digestivas com potencial biotecnológico (GILDBERG et al., 2010; KLOMKLAO et al., 2007). De fato, SILVA et al. (2014) demonstraram que uma solução enzimática preparada a partir de vísceras de tilápia do Nilo, contendo tripsina, quimiotripsina e leucina aminopeptidase, entre outras, apresenta alta atividade proteolítica. Entretanto, a literatura reporta a presença de enzimas seropeno-endoproteases no baço do barrilete (*Katsuwonus pelamis*), destacando a tripsina e a quimiotripsina, capazes de clivar diferentes ligações peptídicas (KLOMKLAO et al., 2007).

A hidrólise proteica pode agregar valor a um material proteico destinado ao descarte, ou de baixo interesse comercial, ampliando a sua funcionalidade e utilização através de modificações das propriedades biológicas, físicas e químicas das proteínas (ARRUDA et al., 2009; CHALAMAIAH et al., 2012; GUERARD et al., 2010; NGUYEN et al., 2011; PAIVA, et al., 2015; SANTOS et al., 2009; SHIRAHIGUE et al., 2016).

Os hidrolisados proteicos de pescado tem sido alvo de interesse, devido à alta quantidade de subprodutos disponíveis e seu elevado teor proteico, com presença de aminoácidos e peptídeos bioativos (CHALAMAIAH et al., 2012; FOH et al., 2010; KHALED et al., 2014; NGO et al., 2010; NGUYEN et al., 2011; KITTIPIHATTANABAWON et al., 2012; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2009; ROSLAN et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2011; SHAMLOO et al., 2012; TAHERI et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Desta forma, pesquisas foram desenvolvidas utilizando diversas espécies de pescado, tais como atum (*Thunnus albacares*) (NGUYEN et al., 2011), cabrinha (*Prionotus punctatus*) (SANTOS et al., 2009; ZAVAREZE et al., 2009), carpa prata (FALLAH et al., 2015), corvina (*Micropogonias furnieri*) (CENTENATO et al., 2009; MARTIN-SANCHEZ et al., 2009; SANTOS et al., 2009), minced de pescado marinho: Maria Luíza (*Paralichthys brasiliensis*), Perna-de-Moça (*Cynoscion sp.*) e Camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus pauliensis*) (NEVES et al., 2004), arenque (*Clupea harengus*) (SATHIVEL, et al., 2003), salmão vermelho (*Oncorhynchus nerka*) (SATHIVEL et al., 2005), salmão do Atlântico (*Salmo solar*) (GBOGOURI et al., 2004), pirarucu (*Arapaima gigas*) (PAIVA et al., 2015), bonito-listrado (*Katsuwonus pelamis*) (LIU et al., 2015) e tilápia (ROSLAN et al., 2014; ROSLAN et al., 2015; ROSLAN et al., 2017; SILVA et al., 2014; VEIT et al., 2013), tornando-se uma alternativa interessante para as indústrias alimentícias como fontes de peptídeos e aminoácidos livres.

3.5.1. Hidrolisados proteicos como fonte de compostos bioativos

Uma substância bioativa é definida segundo a ANVISA como sendo uma substância com função de nutrir ou não advinda de um alimento que possua capacidade metabólica ou fisiológica específica, de origem sintética ou

natural, comprovadamente segura para o consumo humano, sem necessidade de orientação e/ou acompanhamento médico, exceto para grupos populacionais específicos (BRASIL, 2002). Diversos hidrolisados tanto de origem vegetal como animal possuem atividade antioxidante, sendo estes “antioxidantes naturais” os mais atrativos para o mercado consumidor. Neste contexto, a indústria de alimentos tem buscado fontes alternativas e promissoras de ingredientes naturais que exerçam a função antioxidante (FARVIN et al., 2014; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008).

Os compostos bioativos obtidos a partir de resíduos de pescado representam um novo segmento de co-produtos com maior rentabilidade quando comparados aos tradicionais. Os compostos de pescado destacam-se por apresentar capacidade bioativa reconhecida por suas propriedades promotoras de saúde e aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (KHALED et al., 2014; NAJAFIAN & BABJI, 2014). Os hidrolisados proteicos, especialmente as cadeias peptídicas de 2 a 20 aminoácidos, demonstraram efeito benéfico sobre a regulação metabólica e modulação do organismo, melhorando a saúde e prevenindo doenças crônico-degenerativas devido a sua atividade antioxidante, anti-hipertensiva, imunomoduladora e anticoagulante (FARVIN et al., 2014; GALLA et al., 2012; HARTMANN; MEISEL, 2007; KITTS & WEILER, 2003; TAHERI et al., 2014; THIANASILAKUL et al., 2007). Os peptídeos bioativos também promovem propriedades funcionais não nutricionais nos alimentos, tais como solubilidade, retenção de água, retenção de óleo e capacidade emulsificante (FOH et al., 2010; HE et al., 2013; KHALED et al., 2014), porém ainda não foram demonstradas possíveis interferências sensoriais ou alterações na sua atividade devido a variações de temperatura e pH durante o preparo do alimento (MONTEIRO et al., 2016; PAIVA et al., 2015; TAHERI et al., 2014).

3.5.2. Hidrolisados proteicos como fonte de compostos antioxidantes

Os antioxidantes compreendem um conjunto de substâncias naturais ou sintéticas com capacidade de inibir os efeitos nocivos dos radicais livres, sendo utilizados como ingredientes em alimentos, fármacos ou suplementos nutricionais e comprovadamente seguros para consumo humano (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Entre os antioxidantes sintéticos, destacam o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), enquanto que o ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno são os antioxidantes naturais mais utilizados. Diversos peptídeos gerados através da hidrólise proteica de resíduos de pescado também demonstraram propriedades antioxidantes, incluindo espécies como o arenque (*Clupea harengus*) (SATHIVEL et al., 2003; TAHERI et al., 2014), o bacalhau (*Gadus morhua*) (FARVIN et al., 2014), o atum (*Katsuwonus pelamis*) (JE et al., 2009), o beijupirá (*Rachycentron canadum*) (FONSECA et al., 2016), a cavalinha (*Scomber austriasicus*) (WU et al., 2003), a castanha (*Umbrina canosai*) (PEZOA & SALAS-MELLADO, 1979), a cabrinha (*Prionotus punctatus*) (DOS SANTOS et al., 2011), a corvina (*Micropogonias furnieri*) (CENTENARO et al., 2009; PEZOA & SALAS-MELLADO, 1979), o bacalhau da Noruega (*Pollachius virens*) (CHABEAUD et al., 2008), o peixe-espada preto (*Aphanopus carbo*) (*Parastromateus niger*) (BATISTA et al., 2010), (*Parastromateus niger*) (NAZEER & KUMAR, 2011), a sardinha (*Sardinella aurita*) (BOUGATEF et al., 2010; KHALED et al., 2014), o tubarão galha preta (*Carcharhinus limbatus*) (KITTIPIHATTANABAWON et al., 2012) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FOH, et al., 2010; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2009; ROSLAN et al., 2017; ZHANG et al., 2012).

A atividade antioxidante dos hidrolisados está relacionada ao tamanho dos peptídeos bioativos produzidos, sendo os de tamanho entre 2 a 20 aminoácidos e peso molecular de 6 kDa os mais ativos (RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008; YOU et al., 2010). O processo de degradação enzimática favorece a produção destes

fragmentos específicos, aumentando a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, as suas propriedades funcionais (CHALAMAIA et al., 2012; ROSLAN et al., 2017; TAHERI et al., 2014). Os aminoácidos livres encontrados nos hidrolisados proteicos podem influenciar direta ou indiretamente no valor nutricional do alimento, bem como nas propriedades funcionais (DOS SANTOS et al., 2011; TAHERI et al., 2014). O sequestro de radicais livres por meio da doação de prótons é devido a presença de aminoácidos aromáticos como histidina, leucina, tirosina, metionina e cisteína nos hidrolisados, enquanto que aminoácidos hidrofóbicos como prolina e hidroxiprolina atuam na inibição da peroxidação lipídica (MENDIS et al., 2015).

A produção desses peptídeos bioativos pode ser afetada por diversos fatores, como a estrutura primária da proteína que será clivada, a especificidade da enzima, o método proteolítico eleito, a temperatura e o pH durante o processo, assim como o tempo de hidrólise (CHALAMAIA et al., 2012; SAMARANAYAKA & LI-CHAN, 2011). Enzimas proteolíticas como a papaína e a neutrase demonstraram um bom desempenho para a produção de peptídeos com atividade antioxidante (CHALAMAIA et al., 2012; NAZEER et al., 2011; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008). Peptídeos com elevada funcionalidade antioxidante também foram obtidos a partir de hidrolisados de tilápia do Nilo com as enzimas alcalase, flavourzyme e neutrase (FOH et al., 2012).

3.5.3. Hidrolisados proteicos como fonte de nitrogênio para crescimento microbiano

As peptonas são hidrolisados proteicos solúveis em água, não precipitáveis por calor ou por saturação com sulfatos de amônio (DUFOSSÉ, et al., 2001). Em sua forma pura, apresentam-se como um pó de coloração branca a levemente amarelada (JAYATHILAKAN et al., 2012). As peptonas são utilizadas como fonte de nitrogênio em meios de cultivo de células, tanto em escala laboratorial como industrial, sendo esta uma de suas principais aplicações no campo da biotecnologia (PASUPULETI & BRAUN, 2010).

As peptonas podem ser produzidas a partir de matérias primas tanto vegetais (soja e sementes de algodão) como animais (caseína, carne e gelatina), sendo a sua eficiência relacionada ao tipo de proteína e o processo hidrolítico empregado (RENHORAN et al., 2011). Em particular, destaca a eficiência para o crescimento microbiano das peptonas produzidas a base de pescado, devido a maior concentração de compostos nitrogenados solúveis quando comparadas às peptonas comerciais (DERAZ et al., 2011; DUFOSSÉ, et al., 2001; GILDBERG et al., 2010; SAFARI et al., 2012; FALLAH et al., 2015).

Peptonas foram produzidas a partir de estômago e cabeça de atum (*Thunnus albacares*) (GUERARD et al., 2001; SAFARI et al., 2012), de vísceras e estômago de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (ASPMO et al., 2005a; GILDBERG et al., 2010), de vísceras de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (DERAZ et al., 2011), de sardinha (*Sardina pilchardus*) e cavala (*Rastrelliger kanagurta*) (HUSIN et al., 2015), assim como de resíduos de cefalópode (*Sepia officinalis*) (SOUISSI et al., 2009), de peixe faixa amarela (*Selariodes leptolepis*) (KLOMPONG et al., 2012), de camarão (*Macrobrachium amazonicum*), lagosta (*Panulirus argus* e *Panulirus laeviscauda*) e filé de pescada amazônica (*Plagioscion squamosissimus*) (VIEIRA, et al. 2005). Sendo o nitrogênio elemento essencial para estimular o crescimento e multiplicação microbiana, o aproveitamento do material residual de pescado para a elaboração de peptonas mostra-se vantajoso considerando que o nitrogênio é o componente mais oneroso desses substratos (DUFOSSÉ, et al., 2001; HERPANDI et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Processamento e caracterização dos resíduos sólidos

4.1.1. Processamento dos resíduos sólidos

Foram utilizados como matéria prima os resíduos sólidos oriundos do processamento de tilápia vermelha *Oreochromis niloticus* var. na unidade de cultivo e beneficiamento de pescado Piscicultura Cristalina, localizada na cidade de Fartura/SP. Após a filetagem, os resíduos sólidos de tilápia foram coletados, embalados em sacos plásticos de polietileno e transportados sob refrigeração até o Laboratório de Qualidade e Inovação Tecnológica de Pescado, localizado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP em Piracicaba/SP. Os resíduos sólidos compostos por espinhaço com músculo aderido, nadadeira, cabeça, escama, espinhas e vísceras (Figura 1A), foram triturados em moedor/picador CAF 98 BT parcial inox (CAF Máquinas, Rio Claro/SP, Brasil). Os resíduos homogeneizados (Figura 1B) foram posteriormente embalados à vácuo (SELOVAC, modelo 300 B, São Paulo/SP, Brasil) em porções de aproximadamente 300 g, sendo identificadas e armazenadas à -20°C.

Figura 1. Resíduos sólidos de tilápia vermelha, filetada, com vísceras (A) e resíduos triturados (B).

4.1.2. Determinação da composição centesimal

A composição centesimal foi analisada em triplicata e calculado em base úmida de resíduos sólidos. A umidade foi determinada por método gravimétrico, secando a amostra em estufa a 105°C até atingir peso constante (PREGNOLATO & PREGNOLATO, 1985). O conteúdo de cinza foi determinado pelo método gravimétrico da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1997), através da incineração da amostra em mufla a 550-600°C. A proteína bruta foi quantificada através do método de microKjeldahl (AOAC, 1997), por determinação do teor de nitrogênio total e conversão em proteína, multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25. O conteúdo de lipídeos totais foi obtido pelo método de HARA & RADIN (1978), por extração à frio utilizando, como solventes extratores, o hexano (Labsynth Ltda., Diadema/SP, Brasil) e o isopropanol (J. K. Backer, Austin, Texas, USA).

4.1.3. Análises microbiológicas

A qualidade microbiológica da matéria prima foi analisada conforme a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), por meio da pesquisa de coliformes a 45°C (coliformes de origem fecal e termotolerantes), *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva. Adicionalmente, foi quantificado o número total de bactérias aeróbias mesófilas. Foram homogeneizadas 25 g de amostras em 225 mL de peptona durante 1 min em *Stomacher* (ITR Instrumentos para Laboratórios Ltda., Esteio/RS, Brasil), sendo então diluídas decimalmente em peptona (contendo 10 g/L triptona (Neogen Corporation, Indaiatuba/SP, Brasil) e 5 g/L cloreto de sódio (Labsynth Ltda., Diadema/SP, Brasil)).

Para a quantificação de mesófilos, 0,1 mL de cada uma das diluições seriadas foram inoculados em triplicata no meio *Plate Count Agar* (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil), seguido de incubação durante 48 h a 37°C.

Os coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* foram determinados em placas Petrifilm *E. coli* / Coliform Count (3M, Sumaré/SP, Brasil), inoculando em triplicata 1 mL das diluições 1:10 e 1:100, seguido de incubação durante 24 h a 45°C., sendo que as colônias típicas de *E. coli* e de coliformes que desenvolveram-se neste meio apresentaram-se na coloração azul e vermelha respectivamente, associadas a bolhas de ar.

Alíquotas de 0,1 mL das diluições 1:10 e 1:100 foram inoculadas em triplicata em ágar *Desoxicolato-Lisina-Xilose* (XLD, Kasvi, São José dos Pinhais/PR, Brasil) para verificar a presença de colônias típicas de *Salmonella spp.* (cor vermelha com um ponto negro no centro) após 24 h a 37°C.

A presença de *Staphylococcus aureus* foi analisada em ágar *Baird-Parker* (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil) com gema de ovo e telurito (Laborclin Ltda., Pinhais/PR, Brasil), inoculando 0,1 mL das diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 em triplicata e quantificando as colônias típicas (negras, brilhantes, com um halo transparente) após 48 h a 37°C. Os *S. aureus* detectados passaram por teste confirmativo, utilizando as provas bioquímicas de catalase e coagulase. A produção de catalase foi determinada em cultivo incubado durante período 24 h a 37°C em *Brain-Heart Infusion* (BHI, Neogen Corporation, Indaiatuba/SP, Brasil), expostos a peróxido de hidrogênio 3% (F. Maia Indústria e Comércio Ltda., Mogi Das Cruzes/SP, Brasil) numa relação 1:1, observando a formação imediata de bolhas de ar. Para verificar a produção de coagulase, tubos contendo 0,1 mL dos mesmos cultivos e 0,3 mL de plasma de coelho com EDTA (Laborclin Ltda., Pinhais/PR, Brasil) foram incubados durante 4-6 h a 37°C, observando a formação de coágulo.

As cepas *E. coli* ATCC 13706, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 704 e *S. aureus* ATCC 6538 (CECT, Valencia, Espanha) foram utilizadas como controles positivos nas análises microbiológicas realizadas. Em todos os casos, os resultados foram expressos em UFC/g.

4.2. Otimização das condições de hidrólise proteica

4.2.1. Enzimas

No presente estudo, foram utilizados preparados à base das enzimas neutrase (Protemax NP 800) e papaína (Brauzyn 100), com atividades enzimáticas declaradas pelo fabricante de 800 NPPU/g e 100 TUP/mg, respectivamente (Prozyn Indústria e Comércio Ltda., São Paulo/SP, Brasil). Em todos os ensaios foram mantidas as

condições de temperatura e pH ótimas para cada enzima indicada pelo fabricante (60°C e pH 7 para neutrase; 70°C e pH 6 para papaína).

4.2.2. Planejamento Experimental

Objetivando avaliar a influência dos parâmetros concentração de substrato (resíduos sólidos homogeneizados), concentração de enzima e tempo no processo proteolítico, realizou-se um delineamento composto central rotacional, com três variáveis independentes, considerando como variável dependente o grau de hidrólise das proteínas (Tabela 1). Cada ensaio consistiu-se de quinze combinações de variáveis, com cinco réplicas no ponto central do domínio e três nos extremos, com repetição. Os valores mínimos e máximos das concentrações de enzima foram baseados nos limites recomendados pelo fabricante (Prozyn Indústria e Comércio Ltda., São Paulo/SP, Brasil) para neutrase (0,3-1,0 g/100 g proteína) e papaína (0,5-1,5 g/100 g proteína).

Tabela 1. Valores naturais e codificados das variáveis independentes usadas no delineamento composto central rotacional de terceira ordem (substrato, enzima e tempo)

Valores codificados			Valores naturais			
Substrato	Enzima	Tempo	Substrato (g/100 mL água)	Neutrase* (g/100 g proteína)	Papaína* (g/100 g proteína)	Tempo (min)
-1	-1	-1	15,0	0,166	0,277	60
1	-1	-1	50,0	0,555	0,925	60
-1	1	-1	15,0	0,555	0,832	60
1	1	-1	50,0	1,849	2,774	60
-1	-1	1	15,0	0,166	0,277	230
1	-1	1	50,0	0,555	0,925	230
-1	1	1	15,0	0,555	0,832	230
1	1	1	50,0	1,849	2,774	230
-1,68	0	0	3,1	0,075	0,115	145
1,68	0	0	61,9	1,488	2,289	145
0	-1,68	0	32,5	0,075	0,192	145
0	1,68	0	32,5	1,488	2,212	145
0	0	-1,68	32,5	0,781	1,202	2,2
0	0	1,68	32,5	0,781	1,202	288
0	0	0	32,5	0,781	1,202	145

Com o intuito de minimizar os custos industriais, assim como verificar possíveis efeitos aditivos, sinérgicos ou antagonistas com as enzimas comerciais, as enzimas endógenas presentes nos resíduos não foram inativadas, sendo avaliada a sua capacidade hidrolítica sob as condições de temperatura e pH recomendadas para neutrase e papaína. Portanto, realizou-se um delineamento composto central rotacional, com duas variáveis independentes (concentração de substrato e tempo), considerando como variável dependente o grau de hidrólise das proteínas (Tabela 2). Cada ensaio foi constituído de nove combinações de variáveis, com cinco réplicas no ponto central do domínio e três nos extremos, com duas repetições.

Tabela 2. Valores naturais e codificados das variáveis independentes usadas no delineamento composto central rotacional de segunda ordem (substrato e tempo)

Valores codificados		Valores naturais	
Substrato (S)	Tempo (t)	Substrato (g S / 100 mL água)	Tempo (min)
-1	-1	15,0	60
1	-1	50,0	60
-1	1	15,0	230
1	1	50,0	230
-1,41	0	3,1	145
1,41	0	61,9	145
0	-1,41	32,5	2,2
0	1,41	32,5	288
0	0	32,5	145

4.2.3. Determinação do rendimento e do grau de hidrólise do processo proteolítico

Para a obtenção das peptonas, seguiu-se o fluxograma indicado na Figura 2. Primeiramente, os recipientes, erlenmeyers contendo as quantidades de substrato (resíduos sólidos homogeneizados) previamente calculadas (Tabela 1) foram completados com água destilada até 100 mL. Os erlenmeyers foram tampados e colocados em banho-maria (Banho Dubnoff, Nova Instruments, Piracicaba/SP, Brasil) com agitação de 200 rpm. Após alcançar a temperatura ideal de cada enzima, aferiu-se o pH das amostras em pHmetro TEC-3MP (TECNAL, Piracicaba/SP, Brasil) e, quando necessário, adicionou-se solução tampão NaOH 1M (Labsynth Ltd., Diadema/SP, Brasil) para alcançar o pH ótimo das enzimas. Uma vez ajustadas as condições de hidrólise, foram adicionadas as concentrações de enzima comercial indicadas na Tabela 1 às soluções amostrais. Para estudar o efeito das enzimas endógenas, não foram adicionadas enzimas comerciais, seguindo o planejamento da Tabela 2.

Figura 2. Fluxograma de obtenção dos hidrolisados proteicos.

Após cada um dos tempos de hidrólise estabelecidos, alíquotas de 6 mL foram retiradas para determinação do grau de hidrólise em cada ensaio. Neste caso, a reação enzimática foi inativada com 4 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema/SP, Brasil), seguido de repouso por 15 min. Após filtração em papel Whatman nº1 (Whatman International Ltd., Maidstone, Kent, England), o teor proteico dos hidrolisados foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951). As leituras de absorbância com comprimento de onda de 750 nm realizadas no espectrofotômetro Shimadzu UV mini 1240 (Shimadzu, Kioto, Japão) foram comparadas com a curva padrão de albumina bovina sérica (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil). O grau de hidrólise (GH) foi então calculado utilizando a quantidade de proteínas totais presentes na amostra determinada previamente (item 4.1.2) como segue:

$$\% GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em 6,25\% de TCA (mg)}}{\text{Proteína Total (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

O volume de hidrolisado restante foi tratado termicamente em estufa com circulação e renovação de ar TE-394/1 (TECNAL, Piracicaba/SP, Brasil) para a inativação enzimática, seguindo as recomendações do fabricante (80°C durante 5 min para neutrase; 90°C durante 30 min para papaína). Amostras sem adição de enzimas comerciais também foram tratadas termicamente sob as condições de inativação da neutrase e papaína. As amostras foram então resfriadas por imersão em água a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica Shimadzu AV220 (Shimadzu, Kioto, Japão). A seguir, as amostras foram fracionadas em centrífuga Hettich Universal 320R (Hettich, Votuporanga/SP, Brasil), nas condições de 10.000×g a 10°C durante 20 min propostas por Dumay et al. (2006). A fração aquosa de cada ensaio, contendo o hidrolisado proteico (peptona), foi transferida para frascos de vidro com

tampa rosqueada devidamente identificados para sua pesagem e posterior armazenamento sob temperatura controlada de -20°C. O rendimento foi calculado como segue:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso peptona (g)}}{\text{Peso hidrolisado sem fracionar (g)}} \times 100$$

4.2.4. Obtenção dos modelos preditivos e superfícies de resposta

Os resultados de grau de hidrólise e rendimento de cada enzima foram ajustados a modelos polinomiais de segunda e terceira ordem (para processos hidrolíticos sem e com adição de enzimas comerciais, respectivamente) no programa estatístico Protimiza Experimental Design, por meio do método de superfície de resposta (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Fatores com significância $p < 0.05$ foram descartados, sendo aceitos modelos preditivos com coeficiente de regressão $R^2 \geq 80.0$ na ANOVA. As figuras de superfície de resposta foram geradas no software TIBCO Statistica v. 10.0.

4.2.5. Obtenção dos hidrolisados proteicos de tilápia sob condições otimizadas

As condições ótimas de hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia homogeneizados para cada enzima foram selecionadas usando os modelos preditivos, validando na prática o grau de hidrólise e rendimento esperado. Os hidrolisados proteicos de tilápia obtidos com a neutrase (PHT-N) e a papaína (PHT-P) foram liofilizados a -50°C, sob 187 µHg e 208 Vca, no Lioptop L101 (Lioptop, São Carlos/SP, Brasil) por aproximadamente 96 h, sendo então macerados para obtenção de um pó homogêneo.

4.3. Quantificação e caracterização das proteínas no hidrolisado

A quantidade total de proteínas presentes no PHT-N e PHT-P foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e comparada com a das peptonas comerciais BD Bacto (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil), Himedia (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) e Kasvi (São José dos Pinhais/PR, Brasil). Concentrações de 33,3 g/L de PHT-N, 100 g/L de PHT-P e 50 g/L das peptonas comerciais foram preparadas em água destilada. A seguir, 20 µL de cada amostra foram transferidos para tubos *ependorf* contendo 1 mL de solução *Quick Start Bradford* (Bio-Rad Ltda., São Paulo/SP, Brasil). Após 5 min de incubação em repouso a temperatura ambiente, a absorbância à 595 nm das amostras foi quantificada no espectrofotômetro Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, São Paulo/SP, Brasil). A concentração de proteína de cada amostra foi determinada em relação à curva padrão de concentrações conhecidas de albumina bovina sérica (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) por regressão linear.

O peso molecular dos peptídeos presentes em cada amostra foi estimado através de SDS-PAGE (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio), seguindo método otimizado baseado em LAEMMLI (1970). Amostras com 10 µg de proteína (previamente desnaturada termicamente por fervura durante 5 min) foram diluídas em solução tampão SDS (constituído por tampão TRIS 500 mM pH 6,7; glicerol 20%; SDS 10%; azul de bromofenol 0,1%; e β-mercaptoetanol 10% (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil)) numa relação 1:1

antes de serem inoculadas nos poços do gel. A electroforese das amostras foi realizada em gel de poliacrilamida (Bio-Rad Ltda., São Paulo/SP, Brasil) com SDS (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) num sistema tampão descontínuo com 4% de gel de empacotamento e 16% de gel de corrida, durante 3 h a 20 mA. Em seguida, o gel foi fixado e tingido com nitrato de prata seguindo as indicações de BLUM et al. (1987), sendo digitalizado no GE Image Scanner III (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). O padrão BenchMark Protein Ladder (10-220 kDa, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, São Paulo/SP, Brasil) foi incluído nos géis como marcador de peso molecular.

4.4. Determinação da atividade antioxidante

4.4.1. Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico))

A atividade antioxidante total de PHT-N e PHT-P foi determinada pelo método ABTS (DE CAMARGO et al., 2012; RE et al., 1999), que avalia o sequestro do radical livre 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico). Para formar o radical livre, a solução de ABTS 7 mM (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) adicionada com persulfato de potássio 140 mM (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) foi incubada a temperatura ambiente durante 12-16 h em condições de ausência de luz. O radical foi então diluído em etanol P.A. (Êxodo Científica, Hortolândia/SP, Brasil) até alcançar absorvância à 734 nm de $0,700 \pm 0,020$. Por outro lado, cinco concentrações (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 15 mg/mL) de cada peptona, preparadas em triplicata em água destilada, foram centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 10 min a 10°C . Alíquotas de 20 μL do sobrenadante de cada concentração de amostra foram transferidas para tubos contendo 2 mL do radical ABTS, homogeneizando a mistura no vórtex e incubando durante 6 min. Também foi preparado um branco substituindo o volume de amostra por etanol P.A. As absorvâncias à 734 nm das amostras foram então quantificadas no espectrofotômetro Shimadzu UV mini 1240 (Shimadzu, Kioto, Japão) e comparadas com a curva padrão de Trolox (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil). A atividade antioxidante foi então determinada seguindo a equação:

$$\% \text{ Sequestro do radical ABTS} = \frac{\text{Absorvância branco} - \text{Absorvância amostra}}{\text{Absorvância branco}} \times 100 \quad (3)$$

4.4.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante total das concentrações de PHT-N e PHT-P previamente preparadas foi também determinada pelo método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995), que avalia o sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Alíquotas de 0,5 mL de cada concentração foram adicionadas a tubos com 0,3 mL do radical DPPH 0,5 mM (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) e 3 mL de etanol P.A. (Êxodo Científica, Hortolândia/SP, Brasil), sendo então homogeneizadas em vortex e incubadas por 45 min sob temperatura ambiente e ausência de luz. Foi preparado um branco substituindo o volume de amostra por etanol P.A. Posteriormente, a absorvância das amostras à 517nm foi quantificada no espectrofotômetro Shimadzu UV mini 1240 (Shimadzu, Kioto, Japão), e comparada com a curva padrão de Trolox (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil). A atividade antioxidante foi então determinada como segue:

$$\%DPPH\ reduzido = \frac{Abs.\text{branco} - Abs.\text{amostra}}{Abs.\text{branco}} \times 100 \quad (4)$$

4.5. Avaliação da eficiência dos hidrolisados proteicos para uso em bioprocessos

A eficiência das peptonas obtidas a partir de hidrolisados de tilápia vermelha para crescimento microbiano foi comparada com a das peptonas comerciais BD Bacto, Himedia e Kasvi.

4.5.1. Crescimento bacteriano

A eficiência das peptonas foi avaliada com as cepas *Escherichia coli* ATCC 13706, *Listeria monocytogenes* ATCC 15303 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (CECT, Valencia, Spain). As cepas bacterianas foram reativadas em meio BHI (Neogen Corporation, Indaiatuba/SP, Brasil) por 24 h a 37°C, a partir de culturas em estoque. Os cultivos foram então ajustados em espectrofotômetro à densidade óptica de $0,100 \pm 0,01$ a 700 nm com tampão fosfato salino (PBS, constituído de 7,6 g/L de cloreto de sódio; 0,2 g/L de cloreto de potássico; 0,71 g/L de fosfato dipotássico e 0,245 g/L de fosfato sódico (Labsynth, Diadema/SP, Brasil)). Este valor corresponde a, aproximadamente, 10^8 UFC/mL. Aliquotas de 100 µL das cepas ajustadas em PBS foram inoculadas, separadamente, em 100 mL de peptona 0,5% (p/v). O crescimento bacteriano nas peptonas foi monitorado através de leituras de densidade óptica a 700 nm em intervalos de 2 h por até 48 h. Foram incluídos também tubos com peptona sem inoculação microbiana como controle negativo. A viabilidade do inóculo foi comprovada a cada 8 h por plaqueamento em triplicata em meio *Plate Count Agar* (PCA, Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil) utilizando-se 0,1 mL das diluições decimais apropriadas, incubando-se durante 24 h a 37°C.

4.5.2. Crescimento de leveduras

A eficiência das peptonas foi avaliada utilizando-se a cepa *Saccharomyces cerevisiae* Catanduva 1 (LNF Latino Americana, Bento Gonçalves/RS, Brasil). A cepa foi reativada em meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD, contendo 10 g/L de extrato de levedura (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil), 20 g/L de peptona BD Bacto (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil) e 20 g/L de dextrose (Labsynth, Diadema/SP, Brasil) por 24 h a 30°C. Após o tempo de incubação, o YPD foi descartado por centrifugação a $735 \times g$ por 10 min a 6°C e as leveduras ressuspensas em solução salina 0,85% (Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório, Diadema/SP, Brasil). O número de células viáveis foi determinado em câmara de Neubauer espelhada por contagem direta do inóculo tingido com 0,025% azul de metileno (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) (LEE et al., 1981). Aliquotas de 100 µL da solução salina foram adicionadas em duplicata a um recipiente, erlenmeyer, com 50 mL de *Yeast Peptone Sacarose* (YPSAC, contendo 10 g/L de extrato de levedura (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil), 20 g/L da peptona sob estudo e 50 g/L de sacarose (Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório, Diadema/SP, Brasil) para obter 10^5 UFC/mL de carga inicial. Foram incluídos também recipientes, erlenmeyers, sem inoculação microbiana como controle negativo. Os erlenmeyers foram incubados durante 38 h a 30°C em agitação

(145 rpm), realizando leituras de absorbância a 600 nm dos cultivos a cada 2 h. A viabilidade e taxa de brotamento foi verificada em todos os tempos de leitura (CECCATO-ANTONINI, 2010).

O consumo dos açúcares redutores presentes no meio YPSAC também foi determinado antes do cultivo da levedura e após as 38 h de crescimento celular, através de método colorimétrico baseado no ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brazil) (SUMNER & SISLER, 1944; MILLER, 1959). A sacarose presente no YPSAC a tempo “zero” foi hidrolisada, adicionando 2,5 mL de amostra em 12,5 mL de solução HCl 1,3 N (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema/SP, Brasil), incubando-se a 60-65°C durante 30 min em “banho-maria” (Banho Dubnoff, Nova Instruments, Piracicaba/SP, Brasil). A hidrólise foi posteriormente neutralizada com solução NaOH 4N (Labsynth, Diadema/SP, Brasil) e as amostras diluídas 1:50 em água destilada. Alíquotas de 1 mL, tanto da amostra inicial diluída 50 vezes como da amostra coletada após 38 h, foram diluídas em 3 mL de água destilada. Volumes de 0,5 mL das amostras foram então adicionados a 0,5 mL do DNS, submetidos a fervura durante 5 min, na sequência resfriadas, e posteriormente foi realizada a leitura a 540 nm de absorbância. As concentrações foram calculadas com base na equação da reta gerada pela curva de calibração com 5 concentrações de glicose (Labsynth, Diadema/SP, Brasil) (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 g/L), levando em consideração as diluições realizadas.

4.5.3. Cinética e parâmetros de crescimento

Os resultados experimentais foram ajustados à equação de *Gompertz* (Dufossé et al., 2001; Zwietering et al., 1990) a seguir:

$$\ln\left(\frac{DO_t}{DO_0}\right) = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max}e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (5)$$

onde DO_t é a densidade óptica à 700 nm no tempo t (h), DO_0 a densidade óptica à 700 nm no tempo de inoculação, A o valor assintótico adimensional, μ_{max} a taxa de crescimento máximo (1/h), e λ o tempo de detecção de crescimento por aumento da DO à 700 nm.

$$\text{O tempo de geração (g) na fase exponencial foi calculado como segue: } g = \ln(2) \cdot \mu_{max} \quad (6)$$

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares Microsoft Excell 2013 e IBM-SPSS 15.0. Os ensaios foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes, sendo os resultados expressos como média $\pm$ intervalo de confiança. A significância estatística foi verificada por análise de variância unidirecional (ANOVA), sendo a homogeneidade das variâncias examinada pelo teste de Tukey. Também foram realizados testes *t-Student* para amostras independentes para comparar variáveis aos pares. Foram consideradas as diferenças significativas com nível de confiança superior a 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características dos resíduos sólidos de tilápia vermelha

5.1.1. Composição centesimal

Os teores de proteína, lipídeos e cinza dos homogeneizados analisados neste estudo, foram superiores aos obtidos por ROSLAN et al. (2014), em resíduos de tilápia vermelha sem vísceras. Os resíduos de tilápia vermelha também mostraram maior concentração de proteína e cinza em relação aos resíduos sólidos sem eviscerar de tilápia do Nilo (SHIRAHIGUE et al., 2016). Estas diferenças podem ser devido à constituição corpórea da tilápia linhagem vermelha, mais robusta que a tilápia do Nilo (HILSDORF, 2016). Assim, o elevado teor de cinza pode ser resultado do maior tamanho da cabeça, ossos (espinhas e coluna vertebral), escamas e nadadeiras (BATISTA, et al. 2010). Além disso, o teor de proteína bruta pode variar 16-25% entre indivíduos da mesma variedade de tilápia (FOH et al., 2010), dependendo da alimentação, sexo e época do ano da captura (MAI et al., 1980). Variações de 8-35% no teor de proteína foram também detectadas entre diferentes subprodutos de pescado (ROSLAN, et al. 2014). Esta elevada concentração de proteínas detectada nos resíduos sólidos de tilápia vermelha demonstra, portanto, o seu potencial para a produção de peptonas de uso em bioprocessos.

Tabela 3. Composição centesimal dos resíduos sólidos de tilápia vermelha, em g/100g de base úmida.

Parâmetro	Resíduos sólidos
Umidade	54,34 ± 0,31
Lipídeos	10,17 ± 0,65
Proteína	27,03 ± 2,94
Cinza	8,45 ± 0,72

Os valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

O teor de lipídeos dos resíduos sólidos de tilápia vermelha foi similar ao determinado em resíduos de tilápia do Nilo (SHIRAHIGUE et al., 2016). Os resíduos eviscerados de tilápia vermelha analisados por Roslan et al. (2014) apresentavam a metade de teor de lipídeos que os resíduos contendo vísceras analisados no presente estudo.

5.1.2. Qualidade microbiológica

A qualidade microbiológica do pescado, bem como de seus co-produtos, dependem principalmente das condições do ambiente em que foi capturado ou criado, dos procedimentos de manipulação aplicados desde a sua captura até o beneficiamento, assim como, das condições de armazenagem e distribuição do produto final (OETTERER, 2002). Como a legislação vigente não estabelece limites de tolerância microbiológica para resíduos oriundos de pescado, a qualidade microbiológica dos resíduos sólidos de tilápia vermelha foi comparada com os

limites estabelecidos para pescado e produtos de pesca (BRASIL, 2001; ICMSF, 1986). Os resíduos sólidos estão dentro dos limites de tolerância microbiológica para mesófilos, coliformes termotolerantes (coliformes crescendo a 45°C), *Escherichia coli*, estafilococos coagulase positivos e *Salmonella* spp (Tabela 4). Estes resultados satisfatórios demonstram que esta matéria prima, quando processada e armazenada, dentro das boas práticas de fabricação, mesmo com a presença de vísceras, está apta para ser utilizada na produção de co-produtos com maior valor agregado, levando em consideração que estes resíduos estão dentro dos padrões microbiológicos exigidos para produtos destinados ao consumo humano.

Tabela 4. Qualidade microbiológica (UFC/g) dos resíduos sólidos de tilápia vermelha

Microorganismos	Resíduos sólidos	Limites toleráveis*
Mesófilos	2270 ± 41,99	10 ⁷
Coliformes termotolerantes	557 ± 8,49	10 ³
<i>Escherichia coli</i>	20 ± 1,84	10 ³
Estafilococos coagulase positivos	Ausência	10 ³
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência	Ausência

*Limites estabelecidos pelo ICMSF (1986) para mesófilos, e pela ANVISA (Brasil, 2001) para os demais microorganismos.

5.2. Otimização das condições do processo proteolítico para obtenção de peptonas

5.2.1. Características do hidrolisado proteico

Três frações (sedimentar, aquosa e lipídica) foram obtidas após a centrifugação dos hidrolisados a base de resíduos sólidos de tilápia vermelha (Figura 3). A fração sedimentar apresentou-se de coloração marrom. A fração aquosa consistiu-se de em um líquido amarelado. Duas sub fases foram observadas na fração lipídica: uma superficial oleosa e a outra pastosa.

Figura 3. Hidrolisados de resíduos sólidos de tilápia vermelha preparados com as enzimas neutrase (A) e papaína (B).

5.2.2. Efeito das enzimas endógenas sobre o processo proteolítico

O efeito das enzimas endógenas dos resíduos sólidos de tilápia vermelha sobre o processo proteolítico foram determinados sob as condições de temperatura e pH recomendadas para neutrase e papaína. O processo autolítico apresentou elevado rendimento, alcançando mínimos de 52% e de 46% sob condições ótimas para a neutrase e a papaína respectivamente (Figura 4). Os resultados demonstraram que o rendimento diminui linearmente com o aumento das concentrações de substrato, e apenas aumenta com o aumento do tempo de incubação.

Figura 4. Efeito no rendimento da hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha da interação entre a concentração de substrato e tempo sob condições recomendadas para neutrase (A) e papaína (B).

O grau de hidrólise (GH) produzido pelas enzimas endógenas nos resíduos sólidos de tilápia vermelha (S) no intervalo de tempo (t) avaliados sob condições ótimas para neutrase (GH_{EN}) e papaína (GH_{EP}) foi adequadamente descrito pelos seguintes modelos preditivos:

$$\%GH_{EN} = 28,19 - 0,88S - 2,19S^2 + 1,08t - 1,39t^2 \quad (7)$$

$$\%GH_{EP} = 24,14 + 1,14S + 1,44t + 0,79t^2 + 0,75St \quad (8)$$

A análise de variância (ANOVA) dos dados de GH das enzimas endógenas verificou a significância ($p < 0,05$) e ajuste destes modelos (Tabela 5), como indicado pelo valor de F calculado (3-5 vezes maior do que o valor de F tabelado em ambos os casos) e pelo coeficiente de determinação R^2 (superior a 80% em ambos casos).

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para valores de grau de hidrólise das enzimas endógenas nos resíduos sólidos de tilápia vermelha sob as condições de temperatura e pH recomendadas para neutrase (EN) e papaína (EP)

Condição	Fonte de variação	Grau liberdade	Soma quadrados	Média quadrados	F calculado	R ²
EN	Regressão	4	57,3	14,3	14,1	0,87
	Resíduos	8	8,1	1		
	Total	12	65,4			
EP	Regressão	4	33,6	8,4	10,7	0,84
	Resíduos	8	6,3	0,8		
	Total	12	39,8			

F tabelado (4; 8; 5%) = 2,806.

O GH produzido pelas enzimas endógenas nos resíduos sólidos de tilápia vermelha foram afetados significativamente ($p < 0,05$) pela concentração de substrato e pelo tempo (Tabela 6). A relação do substrato com o GH produzido sob as condições ótimas para neutrase foi inversamente proporcional (o GH diminuiu com o aumento da concentração de substrato), porém uma relação diretamente proporcional foi observada sob as condições ótimas para papaína. Também foi detectado um aumento significativo ($p < 0,05$) no GH com o incremento do tempo de incubação sob ambas condições. Entretanto, o efeito da interação entre substrato e tempo no GH não foi significativo.

Tabela 6. Efeito da concentração de substrato (S) e tempo (t) e a sua interação no grau de hidrólise produzido pelas enzimas endógenas de resíduos sólidos de tilápia vermelha sob condições ótimas para neutrase (EN) e papaína (EP)

Variáveis	EN		EP	
	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>p</i>
S	-0,88	0,0393	1,14	0,0000
t	1,08	0,0164	1,44	0,0018
S × t	-0,53	0,3249	0,75	0,1298

Os dados submetidos à análise de superfície de resposta, apontaram que as enzimas endógenas tiveram um comportamento diferente sob as condições recomendadas para neutrase e papaína (Figura 5). Assim, as enzimas endógenas alcançaram o maior GH sob condições ótimas para neutrase quando as concentrações de substrato de 17-31 g/100 mL foram incubadas durante 180-252 min, enquanto que o GH gerado sob condições ótimas para papaína aumentou proporcionalmente com a concentração de substrato e tempo. SILVA et al. (2014) reportaram previamente que as enzimas proteolíticas presentes nas vísceras da tilápia do Nilo produzem GH elevado sobre os próprios resíduos sólidos desta espécie. Não obstante, NGUYEN et al. (2011) observaram que as enzimas da cabeça de atum amarelo tem atividade hidrolítica maior que as enzimas presentes nas vísceras e na cauda. Portanto, seria interessante identificar na tilápia onde estão presentes as enzimas endógenas que produzem maior GH para otimizar o processo hidrolítico dos resíduos sólidos.

Figura 5. Efeito no grau de hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha da interação entre a concentração de substrato e tempo sob condições recomendadas para neutrase (A) e papaína (B).

5.2.3. Rendimento e grau de hidrólise das enzimas neutrase e papaína

O rendimento do processo proteolítico foi elevado, alcançando mínimos de 51% e 41% com a adição das enzimas neutrase e papaína respectivamente (Figura 6). O rendimento aumentou com a diminuição da concentração de substrato, porém apenas foi afetado por variações no tempo de hidrólise. Entretanto, o aumento das concentrações de enzima só incrementou o rendimento sob baixas concentrações de substrato.

Figura 6. Efeito no rendimento da hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha das interações entre a concentração de neutrase e a concentração de substrato (A) ou tempo (B), e entre a concentração de papaína e a concentração de substrato (C) ou tempo (D).

O grau de hidrólise (GH) produzido pelas enzimas neutrase (N) e papaína (P) nos resíduos sólidos de tilápia vermelha (S) no intervalo de tempo (t) avaliado, foram adequadamente descritos pelos seguintes modelos preditivos:

$$\%GH_N = 33,24 - 4,29S + 1,51N + 0,20N^2 - 0,93t + 2,74St + 1,51Nt \quad (7)$$

$$\%GH_P = 36,48 - 4,74S + 3,71P - 2,32P^2 - 2,33t + 1,80St + 0,77Pt \quad (8)$$

A análise de variância (ANOVA) dos dados de GH obtidos para neutrase e papaína verificou a significância ($p < 0,05$) e ajuste destes modelos (Tabela 7), como indicado pelo valor de F calculado (3-5 vezes maior do que o valor de F tabelado em ambos os casos) e pelo coeficiente de determinação R^2 (superior a 80% em ambos os casos).

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para valores de grau de hidrólise nos resíduos sólidos de tilápia vermelha com as enzimas neutrase e papaína

Enzima	Fonte de variação	Grau liberdade	Soma quadrados	Média quadrados	F calculado	R ²
Neutrase	Regressão	6	418,0	69,7	9,5	0,82
	Resíduos	12	88,4	7,4		
	Total	18	506,4			
Papaína	Regressão	6	677,1	112,9	8,1	0,80
	Resíduos	12	167,7	14,0		
	Total	18	844,8			

F tabelado (6; 12; 5%) = 2,996.

O GH produzido pelas enzimas neutrase e papaína nos resíduos sólidos de tilápia vermelha foram afetados significativamente ($p < 0,05$) pela concentração de substrato (Tabela 8), sendo esta, uma relação inversamente proporcional (o GH diminui com o aumento de concentração de substrato). Estudos prévios também observaram este efeito negativo ocasionado pela concentração de substrato no GH durante a obtenção de outros hidrolisados proteicos a base de pescado (KRISTINSSON & RASCO, 2000; ROSLAN et al., 2015). Entretanto, a concentração de papaína teve um efeito significativamente ($p < 0,05$) positivo no GH dos resíduos sólidos de tilápia vermelha (o aumento das concentrações de enzima resultou no aumento do GH nos resíduos). Um efeito similar foi observado na enzima alcalase durante a hidrólise do estômago de atum albacora (*Thunnus albacares*) (GUÉRARD et al., 2001). Este efeito pode ser devido ao maior número de sítios alvo destas enzimas em resíduos proteicos de pescado em relação à neutrase, a qual só tem afinidade pelos sítios contendo os aminoácidos leucina e fenilalanina (HE et al., 2013; XU et al., 2011). Tanto o tempo como as interações entre as diferentes variáveis não apresentaram um efeito significativo no GH.

Tabela 8. Efeito da concentração de substrato (S), concentração de enzima (E) e tempo (t) e suas interações no grau de hidrólise de resíduos sólidos de tilápia vermelha utilizando as enzimas neutrase (PHT-N) e papaína (PHT-P)

Variáveis	PHT-N		PHT-P	
	Efeito	p	Efeito	p
S	-4,29	0,0003	-4,74	0,0009
E	1,51	0,0860	3,71	0,0048
t	-0,93	0,2704	-2,33	0,0498
S × E	0,38	0,7209	-0,01	0,9929
S × t	-0,40	0,7048	1,80	0,2180
E × t	1,51	0,1753	0,77	0,5898

Os dados submetidos às superfícies de resposta obtidas neste estudo, mostraram que o GH aumenta à medida que aumentam as concentrações de neutrase e diminuem as concentrações de substrato (Figura 7A). Em

relação ao tempo, o GH apenas aumentou com o incremento da concentração de neutrase a tempos de hidrólise curtos, obtendo valores de GH intermediários (42% aproximadamente) devido, provavelmente, à alta atividade proteolítica das enzimas endógenas (Figura 7B). Porém, o aumento da concentração de neutrase submetidos a tempos de hidrólise longos permitiu alcançar GH superiores quando comparados aos obtidos nos primeiros minutos do processo, demonstrando que as enzimas endógenas não tem tanta afinidade pelos sítios alvo contendo os aminoácidos leucina e fenilalanina quando comparadas à neutrase. Entretanto, o GH produzido pela papaína foi incrementado com a redução da concentração de substrato e o aumento da concentração de enzima (Figura 7C), porém o tempo de hidrólise apenas afetou o processo proteolítico (Figura 7D), possivelmente devido ao fato de estar atuando nos mesmos sítios alvo que as enzimas endógenas. AMIZA et al. (2011) também constataram interação entre a concentração de enzima (alcalase) e substrato (resíduos de peixe bagre prata *Pangasius* sp.), aumentando o GH quanto maior for a proporção enzima/substrato.

Em relação às enzimas endógenas do pescado e às enzimas comerciais utilizadas em processos hidrolíticos, a literatura reporta que as enzimas comerciais alcalase, flavourzyme e protamex produzem um rápido incremento do GH nos primeiros 30 min em filés de tilápia vermelha (SHAMLOO et al., 2012). FOH et al. (2010) observaram que a inativação térmica das enzimas endógenas aumenta o GH gerado pelas enzimas alcalase, neutrase e flavourzyme em subprodutos de tilápia do Nilo, porém aumentando o tempo necessário para alcançar o limite hidrolítico das enzimas alcalase e neutrase, mas diminuindo o da enzima flavourzyme. Não obstante, as enzimas endógenas presentes nos resíduos sólidos de tilápia vermelha e as enzimas comerciais neutrase e papaína aplicadas neste estudo parecem ter um efeito aditivo no processo proteolítico. ASPMO et al. (2005b) também observaram um incremento na hidrólise produzida por enzimas endógenas de vísceras de bacalhau com a adição de diferentes enzimas comerciais, especialmente alcalase e papaína.

Figura 7. Efeito no grau de hidrólise dos resíduos sólidos de tilápia vermelha das interações entre a concentração de neutrase e a concentração de substrato (A) ou tempo (B), e entre a concentração de papaína e a concentração de substrato (C) ou tempo (D).

5.2.4. Produção de peptonas sob condições otimizadas

Segundo os modelos preditivos, as condições ótimas para a obtenção de hidrolisados proteicos de tilápia, utilizando a enzima neutrase, ocorreram utilizando-se 22 g substrato/100 mL com 0,277 g enzima/100 g proteína durante 3 min, enquanto que para hidrolisados produzidos com a papaína ocorreram utilizando-se 18,5 g substrato/100 mL com 0,570 g enzima/100 g proteína durante 3 min. A reduzida influência do tempo no GH determinou a seleção de um tempo de hidrólise curto para assim aumentar a eficiência do processo. Após o processo proteolítico, foi determinado o rendimento e o GH alcançados nos hidrolisados (vide Figura 3) preparados sob condições otimizadas para verificar o ajuste dos modelos preditivos, não encontrando diferenças significativas entre os valores reais e os valores esperados. Assim, o processo proteolítico com a neutrase teve um rendimento de $80,95 \pm 3,12\%$ e um GH de $45,33\%$, enquanto que a hidrólise com a papaína alcançou um rendimento de $82 \pm 2,21\%$ e

um GH de 42,37%. Após a liofilização, os hidrolisados apresentaram aspecto de pó levemente amarelado com aroma suave de peixe (Figura 8).

Figura 8. Liofilizados contendo os hidrolisados proteicos à base de resíduos sólidos de tilápia vermelha produzidos com as enzimas neutrase (A) e papaína (B).

5.3. Características moleculares dos hidrolisado proteicos

A concentração de proteína foi significativamente ($p < 0,05$) superior nos hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha PHT-N ($9520 \pm 847 \mu\text{g/g}$ peptona) e PHT-P ($5033 \pm 469 \mu\text{g/g}$) que nas peptonas comerciais BD Bacto ($1148 \pm 97 \mu\text{g/g}$ peptona), Himedia ($1072 \pm 95 \mu\text{g/g}$ peptona) e Kasvi ($1276 \pm 214 \mu\text{g/g}$ peptona). Além disso, o processo proteolítico desses resíduos com as enzimas neutrase e papaína aumentou significativamente a quantidade de peptídeos de baixo peso molecular ($< 100 \text{ kDa}$) (Figura 9). A papaína mostrou maior capacidade hidrolítica que a neutrase para peptídeos com pesos compreendidos entre 60-220 kDa, como indicou a ausência de bandas nesse intervalo nos perfis SDS-PAGE de PHT-P. Entretanto, as peptonas comerciais apresentaram principalmente peptídeos de 50 kDa, porém o processo proteolítico desenvolvido no presente estudo com a neutrase e a papaína propiciou aumento considerável na sua quantidade. Também foram detectadas maiores quantidades de peptídeos de 5-20 kDa no PHT-N e no PHT-P que nas peptonas comerciais, os quais são utilizados como fonte suplementar de nitrogênio em bioprocessos e em suplementos alimentares (NEVES et al., 2004). Similarmente, enzimas como a alcalase, protamex e flavourzyme demonstraram alta eficiência para a obtenção de peptídeos de 5-20 kDa a partir de subprodutos de tilápia vermelha (ROSLAN et al., 2014; SHAMLOO et al., 2012).

Figura 9. Perfis SDS-PAGE dos resíduos sólidos de tilápia vermelha sem hidrolisar (2), da fração aquosa de PHT-N (3) e PHT-P (4), do liofilizado de PHT-N (5) e PHT-P (6), e das peptonas comerciais BD Bacto (7), Kasvi (8) e Himedia (9). O padrão BenchMark Protein Ladder (10-220 kDa, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, São Paulo/SP, Brasil) é apresentado na corrida 1.

5.4. Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos

A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos foi determinada seguindo os métodos de ABTS e DPPH. O PHT-P teve atividade antioxidante significativamente ($p < 0,05$) superior à do PHT-N em ambas metodologias, exceto no sequestro do radical ABTS a concentrações de 0,5 mg/mL de proteína, onde não foram encontradas diferenças significativas (Figura 10). Foi observada correlação positiva ($p < 0,01$) entre a atividade antioxidante e a concentração de proteína no PHT-N ($r = 0,969$ para ABTS; $r = 0,957$ para DPPH) e PHT-P ($r = 0,965$ para ABTS; $r = 0,979$ para DPPH). Estudos prévios também observaram forte dependência da capacidade de sequestro do radical DPPH com a concentração de proteína presente em hidrolisados de bacalhau (FARVIN et al., 2014), sardinha (KHALED et al., 2014) e gelatina da pele de tilápia (ZHANG et al., 2012). Além disso, ambos hidrolisados apresentaram capacidade de sequestro do radical ABTS significativamente ($p > 0,05$) superior à do DPPH, exceto para concentrações de 0,5 mg/mL de proteína no PHT-N que apresentaram atividade antioxidante similar. FOH et al. (2010) também detectaram que hidrolisados procedentes de subprodutos de tilápia do Nilo tinham maior capacidade de sequestro do ABTS (88-94%) que do DPPH (64-86%). Estas diferenças podem ser devido a interferência de diversos compostos (ácidos orgânicos, sais minerais, etc.) durante o sequestro do DPPH, o que limita a confiabilidade deste método (WU et al., 2015).

Figura 10. Atividade antioxidante do PHT-P e PHT-N em termos de sequestro do radical livre ABTS (A) e DPPH (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os hidrolisados para uma concentração determinada.

A atividade antioxidante dos hidrolisados de resíduos sólidos de tilápia vermelha podem ser devido ao alto GH alcançado durante o processo proteolítico, dando lugar a peptídeos de baixo peso molecular com propriedades bioativas, capazes de eliminar os radicais livres através da doação de hidrogênio (FOH, et al., 2010; RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008; WU et al., 2015). De fato, KITTIPHATTANABAWON et al. (2012) verificaram que os hidrolisados de pele de tubarão galha preta (*Carcharhinus limbatus*) com GH mais elevado (40%) possuíam maior capacidade de inibição de radicais livres que aqueles com menor GH (10%).

5.5. Eficiência das peptonas para bioprocessos com bactérias

A eficiência das peptonas PHT-N e PHT-P para o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foi determinada e comparada com a das peptonas comerciais BD Bacto, Himedia e Kasvi. A formação de biomassa das espécies bacterianas nas peptonas analisadas foi altamente variável (Figura 11). O PHT-P apresentou a mais alta eficiência para o crescimento das três espécies bacterianas analisadas em termos de assíntota (isto é, o limite de crescimento esperado) (Tabela 9). No caso de *E. coli*, a eficiência da Kasvi foi similar a do PHT-P, porém significativamente ($p < 0,05$) menor para as outras bactérias. Entretanto, o PHT-N demonstrou eficiência intermediária, sendo significativamente ($p < 0,05$) maior que a da Himedia para o crescimento de *L. monocytogenes*, e da BD Bacto para *E. coli* e *S. aureus*. Em relação ao tempo de latência, todas as bactérias cresceram imediatamente nas peptonas comerciais Kasvi e Himedia. Também se observou ausência de fase de latência em cultivos de *E. coli* e *S. aureus* crescidos em PHT-N, porém *L. monocytogenes* necessitou de um tempo de latência considerável (2,75 h). Entretanto, *E. coli* apresentou um tempo de latência similar em BD Bacto e PHT-P, porém *L. monocytogenes* começou a crescer significativamente ($p < 0,05$) antes em PHT-P, assim como *S. aureus* em BD Bacto.

Entretanto, a taxa de crescimento máxima das bactérias foi significativamente ($p < 0,05$) superior nestas peptonas, que apresentaram maior período de latência e menor tempo de geração ($p < 0,05$), explicando deste modo a alta eficiência alcançada pelo PHT-P em todos os casos.

Figura 11. Cinéticas de crescimento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* com as peptonas BD Bacto (A, B, C, respectivamente), Himedia (D, E, F), Kasvi (G, H, I), PHT-N (J, K, L) e PHT-P (M, N, O). Valores experimentais são representados por símbolos, enquanto os valores esperados são mostrados como linhas sólidas, segundo a equação de *Gompertz* (vide item 4.5.3.).

Tabela 9. Tempo de latência (λ), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$), tempo de geração (g) e assíntota (A) das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* crescidas em peptonas comerciais (BD Bacto, Kasvi e Himedia) e hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha (PHT-N e PHT-P)

Bactéria	Parâmetro	BD Bacto	Kasvi	Himedia	PHT-N	PHT-P
<i>Escherichia coli</i>	λ (h)	0,69 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,69 ^a
	$\mu_{\max}$ (1/h)	0,68 ^a	0,33 ^c	0,20 ^d	0,32 ^c	0,47 ^b
	g (h)	1,02 ^c	2,09 ^c	3,39 ^a	2,20 ^b	1,47 ^d
	A	2,11 ^d	3,51 ^a	2,96 ^b	2,80 ^c	3,52 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	λ (h)	3,47 ^a	0,00 ^d	0,00 ^d	2,75 ^c	2,99 ^b
	$\mu_{\max}$ (1/h)	0,45 ^c	0,34 ^d	0,15 ^e	0,98 ^a	0,52 ^b
	g (h)	1,53 ^c	2,04 ^b	4,72 ^a	0,71 ^e	1,35 ^d
	A	2,45 ^c	2,65 ^b	1,85 ^e	2,18 ^d	3,40 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	λ (h)	0,85 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	1,53 ^a
	$\mu_{\max}$ (1/h)	0,84 ^a	0,17 ^d	0,16 ^d	0,24 ^c	0,39 ^b
	g (h)	0,82 ^c	4,05 ^b	4,28 ^a	2,86 ^c	1,36 ^d
	A	2,38 ^d	3,46 ^b	2,51 ^c	2,50 ^c	3,58 ^a

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as peptonas para os valores de um parâmetro cinético determinado obtidos para cada bactéria.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram, portanto, que os hidrolisados proteicos preparados a partir de resíduos sólidos de tilápia vermelha podem ser uma alternativa eficiente às peptonas comerciais. Estes resultados estão em concordância com estudos prévios realizados com peptonas oriundas de hidrolisados de resíduos de pescado, os quais também alcançaram excelente desempenho como fonte de nitrogênio para crescimento bacteriano (DUFOSSÉ et al., 2001; DERAZ et al., 2011), inclusive maior que outras fontes de nitrogênio já comercializadas (ASPMO et al., 2005a; FALLAH et al., 2015; GILDBERG et al., 2010; SAFARI et al., 2012; VIEIRA et al., 2005). Contudo, a enzima utilizada durante o processo proteolítico parece ser um fator limitante, independentemente do GH produzido. Assim, o PHT-P foi significativamente ($p < 0,05$) mais eficiente que o PHT-N, apesar de ambas terem GH semelhante sob as condições otimizadas. FALLAH et al. (2015) também observaram que peptonas obtidas de subprodutos de carpa prateada com alcalase tiveram um melhor desempenho no crescimento de *S. aureus* que aquelas produzidas com tripsina, ainda que ambas enzimas alcançaram valores de GH similares (4,94% e 4,60%, respectivamente). Embora, KLOMPONG et al. (2012) tenham demonstrado que peptonas a partir de *minced* do peixe *Selaroides leptolepis*, produzidas com flavourzyme foram mais eficientes no crescimento de *E. coli* e *S. aureus* que as produzidas com alcalase, para GH similares (25%). Estas diferenças podem ter ocorrido devido à especificidade da enzima quanto a sítios alvo nas proteínas presentes nos resíduos, resultando em peptonas com peptídeos de distinto peso molecular que podem ser biodisponíveis ou não para cada bactéria (XU et al., 2011; HE et al., 2013).

5.6. Eficiência das peptonas para bioprocessos com leveduras

A eficiência das peptonas PHT-N e PHT-P para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram determinadas e comparadas com a das peptonas comerciais BD Bacto, Himedia e Kasvi em meio *Yeast Peptone Sacarose* (YPSAC). Neste caso, a concentração de peptona foi ajustada a quantidade de proteína presente em cada uma (determinada previamente de acordo com o método de Bradford (1976), descrito no item 4.3) para detectar possíveis diferenças no seu metabolismo. Como as leveduras foram capazes de consumir grande parte dos açúcares redutores presentes no meio YPSAC contendo PHT-N (99,27%), PHT-P (99,50%), BD Bacto (99,65%), Himedia (98,79%) e Kasvi (99,44%), as variações observadas no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* entre as diferentes peptonas ocorreram devido a diferenças no metabolismo quanto à utilização das diferentes fontes de nitrogênio, e não propriamente dos açúcares presentes.

O crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi elevado em todas as peptonas analisadas, exceto no PHT-P que teve menor formação de biomassa (Figura 12). Em termos de assíntota (isto é, o limite de crescimento esperado), todas as peptonas apresentaram alta eficiência para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a BD Bacto a mais eficiente, seguida da Himedia, Kasvi, PHT-N, enquanto que a assíntota do PHT-P foi significativamente ($p < 0,05$) menor (Tabela 10). *Saccharomyces cerevisiae* também teve taxa de crescimento máxima significativamente ($p < 0,05$) menor nos hidrolisados proteicos de tilápia vermelha do que nas peptonas comerciais e, portanto, um tempo de geração significativamente ($p < 0,05$) maior. KLOMPONG et al. (2012) também detectaram taxa de crescimento máxima significativamente ($p < 0,05$) menor em peptonas a partir de *minced* de *Selaroides leptolepis* produzidas com flavourzyme ou alcalase que na BD Bacto. Contudo, as leveduras não apresentaram latência em PHT-P, enquanto que o período de latência na PHT-N foi significativamente ($p < 0,05$) menor que nas peptonas comerciais. Além disso, deve-se levar em consideração que as peptonas desenvolvidas neste estudo apresentaram quantidades de proteína significativamente ($p < 0,05$) maiores que as peptonas comerciais, o desempenho das mesmas no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi altamente satisfatório, demonstrando eficiência comparativamente similar em menor concentração de peptona.

Tabela 10. Tempo de latência (λ), taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$), tempo de geração (g) e assíntota (A) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* crescida em peptonas comerciais (BD Bacto, Kasvi, Himedia) e hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha (PHT-N, PHT-P).

Parâmetro	BD Bacto	Kasvi	Himedia	PHT-N	PHT-P
λ (h)	3,80 ^c	5,26 ^a	5,08 ^b	0,63 ^d	0,00 ^e
$\mu_{\max}$ (1/h)	1,13 ^b	1,53 ^a	1,53 ^a	0,69 ^c	0,56 ^d
g (h)	0,61 ^c	0,45 ^d	0,45 ^d	1,01 ^b	1.25 ^a
A	6,57 ^a	6,41 ^c	6,50 ^b	6,39 ^c	5,52 ^d

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as peptonas para os valores de um parâmetro cinético determinado.

Diversos estudos também reportaram alta eficiência de diferentes hidrolisados proteicos elaborados à base de resíduos de pescado no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (ASPMO et al., 2005a; DUFOSSÉ et al., 2001; HUSIN et al., 2015; KLOMPONG et al., 2012; NAJIM et al., 2015). Similar ao caso das bactérias, as diferenças

observadas entre PHT-N e PHT-P no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* podem ter ocorrido também devido à especificidade da enzima em relação aos sítios alvo nas proteínas presentes nos resíduos, resultando em peptonas com peptídeos de distinto peso molecular que podem ser biodisponíveis ou não para a levedura (XU et al., 2011; HE et al., 2013). De fato, sabe-se que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio interfere, por exemplo, na expressão e estabilidade de transporte do íon amônio em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo os peptídeos os mais eficientes nesse processo (CRUZ et al., 2001).

Figura 12. Cinéticas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* com as peptonas BD Bacto (A), Kasvi (B), Himedia (C), PHT-N (D) e PHT-P (E). Valores experimentais são representados por símbolos, enquanto os valores esperados são mostrados como linhas sólidas, segundo a equação de *Gompertz* (vide item 4.5.3.)

6. CONCLUSÕES

Os elevados teores de proteínas encontrados nos resíduos sólidos de tilápia vermelha demonstraram, que estes podem se constituir em interessante fonte de nitrogênio a ser aproveitada pela indústria processadora.

O planejamento experimental, através de um delineamento composto central rotacional, com três variáveis independentes e uma dependente, realizado neste estudo permitiu otimizar as condições de proteólise desses resíduos sólidos para a elaboração de peptonas, assim como a obtenção de modelos preditivos.

Quanto ao grau de hidrólise, a adição das enzimas comerciais neutrase e papaína resultaram em efeito aditivo à atuação hidrolítica das enzimas endógenas previamente presentes nos resíduos, sinalizando que essas enzimas devem apresentar diferentes sítios alvo de atuação no substrato proteico.

Os hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha apresentaram maior concentração de peptídeos de 5-20 kDa que as peptonas comerciais BD Bacto, Himedia e Kasvi, as quais são utilizadas como fonte suplementar de nitrogênio em bioprocessos e em suplementos alimentares.

Os hidrolisados proteicos apresentaram atividade antioxidante satisfatória, sendo correlacionada positivamente com a concentração de proteína presente.

Constatou-se eficiência dos hidrolisados proteicos de resíduos sólidos de tilápia vermelha para o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, assim como da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em relação as peptonas comerciais BD Bacto, Himedia e Kasvi.

Portanto, o aproveitamento de resíduos sólidos de tilápia vermelha em forma de hidrolisados proteicos representa uma relevante fonte tanto de compostos bioativos com atividade antioxidante, como de nitrogênio para o crescimento microbiano, permitindo aumentar a sustentabilidade da indústria pesqueira e reduzir o impacto ambiental gerado atualmente pelo descarte direto.

REFERÊNCIAS

- ANBE, L.; FERRAZ DE ARRUDA, L.; OETTERER, M. Importância da adoção de programa de gerência do resíduo de processamento da tilápia. **Informações Econômicas** (Impresso), v. 45, p. 1-9, 2015.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura, p. 138, 2018.
- AMIZA, M. A.; NURUL ASHIKIN, S.; FAAZAZ, A. L. Optimization of enzymatic protein hydrolysis from silver catfish (*Pangasius sp.*) frame. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 2, 2011.
- ARRUDA, L. F.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; D'ARCE, M. A. B. R.; OETTERER, M. Nutritional aspects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.749-753, 2006.
- ARRUDA, L. F.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Use of fish waste as silage: a review. Brazilian **Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 879-886, 2007.
- ARRUDA, L. F.; BORGHESI, R.; PORTZ, L.; CYRINO, J. E. P.; OETTERER, M. Fish silage in black bass (*Micropterus Salmonides*) feed as an alternative to fish meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p.1261-1266, 2009.
- ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3714-3722, 2005a.
- ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 1957-1966, 2005b.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**, 14 ed., Washington, DC, 1995, 1141p.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a peptidase information system. **Journal of Structural Biology**, v.134, p.95-103, 2001.
- BÁRZANA, E.; GARIBAY-GARCÍA, M. Production of fish protein concentrates. In: **Fisheries Processing: Biotechnological Applications**. MARTIN, A. M.; CHAPMAN & HALL, London, p. 206-222, 1994.
- BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v. 45, p.18-24, 2010.
- BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n. 2, p. 227-236, 2008.
- BEZERRA, R. S.; LINS, E. J.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M.; CHAVES, M. E.; COELHO, L. C.; CARVALHO JR., L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1829-1834, 2005.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

- BORGHESI, R.; ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. A. Silagem de pescado na alimentação de organismos aquáticos. **Boletim do Centro de Pesquisa Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 329-339, 2007.
- BOSCARDIN, N. R. A produção Aquícola Brasileira. IN: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, p.55, 2008.
- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Digestibilidade aparente da energia e proteínas das farinhas de resíduo da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da corvina (*Plagioscion squamosissimu*) e farinha integral do camarão canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n. 1, p.8-13, 2004.
- BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118 p. 559–565, 2010.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p.93-99, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html> Acesso em: 27 de nov. 2016.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº2, de 7 de janeiro de 2002**. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde. Publicado do Diário Oficial da União, Brasília, 17 de julho de 2002. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI1Mw%2C%2C>. Acesso em: 14 de fev. 2017
- CABRAL, I. S. R.; ANGELINI, M. F. C.; SHIRAHIGUE, L. D.; SUCASAS, L. F. A.; OETTERER, M. Stability of tilapia minced (*Oreochromis niloticus*) due to the use of different additives. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos – REBRAPA**, v. 3, p. 44-49, 2013.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico, 1. ed. São Carlos: UDURFSCar; 2010. 105p.
- CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p.1792-1798, 2009.

- CHABEAUD, A.; DUTOURNIÉ, P.; GUÉRARD, F.; VANDANJON, L.; BOURSEAU, P. Application of Response Surface Methodology to Optimise the Antioxidant Activity of a Saithe (*Pollachius virens*) Hydrolysate. **Marine Biotechnology**, França, v. 11, n. 4, p.445-455. 2008.
- CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012.
- CINTRA, V.G. Tratamento de resíduos industriais provenientes do processamento de pescado do empreendimento Kipeixe Indústrias e Comércio de Pescado Ltda. **Revista Especialize On-line IPOG**, Goiânia, n.7, p.3, 2014.
- COELHO, M. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro. Editora Epub, 288p, 2008.
- CRUZ, S. H., CASSIO, F., LEÃO, C., ERNANDES, J. R. O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônio em *Saccharomyces cerevisiae*. **Eclética Química** 26, p. 157-173, 2001.
- CYRINO, J. E.; CONTE, L. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, cap.12, p.151-171, 2006.
- DE CAMARGO, A. C.; VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.13, p. 3073-3084, 2012.
- DERAZ, S. F.; EL-FAWAL, G. F.; ABD-ELLATIF, S. A.; KHALIL, A. A. Autohydrolysed Tilapia nilotica vish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian Journal Microbiological**. New Delhi, v.51, n.2, p.171-175, 2011.
- DOS SANTOS, S. D. A.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing scorpion (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399-1406, 2011.
- DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D.; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2001.
- DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGÉ, J.P. Improvement of lipids and phospholipids recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2327-2332, 2006.
- FALLAH, M.; BAHRAM, S.; JAVADIAN, S. R. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. **Food Science & Nutrition**, Malden, v. 3, n. 2, p. 153-157, 2015.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, p. 224, 2016.
- FAO. FAO yearbook. Fisheries and Aquaculture Statistics 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p.107, 2017.

- FARVIN, K. H.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: in vitro assays and evaluation 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 149, p. 326-334, 2014.
- FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.6, p.669-677, 2010.
- FOH, M. B. K.; AMADOU, I.; FOH, B. M.; KAMARA, M. T.; XIA, W. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1851-1869, 2010.
- FONSECA, R. A. S. ; SILVA, C. M. ; ROSA, G. F. ; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Enzymatic hydrolysis of cobia (*Rachycentron canadum*) meat and wastes using different microbial enzymes. *International Food Research Journal* , v. 23, p. 152-160, 2016.
- FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**. Piracicaba, v.10, n.19, p.79-89, 2002.
- GALLA, N. R.; PAMIDIGHANTAM, P. R.; AKULA, S.; KARAKALA, B. Functional properties and *in vitro* antioxidante activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. **Food Chemistry**, Hyderabad, v. 135, n. 3, p. 1479-1484, 2012.
- GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by products hydrolysates. **Journal of Food Science**, v.69, n.8, p. 615-622, 2004.
- GILDBERG, A.; DAHL, R.; MIKKELSEN, H.; NILSEN, E.K. Peptones from Atlantic Cod stomach as a nitrogen sources in growth media to marine bacteria. **Journal Aquatic Food Product Technology**, London, v.19, n.2, p.75-83, 2010.
- GUERARD, F.; DUFOSE, L.; DE LA BROISE, D.; BINET, A. Enzymatic hydrolysis of protein from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**, Quimper, v. 11, p. 1051-1059, 2001.
- GUERARD, F.; DECOURCELLE, N.; SABOURIN, C.; FLOCH-LAIZET, C.; LAURENT, L. C.; FLOCH, P.; GOURLAY, F.; LE DELEZIR, R.; JAOUEN, P.; BOURSEAU, P. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. **Journal des sciences Halieutique et Aquatique**, v. 2, p. 21-27, 2010.
- HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food & Technology**, n.51, p.24-33, 2016.
- HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n.1, p. 420-426, 1978.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.

- HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, n.1, p. 289-297, 2013.
- HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 195-207, 2011.
- HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias-vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 22, p. 73-84, 1995.
- HILSDORF, A. W. S. A vez da tilápia, Revista FAPESP, São Paulo, n. 249, p. 66-71, 2016.
- HOU, H., LI, B., ZHAO, X.; ZHANG, Z.; LI, P. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness. **Food Science and Technology**, v.44, p.421–428, 2011.
- HUSIN, N.; KAMAL, S. M. M., CHUAN, L. T.; MUHAMMED, N. F. Comparison of Microbial Growth on Fish Waste Peptones from Different Hydrolysis Methods. In: **5th International Conference on Biomedical Engineering and Technology (ICBET 2015)**. IACSIT Press, Singapore. p. 54-57. 2015.
- IBAMA. Estatística da pesca 2007 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 175 p, 2009. ISBN 978-85-7300-303-1
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2016. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão, Rio de Janeiro, p. 51, 2017.
- ICMSF. Microorganisms in Foods. 2-Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications, 2nd ed., University of Toronto Press, Toronto, 1986. 310p.
- JAYATHILAKAN, K., SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A.S. Utilization of byproducts and waste material from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**. Mysore, India, v.49. n.3, p. 278-293, 2012.
- JE, J.; LEE, K.; LEE, M. H.; AHN, C. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, p. 1266–1272, 2009.
- KHALED, H. B.; KATARIN, N.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; JRIDI, M.; LASSOUED, I.; NARSI, M.. Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 622-633, 2014.
- KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F. Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: Antioxidant activity and its potential in model systems. **Food Chemistry** v. 135, p. 1118-1126, 2012.
- KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, Vancouver, Canadá v. 9, n. 16, p.1309-1323, 2003.
- KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SIMPSON, B. K. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**, 100, p. 1580-1589, 2007.

- KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Use of protein hydrolysate from yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as microbial media. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1317-1327, 2012.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p.43-81, jan. 2000.
- KUBITZA, F. **Tilápias: tecnologia e planejamento na produção comercial**. São Paulo: Degaspari, 2000. 289 p.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p.680-685, 1970.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. In: **Biotechnology and Bioengineering. Symposium (United States)**. University. of Michigan, Ann Arbor, 1981.
- LIU, J.; LYU, F.; ZHOU, X.; WANG, B.; WANG, X.; DING, Y. Preparation of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysate using combined controlled enzymatic hydrolysis and glycation for improved solubility and emulsifying properties. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.3, n.7, p.471-477, 2015.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p. 265-275, 1951.
- MAI, J.; SHETTY, J. K.; KAN, T. M.; KINSELLA, J. E. Protein and amino acid composition of select freshwater fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 884-885, 1980.
- MARTIN-SANCHEZ, A. M.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; KURI, V. Alternatives for efficiency and sustainable production of surimi: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. Chicago, v. 8, n. 4, p.359-374, 2009.
- MDIC – Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Economia e Emprego. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/03/feira-de-pescados-nos-eua-pode-gerar-us-12-mi-em-negocios-para-o-brasil>. Acesso em: 05 de dez. 2017.
- MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, p. 581–587, 2015.
- MICHAIL, M.; VASILIADOU, M.; ZOTOS, A. Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 50-55, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Whashington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v.3, n.5, p. 9-23, 2009.
- MONTEIRO, M. L. G.; MÁRSICO, E. T.; SOARES, M. S.; MAGALHÃES, A.; CANTO, A. C. V. C. S.; COSTA-LIMA, B. R. C.; ALVARES, T. S.; CONTE, C. Nutritional Profile and Chemical Stability of Pasta Fortified with Tilapia (*Oreochromis niloticus*) flour. **Plos One**, v. 11, p. e0168270-17, 2016.

- MOREIRA, R.L.; DA COSTA, J.M.; MOURA, P.S.; FARIAS, W.R.L. Salinidade da água e suplementação alimentar com microalga marinha no crescimento e masculinização de *Oreochromis niloticus*, Tilápia do Nilo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 7, n. 1, p. 116-124, 2011.
- NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, Selangor, Malásia, p. 280-289, 2014.
- NAJIM, S. M.; AL-NOOR, J. M.; AL-WAELY, W. A. Extraction of crude peptone from fish wastes for use as a nitrogen source in microbiological media. **Global Journal of Fisheries and Aquaculture Researches**, v. 2, p. 29-37, 2015
- NAZEER, R. A.; KUMAR, N. S. Purification and identification of antioxidant peptide from Black Pomfret, *Parastromateus niger* (Bloch, 1975) viscera protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 1087-1094, 2011.
- NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p.101-108, 2004.
- NGO, D. H.; QIAN, Z. J.; RYU, B.; PARK, J. W.; KIM, S. K. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 2, p. 107-117, 2010.
- NGUYEN, H. T.; SYLLA, K. S. B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L. T.; BERGÉ, J. P. Enzymatic hydrolysis of yellowfin trout (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. *Food Technology Biotechnology*, Nantes, v. 49, n. 1, p. 48-55, 2011.
- NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANING, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by comercial proteases. **Journal of Food Engineering**. v. 70, p. 571-578, 2005.
- OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200 p.
- OETTERER, M. Proteínas de pescado – processamento com intervenção da fração proteica. In: OETTERER, M. et al. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Manole: Barueri, SP. p. 99-134, 2006.
- PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 333 - 338, 2005.
- PAIVA, F. C.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; JESUS, R. S. Produção de hidrolisado proteico de pirarucu utilizando-se protease de *Aspergillus flavo-furcatis* e pancreatina. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 1, p. 89-96, 2015.
- PASUPULETI, V. K., BRAUN, S. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In: Protein Hydrolysates in Biotechnology, Springer Dordrecht Heidelberg: New York, NY, USA, p. 11-32, 2010.

- PEZOA, V. G.; SALAS-MELLADO, M. Estudo das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de estratos dos componentes do aparelho digestivo de corvina (*Micropogon furnieri*) e castanha (*Umbrina canosai*). In: PEZOA, V. G.; SALAS-MELLADO, M. Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado. Rio Grande: Editora FURG, p. 5-38, 1979.
- PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 553. 1985.
- RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p.1434-1441, 2008.
- RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Gainesville, v. 117, n. 4, p.582-588, 2009.
- RENHORAN, M.; SARASWATI, A.; AKTINIDIA, Y.; SYUKRON, F.; RUKMANA, R. K.; Utilization of trash fish solid waste as peptone for additional material for potential bacteria's growth medium. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL, BIOLOGICAL AND ENVIRONMENT SCIENCES, 2011, Bangkok. **Abstracts...** Bangkok. PSRC, 2011. p. 334-336.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology**, v.26, n.9/10, p. 1231-1237, 1999.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos & otimização de processos. 2ª edição. Campinas, SP. 2009, 618p.
- ROSLAN, J.; YUNOS, K. F. M.; ABDULLAH, N.; KAMAL, S. M. M. Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 312-319, 2014.
- ROSLAN, J.; KAMAL, S. M. M.; YUNOS, K. F. M.; ADDULLAH, N. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product using response surface methodology. **International Food Research Journal**. v. 22, n.3, p.1117-1123, 2015.
- ROSLAN, J.; KAMAL, S. M. M.; YUNOS; ABDULLAH, N. Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p.250-257. 2017.
- RUTHERFURD, S. M.; GILANI, G. S. Amino acid analysis. **Current Protocols in Protein Science**, p.9-11, 37, 2009.
- SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J. M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, p. 73-79, 2012.

- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C.Y. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). **Food Chemistry**, Vancouver, Canadá, v. 107, n. 2, p.768-776, 2008.
- SANROMÁN, M. A. Food Enzymes. In: PANKEY, A., SANROMÁN, M. A, DU, G., SOCCOL, C. R., DUSSAP, C.G. Current developments in biotechnology and bioengineering: **Food and Beverages Industry**. Elsevier, p.119-133, 2017.
- SANTOS, V. B. A disponibilidade de diferentes linhagens de tilápias. **Pesquisa e Tecnologia**. v. 3, n. 1, 2006.
- SANTOS S. D.; MARTINS, V. G.; MELLADO, M. S.; HERNANDEZ, C. P. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v.32, p.72-77, 2009.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, 31, p. 1949-1956, 2010.
- SATHIVEL, S.; BECHTEL, P.J.; BABBITT, J.; SMILEY, S.; CRAPO, C.; REPPOND, K. D.; PRINYAWIWATKUL, K. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. **Journal of Food Science**, v.68, n.1, p. 2196-2200. 2003.
- SATHIVEL, S.; SMILEY, S.; PRINYAWIWATKUL, W.; BECHTEL, P. J. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. **Journal of Food Science**, v.70, n.6, p.401-406, 2005.
- SHAHIDI, F.; KAMIL, Y. V. A. J. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 12, p. 435-464, 2001.
- SHAMLOO, M.; BAKAR, J.; MAT HASHIM, D.; KHATIB, A. Biochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, 2012.
- SHIRAHIGUE, L. D.; SILVA, M. O.; CAMARGO, A.C.; SUCASAS, L.F.A.; CABRAL, I.S.R.; SILVA, L.K.S.; GALVÃO, J.A.; OETTERER, M. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste: by products and lipid recovery. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 1, p. 1, 2016.
- SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste fore the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Techonology**, v. 196, p.96-106, 2014.
- SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v.8, n.3, p.5, p.451-457, 2009.
- SUMNER, J. B.; SISLER, E. B. A simple method for blood sugar. **Archives of Biochemistry**, New York, v. 4, p. 333-336, 1944.
- TAHERI, A; FARVIN, K.H; JACOBSEN, C; BARON, C. P. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. **Food Chemistry**, Lyngby, Denmark, v. 142, p.318-326, jan. 2014.
- TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an importante tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

- THIANSILAKUL, Y; BENJAKUL, S; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, Tailândia, v. 103, n. 4, p.1385-1394, 2007.
- VALENTI, W. C.; KIMPARA, J. M. K.; PRETO, B. L.; MORAES-VALENTI, P. Indicators of sustainability to assess aquaculture systems. **Ecological Indicators**, v. 88, p. 402-413, 2018.
- VEIT, J. C.; FREITAS, M. B.; REIS, E.; MOORE, O.; FINKLER, J. K.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Desenvolvimento e caracterização centesimal e microbiológica de hidrolisados proteicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Braslian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 3, p. 434, 2013.
- VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. D. C. P.; ZAPATA, J. F. F. VIEIRA, J. M. M. Concentrado protéico de resíduos da filetagem de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.1, p. 92-99, 2011.
- VIDOTTI, R. M. Tecnologia para aproveitamento integral dos resíduos do agronegócio da piscicultura. In: Castellani, D. (Ed.) **I Workshop de Piscicultura do Noroeste Paulista**, Votuporanga, São Paulo, 2009.
- VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V. Peptone preparation from fishing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. London, v.85, p.1235-1236, 2005.
- VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 244, p.160-171, 2017.
- XU, W.; KONG, B-H.; ZHAO, X-H. Optimization of some conditions of Neutrase-catalyzed plastein reaction to mediate ACE-inhibitory activity in vitro of casein hydrolysate prepared by Neutrase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 276-284, 2014.
- WU, H.C.; CHEN, H.M.; SHIAU, C.Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, Keelung, v. 36, p. 949–957, 2003.
- WU, R.; WU, C.; LIU, D.; YANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, J.; LIAO, B.; HE, H.; LI, H. Overview of antioxidant peptides derived from marine resources: The sources, characteristic, purification, and evaluation methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 7, p. 1815-1833, 2015.
- YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, M.J.; REN, J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, Guangzhou, v. 120, p. 810-816, 2010.
- ZAVARESE E. D. R.; SILVA, C. M.; MELLADO, M. S.; HERNANDEZ, C. P. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, Rio Grande, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.
- ZHANG, Y.; DUAN, X.; ZHUANG, Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 13-21, 2012.
- ZWIETERING, M. H. JNGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN’T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.