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

Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisado proteico como coproduto

Taciana Lunelli

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

**Piracicaba
2015**

Taciana Lunelli
Bacharela em Ciências Biológicas
Ênfase em Biotecnologia

Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*)
visando obter hidrolisados proteicos como coproduto
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARÍLIA OETTERER**

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

Piracicaba
2015

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

Lunelli, Taciana

Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisado proteico como coproduto / Taciana Lunelli. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

76 p. : il.

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

1. Hidrolisados protéico 2. Peptídeos 3. Atividade antioxidante I. Título

CDD 664.94
L962r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico esse trabalho aos meus pais Nelson e Elenita por tudo que abdicaram para que eu tivesse tudo que posso ter e às minhas irmãs Tatiana e Taisa; afinal eu nada seria e nada teria se não fosse por vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e imensamente a Deus, pela minha vida e todas as bênçãos que tenho tido até hoje.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marília Oetterer pela orientação, por todos os ensinamentos pessoais e profissionais, por ter me recebido e acreditado no meu potencial e pelo seu exemplo de profissionalismo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por suas instalações e pelo corpo docente que contribuiu para minha formação acadêmica.

À CAPES pela bolsa concedida no período de realização desse projeto.

Aos professores que me auxiliaram na elaboração do projeto, professora Thais Vieira, professor Cláudio Rosa Gallo e Juliana Antunes Galvão.

Ao Engenheiro Irineu Batista e à Engenheira Carla Pires pelo apoio, ensinamentos e receptividade em Portugal.

Ao professor Carlos Tadeu pelo auxílio nas análises estatísticas do trabalho.

Ao professor Marcos Luiz Pessatti por me possibilitar o primeiro contato com a área e pela importante ajuda e influência na minha formação. A todos os professores da UNIVALI pela minha formação acadêmica.

Ao GETEP pelo suporte e ajuda técnica ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

À minha família e, em especial, aos meus pais Nelson e Elenita Lunelli por terem me concedido a vida, por todos os ensinamentos e amor que foram essenciais para construir meu caráter e minha história. Às minhas queridas irmãs Tatiana e Taisa por estarem sempre ao meu lado, pelo suporte e exemplo. Aos meus cunhados, que são para mim como irmãos, Hércio e Alvi. Aos meus sobrinhos lindos Pâmela, Ana, Arthur e Heloisa. A minha “oma” que é um dos maiores exemplos que posso ter. Aos meus avós. E aos primos, Rafa e Marcos.

Ao meu amado noivo, Afonso, por ter entrado na minha vida e ter exercido papel essencial na construção de quem eu sou hoje. Agradeço por acreditar sempre na minha capacidade, por me incentivar a crescer sempre e nunca desistir, por toda a ajuda na construção desse trabalho, pelo amor, paciência, carinho, apoio e, por fim, pela amizade incondicional.

À minha segunda família, Ethel, Marcos, Luiz, Betina e Murilo. Só tenho a agradecer por ter vocês em minha vida e fazer parte dessa família. Agradeço por todos os bons momentos, conselhos e por todo o apoio que me deram.

À Luciana Kimie, do fundo do meu coração, por todo incentivo, oportunidades e auxílio. Por ter a boa vontade de me receber e ensinar e ter me apresentado à ESALQ, possibilitando o início desse curso e trabalho que se encerra.

Àqueles que posso chamar de os melhores, Duda, Juli e Richtier por me incentivarem a ser sempre uma pessoa melhor e por todo o amor e carinho.

Aos “velhos” e “novos” amigos que conquistei pelos caminhos dessa vida, Mari, Paulinha, Gabriel, Lu, Bruna, Tânia, Alan, Fran, Aline, Tuz, Saskya, Thaise, Rúbia, Taline, Heron, Djan, Nika, Jo, Bá, Jenny, Du, Eliana, Virlane, Rogério, Cris, Camila, Quel, Ju, Marina, Mi, Khouloud.

A todos os colegas de mestrado, em especial ao Eddie e Douglas pela amizade e suporte desde o primeiro momento e pela parceria durante o curso.

A todos os colegas e estagiários do Laboratório de Pescado, Lia, Ligi, Ju, Suzan, Cléo, Raquel, Aline, Bárbara, Camila, Paulo, Alexandre e, em especial, a Tati pela dedicação e trabalho nessa pesquisa.

Aos funcionários do LAN, Regina, Fábio e Ana Paula pela ajuda em todos os serviços burocráticos prestados.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Resíduos de pescado, destino e reutilização	21
2.2 Coprodutos de pescado	23
2.2.1 Hidrolisados químicos (Silagem)	24
2.2.2 Hidrolisados enzimáticos	26
2.2.3 Peptídeos biologicamente ativos	30
2.2.4 Peptídeos antioxidantes	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Coleta e transporte da matéria prima	35
3.2 Caracterização da matéria prima	35
3.3 Elaboração dos hidrolisados proteicos	36
3.4 Análise de rendimento	37
3.5 Caracterização dos hidrolisados proteicos	38
3.5.1 Composição em umidade, proteína e cinza	38
3.5.2 Grau de hidrólise	38
3.5.3 Distribuição de peso molecular	39
3.6 Atividade antioxidante	39
3.6.1 Método do radical DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	39
3.6.2 Método do radical ABTS- 2,2- azino-bis- (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)	39
3.6.3 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Composição centesimal da matéria prima utilizada	41
4.2 Processo de hidrólise e rendimento de frações	42
4.3 Rendimento da Liofilização	44
4.4 Composição centesimal dos hidrolisados	45
4.5 Grau de hidrólise	48

4.6 Atividade antioxidante.....	50
4.7 Peptídeos.....	56
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisados proteicos como coproduto

O crescimento da produção e comercialização de pescado gera um aumento considerável na quantidade de resíduos. A escassez de reutilização e as formas incorretas de descarte tem sido preocupação constante das indústrias e dos pesquisadores, que buscam soluções para a melhor destinação dos mesmos. Buscando o conceito de empresa eco eficiente, são propostos tratamentos que levem à obtenção de coprodutos. A produção de “farinha de peixe” é a forma de aproveitamento do resíduo mais utilizada, porém apresenta baixo valor comercial. A elaboração de hidrolisados proteicos apresenta-se como uma alternativa de maior valor agregado. A clivagem proteica realizada por enzimas específicas pode gerar peptídeos biologicamente ativos, que apresentam propriedades funcionais e medicinais, bem como atividade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi a elaboração e caracterização de hidrolisados proteicos de cabeças de tilápia (*Oreochromis niloticus*), a aferição da atividade antioxidante destes e sua relação com o tamanho de peptídeos, como forma de se obter e disponibilizar coprodutos, visando a sustentabilidade da cadeia produtiva desta espécie. O hidrolisado proteico de tilápia (HPT) foi obtido por hidrólise enzimática e empregando as enzimas Neutrase (Protamax NP-800), Papaína (Brauzyn-100) e Pepsina nos tempos 30, 60 e 120 minutos. O grau de hidrólise foi determinado através da metodologia com utilização do o-ftaldialdeído. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios do DPPH e ABTS+. O perfil de peptídeos foi avaliado através da separação por cromatografia em gel com coluna *Superdex peptide*. O grau de hidrólise para os tratamentos com a neutrase (30 min, 60 min, 120min) variou de 11,3% a 14,1%. No tratamento com a papaína (30 min, 60 min, 120 min) o grau de hidrólise foi superior ao observado com a enzima neutrase, apresentando variação de 21,14% a 25,28%. A variação para o tratamento com a pepsina (30 min, 60 min e 120 min) foi de 10,18% a 14,97%. Todos os hidrolisados apresentaram propriedade antioxidante através da inibição de radicais livres, mesmo a concentrações baixas de hidrolisado. A inibição de 50% (EC50) dos radicais na metodologia de DPPH ocorreu com concentrações inferiores a 3mg/mL para todos os tratamentos, sendo a menor concentração 1,36 mg/mL (pepsina 120 min) e a maior 2,70 mg/mL (neutrase 30 min). Na metodologia de ABTS, concentrações superiores foram necessárias para a inibição de 50% dos radicais, porém ainda assim foram inferiores a 5%. A menor concentração foi 3,58 mg/mL (pepsina 120 min) e a maior foi de 4,49 mg/mL (neutrase 60 min). O tamanho das cadeias de peptídeos para a maioria dos tratamentos se situou entre cadeias de 1000 a 10000Da, sendo que o tratamento com pepsina promoveu porcentagem de peptídeos com maior peso molecular seguido pela neutrase. A papaína foi a enzima que promoveu maior clivagem de proteína e menores tamanhos de peptídeos, localizados na faixa de 100 a 1000 Da, valor relacionado ao seu maior grau de hidrólise. As propriedades observadas nos hidrolisados elaborados indicam que este pode ser um potencial suplemento alimentício devido ao seu elevado valor proteico, aditivos para conservação de alimentos e ainda aplicados na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Hidrolisados proteico; Peptídeos; Atividade antioxidante

ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing residues recycling to obtain protein hydrolysates as coproduct

The growth in production and marketing of fish generates a considerable increase in the amount of waste. The scarcity of re-used products and incorrect disposal forms has been a constant concern of industries and researchers who seek solutions for better allocation thereof. Seeking an *efficient eco company* concept, proposed treatments are leading to obtaining co-products. The production of "fish meal" with the residues is the most common use for the waste, but has a low commercial value. The preparation of protein hydrolysates is presented as an alternative with higher added value. The protein cleavage performed by specific enzymes can generate biologically active peptides which exhibit functional and medicinal properties as well as antioxidant activity. The objective of this work was the preparation and characterization of protein hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*), the measurement of antioxidant activity of these and its relation to the size of peptides as a way to obtain and provide co-products, aimed at the sustainability of the chain production of this species. The protein hydrolyzate of tilapia (HPT) was obtained by enzymatic hydrolysis and employing the enzyme Neutrase (Protamax NP- 800), Papain (Brazyn - 100) and Pepsin at 30, 60 and 120 minutes. The degree of hydrolysis was determined using o- phthaldialdehyde. In the treatment with papain (30 min, 60 min, 120 min) the degree of hydrolysis was higher than that observed with Neutrase enzyme, showing variation of 21.14% to 25.28%. The variation for treatment with pepsin (30 min, 60 min and 120 min) was 10.18% and 14.97% hydrolyzed. All samples showed antioxidant properties through inhibition of free radicals, even at low concentrations hydrolyzate. The 50% inhibition (EC₅₀) of the DPPH radical methodology occurred at concentrations below 3 mg / ml for all treatments, being the lowest concentration 1.36 mg / ml (lot 120 min) and the largest 2.70 mg / ml (Neutrase 30 min). In the ABTS method, higher concentrations were required for 50% inhibition of the radical, but still was less than 5%. The lowest concentration was 3.58 mg / mL (120 pepsin min) and the largest was 4.49 mg / mL (Neutrase 60 min). The size of the peptide chains to most treatments ranged from 1000 to 10000Da chains, whereas treatment with pepsin promoted percentage of peptides of higher molecular weight followed by Neutrase. The papain was the enzyme cleavage that generated more protein and peptides of smaller size, situated in the range from 100 to 1000 Da, which is related to the higher degree of hydrolysis. The properties observed in hydrolysates produced indicate that this is a potential food supplement because of its high protein value for food preservation additives, and applied in the pharmaceutical industry.

Keywords: Protein hydrolysate; Peptides; Antioxidant activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hidrolisados líquidos e detalhe, após término da hidrólise	43
Figura 2 - Frações, em porcentagem, obtidas após centrifugação do material hidrolisado para os tratamentos 1, 2 e 3 (neutraxe)	43
Figura 3 - Frações, em porcentagem, obtidas após centrifugação do material hidrolisado para os tratamentos 4,5 e 6 (papaína)	43
Figura 4 - Frações, em porcentagem, obtidas após centrifugação do material hidrolisado para os tratamentos 7,8 e 9 (pepsina)	44
Figura 5 - Atividade antioxidante (DPPH) para o hidrolisado com a enzima neutraxe (protemax) nos diferentes tempos de hidrólise.....	52
Figura 6 - Atividade antioxidante (DPPH) para o hidrolisado com a enzima papaína (brauzyn) nos diferentes tempos de hidrólise.....	53
Figura 7 - Atividade antioxidante (DPPH) para o hidrolisado com a enzima pepsina nos diferentes tempos de hidrólise.....	53
Figura 8 - Atividade antioxidante (ABTS) para o hidrolisado com a enzima neutraxe (protemax) nos diferentes tempos de hidrólise.....	55
Figura 9 - Atividade antioxidante (ABTS) para o hidrolisado com a enzima papaína (brauzyn) nos diferentes tempos de hidrólise.....	55
Figura 10 - Atividade antioxidante (ABTS) para o hidrolisado com a enzima pepsina nos diferentes tempos de hidrólise.....	56
Figura 11 - Distribuição dos pesos moleculares dos peptídeos obtidos nos hidrolisados elaborados a partir da enzima neutraxe (protemax).....	58
Figura 12 - Cromatograma de filtração em gel, mostrando a distribuição do peso molecular dos hidrolisados elaborados a partir da enzima neutraxe (protemax)	58
Figura 13 - Distribuição dos pesos moleculares de peptídeos obtidos nos hidrolisados elaborados a partir da enzima papaína (brauzyn)	59
Figura 14 - Cromatograma de filtração em gel, mostrando a distribuição do peso molecular dos hidrolisados elaborados a partir da enzima papaína (brauzyn).....	60
Figura 15 - Distribuição dos pesos moleculares de peptídeos obtidos no hidrolisados elaborados a partir da enzima pepsina	61
Figura 16 - Cromatograma de filtração em gel, mostrando a distribuição do peso molecular dos hidrolisados elaborados a partir da enzima pepsina	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processo de hidrólise do pescado-vantagens e desvantagens.....	29
Tabela 2 - Tratamentos enzimáticos para hidrólise proteica	37
Tabela 3 - Rendimento, em porcentagem, da liofilização das amostras	45
Tabela 4 - Composição em umidade, proteína e cinza dos hidrolisados para as diferentes enzimas e tempos de hidrólise (g/100g)	48
Tabela 5 - Grau de hidrólise para os diferentes hidrolisados	49
Tabela 6 - Mensuração da EC50 para a metodologia DPPH	53
Tabela 7 - Mensuração da EC50 para a metodologia ABTS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da produção de pescado faz com que as indústrias processadoras voltem a sua atenção para os problemas ambientais, uma vez que haverá maior volume de descarte, em uma cadeia produtiva que produz quantidade significativa de resíduos sólidos e líquidos e que, em sua maioria, são descartados na natureza sem nenhum tipo de tratamento, gerando impacto ambiental. Por esse motivo, órgãos governamentais e indústrias de vários países passaram, recentemente, a se preocupar em adotar uma política ambiental que minimize os impactos negativos à natureza advindos desse descarte (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Desde 2001, a produção pesqueira se mantém em torno de 90 milhões de toneladas, enquanto a produção aquícola continua aumentando a uma taxa média de anual de 6,2% (OLIVEIRA et al., 2011). A produção, comercialização e industrialização de pescado geram quantidades elevadas de resíduos ricos em proteínas e que, na maior parte das vezes, são descartados sem aproveitamento (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Em 2009, a produção mundial de tilápia proveniente da aquicultura, foi de 132.957 t, sendo que a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi responsável por 96.286 t (FAO, 2011). Essa é uma espécie que vem se destacando como uma das mais cultivadas e comercializadas no Brasil, uma vez que pode ser criada em uma ampla variedade de *habitats* de água doce e apresenta características zootécnicas de adaptação ao clima do país com resistência a temperatura e estresse (CABRAL et al., 2012) (FOH et al., 2010).

A produção mundial de pescado alcançou 158 milhões de t em 2012, sendo 66,6 milhões provenientes da aquicultura e 91,3 milhões da pesca ou captura (FAO, 2014). Desse total, 136 milhões foram utilizadas como alimento humano e cerca de 21,7 milhões destinadas a fins não alimentares, dos quais 75% foram reduzidos a farinha de peixe e óleo; e o restante, utilizado para fins farmacêuticos, produção de alevinos, utilização como iscas, dentre outros (FAO, 2014).

O rendimento do pescado submetido à industrialização pode variar de 30 a 77%, dependendo da espécie e do tipo de processamento ao qual é submetido, e parte destes resíduos é conduzida às fabricas de farinha e óleo, entretanto, há

evidências do despejo destes em aterros públicos, caracterizando fontes potenciais de poluição orgânica (STORI, 2000).

Desta forma, o desenvolvimento de medidas preventivas e métodos de bio-remediação, tendo em vista o melhoramento da qualidade da água dos efluentes antes do descarte, mostra-se cada vez mais necessário, assim como, o aproveitamento dos resíduos sólidos, como uma medida preventiva rentável e ambientalmente correta (JONES et al., 2001).

São considerados resíduos oriundos do processamento de pescado, cabeças, carcaças e vísceras provindas da filetagem, as partes de coloração mais acentuada do músculo e os peixes de menor tamanho comercial (VISENTAINER et al., 2003); (AMIZA; OW; FAAZAZ, 2013). Os coprodutos que podem ser obtidos a partir desses resíduos, como a farinha e o óleo, apresentam valor nutritivo considerável (ARVANITOYANNIS, 2008), além de colaborarem para o aumento da rentabilidade da indústria, através do aproveitamento integral da matéria prima.

Com o intuito de buscar possíveis utilizações para esses resíduos, têm surgido diversos coprodutos, frutos de pesquisas e com boa aceitabilidade no mercado, como é o caso do *Surimi*, que é obtido a partir do músculo aderido à espinha dorsal do pescado no processo de filetagem ou a CMS - carne mecanicamente separada (BRUSCHI, 2001), que também pode ser processada como patês, hambúrgueres, salsichas, e constituir matéria prima para elaboração de hidrolisados proteicos (HE; FRANCO; ZHANG, 2013).

A obtenção dos hidrolisados proteicos ocorre através de um processo proteolítico enzimático, onde as proteínas são clivadas e transformam-se em peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. A hidrólise pode ocorrer por via química (silagem), sendo que esta apresenta baixo custo de produção e pode ser destinada a alimentação animal (FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2005) ou ainda por via enzimática, que apresenta diversas vantagens como especificidade, controle do grau de hidrólise e condições moderadas de ação. A hidrólise enzimática é aplicada com objetivo de melhorar as propriedades funcionais da proteína, sendo que sua utilização pode ser destinada tanto ao consumo humano, como à utilização na indústria farmacêutica e alimentícia (HE; FRANCO; ZHANG, 2013) (ZAVAREZE et al., 2009).

Como propriedades funcionais desses hidrolisados podem ser citadas a solubilidade, absorção de gordura, capacidade de absorção de água, formação de gel e capacidade emulsificante; estas propriedades, podem estar atuantes sem que ocorra diminuição do valor nutricional dos hidrolisados (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Os hidrolisados possuem elevada atividade antioxidante (You et al., 2008), que, por sua vez, se relaciona com os peptídeos bioativos, que apresentam tamanho de 2 a 20 aminoácidos e peso molecular de 6000Da, considerados fragmentos específicos e inativos quando na cadeia de proteína (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Os objetivos deste trabalho foram elaborar e caracterizar hidrolisados proteicos de cabeças de tilápia, com foco na atividade antioxidante e sua relação com o tamanho de peptídeos, visando obter e dispor coprodutos, como forma de colaborar para a sustentabilidade da cadeia produtiva da tilápia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos de pescado, destino e reutilização

O resíduo pode ser definido como o material descartado em várias etapas da cadeia de produção e consumo de um alimento, que por limitações tecnológicas ou de mercado, não apresenta valor de uso ou de mercado e, ao ser manejado de forma inadequada, resulta em impactos negativos ao ambiente (BRASIL, 2010). O termo resíduo compreende, não somente, os descartes sólidos, mas também os efluentes líquidos e o material presente nas emissões atmosféricas (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Quanto aos resíduos do processamento de pescado, em sua maioria, são considerados como lixo e descartados na natureza, sem nenhum tratamento ou recuperação, gerando problemas ambientais ao poluir os recursos hídricos, solo e ar, oferecendo riscos à saúde pública e interferindo de forma negativa na sustentabilidade da cadeia produtiva. Além disto, o resíduo descartado afeta não apenas a área circundante, mas também pode alterar a zona costeira em diferentes níveis do ecossistema, reduzindo a biomassa, densidade e diversidade de bentos, plâncton e nécton e modificando teias alimentares naturais (GOWEN, 1991).

Dentre os impactos causados pelos resíduos sólidos de pescado, destacam-se os potenciais efeitos negativos causados pela biodeposição, que se acumula sob e no entorno das áreas de cultivo, e o posterior enriquecimento orgânico do leito, com alterações da comunidade de invertebrados bentônicos frente ao estresse ambiental (CALLISTO, 2000; AMIZA; OW; FAAZAZ, 2013).

São considerados, resíduos do processamento de pescado, as partes escuras do músculo e os resíduos de filetagem, como cabeça, carcaça, ossos, escamas e vísceras, e que podem representar até 70% da matéria prima original (RAMÍREZ, 2007). A quantidade desses resíduos descartados, no mundo, varia de 18 a 30 milhões de t, considerando aquele descartado pela indústria e o que é perdido antes de chegar às processadoras, seja através de manejo, transporte e/ou armazenamento inadequados (ZAHAR et al., 2002).

A cadeia produtiva do pescado gera quantidade considerável de resíduos sólidos e líquidos durante a produção, captura, processamento e comercialização, seja este proveniente de água continental ou marinha, sendo que, estas atividades levam a um elevado desperdício. O processo de industrialização do pescado tem

aumentado de forma considerável, porém as indústrias de beneficiamento têm a filetagem como atividade principal (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008; VIDOTTI et al., 2003). No processo de filetagem da tilápia o volume de descarte pode chegar a 65% da matéria prima (BOSCOLO, 2003).

De acordo com estudo realizado por Anbe (2011) em uma propriedade produtora e processadora de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) obteve-se 61,15% de resíduo, sendo que, 28,23%; 17,12%; 7,97% e 7,83% eram constituídos de carcaças, cabeças, vísceras e peles, respectivamente. A autora sugere o encaminhamento dos resíduos gerados na unidade de processamento para produção de coprodutos como silagem, óleo, farinha, couro, dentre outros, como forma de aumentar a receita e minimizar custos da empresa, buscando a sustentabilidade da unidade agroindustrial.

O aproveitamento desse tipo de matéria prima apresenta potencial para elaboração de coprodutos, pois possui elevada quantidade de proteínas, enzimas e ácidos graxos (ANBE, 2011; OETTERER et al., 2003). Além disso, o resíduo de pescado apresenta compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras da saúde e pelas aplicações tecnológicas. Se aplicada tecnologia adequada, este material residual pode ser convertido em produtos comerciais ou matéria prima para processos secundários (FERRAZ DE ARRUDA et al., 2007).

No Brasil, os custos para descarte e/ou reutilização de resíduos são elevados. Em um estudo realizado por Martins (2011), empregando um questionário estruturado, aplicado às empresas de pesca, habilitadas pelo Serviço de Inspeção Federal – SIF, nos cinco estados de captura mais expressiva do país, concluiu-se que, o beneficiamento, principalmente para obtenção de filés, é a atividade que mais gera resíduos. A remoção de resíduo das instalações representa custos em 83% das indústrias avaliadas; despesas com movimentação de resíduos influenciam o equilíbrio econômico em 44% das empresas; o armazenamento em câmara refrigerada (64%) e o transporte para descarte (32%) são considerados os principais componentes do custo de gestão de resíduos. Das indústrias que colaboraram com a pesquisa, 44% destinam seus resíduos para aterros e lixões públicos. O transporte do resíduo da empresa geradora até o local de descarte ou processamento apresenta um custo de R\$ 0,52 a cada t / km, excluídos impostos e seguro.

Assim, aproveitar os resíduos agroindustriais é uma forma eficiente de reduzir os impactos ambientais, além de gerar empregos e colaborar com o crescimento econômico (REBOUÇAS; CAVALCANTE, 2009). E a escolha da alternativa para o seu aproveitamento, tratamento e disposição, depende diretamente de sua composição química, da presença ou não de contaminantes e do seu estado físico (RIBEIRO et al., 2011).

2.2 Coprodutos de pescado

Os coprodutos de pescado são elaborados com o material que sobra do processamento, porém podem apresentar valor comercial semelhante ao do produto principal (HE; FRANCO; ZHANG, 2013), sendo, cada vez mais, vistos como um potencial recurso para obtenção de compostos de interesse nutricional, sendo necessário, portanto, que sejam investigados e caracterizados.

Devido à baixa lucratividade advinda do manejo dos resíduos do processamento, permanece a falta de interesse das indústrias em reaproveitá-los. Porém, a sua alta qualidade nutricional, e os impactos negativos ao ambiente são fatores que podem impulsionar as indústrias a voltarem seu interesse ao desenvolvimento de coprodutos de elevado valor agregado. REF

Quando o resíduo é gerado, o seu aproveitamento deve ser planejado, dessa forma é possível evitar desperdícios e diminuir a poluição ambiental, além de colaborar para o desenvolvimento sustentável através da criação de novas tecnologias (ANBE 2011; ESPINDOLA-FILHO, 1997).

As formas mais comuns para a utilização desses resíduos, em geral, são na fabricação de farinha de peixe, de óleo e na produção de silagem e adubo orgânico (ARVANITOYANNIS, 2008). Estes coprodutos nem sempre apresentam lucratividade, sendo interessante a utilização dos resíduos para a obtenção de coprodutos mais nobres ou verticais e com maior valor agregado.

Proteínas de subprodutos de pescado e de espécies subutilizadas são geralmente utilizados na produção de farinha e silagem, porém outras alternativas como a recuperação da proteína na forma de hidrolisados proteicos tem sido investigada (PIRES; CLEMENTE; BATISTA, 2012). A otimização da obtenção destes produtos possibilitará o fornecimento de matérias primas diferenciadas para diversos fins industriais.

Em um estudo sobre a qualidade química e nutricional de hidrolisados do processamento de pescado, Bechtel (2003) demonstrou que o teor de proteína do mesmo é geralmente superior a 50%. O elevado teor proteico obtido através do processo de hidrólise, bem como a geração de peptídeos bioativos e aminoácidos livres aponta para a utilização da proteína dos resíduos na forma deste subproduto que, por sua vez, pode exercer atividade antioxidante e antihipertensiva.

A atividade antioxidante de hidrolisados elaborados a partir de *loach fish* (*Misgurnus Anguillicaudatus*) foram determinadas e relacionadas ao grau de hidrólise por You et al. (2009), que, por sua vez, está diretamente relacionado às propriedades funcionais dos hidrolisados, uma vez que é este parâmetro que determina a intensidade da clivagem das cadeias de proteína (HE; FRANCO; ZHANG, 2013).

2.2.1 Hidrolisados químicos (Silagem)

Hidrolisado proteico é o produto obtido da quebra de ligações peptídicas das proteínas e sua transformação em peptídeos de diferentes tamanhos e pesos moleculares, bem como, aminoácidos livres. O primeiro foi produzido comercialmente em 1940 na Suécia, sendo que para o mesmo foi realizada uma hidrólise química (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

A quebra das ligações pode ser realizada quimicamente, utilizando ácido ou base ou biologicamente, utilizando enzimas (PASUPULETI; BRAUN, 2010). Neste processo a proteína é hidrolisada em peptídeos de diferentes pesos moleculares, sem controle da quebra e, conseqüentemente, do tamanho e funcionalidade dos peptídeos (SANMARTIN et al., 2009).

A silagem de pescado, constitui-se em um hidrolisado ácido, que apresenta baixo custo de investimento para sua produção, especialmente por não necessitar de equipamentos onerosos e de muita energia (FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2005). A silagem pode ser obtida pela ação de ácidos - silagem química, ou por fermentação microbiana induzida por carboidratos - silagem microbiológica (KOMPIANG, 1981) (FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2005). O princípio deste processo consiste na preservação da matéria orgânica, via acidificação, quando há

limitação do crescimento bacteriano e ocorre a liquefação gerada pela atividade enzimática (proteólise) (SHIRAI et al., 2001; GILDBERG, 2004).

Uma completa homogeneização é necessária e a biomassa obtida pode ser acondicionada em recipientes plásticos e estocada à temperatura ambiente (AMANCIO et al., 2010). Assim, a silagem química pode ser obtida pela adição dos ácidos orgânicos, fórmico e propiônico, ou minerais, clorídrico e sulfúrico, a serem utilizados separadamente ou em mistura, adicionados à massa de pescado.

A elaboração de silagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), através da acidificação da biomassa com 3% de ácido fórmico: propiônico, 1:1, adição do antioxidante BHT e manutenção do pH ao redor de 4,0 foi realizada por Ferraz de Arruda (2004) apresentando teores semelhantes ou maiores aos preconizados pelo padrão da FAO para todos os aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano. Os valores mais elevados encontrados foram para o ácido glutâmico, leucina e lisina. Os resultados indicam uma possível utilização da silagem, preparada a partir do resíduo de processamento da tilápia-do-Nilo, como fonte proteica na formulação de ração para peixes.

A silagem de vísceras de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) foi preparada por Hisano, Ishikawa e Portz (2012), com a utilização de diferentes proporções de ácido fórmico e ácido cítrico, a saber: 1:0,75; 0,75:1; 1:1,25 e 1,25:1, além do antioxidante, BHT a 0,02%. Após 30 dias, observou-se que todas as proporções dos ácidos (responsáveis pela estabilidade do pH 4) promoveram a obtenção de material estável sem diferirem entre si. Os resultados deste estudo permitiram concluir que a produção de silagem de vísceras de surubim com ácido cítrico e ácido fórmico é viável, e que esse coproduto ou ingrediente pode ser considerado uma fonte proteica alternativa e de elevado valor biológico.

Os principais interferentes na manutenção da qualidade da silagem são a oxidação lipídica e a logística de distribuição deste material, devido a sua elevada umidade e volume (FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2005). A separação das frações lipídica e aquosa aumenta a estabilidade dos coprodutos e provoca diminuição da umidade do material, aumentando a viabilidade de utilização da fração proteica. Sendo que a fração aquosa de silagem de sardinha, elaborada com ácido

cítrico, pode ser caracterizada como uma fonte de nitrogênio devido à presença de todos os aminoácidos, contudo, apresenta a necessidade de ser testada como meio de cultura microbiano (ANBE, 2011).

Foi realizada por Shirahigue et al. (2013) a investigação do aproveitamento dos resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e beijupirá (*Rachycentron canadum*), elaborando-se peptona a partir do fracionamento da silagem química. Para a elaboração das silagens, lotes contendo tecido muscular, cabeças, nadadeiras, carcaças e vísceras foram triturados e, em seguida, foi adicionado o antioxidante BHT (hidroxibutilanisol), dissolvido em álcool etílico (0,02g/100g). Foram testados dois tratamentos para as duas espécies: ácido cítrico + ácido fórmico (1:3), na relação de 3% (v/m) e ácido propiônico + ácido fórmico (1:3), na relação de 3% (v/m). O material foi centrifugado e fracionado, obtendo-se as frações aquosas, as quais foram liofilizadas para obtenção das peptonas, para utilização em meio de crescimento bacteriano.

2.2.2 Hidrolisados enzimáticos

A hidrólise enzimática se deve à ação de enzimas proteolíticas, as quais clivam a cadeia de aminoácidos em pontos específicos, gerando peptídeos e aminoácidos livres (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; SILVA, 2010). Essas enzimas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação: as endoproteases são responsáveis por clivar as ligações no interior das moléculas, produzindo peptídeos de cadeia relativamente grande, e as exoproteases são enzimas que removem aminoácidos das regiões N- e C- terminais, hidrolisando as ligações peptídicas terminais (CLEMENTE, 2000).

A hidrólise por enzimas proteolíticas específicas é um método que apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise química, como a especificidade em ligações peptídicas, o controle do grau de hidrólise e as condições moderadas de ação. Furlan e Oetterer (2002) também conferem ao processo de hidrólise enzimática a característica de ser mais simples e rápido.

Várias pesquisas têm sido realizadas em relação à avaliação das condições de hidrólise e às propriedades funcionais do hidrolisado proteico (SANTOS et al., 2009). De modo geral, a hidrólise é um processo com boa eficiência no requisito

solubilidade das proteínas do pescado, sendo que a produção de proteínas com boa solubilidade depende de alguns fatores como reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, temperatura, pH, tempo de incubação e concentração da enzima (CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; SALAS-MELLADO, 2009; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). A possibilidade de controlar o processo de hidrólise permite a obtenção de hidrolisados em diferentes graus e, consequentemente, com propriedades funcionais específicas. A seleção do substrato, da enzima, das condições de hidrólise e do grau de hidrólise afeta diretamente as propriedades funcionais e químicas do hidrolisado (SANTOS et al., 2009).

As enzimas que apresentam sua faixa ótima de trabalho em pH próximo à neutralidade têm sido usadas em preferência às enzimas ácidas, uma vez que o baixo pH gera efeitos indesejáveis ao hidrolisado, como a redução do teor proteico, queda no valor nutricional e excesso de hidrólise. As comumente utilizadas e que apresentam faixa de ação próximo à neutralidade são: alcalase, neutrase e *flavourzyme* (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Grande parte das enzimas que atuam em pH neutro são de origem microbiana, sendo que estas apresentam maior estabilidade e são consideradas mais eficientes (HERPANDI et al., 2011). A neutrase é uma protease que atua em condições neutras e é produzida a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Segundo Furlan e Oetterer (2002) a ação proteolítica enzimática é acelerada com controle do pH, da temperatura, do tempo e de outros fatores durante o processo. Por exemplo, o aumento do tempo promove maior quebra e diminuição do comprimento médio da cadeia de peptídeos na fração solúvel, assim como, a relação enzima/substrato. No entanto, o tempo de proteólise deve ser controlado, não podendo ocorrer em excesso, a fim de não formar peptídeos muito solúveis com características funcionais inadequadas, os quais podem conferir sabor amargo ao produto (ZAVAREZE et al., 2009).

Dessa forma, a hidrólise enzimática das proteínas para produção de hidrolisados permite a geração de um produto com maior controle da lise e maior especificidade, além de um controle otimizado da quebra das ligações peptídicas, que se baseia na escolha da enzima adequada para o processo, sendo que hoje

estão disponíveis no mercado diversas enzimas de diferentes fontes (animal, vegetal e microbiana (PASUPULETI; BRAUN, 2010) e que podem ser empregadas com a finalidade de remover aminoácidos das extremidades N ou C (SANMARTIN et al., 2009).

Assim, o uso de enzimas no processo de hidrólise proteica permite melhor controle do grau de clivagem das proteínas no substrato, por meio da desativação enzimática pelo aquecimento, com controle das proporções adequadas de enzima/substrato e do tempo de reação ideal, para que haja a produção de hidrolisados com distintas estruturas moleculares, bem como, obtenção de distintas propriedades funcionais, podendo ser aplicadas em formulações alimentícias (SANTOS et al., 2009).

Os hidrolisados proteicos consistem em um produto líquido, o que dificulta o transporte e o armazenamento, sendo altamente perecíveis. Para solucionar esse problema, os hidrolisados podem ser submetidos ao processo de centrifugação, onde resultam três fases: semi-sólida ou fase insolúvel; fase líquida ou fase solúvel e a fração superior, sobrenadante (CHO et al., 2008). Na fração superior encontram-se os lipídios e na fração solúvel estão presentes as proteínas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres (BOMBARDELLI; SYPERRECK; SANCHES, 2005). A posterior desidratação da fração solúvel, rica em proteínas, gera um produto concentrado em proteínas e peptídeos, que apresenta funcionalidade. O teor de proteínas presente nesta fração pode chegar a 90% (FURLAN; OETTERER, 2002; SILVA, 2010).

O processo enzimático de hidrólise apresenta muitas vantagens (Tabela 1) que são promissoras para a produção de hidrolisado proteico de pescado. Este processo é dividido em três etapas: pré-tratamento, hidrólise e recuperação.

Tabela 1 - Processo de hidrólise do pescado-vantagens e desvantagens

Método	Vantagens	Desvantagens
Processo químico (ácido ou básico)	Alta recuperação de proteína Tempo de processamento curto Processo com baixo custo	Hidrolisados heterogêneos Amargor Pouca funcionalidade Alto teor de sais Corrosão dos equipamentos Controle da reação dificultado Formação de substância tóxica
Processo enzimático	Hidrolisados com menos amargor Alta funcionalidade e valor nutricional Baixo teor de sais Possibilita o controle do processo Hidrolisados homogêneos	Processo com custo elevado Processo mais trabalhoso

Fonte: Adaptado de He et al. (2013)

Para a hidrólise enzimática das proteínas, diversas enzimas podem ser aplicadas; a alcalase é comumente indicada para obtenção de hidrolisados com características sensoriais desejadas, com ausência de cheiro desagradável, sendo de funcionalidade alta (SILVA, 2010).

A seleção da enzima é essencial para a obtenção dos atributos funcionais do hidrolisado proteico, pois as enzimas que apresentam seu ponto ótimo de atuação em um pH ácido, como a pepsina, apresentam, como vantagem, a inibição do crescimento microbiano, porém o pH ácido leva à diminuição na recuperação proteica e menor valor nutricional, sendo que a hidrólise intensa leva à diminuição na funcionalidade do hidrolisado (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Enzimas com um ótimo de atividade em pH neutro, como a neutrase, tem sido amplamente utilizada por promoverem a hidrólise controlada, gerando hidrolisados com propriedades funcionais apreciadas.

Em comparação às enzimas de origem animal ou vegetal, as de origem microbiana apresentam diversas vantagens, incluindo estabilidade de pH e temperatura. As enzimas microbianas apresentam um ótimo de atividade em pH 7,0,

têm se mostrado mais eficientes na hidrólise de proteínas de pescado (HERPANDI et al., 2011).

Estudos ainda demonstram que a utilização da alcalase na elaboração de hidrolisados da mesma espécie de pescado resulta em hidrolisados com maior atividade antioxidante, quando comparados aos obtidos com outras enzimas (SARMADI; ISMAIL, 2010). No entanto, outras funcionalidades podem ser adquiridas, sendo que a relação enzima/funcionalidade do hidrolisado ainda não está bem determinada.

A eficiência da hidrólise enzimática é indicada pelo grau de hidrólise (GH), que pode ser definido como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas ao longo da reação (ADLER-NISSEN, 1979). O GH é considerado o principal indicador da hidrólise enzimática (HE; FRANCO; ZHANG, 2013), e está relacionado à funcionalidade dos hidrolisados proteicos, sendo que o seu aumento pode levar ao prolongamento da capacidade emulsificante e de absorção de óleo.

Os hidrolisados proteicos podem ser utilizados para aumentar ou modificar as propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas, como a solubilidade, absorção de óleo, propriedades emulsificantes e, ainda, melhorar as propriedades sensoriais, sem perder o seu valor nutricional (KRINSTINSSON; RASCO, 2000 (PANYAM; KILARA, 1996; HE; FRANCO; ZHANG, 2013). As propriedades funcionais os tornam interessantes aditivos em alimentos, servindo como um veículo para o consumo de peptídeos bioativos. Por apresentarem solubilidade em uma ampla faixa de pH podem ser adicionados em sistemas alimentícios com diferentes condições.

2.2.3 Peptídeos biologicamente ativos

A importância das proteínas e de seus aminoácidos essenciais na saúde já é bem documentada. Recentemente tem sido relatada a importância não apenas das proteínas, mas também de seus peptídeos hidrolisados. A hidrólise proteica leva a geração de fragmentos específicos que podem apresentar elevada funcionalidade em sistemas alimentares e também farmacêuticos. A maneira mais comum para a

produção destes peptídeos é através da hidrólise enzimática de proteínas nativas (MÖLLER et al., 2008).

Os peptídeos biologicamente ativos são inativos dentro da cadeia de proteína, sendo liberados através da hidrólise enzimática *in vivo* por enzimas digestivas no trânsito gastrointestinal, ou *in vitro*, na hidrólise enzimática através de proteases específicas. Estes peptídeos têm sido descritos como fragmentos específicos de proteínas, que apresentam impacto positivo sobre as funções do organismo, influenciando de forma benéfica a saúde (KITTS; WEILER, 2003).

Os peptídeos bioativos obtidos pelo processo de hidrólise são fragmentos proteicos que, além de atuarem como fonte de aminoácidos, possuem inúmeras funções fisiológicas em potencial, incluindo atividades antioxidante, imunomodulatória, antibacteriana, antitrombótica e anti-hipertensiva (MURRAY e FITZGERALD, 2007). O tipo de peptídeo bioativo a ser gerado de uma fonte proteica em particular depende da sequência primária da proteína em questão e da especificidade da enzima a ser utilizada (HARNEDY e FITZGERALD, 2012). Além disso, a escolha cuidadosa de condições como temperatura, pH e controle de tempo de hidrólise é crucial para a obtenção de hidrolisados com as propriedades bioativas e funcionais desejáveis (SARAMANAYAKA e LI-CHAN, 2011; TAHERI et al., 2013).

As propriedades antioxidantes e anti-hipertensiva vem sendo foco das pesquisas na área de peptídeos biologicamente ativos. Hidrolisados de subprodutos de organismos aquáticos são apontados em pesquisas por apresentarem potencial propriedade antioxidante (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008).

A aplicação destes peptídeos biologicamente ativos pode ser realizada na forma de hidrolisados proteicos ou ainda como peptídeos ativos isolados. Nos hidrolisados, os peptídeos encontram-se juntamente a aminoácidos livres e demais cadeias peptídicas, já em sua forma isolada encontram-se apenas as sequências específicas de aminoácidos purificados a partir dos hidrolisados (SARMADI; ISMAIL, 2010). Segundo Pappenheimer e Volp (1992), a utilização de hidrolisados apresenta benefícios em relação a de peptídeos purificados, uma vez que nos hidrolisados há presença de açúcares e aminoácidos que facilitam a absorção destes peptídeos.

Além disso, a utilização de hidrolisados em preferência a peptídeo isolados tem mostrado maior atividade antioxidante (CHEN et al., 1996).

2.2.4 Peptídeos antioxidantes

As pesquisas e indústrias farmacêuticas concentram grandes esforços sobre o mecanismo de oxidação, pois estes processos são a principal causa da diminuição da vida útil de alimentos e matérias-primas em geral, bem como, são os grandes responsáveis pelo envelhecimento dos organismos vivos. Os antioxidantes são utilizados com intuito de retardar a oxidação lipídica e a formação de seus produtos secundários, auxiliando também na manutenção da funcionalidade proteica, através da redução da sua oxidação (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008).

A reação de oxidação se inicia através dos radicais livres, que são espécies altamente reativas por apresentarem um desequilíbrio de elétrons. No início da reação há formação de substâncias reativas ao oxigênio (ROS), que estão envolvidas na ocorrência de uma série de doenças crônicas, cardiovasculares e câncer (DONG et al., 2008), além da considerável diminuição da qualidade em alimentos. Esses radicais são naturalmente gerados no corpo de organismos aeróbicos durante a respiração, e também, através da oxidação de óleos e gorduras durante a estocagem, diminuindo consideravelmente a qualidade dos alimentos (KRISTINSSON; RASCO, 2000; SARMADI; ISMAIL, 2010).

Em condições normais, o sistema de defesa do corpo consegue remover as substâncias reativas por meio de antioxidantes enzimáticos (superóxido desmutase) e não enzimáticos (vitaminas e cofatores). Em certas circunstâncias o sistema endógeno pode falhar na defesa e gerar um acúmulo de moléculas altamente reativas (SARMADI; ISMAIL, 2010). Isso leva à necessidade da utilização de antioxidantes sintéticos e naturais que previnem o estresse oxidativo e os seus efeitos deteriorantes.

Os antioxidantes sintéticos, como o BHT- Butil hidroxi tolueno e BHA - Butil hidroxi anisol, apresentam alta eficiência e custo-benefício, porém podem apresentar toxicidade e promover efeitos danosos ao organismo (ITO; FUKUSHIMA; TSUDA, 1985). Devido ao conhecimento sobre essa repercussão negativa, os antioxidantes

de fontes naturais têm sido foco de muitas pesquisas, que os apontam como mais eficientes e que geram pouco ou nenhum efeito negativo sobre o corpo. Como exemplos, a catequina, tocoferóis, ascorbato e diversos extratos fenólicos de plantas são utilizados na indústria de alimentos (ZHU et al., 2008). Além disso, inúmeros peptídeos de ingredientes proteicos têm apresentado capacidade antioxidante (MARCUSE, 1960).

Peptídeos antioxidantes de fontes alimentares contém resíduos de 15 a 16 aminoácidos (CHEN et al., 1996) e são considerados compostos seguros, com baixo peso molecular, baixo custo, alta atividade e fácil absorção. Por possuírem estrutura mais simples e serem mais estáveis, eles apresentam vantagem em relação aos antioxidantes enzimáticos, além de juntamente as suas propriedades antioxidantes apresentarem propriedade nutricionais e funcionais.

Foh et al. (2010), encontraram peptídeos com elevada funcionalidade antioxidante em hidrolisados elaborados a partir de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio a utilização de alcalase, *flavourzyme* e neutrase. Taheri et al. (2013) por outro lado tiveram como foco de sua pesquisa a comparação de propriedades funcionais de hidrolisados elaborados com alcalase através de subprodutos de truta (*Onchorhynchus mykiss*) e de frango. Estes autores encontraram para o hidrolisado de truta, elevada capacidade e estabilidade emulsificante, alta solubilidade e propriedades anti-hipertensivas, sendo estes resultados superiores aos reportados para os hidrolisados de frango.

As propriedades antioxidantes encontradas para os peptídeos estão diretamente relacionadas com a sua composição e estrutura. Os aminoácidos tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteína e histidina são exemplos de aminoácidos que podem promover atividade antioxidante. Aminoácidos com anéis aromáticos podem doar prótons para radicais com desbalanço de elétrons. Além da presença de aminoácidos específicos, sua posição correta na cadeia de peptídeos exerce importante papel na atividade antioxidante (CHEN et al., 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e transporte da matéria prima

A matéria prima utilizada para obtenção dos hidrolisados proteicos constituiu-se dos descartes do processamento de filetagem da tilápia (*Oreochromis niloticus*), provenientes de unidade de beneficiamento de pescado, localizada na cidade de Sumaré-SP. As amostras de carcaças após retirados os filés foram coletadas em caixas isotérmicas e transportadas até a planta piloto de processamento do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizada a 20km do frigorífico. Em seguida, a carcaça foi seccionada em cabeças, vísceras e espinhaço. As cabeças foram trituradas em moedor/picador de carnes marca CAF, 106 BT parcial inox e motor de 3 CV. As amostras já trituradas foram acondicionadas em sacos plásticos, sendo acomodadas e intercaladas com gelo em caixas térmicas com tampa e em seguida transportadas ao Laboratório de Pescado localizado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, Piracicaba – SP. A seguir foram mantidas a -18°C até o seu uso para caracterização e elaboração dos hidrolisados.

As enzimas utilizadas para a hidrólise foram fornecidas pela Prozyn Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil). Foram utilizadas as enzimas: neutrase (Protemax NP800), um preparado a base de protease neutra produzida por uma cepa de *Bacillus amylolyquefaciens*, que se apresenta na forma de pó de cor bege. papaína (BRAUZYNN 100), uma preparação a base de protease vegetal que se apresenta na forma de pó e possui fácil manipulação e solubilidade em água. Pepsina 1:1000 marca Inlab, e apresenta-se a forma de pó cor âmbar. As enzimas foram armazenadas em local seco e arejado, ao abrigo do sol e em temperatura ambiente.

3.2 Caracterização da matéria prima

A caracterização da matéria prima foi realizada através das análises de composição centesimal, sendo elas: **a) umidade**: determinada por perda de peso da amostra em estufa a 105° C, até peso constante (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985); **b) proteína bruta**: através da determinação do nitrogênio total, pelo método de Microkjeldahl e conversão em proteína, multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25 (JOHNSON; ULRICH, 1974); **c) cinza**: determinada por calcinação da matéria orgânica em forno mufla a 550° C (PREGNOLATTO;

PREGNOLATTO, 1985); **d) lipídeos totais**: determinados através do método de *Soxhlet*, utilizando amostra seca e hexano como solvente extrator (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.3 Elaboração dos hidrolisados proteicos

A matéria-prima, 250g, foi homogeneizada em 250mL de água destilada (1:1) com o auxílio de triturador doméstico, da marca comercial Walita até a formação de massa homogênea e, a seguir, distribuídos em *erlenmeyers*, os quais foram imersos em “banho”, marca Tecnal, modelo TE093, a 85°C, por 20 min, para promover a pasteurização e inativação de enzimas endógenas (GUERARD et al., 2001). A partir deste material foram elaborados diferentes tratamentos (Tabela 2). Posteriormente, procedeu-se à pré incubação das amostras nas condições ótimas de temperatura de atuação, ajuste do pH em “banho-maria”, através de potenciômetro digital, marca Digimed. Para ótima atividade enzimática foram utilizados os parâmetros estipulados pelas fichas técnicas dos fornecedores. O ajuste das condições ótimas para atuação de cada enzima, a saber, a) neutrase- Neutrase NP 800 = 60°C e pH 7; b) papaína- Papaína 100 = 70°C e pH 6 e c) Pepsina = 30°C e pH 2, foram realizados através da adição de HCl ou NaOH.

Uma vez ajustados a temperatura e o pH, adicionou-se as enzimas, na proporção de 1% em relação à quantidade de proteína da amostra para todos os tratamentos. Os parâmetros temperatura e pH foram monitorados ao longo do experimento (potenciômetro digital, Digimed). Ao atingirem o tempo de hidrólise pré-determinado, os tratamentos foram submetidos à temperatura de 80°C durante 10 min para desativação das enzimas.

Tabela 2 - Tratamentos enzimáticos para hidrólise proteica

Tratamento	Descrição
T1	Neutrase 30 minutos
T2	Neutrase 60 minutos
T3	Neutrase 120 minutos
T4	Papaína 30 minutos
T5	Papaína 60 minutos
T6	Papaína 120 minutos
T7	Pepsina 30 minutos
T8	Pepsina 60 minutos
T9	Pepsina 120 minutos

Os hidrolisados foram elaborados, em triplicata, para cada um dos três tempos e das três enzimas, resultando em um total de 27 hidrolisados. Após a finalização da hidrólise e inativação enzimática, as amostras foram transferidas para béqueres de 1000 mL, onde permaneceram por alguns minutos para o resfriamento. Foram, a seguir, submetidos ao fracionamento em três fases: sólida, líquida (hidrolisado propriamente dito) e lipídica, segundo método descrito por Dumay et al. (2006). Realizou-se a centrifugação (centrífuga refrigerada 5810 R Eppendorf) a 5000xg, 0 °C e durante 10 minutos. Das três fases obtidas, a fase líquida foi distribuída em placas de *Petri*, e estas congeladas a -18°C até o momento da liofilização.

A fração líquida (hidrolisado proteico) foi liofilizada por, aproximadamente, 48 horas em liofilizador L101 da marca Lioptop, e mantida sob congelamento a -18°C. As amostras liofilizadas foram armazenadas em sacos plásticos, embaladas a vácuo e transportadas ao Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA), Lisboa – Portugal, onde foram mantidas sob congelamento até proceder-se às análises para caracterização das mesmas, em duplicata, para cada um dos 27 hidrolisados elaborados.

3.4 Análise de rendimento

O rendimento das frações foi calculado em porcentagem. As amostras foram pesadas antes e depois do fracionamento, bem como, as diferentes fases, individualmente, para cálculo do rendimento. Os cálculos foram feitos em relação ao

peso do hidrolisado e expressos em porcentagem de sedimentado, de fração lipídica e de fração aquosa.

O rendimento de liofilização foi calculado, através do quociente entre o nitrogênio total obtido no hidrolisado e o nitrogênio total da amostra. Para isso utilizou-se a equação: $\text{Rendimento} = (\text{mH}) \times (\text{PH}) \times 100 / (\text{m}) \times (\text{P})$, onde: mH = massa do hidrolisado seco, PH = teor de proteína do hidrolisado seco, m = massa de material usada na preparação do hidrolisado e P = teor de proteína do material utilizado na preparação do hidrolisado. O rendimento foi expresso em porcentagem.

3.5 Caracterização dos hidrolisados proteicos

3.5.1 Composição em umidade, proteína e cinza

As análises foram realizadas em duplicata para todos os hidrolisados elaborados. A umidade foi determinada por perda de peso da amostra em estufa a 105° C, até peso constante (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985). O Teor de cinza foi determinado por calcinação da matéria orgânica em forno mufla a 550° C (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985; WINTERS; TENNYSON, 2005); e proteína foi determinada utilizando o analisador de nitrogênio FP-528 LECO (LECO, St Joseph, MI, USA) calibrado com ácido etileno-diamino-tetracético, de acordo com metodologia descrita por Dumas (GOUPY; SAINT-DENIS, 2004).

3.5.2 Grau de hidrólise

A determinação do grau de hidrólise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nielsen et al., (2001), onde 3 mL de solução de O-ftal-dialdeído (OPA) foram adicionados a 400 µL (40mg/mL) de amostra, submetidos à agitação em *vortex* Modelo Reax, marca Heidolph por 5 seg e, após 2min, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 340nm. O branco foi preparado da mesma forma, porém em vz de amostra utilizou-se água destilada. Foi preparada também uma solução de serina a 0,1mg/mL. O grau de hidrolise foi então calculado através da expressão:

$$\text{DH}(\%) = \frac{[\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}]}{[\text{Abs serina} - \text{Abs branco}]} \times \frac{[0,9516 \times 10]}{[W \times N \times 6,25]} - 0,4 \times \frac{100}{8,6}$$

Onde: w é o peso em gramas do hidrolisado e N é o total de nitrogênio da amostra.

3.5.3 Distribuição de peso molecular

O peso molecular dos hidrolisados proteicos foi avaliado através de cromatografia líquida de filtração em gel, em um cromatógrafo FPLC (*Fast protein liquid chromatograph*), modelo AKTA (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). A coluna utilizada foi a *Superdex Peptide 10/300 GL* com detector de UV a 254 nm e 280 nm. O eluente utilizado foi a acetonitrila 30% com 0,1% de ácido trifluoroacético com uma taxa de eluição de 0,5 ml/ min. A curva de calibração para pesos moleculares foi preparada utilizando os seguintes padrões: ribonuclease A (13 700 Da), aprotinina (6500 Da), angiotensina I (1296 Da) e triptofano (204 Da).

3.6 Atividade antioxidante

3.6.1 Método do radical DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

O efeito do sequestro de radical no radical livre 1 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi medido por espectrofotometria pelo método de Shimada et al. (2001) com algumas modificações descritas por Picot et al. (1992). Foram preparadas soluções de hidrolisado em concentrações crescentes de 2 a 20mg/mL, sendo essas adicionadas a 1mL da solução de DPPH (0,1mM) agitadas em vortex Modelo Reax, marca Heidolph, incubadas no escuro, por uma hora, à temperatura ambiente, centrifugadas a 10000g por 10 min e, então, lidas em espectrofotômetro a 517nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição, que foram calculadas conforme a equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs branco}} \times 100$$

A concentração que exibe 50% de inibição dos radicais (EC50) foi estimada através da equação da reta obtida da curva de inibição das diferentes concentrações de hidrolisado, sendo substituído o valor de inibição por 50 para obtenção da concentração.

3.6.2 Método do radical ABTS- 2,2- azino-bis- (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O efeito de sequestro de radical no radical livre 2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico-ABTS) foi medido por espectrofotometria pelo método descrito por Re et al. (1999). Foram preparadas soluções de hidrolisado em

concentrações crescentes (2 a 20mg/mL), sendo essas adicionadas a 1mL da solução de ABTS (abs 0,700+/- 0,020) agitadas em *vortex* Modelo Reax, marca Heidolph, incubadas no escuro por 6 min à temperatura de 30°C, e então lidas em espectrofotômetro a 517nm. Os resultados em porcentagem de inibição foram calculados de acordo com a equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs branco}} \times 100$$

A concentração que exhibe 50% de inibição dos radicais (EC50) foi estimada através da equação da reta obtida da curva de inibição das diferentes concentrações de hidrolisado, sendo substituído o valor de inibição por 50 para sua obtenção.

3.6.3 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do Software SAS. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a fim de observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como método de pesquisa foram comparados os diferentes tempos de hidrólise de cada enzima empregada, e também as diferentes enzimas para o mesmo tempo como, por exemplo, comparar neutrase nos tempos de 30, 60 e 120 min e, posteriormente, comparar 30 min para neutrase, papaína e pepsina. Para isso, as condições de atuação da enzima, ou seja, temperatura e pH e concentração, foram escolhidas de acordo com a melhor condição descrita pelo fabricante. O tempo de hidrólise para a enzima neutrase foi selecionado com base em um estudo anteriormente realizado por Shirahigue (2013), onde se concluiu que a eficiência de hidrólise para esta enzima se deu em duas horas, sendo, portanto, o maior tempo empregado neste experimento. A condição do tempo foi fixa para todas as enzimas, uma vez que o objetivo foi comparar as diferenças entre elas nas mesmas condições.

Dieterich (2014), na avaliação da hidrólise de fígado suíno e resíduos do processamento de tilápia, utilizou a enzima papaína por um tempo de 60 min. Nazeer, Sampath Kumar e Jai Ganesh (2015), utilizaram a enzima pepsina por 2h30 min na hidrólise da corvina ou *yellow fin* (*Otolithes ruber*), sendo realizado neste estudo a avaliação *in vivo* da atividade antioxidante de peptídeos. Estudos recentes têm utilizado as enzimas e condições semelhantes às selecionadas para o presente trabalho.

4.1 Composição centesimal da matéria prima utilizada

A composição centesimal das cabeças de tilápia, em g.100g^{-1} de matéria seca, apresentou $63,6 \pm 1,11$ de umidade; $7,41 \pm 0,16$ de cinza; $12,56 \pm 0,35$ de proteína e $14,20 \pm 0,15$ de lipídeos. Stevanato et al. (2007) utilizaram cabeças de tilápia para a elaboração e caracterização de farinha, encontrando para a matéria prima 67% de umidade, 6% de cinza, 16% de proteína e 10% de lipídeos. Estes resultados apresentam algumas diferenças em relação aos deste trabalho, que podem ser atribuídas à variação do tipo de alimentação, época do ano e sexo (SALES, 1995; SHARDA; MAHAN; WILSON, 1976; TATTERSON; WINDSON, 1974). De acordo com Ogawa e Koike (1987), o teor de umidade em peixes varia de 70% a 85%. O valor encontrado neste estudo foi de 63,6%, inferior ao encontrado por Visentainer et al. (2003), que encontraram 73,15% de umidade para cabeças de tilápia.

Diversos estudos vêm sendo realizados para elaboração de hidrolisados proteicos, sendo que, em sua maioria, a matéria utilizada é o músculo do pescado (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2009; ZHU et al., 2008; YARNPAKDEE; BENJAKUL; KRISTINSSON, 2012; DONG et al., 2008; NAKAJIMA; STARK; OGUSHI, 2009). As cabeças representam, aproximadamente, 37% do resíduo total do processamento da tilápia e diferente da carne aderida à musculatura, apresenta ainda pouco destino e reutilização, sendo esta uma das justificativas para a sua seleção como matéria prima para este estudo. Simões et al. (2007), encontraram rendimento de 29% para as cabeças de tilápia do Nilo, valor inferior ao encontrado neste trabalho. Gaya, (2014) na elaboração de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) encontrou 36,3% de rendimento para as cabeças de corvina.

4.2 Processo de hidrólise e rendimento de frações

A hidrólise proteica das cabeças de tilápia levou à formação de um produto líqüefeito, apresentando coloração marrom clara e aroma suave (Figura 1).

Pode-se observar que para todas as enzimas e todos os tempos de hidrólise, a fração aquosa apresentou-se superior a 60%, conforme apresentado nas Figuras 2 a 4. Na fração aquosa encontram-se os peptídeos e aminoácidos livres (BOMBARDELLI; SYPERRECK; SANCHES, 2005), sendo a fração de interesse no presente estudo. As porcentagens de fração aquosa variaram de 61 a 75%, tendo-se obtido a quantidade mais elevada no hidrolisado com pepsina, durante 60 min, e o menor, com papaína após 60 min.

A porcentagem da fração lipídica variou de 8 a 21%, apresentando a fração obtida com neutrase, após 120 min, o maior valor; sendo o menor, da pepsina, após 60 min de hidrólise. A variação da porcentagem de sedimentos situou-se de 15 a 27%, sendo a menor obtida com neutrase, 30min e a maior com papaína, 60min.

Figura 1 - Hidrolisados líquidos e detalhe, após término da hidrólise

Figura 2 - Frações, em porcentagem, obtidas após centrifugação do material hidrolisado para os tratamentos 1, 2 e 3 (neutrase)

Figura 3 - Frações, em porcentagem, obtidas após centrifugação do material hidrolisado para os tratamentos 4,5 e 6 (papaína)

Figura 4 - Frações, em porcentagem, obtidas após centrifugação do material hidrolisado para os tratamentos 7,8 e 9 (pepsina)

4.3 Rendimento da Liofilização

O rendimento da liofilização, expresso em porcentagem, leva em consideração os volumes utilizados, bem como, a quantidade de proteína. A eliminação da água concentra o hidrolisado e faz com que o rendimento em peso seja baixo, e os teores proteicos elevados. Não houve diferença significativa entre os diferentes tempos para o tratamento com neutrase. Para o tratamento com a enzima papaína, ocorreram diferenças significativas entre os tempos 60 e 120 min e 30 e 120 min, sendo os tempos 30 e 60 min iguais e o maior rendimento obtido de 34%, no tempo de 120 min. Para o tratamento com a enzima pepsina, os tempos de 60 e 120 min foram significativamente iguais, já o tempo de 30 min diferiu, significativamente, dos demais e o maior rendimento obtido foi de 26% no tempo de 120 min.

Para o tempo de 30 min, não houve diferença significativa entre o rendimento das enzimas neutrase e papaína, porém a enzima pepsina diferiu significativamente das demais, apresentando resultado inferior, 17%. Para o tempo de 60 min o rendimento das enzimas neutrase e pepsina foram significativamente iguais; já o rendimento da enzima papaína foi significativamente inferior, 18%. Para o tempo de hidrólise de 120min os rendimentos das enzimas neutrase e pepsina foram significativamente iguais, porém o rendimento da enzima papaína foi significativamente superior (34%) aos demais tratamentos.

Tabela 3 - Rendimento (em porcentagem) da liofilização das amostras

Tempo (min)	Enzimas		
	Neutrase	Papaína	Pepsina
30	22,50 ^a	22,59 ^a	17,61 ^b
60	24,80 ^a	18,26 ^{ab}	25,61 ^a
120	25,42 ^a	33,51 ^c	25,88 ^a

Rendimento médio do processo de liofilização das amostras.

Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Santos (2011), na elaboração de hidrolisados proteicos a partir de subprodutos de sardinha (*Sardina pilchardus*) com a utilização de neutrase obteve rendimento médio de proteína no hidrolisado líquido de 21,8% e 10 % no hidrolisado em pó. No presente trabalho pode-se observar maior rendimento para os maiores tempos de hidrólise e, na maioria dos tratamentos, valores superiores aos relatados por este autor. Uma vez que o objetivo do trabalho é recuperar a qualidade nutritiva e funcional, um aumento no rendimento é desejável. A metodologia aplicada no presente trabalho utilizou a inativação de enzimas endógenas por meio de aquecimento (85°C por 20 min) anteriormente ao processo de hidrólise. Batista et al. (2009), realizaram processos de hidrólise com sardinha crua e cozida, sem realizar a inativação de enzimas endógenas antes de iniciar o processo de hidrólise, pois estes relatam que o pré-aquecimento dos subprodutos, mesmo em condições suaves, pode levar à desnaturação das proteínas, dificultando a ação enzimática.

4.4 Composição centesimal dos hidrolisados

A composição centesimal dos hidrolisados obtidos com as diferentes enzimas e tempos de hidrólise encontra-se na Tabela 4. A composição centesimal da matéria-prima foi de 63,6% de umidade, 12,6% de proteína e 7,41% de cinza. A composição de umidade da matéria prima diferiu significativamente de todos os hidrolisados, sendo que no processo de liofilização ocorre a eliminação quase total da água. A umidade dos hidrolisados elaborados a partir das enzimas neutrase, papaína e pepsina não apresentou diferença significativa entre os tempos de hidrólise. Para os tempos de tratamento de 30 e 60 min, os hidrolisados elaborados a partir de neutrase e papaína não apresentaram diferenças significativa entre eles,

já o hidrolisado elaborado com pepsina apresentou umidade significativamente maior que os demais. Para o tempo de 120 min a umidade de todos os hidrolisados foi significativamente igual. O menor valor de umidade, 7,3% foi encontrado para o tratamento com a enzima neutrase no tempo de 30 min; já o maior valor, 11,20%, foi observado no tratamento com pepsina a 60 min. Amiza, Ow e Faaz (2013) elaboraram hidrolisados proteicos a partir de *Pangasius sp.* através da utilização de alcalase, sendo que, os autores obtiveram 3 hidrolisados com 3 graus de hidrólise diferentes. Para o grau de hidrólise de 43%, a umidade do hidrolisado foi de 4%, para o grau de hidrólise 55%, a umidade foi de 6% e para o grau de hidrólise de 68% foi de 5,6%. Os resultados observados por esses autores foram inferiores aos observados no presente trabalho. O hidrolisado líquido apresenta desvantagem, devido ao seu transporte e vida útil, em relação ao hidrolisado seco (NUNES; OGAWA, 1999; HE; FRANCO; ZHANG, 2013).

O teor de proteína dos hidrolisados foi significativamente superior ao encontrado na matéria prima. Um produto hidrolisado é um concentrado proteico (OETTERER, 2002). Para o tratamento com as enzimas neutrase e papaína, não ocorreram diferenças marcantes na composição proteica entre os diferentes tempos e enzimas, sendo apenas o tratamento com a enzima papaína, por 30 min, significativamente menor em composição proteica que os demais. O maior teor encontrado foi para o tratamento com papaína a 60 min (85,91%), e o menor para pepsina por 30 min, 62,60%. O tratamento com a pepsina foi o que apresentou os menores teores proteicos, sendo que não houve diferença significativa entre a composição proteica nos diferentes tempos de hidrólise. Amiza et al. (2013) encontraram valores, de cerca de 35 % de proteína para hidrolisados de *Pangasius sp.* em diferentes graus de hidrólise, com alcalase. Neves et al. (2003) trabalharam com a caracterização de hidrolisados enzimáticos elaborados com utilização de sistemas sequenciais de duas enzimas com especificidades diferentes, de modo que, pelo menos uma delas fosse específica para aminoácidos aromáticos (pepsina, bromelina e α -quimotripsina) e a outra, com menor especificidade. O objetivo do trabalho foi obter hidrolisados com peptídeos de tamanho pequeno e aminoácidos livres, para utilização em pacientes com dificuldades em digerir proteína. Nesse estudo foram encontrados teores de proteína muito semelhantes aos encontrados no presente trabalho (75 a 81%). Zavazare et al. (2009) encontraram teores de proteína de 87,84% (alcalase), 92,39 % (*flavourzyme*) e 90,53% (*novozyn*) para hidrolisados

de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas.

O teor de cinza encontrado para a matéria prima é elevado, uma vez que consiste de material composto por tecido ósseo. Nos hidrolisados pode-se observar uma diminuição no teor de cinza, que pode ser justificado pela eliminação da parte sólida no processo de separação de frações. A composição da matéria prima é estatisticamente igual ($p < 0,05\%$) aos tratamentos para neutrase por 30 e 60 minutos e para papaína por 120 minutos. Nos demais tratamentos a matéria prima diferiu significativamente. No tratamento com neutrase o teor de cinza para os tempos de hidrólise não apresentou diferenças marcantes, da mesma forma para a enzima papaína. Por outro lado, no tratamento com a enzima pepsina, o teor de cinza para o tempo de hidrólise de 120 min foi estatisticamente maior em relação ao tempo de 30 min. O tratamento com pepsina foi, significativamente, superior aos demais tratamentos. A condição de hidrólise para as enzimas neutrase e papaína ocorreu em pH neutro, uma vez que a hidrólise com pepsina necessitou da adição de ácido para a diminuição do pH e alcance da faixa ótima de atuação. A maior concentração de cinzas verificada nos hidrolisados é decorrente do ajuste do pH e adição de ácido e posteriormente NaCl para a neutralização. Elevados teores de cinza foram encontrados por Neves et al., 2004 (10,7 a 18,7%), sendo decorrente da formação de NaCl em razão do ajuste do pH durante a hidrólise enzimática das proteínas. Elevados teores de minerais também foram encontrados por Amiza et al., 2013 (4,45%), esses autores relacionam o aumento do grau de hidrólise e conteúdo de minerais ao proporcional aumento da adição de NaOH. Segundo Marquez et al., 2004, a elevada concentração de cinzas verificada nos hidrolisados das espécies maria-luiza (*Paralanchurus brasiliensis*) e perna-de-moça (*Cynoscion* sp), de 10,7 e 18,7%, foi decorrente da formação de NaCl em razão do ajuste do pH durante a hidrólise enzimática das proteínas.

Tabela 4 - Composição em umidade, proteína e cinza dos hidrolisados para as diferentes enzimas e tempos de hidrólise (g/100g)

Tempo (min)	Enzimas								
	Neutrase			Papaína			Pepsina		
	Umidade	Proteína	Cinza	Umidade	Proteína	Cinza	Umidade	Proteína	Cinza
30	7,30 ($\pm$ 0,69) ^b	84,48 ($\pm$ 0,37) ^a	5,87 ($\pm$ 0,10) ^{cd}	7,81 ($\pm$ 2,11) ^b	70,02 ($\pm$ 2,38) ^c	4,36 ($\pm$ 0,18) ^c	11,15 ($\pm$ 2,27) ^{bc}	62,60 ($\pm$ 2,13) ^d	14,93 ($\pm$ 2,28) ^{ba}
60	7,58 ($\pm$ 0,63) ^b	84,84 ($\pm$ 0,49) ^a	5,78 ($\pm$ 0,47) ^{cd}	10,49 ($\pm$ 1,78) ^{bc}	85,91 ($\pm$ 1,42) ^a	4,60 ($\pm$ 0,34) ^c	11,20 ($\pm$ 3,07) ^{bc}	64,33 ($\pm$ 1,36) ^{cd}	15,80 ($\pm$ 1,87) ^a
120	8,59 ($\pm$ 0,33) ^b	81,95 ($\pm$ 3,23) ^a	4,90 ($\pm$ 0,10) ^c	8,24 ($\pm$ 1,32) ^{bc}	60,04 ($\pm$ 6,04) ^d	5,15 ($\pm$ 0,09) ^c	8,71 ($\pm$ 1,55) ^c	71,23 ($\pm$ 6,84) ^c	17,37 ($\pm$ 0,40) ^a

Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

4.5 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise é uma medida do grau de clivagem das proteínas durante a hidrólise, sendo o tamanho dos peptídeos tanto menor quanto maior for o GH (NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001). Quanto maior o GH, maior terá sido a quebra das proteínas em peptídeos e aminoácidos livres. As propriedades funcionais estão diretamente relacionadas ao GH, uma vez que peptídeos com tamanho e sequências específicas conferem funcionalidade aos hidrolisados. Devido ao elevado valor biológico da proteína de pescado, os hidrolisados apresentam em sua maioria, assim como a proteína, todos os aminoácidos essenciais. A disponibilidade da proteína na forma de peptídeos e aminoácidos livres contribui para dietas, facilitando assim sua absorção pelo organismo. Neves et al., 2004 utilizaram hidrolisados enzimáticos no tratamento clínico de pacientes com dificuldade em digerir e absorver proteínas, sendo preferidos em relação às misturas de aminoácidos livres. Neste trabalho foram caracterizados quimicamente seis hidrolisados de pescado, obtidos por diferentes sistemas enzimáticos, quanto à extensão da hidrólise, distribuição de peso molecular dos peptídeos, composição química e perfil de aminoácidos.

Tabela 5 - Grau de hidrólise para os diferentes hidrolisados

Tempo (min)	Enzimas		
	Neutrased	Papaína	Pepsina
30	11,61 ($\pm$ 0,49) ^a	21,14 ($\pm$ 1,45) ^b	10,64 ($\pm$ 1,45) ^{ab}
60	11,35 ($\pm$ 0,83) ^a	21,88 ($\pm$ 0,87) ^b	10,18 ($\pm$ 1,89) ^{ab}
120	14,10 ($\pm$ 1,08) ^a	25,28 ($\pm$ 2,06) ^d	14,97 ($\pm$ 3,93) ^{ab}

Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

A enzima que apresentou maior GH foi a papaína, sendo que houve um aumento significativo do tempo de 60 min para 120 min de hidrólise; os tempos de 30 e 60 min foram estatisticamente iguais. O maior GH foi obtido no tratamento com papaína a 120 min (25,28%). A papaína apresenta atividade sobre ligações éster e amida e tem boa atuação na síntese de peptídeos. Apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa, preferencialmente, ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina (KOBBLITZ, 2010). You et al. (2008), na elaboração hidrolisados proteicos de *loach fish*, encontraram grau de hidrólise que variou de 18 a 33% com a papaína. O GH de 18%, foi inferior ao encontrado no presente trabalho, sendo que, as condições para sua obtenção foram muito semelhantes (pH 7,0, 120 min e 55°C). O GH, de 33%, foi observado após 20 horas de hidrólise. As diferenças no grau de hidrólise podem estar associadas ao tipo de matéria prima utilizada para a sua obtenção.

Não houve diferença significativa entre o GH dos diferentes tempos de tratamento com a enzima neutrased (11,61; 11,35 e 14,10 %), embora para o tempo de 120 min se registrasse um aumento de 2,75%. A neutrased, catalisou a hidrólise das proteínas existentes na amostra. A utilização de enzimas proteolíticas no pescado permite alterar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas presentes no pescado, sem prejudicar o seu valor nutricional (FURLAN; OETTERER, 2002). Santos (2011), na elaboração de hidrolisados proteicos de sardinha com adição de neutrased, encontrou para um tempo de 120 min grau de hidrólise superior a 25%. Os resultados encontrados neste trabalho apresentam-se inferiores, o que pode ser justificado pela diferença de matéria prima e acessibilidade da enzima à matéria prima no processo de hidrólise. O elevado GH nem sempre é interessante, sendo que, em muitos casos, o GH mais baixo pode levar à formação de peptídeos de interesse e menos aminoácidos livres (HE; FRANCO; ZHANG,

2013). Amiza, Ow e Faaz (2013), relatam que a excessiva hidrólise em hidrolisados elaborados com *cattfish* provocou diminuição de capacidade emulsificante e capacidade de ligação de água, além de gerar um produto de cor escura. O maior GH obtido por esses autores, com a utilização de alcalase, foi de 68%, sob ação de alcalase a 2% e tempo de 180 min.

No tratamento com a pepsina de 30 para 60 min o GH permaneceu estável, 10,64% e 10,18%, respectivamente, no entanto, ocorreu aumento de 4,79% no tempo 120 min (14,97%). Martins et al. (2009) na elaboração de hidrolisado proteico de pescado obtido por via química e enzimática, a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*), utilizaram *flavourzyme* no resíduo e filé de corvinas e obtiveram, para esta enzima, GH, máximo de 18%, após 120 min de hidrólise. Zavareze et al. (2009) na elaboração de hidrolisados de cabrinha (*Prionotus punctatus*) a partir de alcalase, *flavourzyme* e *novozym* encontraram grau de hidrólise de 25,41%, 23,68% e 27,96%, respectivamente, após 60 min de hidrólise para estas enzimas.

A utilização de sistemas enzimáticos proporciona GH elevado, porém a hidrólise conduzida apenas com uma única enzima tem certo limite de quebra devido à especificidade das mesmas. Uma proteólise prolongada pode resultar na formação de peptídeos extremamente solúveis, sem funcionalidades desejáveis e promover gosto amargo ao hidrolisado (FURLAN; OETTERER, 2002; BHASKAR et al., 2008).

Os hidrolisados obtidos através dos tratamentos aplicados no presente trabalho apresentaram GH semelhante aos obtidos em outros estudos com as mesmas enzimas e condições.

4.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante, por meio de DPPH, ABTS e poder redutor foi determinada para diferentes concentrações de hidrolisado. As curvas de inibição geradas permitiram, através de uma equação de reta, realizar o cálculo do EC50, que representa a concentração de hidrolisado necessária para inibir 50% dos radicais livres. Foi possível calcular o EC50 nas metodologias de DPPH e ABTS

Os peptídeos presentes nos hidrolisados podem exercer sua atividade eliminando radicais livres, quelando metais de transição ou inibindo a peroxidação lipídica (SARMADI; ISMAIL, 2010). Apesar de sua relação estrutura-atividade antioxidante ainda não estar estabelecida, estudos sugerem que o tipo, a posição e

o grau de hidrofobicidade dos aminoácidos presentes parecem exercer um papel essencial sobre a atividade antioxidante (HARNEDY; FITZGERALD, 2012).

A atividade antioxidante não pode ser mensurada com base em apenas um modelo e, na prática, mais de um teste é utilizado na sua determinação (ALAN; BRISTI; RAFIQUZZMAN, 2012). Os ensaios para a avaliação da atividade antioxidante são divididos em dois grupos de reações, a saber, reações de transferência de átomos de hidrogênio e reações de transferência de elétrons. Os ensaios de transferência de átomos de hidrogênio quantificam a habilidade de um antioxidante em doar átomos de hidrogênio, por meio de uma reação de competição entre o composto antioxidante e um substrato. Os ensaios de transferência de elétrons medem a capacidade redutora do composto através de mudanças na coloração da reação (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Nessa categoria se enquadram os ensaios de DPPH e de poder redutor total. Além disso, os peptídeos antioxidantes também podem atuar como quelantes de metais. A redução da oxidação resultante desse processo pode ser avaliada, por uma reação de espectrometria, na qual a interação do antioxidante com o íon Fe^{2+} presente no meio, é determinada pela formação de um complexo colorido com a ferrozina (NAJAFIAN; BABJI, 2012).

Método DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

A atividade antioxidante para o tratamento com neutrase, apresentou diferença significativa de 30 para 60 min, bem como, de 30 para 120 min. Os tratamentos 60 e 120 min não apresentaram diferença significativa (um em relação ao outro), sendo que estes foram significativamente maiores em relação ao tratamento de 30 min. O GH, não apresentou diferença significativa para os tratamentos com neutrase, sendo que, neste caso, não é possível relacionar um aumento ou diminuição do GH na atividade antioxidante, medida por meio da metodologia de DPPH. A maior atividade antioxidante pode ser observada no tempo de 60 min através do valor de EC_{50} , da ordem de 1,68. Quanto menor o valor de EC_{50} , menor a concentração de hidrolisados necessária para inibir 50% dos radicais livres. Nas Figuras 5,6 e 7, pode-se observar que um aumento na concentração de hidrolisado leva a um aumento na inibição de radicais, sendo que, apesar de não apresentar relação com o GH, os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante.

A atividade antioxidante medida nos hidrolisados elaborados a partir de papaína não apresentou diferença significativa para os tempos de hidrólise, sendo o menor EC₅₀ encontrado para o tempo de 60 min. O GH para este tratamento apresentou diferença significativa do tempo 60 para o tempo 120 min, porém não se pode relacionar este aumento a um aumento da atividade antioxidante, apenas que, para esse GH, os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante. Embora o GH para a papaína tenha sido superior ao encontrado pra neutrase, a atividade antioxidante de ambas foi semelhante, o que indica que a propriedade não pode ser relacionada a uma extensiva hidrólise, mas sim ao tamanho de peptídeos específicos gerados. Assim como para a neutrase, as Figuras indicam que um aumento na concentração de hidrolisado aumenta a inibição de radicais livres.

Para o tratamento com a pepsina, pode-se observar diferença significativa do tempo 30 para o tempo 120 min, podendo dessa forma relacionar-se um aumento no GH a um aumento do potencial antioxidante para essa metodologia.

Para todos os tratamentos, a concentração de hidrolisado de 5mg/mL foi suficiente para o cálculo de EC₅₀, o que indica que todos os hidrolisados apresentaram elevada capacidade de doação de elétrons para promover a ligação e interromper a reação de oxidação.

You et al. (2008) na elaboração de hidrolisados de papaína, encontraram para um grau de hidrólise de 18% e em uma concentração de 40mg/mL, 83,5% de inibição de radical, sendo que no presente trabalho, concentrações de 5mg/mL em GH, médio de 21% apresentaram inibição semelhante à relatada por esses autores.

Figura 5 - Atividade antioxidante (DPPH) para o hidrolisado com a enzima neutrase (protemax) nos diferentes tempos de hidrólise

Figura 6 - Atividade antioxidante (DPPH) para o hidrolisado com a enzima papaína (brauzyn) nos diferentes tempos de hidrólise

Figura 7 - Atividade antioxidante (DPPH) para o hidrolisado com a enzima pepsina nos diferentes tempos de hidrólise

Tabela 6 - Mensuração da EC50 para a metodologia DPPH

Tempo (min)	Enzimas		
	Neutrase	Papaína	Pepsina
30	2,70 ($\pm 0,55$)a	2,00 ($\pm 0,17$)ab	2,05 ($\pm 0,33$)ab
60	1,68 ($\pm 0,24$)b	2,62 ($\pm 0,94$)ab	1,70 ($\pm 0,06$)ab
120	2,12 ($\pm 0,28$)ab	2,23 ($\pm 0,19$)ab	1,36 ($\pm 0,43$)ab

Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Método ABTS- 2,2- azino-bis- (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico

A análise de sequestro de radicais, via radical ABTS, pode ser aplicada tanto para compostos lipofílicos, como para compostos hidrofílicos, e tem sido amplamente utilizada em análises de atividade antioxidante (MILIAUSKASA et al., 2004). Para todas as enzimas, nesta metodologia, a concentração dos hidrolisados foi superior àqueles obtidos quando aplicada a análise de DPPH. O hidrolisado que apresentou menor EC50 foi o hidrolisado de pepsina a 120 min, porém pode se observar que este valor foi, significativamente, igual ao encontrado para o tratamento com papaína a 60 min (Tabela 7).

O valor de EC50 para o tratamento com a enzima neutrase foi significativamente igual, para todos os tempos. Apresentou potencial função de sequestro de radical, porém assim como para o GH, os tratamentos para os diferentes tempos foram significativamente iguais (Figura 8).

Para a enzima papaína, o valor de EC50 para o tempo de 120 min foi significativamente menor que os demais, bem como o GH, o que indica que houve relação entre maior grau de hidrólise para um aumento do potencial antioxidante desse hidrolisado (Figura 9).

Assim como na metodologia de ABTS, o tratamento aplicado com a enzima pepsina apresentou diferença significativa com o aumento do grau de hidrólise no tempo de 120 min. (Figura 10).

Para todos os hidrolisados, a concentração de 20mg/mL foi suficiente para inibir quase 100 % dos radicais livres, sendo estes resultados semelhantes aos relatados por You et al. (2009), onde, para o GH, de 23 % houve 95,5% de inibição de radicais.

Figura 8 - Atividade antioxidante (ABTS) para o hidrolisado com a enzima neutrase (protemax) nos diferentes tempos de hidrólise

Figura 9 - Atividade antioxidante (ABTS) para o hidrolisado com a enzima papaína (brauzyne) nos diferentes tempos de hidrólise

Figura 10 - Atividade antioxidante (ABTS) para o hidrolisado com a enzima pepsina nos diferentes tempos de hidrólise

Tabela 7 - Mensuração da EC50 para a metodologia ABTS

Tempo (min)	Enzimas		
	Neutrase	Papaína	Pepsina
30	4,137 ($\pm 0,11$)a	4,276 ($\pm 0,41$)a	4,232 ($\pm 0,36$)a
60	4,499 ($\pm 0,54$)a	3,966 ($\pm 0,92$)a	4,297 ($\pm 0,07$)a
120	3,788 ($\pm 0,21$)a	3,637 ($\pm 0,35$)b	3,584 ($\pm 0,21$)b

Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

4.7 Peptídeos

Peptídeos biologicamente ativos são considerados fragmentos específicos de proteínas que são inativos na estrutura da proteína, mas que quando clivados, podem exercer diversas atividades funcionais. Peptídeos que apresentam tais propriedades apresentam tamanho de 2 a 20 aminoácidos e pesos moleculares geralmente inferiores a 6000 Da (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Os hidrolisados proteicos foram categorizados por Vioque et al. (2000) em três grupos, baseados no seu GH e aplicação, sendo eles: hidrolisados com baixo GH, e com propriedades funcionais melhoradas, hidrolisados com diversos GH (geralmente utilizados como flavorizantes), e hidrolisados com amplo GH, geralmente utilizados como suplementos alimentares e em dietas médicas para pacientes com dificuldades de absorção. Isto indica que para obtenção de

hidrolisados com propriedades funcionais melhoradas nem sempre um extensivo GH é desejado.

A hidrólise realizada através da neutrase promoveu a quebra dos peptídeos em pesos moleculares situados em sua maioria entre 1000 a 10000 Da. O GH para os tempos do tratamento com a enzima neutrase não apresentou diferenças significativas, porém observa-se que o aumento no tempo de hidrólise levou a um aumento nos peptídeos de cadeia entre 100 e 1000 Da para o tempo 60 e de cadeias de 0 a 100 para o tempo de 120min. A atividade antioxidante na metodologia de DPPH apresentou maior atividade antioxidante para o tempo de 60 min e 120min.

A maior concentração de peptídeos com pesos moleculares entre 100 a 1000 Da nos tempos de 60 min e 120 min pode ter influenciado a maior atividade antioxidante para o DPPH em relação ao tempo 30 min, apesar de o GH não ter apresentado diferença significativa. Li, Hang e Chen (2008), na elaboração de hidrolisados proteicos preparados de glúten de milho, observaram forte influência do peso molecular na atividade antioxidante destes hidrolisados, sendo atribuída maior capacidade antioxidante a peptídeos que apresentaram peso molecular entre 500 e 1500 Da em relação aos inferiores a 500 Da e superiores a 1500Da.

Para a metodologia de ABTS, assim como para o GH, não foram observadas diferenças significativas na atividade antioxidante entre os tempos de hidrólise para esta enzima, sendo, portanto, difícil estabelecer relação entre a extensão da clivagem e a observação das propriedades, porém pode-se concluir que apesar de não apresentarem diferença significativa, a quebra da cadeia proteica gerou peptídeos com potencial atividade antioxidante.

Figura 11 - Distribuição dos pesos moleculares dos peptídeos obtidos nos hidrolisados elaborados a partir da enzima neutrase (protemax)

Figura 12 - Cromatograma de filtração em gel, mostrando a distribuição do peso molecular dos hidrolisados elaborados a partir da enzima neutrase (protemax)

No tratamento com a enzima papaína pode se observar uma elevada concentração de peptídeos com cadeia de 1000 a 10000 Da, porém com o tempo de hidrolise, houve um considerável aumento de peptídeos de 100 a 1000 Da. A quebra em peptídeos de cadeia mais curta foi mais evidenciada com a utilização da papaína em relação a neutrase. A maior concentração de peptídeos com cadeia de 1000 a 10000 Da, indica que, de acordo com Sarmandi e Ismail (2010), esses hidrolisados apresentam maior potencial no que se refere às propriedades funcionais, uma vez que peptídeos com cadeia inferior a 6000 Da apresentam maior funcionalidade.

O grau de hidrólise para a enzima papaína apresentou-se significativamente igual para os tempos 60 e 30 min, porém superior no tempo de 120 min. Esse comportamento foi também observado para a metodologia de ABTS, onde a atividade antioxidante do tratamento em 120 min foi superior. Para a metodologia de DPPH não houve diferenças entre a atividade antioxidante. Neste caso pode-se fazer uma comparação entre um aumento da clivagem da cadeia proteica gerando peptídeos de cadeia mais curta e consequente aumento do GH e propriedade antioxidante. Wu et al. (2003) na elaboração de hidrolisados proteicos de *Mackerel*, reportaram que os hidrolisados com peso molecular de aproximadamente 1400 Da possuíam atividade antioxidante superior daqueles com peptídeos com pesos moleculares inferiores a 200 Da. Estes resultados apresentam concordância com os resultados obtidos para os hidrolisados elaborados no presente trabalho.

Figura 13 - Distribuição dos pesos moleculares de peptídeos obtidos nos hidrolisados elaborados a partir da enzima papaína (brauzyn)

Figura 14 - Cromatograma de filtração em gel, mostrando a distribuição do peso molecular dos hidrolisados elaborados a partir da enzima papaína (brauzyn)

A hidrólise com a pepsina nos tempos de 30 e 60 min realizou pouca clivagem dos peptídeos, o que se observa por meio da composição de peptídeos de alto peso molecular. Após 120 min de hidrólise houve um considerável aumento na quantidade de peptídeos de cadeia mais curta. Para esse tratamento, o grau de hidrólise e a atividade antioxidante tanto para o DPPH como para ABTS, apresentaram aumento significativo do tempo 30 e 60 para 120 min. Pode-se então fazer uma relação direta no aumento da funcionalidade com a clivagem em peptídeos de cadeia inferior a 1000 Da. Jun et al. (2004) na elaboração de hidrolisados proteicos de linguado (*Limanda aspera*) utilizaram a pepsina como enzima exógena e obtiveram sucesso na obtenção de hidrolisados com potencial antioxidante. Os hidrolisados elaborados por esses autores inibiram a oxidação do ácido linoleico em 70 %, sendo que eles relacionam esta propriedade a clivagem da cadeia proteica em resíduos contendo 10 aminoácidos e a presença da tirosina, que é um potencial doador de hidrogênio.

Figura 15 - Distribuição dos pesos moleculares de peptídeos obtidos no hidrolisados elaborados a partir da enzima pepsina

Figura 16 - Cromatograma de filtração em gel, mostrando a distribuição do peso molecular dos hidrolisados elaborados a partir da enzima pepsina

A clivagem da cadeia proteica em peptídeos e aminoácidos é refletida através dos gráficos observados acima, sendo que quanto maior o tempo de hidrólise maior a proporção de cadeias mais curtas de peptídeos e aminoácidos livres.

5 CONCLUSÕES

Para todos os hidrolisados houve um aumento considerável na composição proteica em relação à matéria prima, portanto, pode-se considerar este produto como um hidrolisado proteico.

Por apresentar elevado teor proteico, os hidrolisados apresentam potencial para utilização como suplemento em dietas.

Por apresentar peptídeos com propriedades bioativas o hidrolisado apresenta potencial para possível uso no setor farmacêutico.

A hidrólise levou à geração de peptídeos, em sua maioria, de pesos moleculares superiores a 10000 Da, sendo que todos os tratamentos apresentaram atividade antioxidante.

O tratamento que apresentou as melhores características foi aquele utilizando a enzima papaína, sendo que esta promoveu a quebra em situações mais amenas e com melhor controle do processo.

REFERÊNCIAS

Fisheries and Aquaculture Department. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2011. 209 p.

_____. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E, p. 45-53.

_____. Proteínas do pescado- processamento com intervenção protéica. In: OETTERER, M.; REGITANO D'ARCE, M.A.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p. 99-134.

_____. Secretaria da Vigilância Sanitária. **Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado)**. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Brasília, 1997. Disponível em: <http://www.agais.com/normas/carne/peixe_fresco.htm>. Acesso em: 25 jul. 2015.

_____. **The state of world fisheries and aquaculture**: 2010. Rome, 2012. 209 p.

AFONSO, M.D.; BÓRQUEZ, R. Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes: prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. **Desalination**, Lisboa, v. 142, p. 29-45, 2002.

ALMEIDA, T.L.; SIMÕES, D.R.S.; PEDROSO, M.A.; RUIZ, W.A. Hambúrgueres formulados com base protéica de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 410-413, out./dez. 1998.

AMANCIO, A.L.L.; SILVA, J.H.V.; LIMA, C.B.; ARAÚJO, J.A.; COELHO, M.S.; OLIVEIRA, E.R.A.; LIMA, M.R.; SILVA, N.V.; RODRIGUES, M.L. Valor nutricional da silagem de pescado e utilização na alimentação animal. **Boletim Técnico-Científico do CEPNOR**, Belém, v. 10, n. 1, p. 79-93, 2010

AMIZA, M.A.; OW, Y.W.; FAAZAZ, A.L. Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius* sp.) frame hydrolysate. **International Food Research Journal**, Serdang, v. 20 n. 3, p. 1255-1262, 2013.

ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011, 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ANGELINI, M.F.C. **Desenvolvimento do produto de conveniência Quenelle de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ARVANITOYANNIS, I.S. **Waste management for the food industries**. London: Academic Press, 2008. 1069 p.

ARVANITOYANNIS, I.S.; KASSAVETI, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 726-745, 2008

ASPÉ, E.; MARTI, M.C.; ROECKEL, M. Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. **Water Research**, New York, v. 9, n. 31, p. 2147-2167, 1997.

AYER, N.; COTÉ, R.P.; TYEDMERS, P.H.; WILLISON, J.H.M. Sustainability of seafood production and consumption: an introduction to the special issue. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 321-324, 2009.

BECHTEL, P.J. Properties of different fish processing by-products from Pollock, cod and salmon. **Journal of Food Processing Preservation**, Fairbanks, v. 27, p. 101-116, 2003.

BELDA, M.C.R.; POURCHET-CAMPOS, M.A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 5-35, 1991.

BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M.T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Thailand, v. 45, p. 3424-3430, 1997.

BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.S. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. **Bioresource Technology**, Mysore, v. 99, p. 4105–4111, 2008

BORGHESI, R. **Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BOSCOLO, W. R. **Farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápias na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)**. 2003. 82 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, Tunisia, v. 118, p. 559–565. 2010

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2008 - 2009**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/anu%C3%A1rio%20da%20pesca%20completo2.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

BRUSCHI, F.L.F. **Rendimento, composição química e perfil de ácidos graxos de pescados e seus resíduos: uma comparação**. 2001. 65 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Oceanografia) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2001.

CABRAL, I.S.R. **Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de Minced de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2012. 139 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CALLISTO, M. **Diversidade de macroinvertebrados bentônicos e sua utilização como indicadores de qualidade de água**. 2010. Disponível em: <<http://www.icb.ufm.br/bioindicadores>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

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 proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, Rio Grande, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CHEN, H.; MURAMOTO, M.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptide from soybean β -Conglycnin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Japan, v. 53, p. 574-578, 1995.

COMPROMISSO EMPRESARIAL PARA RECICLAGEM. **Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado**. São Paulo: IPT, 2000. 370 p.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409 p.

DAMASCENO, A. **Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte – MG**. 2009. 48 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DEKKERS, E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G.; MARSHALL, M.R. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Gainesville, v. 124, n. 2, p. 640–645. 2011.

DISNEY, J.G.; JAMES, D. **Fish silage production and its use**. Rome: FAO, 1980. 105 p. (FAO. Fish Report, 230).

DONG, F.M.; FAIRGRIEVE, W.T.; SKONBERG, D.I.; RASCO, B.A. Preparation and nutrient analyses of lactic acid bacteria ensiled salmon viscera. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 4, p. 351-366, 1993.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, Guangzhou, v. 107, p. 1485–1493, 2008.

ESPÍNDOLA-FILHO, A. **Aproveitamento de resíduos sólidos de pescado como fertilizante marinho**. 1997. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Mackenzie, São Paulo, 1997.

FAO. **Fishery statistics**: summary tables. Rome, 2005. 196 p.

FAO/WHO. Code practice for fish and fishery products (CAC/ RCP 52-2003). In: _____. **Codex alimentarius**: food standards, Rome, 2003. p. 146. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en. Acesso em: 01 ago. 2013.

FARIA, M.G.; BATISTA, I. Actividade antioxidante de hidrolisados proteicos de bacalhau, salmão e solha. **Relatório Científico Técnico IPIMAR**, Lisboa, n. 36, p. 1-31, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Fish silage: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 879-886, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; OETTERER, M. Silagem ácida- uma tecnologia alternativa para o aproveitamento de resíduo do pescado. **Revista Aquicultura e Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 30-33, 2005.

FERRAZ-ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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 degree of hydrolusis. **International Journal of Molecular Sciences**, Jiangsue, v. 11, p. 1851-1869, 2010.

FONTANA, A. Obtenção e avaliação de concentrados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2299-2303, 2009.

FREIRE, R.S.; PLEGRINI, R.; KUBOTA, L.T. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, Campinas, v. 23, p. 504-511, 2000.

FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado Protéico de Pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

GANONG, W.F. Dinâmica do sangue e do fluxo linfático. In: _____. **Fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall, 1993. p. 408-420.

GILDBERG, A. Enzymes and bioactive peptides from fish waste related to fish silage, fish feed and fish sauce production. **Journal of Aquatic Food Product Technology**. London, v. 13, n. 2, p. 3-11, 2004.

GONZÁLEZ, L.E.; CAÑIZARES, R.O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, SantaFe de Bogota, v. 60, p. 259-262, 1997.

GOWEN, R.J. Aquaculture and the environment. In: PAUW, N.; JOYCE, J. (Ed.). **Aquaculture and the environment: reviews of the International Conference Aquaculture Europe**. Ghent: European Aquaculture Society, 1991. p. 30-38. (Special Publications, 16).

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. Protein recovery during the overall treatment of wastewaters from fish-meal factories. **Bioresource Technology**, Essex, v. 63, p. 221-229, 1998.

GUILHERME, R.F.; CAVALHEIRO, J.M.O.; SOUZA, P.A.S. Caracterização química e perfil aminoácídico da farinha de silagem de cabeça de camarão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 793-797, 2007.

GUIMARAES J.L.; ADELL, E.A; FELICIO, P.E. **Estrutura e composição do músculo e tecidos associados**. Disponível em: <[http://www.servicodeinformacaodacarne.org.br/pdf/\[1\]qc_estrutura.pdf](http://www.servicodeinformacaodacarne.org.br/pdf/[1]qc_estrutura.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2015.

HARNEDY, P.A.; FITZGERALD, R.J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review. **Journal of Functional Foods**, Limerick, v. 4, p. 6-24, 2012.

HASSAN, F.; MATHEW, S. Physico-chemical, microbiological and sensory characteristics of washed fish mince prepared from some selected species of fish. **Journal of Food Science and Technology**, Kochi, v. 36, n. 5, p. 459-462, 1999.

HE, S.; FRANCO, C; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, Adelaide, v. 50, p. 289-297, 2013.

HERPANDI, N.H.; ROSMA, A.; NADIAH, W.A.W. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Penang, v.10, n. 4, p. 195–207, 2011

HISANO, H.; ISHIKAWA, M. M.; PORTZ, L. Produção de silagem ácida a partir de vísceras de surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) e avaliação da digestibilidade para tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 3, p. 872-879, jul./set. 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Singapore, v. 53, p. 1841–1853, 2005.

ILES, A. Making the seafood industry more sustainable: creating production chain transparency and accountability. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 15, n. 6, p. 577-589, 2007.

JE, J.Y.; LEE, K.H.; LEE, M.H.; AHN, C.B. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, Yeosu, v. 42, p. 1266–1272, 2009.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. Analytical methods. In: SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química. Setor Nutrição Mineral de Plantas, 1974. p. 4-10.

JONES, A.B.; DENNISON, W.C.; PRESTON, N.P. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. **Aquaculture**, Brisbane, v. 193, p. 155–178, 2001.

KIRSCHNIK, P.G. **Avaliação da estabilidade de produtos obtidos de carne mecanicamente separada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)**. 2007. 102 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, Hat Yaiv, v. 102, n. 4, p. 1317-1327, 2007.

KOMPIANG, IP. Fish silage: its prospect and future in Indonesia. **Indonesia Agricultural Research & Development Journal**, Jakarta, v. 3, n. 1, p. 9-12, 1981.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Seattle, v. 40, p. 43-81, 2000.

KUCA, M; SZANIAWSKA, D. Application of microfiltration and ceramic membranes for treatment of salted aqueous effluents from fish processing. **Desalination**, Amsterdam, v. 241 p. 227-235, 2009.

LAROSA, G.; CARVALHO, M.R.B.; VIDOTTI, R.M.; LIMA, T.M.A.; ALVES, V.F. Elaboração de produto cárneo de tilápia com antioxidantes visando sua utilização como Recheio ou acompanhamento da refeição. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 609-617, out./dez. 2012.

LEE, W.; JEON, J.; BYUN, H. Characterization of a novel antioxidative peptide from the sand eel *Hypoptychus dybowskii*. **Process Biochemistry**, Gangneug, v. 46, p. 1207–1211, 2011.

LI, X.X.; HANF, L.J.; CHEN, L.J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of Food Agriculture**, Beijing, v. 88, p. 1660-1666, 2008.

MARCHI, J.F. **Desenvolvimento e avaliação de produtos à base de polpa e surimi produzidos a partir de tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus***. 1997. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

MARCUSE, R. Antioxidative effect of amino-acids. **Nature**, London, v. 186, p. 886-887, 1960.

MARQUEZ, V.M.L.; NEVES, R.A.M.; MIRA, N.V.M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

MARTINS, W.S. **Inquérito exploratório referente à geração, armazenamento, transporte e descarte de resíduos em indústrias de pesca do Brasil**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MARTÍN-SÁNCHEZ, A.M.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; KURI, V. Alternatives for efficient and sustainable production of surimi: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 8, n. 4, p. 359-374, 2009.

MATOS, A.T. **Tratamento e aproveitamento agrícola de resíduos sólidos**. Viçosa: AEAGRI, 2004. 136 p. (Série Cadernos Didáticos, 38).

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. Antioxidant properties of a radical scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Busan, v. 53, n. 3, p. 581–587, 2004.

MOORE, I.; STEIN, W.H. Chromatographic determination of amino acids by use of automatic recording equipment. **Methods in Enzymology**, New York, v. 6, p. 919-931, 1963.

MORALES-ULLOA, D.F. **Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira**. 1994. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

NEIVA, C.R.P. **Aplicação da tecnologia de carne mecanicamente separada – CMS na indústria de pescado**. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeca/Isimcope/palestra_cristiane_neiva.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015.

NILSEN, P.M.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Food chemistry and Toxicology**, Bagsvaerd, v. 66, n. 5, p. 642-646, 2001.

OETERRER, M; ESPÍNDOLA-FILHO, A.; MORALLES-ULLOA, D.F.; FERRAZ-ARRUDA, L.; BORGHESI, R. Bioconversão de resíduos do pescado para obtenção de subprodutos In: **WORKSHOP BRASILEIRO EM APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DE PESCADO**. Itajaí, 2003. Itajaí: WARP, 2003. CD-ROM.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2002. 200 p.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca, ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. v. 1, 453 p.

OLIVEIRA, M.M.; PIMENTA, M.E.S.G.; CAMARGO, A.C.S.; FIORINI, J.E.; PIMENTA, C.J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico - análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.

OLIVEIRA, R.L.M. **Morfometria, rendimento de carcaça e composição do filé do beijupirá (*Rachycentron canadum*) cultivado em tanques-rede em mar aberto no litoral de Pernambuco**. 2012. 64 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

PASUPULETI, V.K.; BRAUN, S. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In: PAPSULETI, V.K. **Protein hydrolysates in biotechnology**. Geneva: Springer, 2010. chap. 2, p. 11–32.

PELIZER, H.L; PONTIERI H.M; MORAES, O.I. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. São Paulo: **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, v. 2, n.1, p. 118-127, 2007.

PEREGRINO JR., R.B. **Formação e manejo de um plantel de reprodutores do beijupirá (*Rachycentron canadum*) em Pernambuco**. 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

PHILANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, Jokioinen, v. 16, p. 1306–1314, 2006.

PICOT, L.; BORDENAVE, S.; DIDELOT, S.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; SANNIER, F.; THORKESSON, G.; BERGE, J.P.; GUÉRARD, F.; CHABEAUD, A.; PIOT, J.M. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, La Rochelle, v. 41, p. 1217–1222, 2006.

PIRES, C.; CLEMENTE, T.; BATISTA, I. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of Science Food Agriculture*. Lisboa, v.93, p.771–780, 2012.

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, 1985. 553 p

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Gainesville, v. 117, p. 582–588. 2009.

RAMÍREZ, A. **Salmon by-product proteins**. Rome: FAO, 2007. 31 p. (Fisheries Circular, 1027).

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; Yan, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REBOUÇAS, D.; ABELHA, L.; LEGAY, L.F.; LOVISI, G.M. O trabalho em saúde mental: um estudo de satisfação e impacto. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 624-632, 2008.

REBOUÇAS, M.C.; CAVALCANTE, J.M. Avaliação das propriedades funcionais de fibras obtidas a partir de resíduos agroindustriais. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 15., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Universidade de Fortaleza, 2009. p. 697-704.

RIBEIRO, J.C.J.; GARCIA, R.L.; ABREU, G.M.R.A.; LESSA, M.M.; STRAUS, E.L. **Utilização de resíduos sólidos, 2011**. Disponível em: <<http://www.abnt.org.br>>. Acesso em: 24 fev. 2015.

ROSA, C.A.; FERRANDIN, D.C.; SOUZA, M.M. **Desenvolvimento de nuggets de filé e polpa de tilápia com adição de linhaça (*linum usitatissimum* L.)**. 2012. 75 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2012.

RUITER, A. **Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability**. Wallingford: CAB International. 1995. 387 p.

SAINT DENIS, T., GOUPY, J. Optimization of a nitrogen analyzer based on the Dumas method. **Analytica Chimica**, Palaiseau Cedex, v. 515, p. 191-198, 2004.

SANMARTIN, E.; ARBOLEYA, J.C.; VILLAMIEL, M.; MORENO, J. Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-

products: use of protein glycation as an alternative method. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Derio, v. 8, n. 4, p. 332–344, 2009.

Santos, M.F.G. Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – Aplicações. 2011. 68 p. Trabalho de projeto apresentado à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos.

GUÉRARD, F., SELLOS, D., LE GAL, Y. Fish and shellfish upgrading, traceability. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* v. 96, p. 127–63. 2005.

SARMADI, B. H., ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides.* v. 31, p. 1949–1956. 2010.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, Selangor, v. 31, p. 1949–1956. 2010

SHIMADA, K.; FUGIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 40, p. 945-948, 1992.

SHIRAHIGUE, L.D.; SILVA, M.O.; CAMARGO, A.C.; SUCASAS, L.F.; BORGHESI, R.; CABRAL, I.S.R.; SAVAY-DA-SILVA, L.K.; GALVÃO, J.A.; OETTERER, M. The feasibility of increasing lipid extraction in tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by proteolysis. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, 2014. DOI:10.1080/10498850.2013.845276. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10498850.2013.845276>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

SHIRAI, K.; GUERRERO, I.; HUERTA, S.; SAUCEDO, G.; CASTILHO, A.; GONZALEZ, R.O.; HALL, G.M. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 28, p. 446-452, 2001.

SILVA, J.F.X. **Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2010.

SOUISSI, N.; ELLOUZ-TRIKI, Y.; BOUGATEF, A.; BLIBECH, M.; NASRI, M. Preparation and use of media for protease producing bacterial strains based on by-products from cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 163, p. 473-480, 2008.

SOUZA, M.L.R. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de filé e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1076-1084, 2002.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in protein. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

STEVANATO, B.F.; PETENUCCI, M.E.; MATSUSHITA, M.; MESOMO, M.C.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.E.L.; ALMEIDA, V.V.; VISENTAINER, J.V. Avaliação química e sensorial da farinha de resíduo de tilápias na forma de sopa. **Ciência Tecnologia de Alimentos** Campinas, v. 27, n. 3, p. 567-571, jul./set. 2007.

STORI, F.T. **Avaliação dos resíduos da industrialização do pescado em Itajaí e Navegantes (SC), como subsídio à implementação de um sistema gerencial de bolsa de resíduos**. 2000. 145 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Oceanografia) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2000.

STORI, F.T.; BONILHA, E.C.; BARREIROS, M.A.; LACAVA, L.; PESSATTI, M.L. The organic solid residues of fish processing industries in Santa Catarina Brazil: production scenarios and technologies. **Journal of Coastal Research**, Itajaí, v. 39, n. 39, p. 1793-1797, 2006.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado para o desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TENUTA-FILHO, A.; JESUS, R.S. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria prima industrial. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 59-64, 2003.

TOKUR, B.; POLAT, A.; BECLEVIK, C.; ÖZKÜTÜK, S. Changes in the quality of fishburger produced from tilapia (*Oreochromis niloticus*) during frozen storage (18°C). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 4, p. 420-423, 2004.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de Tilápia e sua utilização na alimentação animal**. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br>>. Acesso em: 04 out. 2006.

VIDOTTI, R.M.; VIEGAS, E.M.M.; CARNEIRO, D.J. Amino acid composition of processed fish silage using diferent raw materials. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 199-204, 2003

VIOQUE, J.; VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; PREDROCHE, J.; MILLAN, F. Partially hydrolysed rapeseed protein isolates with improved functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Sevilla, v. 77, p. 447-450, 2000.

VISENTAINER, J.V.; GOMES, S.T.M.; HAYASHI, C.; SANTOS-JÚNIOR, O.O.; SILVA, A.B.M.; JUSTI, K.C.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Maringá, v. 23, n. 3, p. 478-484, 2003

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.

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.

ZAHAR, M.; BENKERROUM, N.; GUEROUALI, A.; LARAKI, Y.; EI-YAKOUBI, K. Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 171-176, 2002.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; MELLADO, M.S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, Rio Grande, v. 32, p. 1739-1743, 2009.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y.L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Wuxi, v. 56, p. 2714-2721, 2008.