UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

SUZAN BLIMA PAULINO LEITE

Efluentes do processamento de *Minced* de tilápia reaproveitados como coprodutos com atividade antioxidante e para uso como meio de cultura em bioprocessos

Piracicaba
2016

SUZAN BLIMA PAULINO LEITE

Efluentes do processamento de *Minced* de tilápia reaproveitados como coprodutos com atividade antioxidante e para uso como meio de cultura em bioprocessos

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Marília Oetterer

Piracicaba

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Serviço Técnica de Biblioteca – CENA/USP

Leite, Suzan Blima Paulino

Efluentes do processamento de *Minced* de tilápia reaproveitados como coprodutos com atividade antioxidante e para uso como meio de cultura em bioprocessos / Suzan Blima Paulino Leite; orientadora Marília Oetterer. -- Piracicaba, 2016.
106p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aminoácidos 2. Antioxidantes 3. Crescimento microbiano 4 Peptídeos 5. Pescado 6. Resíduos I. Título

CDU 628.477.5 : 678.048

Dedico este trabalho aos meus pais e minhas irmãs,
por todo apoio e incentivo concedidos
em cada etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra e glória.

Aos meus pais, Joaquim e Roselena, minhas irmãs, Sarah e Stephanie, pelo exemplo de amor, honestidade, trabalho, coragem, persistência, superação. E todos os familiares pelo carinho.

A Profª Marília Oetterer pelos ensinamentos, orientação, paciência, confiança e exemplo profissional.

As minhas amigas Aline Camargo e Tatiane Ferreira, pela parceria e toda ajuda e dedicação oferecidas no desenvolvimento deste trabalho, e aos queridos getepianos, Lia, Ligi, Camila, Eddie, Iris, Monalisa, Nathalia, Paulo, Vanessa, Taci, Luiza, Felipe, Luciana, Ju, e aos novos integrantes do grupo, sucesso para todos.

Aos Laboratórios de Frutas, Higiene e Laticínios, Qualidade de Carnes, Micotoxinas, Bioquímica de Alimentos, Amiláceos, Óleos e Gorduras, Ecotoxicologia, Max Feffer de Genética de Plantas, Saneamento (FEC/UNICAMP), por disponibilizarem o espaço e equipamentos para realização das análises; especialmente às técnicas Cleomar Carvalho e Silvana Albertini pelo apoio científico e amizade, sempre dispostas em ajudar.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, especialmente, Adriana, Daiane, Fábio, Magali, Marília e Raquel, por todo apoio e paciência.

As minhas queridas maninhas da graduação que sempre estiveram presentes, mesmo vivenciando realidades diferentes. Aos amigos do programa de pós graduação, Alan, Ana Paula, Bruna, Carmen, Eliézer, Jamile, Mariana, Maressa, Melina, Thalita e Yemina. Aos antigos e atuais moradores da vila estudantil PG e funcionários da DVATCOM.

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

Assim como, todos que contribuíram direta e indiretamente para meu crescimento profissional e pessoal durante essa fase da minha vida sou grata por todas as experiências e aprendizado compartilhados.

RESUMO

LEITE, S. B. P. **Efluentes do processamento de *Minced* de tilápia reaproveitados como coprodutos com atividade antioxidante e para uso como meio de cultura em bioprocessos**. 2016. 106p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

A água residual do processamento do *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*) é descartada sem qualquer aproveitamento, constituindo um efluente de potencial impacto ao ambiente. O objetivo desse estudo foi avaliar este efluente, caracterizar sua fração proteica, verificar seu potencial antioxidante e sua eficiência como meio de cultura para o crescimento microbiano. A carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia foi submetida à operação de clarificação em água destilada a 10ºC, na proporção 1:3, processo que se constituiu em homogeneização por 3 min, repouso por 3 min, sendo o *Minced* acondicionado e prensado em tecido de algodão esterilizado para drenagem da água residual. O efluente gerado pela etapa de lavagem do *Minced* apresentou 8854,5 mgO_2/L de DQO e 4656,88 mgO_2/L de DBO, valores considerados elevados dentre os padrões de qualidade, devido ao alto teor de matéria orgânica. O efluente foi submetido à centrifugação e a fração aquosa foi liofilizada, sendo designada de peptona e submetida à análise eletroforética que apresentou maior concentração de proteínas na faixa de 47-60 kDa. A atividade antioxidante foi avaliada em diferentes concentrações utilizando ensaios *in vitro* como o método do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico) (ABTS) e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), sendo que, em ambos, o aumento da atividade antioxidante acompanhou a concentração. Com destaque para o extrato 15 mg/ml que propiciou 46,23% de inibição do radical ABTS, e 83,22% em DPPH. Em relação ao teste de efetividade, foram comparadas peptonas comerciais e a peptona da água residual liofilizada, sendo avaliada a curva de crescimento pela densidade óptica, produção de biomassa e detecção por plaqueamento da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A performance obtida nas peptonas da água residual foram superiores às comerciais, evidenciando o vantajoso reuso desse efluente como coproduto destinado ao cultivo de microrganismos. O desempenho do peptídeo residual permite que se recomende o seu uso por parte das empresas que buscam a ecoeficiência.

Palavras-chave: Água residual; *Minced*; Aminoácidos; Peptídeos; Atividade antioxidante; Peptona; Crescimento microbiano; *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

LEITE, S. B. P. **Effluent of processing Minced tilapia reutilized as co-products with antioxidant activity and for use as culture medium in bioprocesses**. 2016. 106p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

The wastewater of minced tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing is discarded without any use, constituting a effluent of potential impact on the environment. The aim of this study was to evaluate this effluent, characterize its protein fraction, verify its antioxidant potential and its efficiency as a culture medium for microbial growth. Mechanically separated meat (CMS) tilapia was submitted to clarification operation in distilled water at 10°C in a 1:3 ratio, a process that constitutes homogenizing for 3 minutes, rest for 3 minutes, and the minced packed and compressed in a sterilized cotton fabric for drainage of wastewater. The effluent generated by the minced washing step showed 8854.5 mgO_2 / L of COD and 4656.88 mgO_2 / L BOD, values considered among high quality standards due to the high content of organic matter. The effluent was subjected to centrifugation and the aqueous fraction was lyophilized, and designated peptone and subjected to electrophoresis analysis showed a higher concentration of proteins in the 47-60 kDa range. The antioxidant activity was evaluated at different concentrations using in vitro assays such as radical method 2,2-azinobis- (3-sulphonic acid 6-etilbenzotiazoline) (ABTS), and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), wherein, in both the increased antioxidant activity followed the concentration. Especially the extract 15 mg / ml which provided 46.23% inhibition of ABTS radical, and 83.22% in DPPH. Regarding the effectiveness test, they were compared to commercial peptones and peptone lyophilized wastewater, assessing growth curves by optical density biomass production by plating and detection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The performance achieved in peptones wastewater were higher than commercial, showing the beneficial reuse of the effluent as a co-product intended for microorganisms cultivation. The performance of the residual peptide allows recommending its use by businesses seeking eco-efficiency.

Keywords: Wastewater; Minced; Amino acids; Peptides; Antioxidant activity; Peptone; Microbial growth; *Oreochromis niloticus*.

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 9
1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Objetivos 16
Referências 16
2 EFLUENTES INDUSTRIAIS DE PESCADO E SEU POTENCIAL PROTEICO COMO PEPTÍDEOS BIOATIVOS 19
RESUMO 19
ABSTRACT 21
2.1 Introdução 23
2.2 Desenvolvimento 24
2.2.1 Recursos hídricos 24
2.2.1.1 Poluição aquática 24
2.2.1.3 Reutilização 26
2.2.2 Indústrias processadoras de pescado, descartes e consumo de água 27
2.2.2.1 Alternativas para recuperação da água e de proteínas 30
2.2.3 CMS e *Minced* 31
2.2.4 Substratos de crescimento microbiano 32
2.2.4.1 Peptonas de pescado 34
2.2.5 Proteínas do pescado 35
2.2.5.1 Características e propriedades 35
2.2.5.2 Hidrolisados proteicos 37
2.2.5.3 Peptídeos bioativos 37
2.2.6 Antioxidantes 38
2.2.6.1 Peptídeos antioxidantes de pescado e suas características 39
2.3 Conclusão 40
Referências 41
3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PEPTÍDEOS DA ÁGUA RESIDUAL DE MINCED DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) 57
RESUMO 57
ABSTRACT 59
3.1 Introdução 61

3.2 Desenvolvimento 62
3.2.1 Preparo da amostra 62
3.2.2 Fracionamento da água residual do *Minced* 63
3.2.3 Rendimento das frações 63
3.2.4 Caracterização físico-química da fração aquosa 64
3.2.4.1 Determinação de lipídeos e proteínas 65
3.2.4.2 Caracterização dos aminoácidos da fração aquosa por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) 65
3.2.4.3 Quantificação de proteínas e eletroforese (SDS-PAGE) 65
3.2.5 Atividade antioxidante 66
3.2.5.1 Método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) 66
3.2.5.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 66
3.2.6 Análise estatística 67
3.3 Resultados e Discussão 67
3.3.1 Rendimento das frações 67
3.3.2 Composição de aminoácidos da água residual liofilizada 67
3.3.3 Eletroforese (SDS-PAGE) 69
3.3.4 Determinação da atividade antioxidante 71
3.4 Conclusão 73
Referências 73
4 EFETIVIDADE DA PEPTONA DE EFLUENTE DO PROCESSAMENTO DE MINCED DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), COMO MEIO DE CULTURA PARA BIOPROCESSOS 81
RESUMO 81
ABSTRACT 83
4.1 Introdução 85
4.2 Desenvolvimento 86
4.2.1 Material 86
4.2.2 Métodos para coleta e análise da água residual 86
4.2.2.1 Elaboração do *Minced* e coleta da água residual 86
4.2.3 Análises da água residual antes do fracionamento 87
4.2.3.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO) 87
4.2.3.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) 88
4.2.3.3 Análise de pH, nitrogênio total e fósforo 89

4.2.4 Análises da água residual após o fracionamento 89
4.2.4.1 Fracionamento e liofilização da amostra 89
4.2.4.2 Determinação de proteínas e lipídeos 89
4.2.4.3 Métodos de análise de efetividade das peptonas 89
4.2.5 Análise estatística 91
4.3 Resultados e Discussão 91
4.3.1 Qualidade da água residual do *Minced* 91
4.3.2 Caracterização da fração aquosa liofilizada 93
4.3.3 Efetividade de peptonas 93
4.3.3.1 Curvas de crescimento de microrganismos 93
4.3.3.2 Produção de Biomassa 96
4.3.3.3 Avaliação por Plaqueamento 97
4.4 Conclusão 99
Referências 100
5 CONCLUSÕES GERAIS 106

1 INTRODUÇÃO

A contribuição da aquicultura para o abastecimento mundial de pescado chegou a 41% em 2012 e a projeção para 2022 é de cerca de 85 milhões de t (FAO, 2014). A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de importância na aqüicultura mundial e a primeira em volume de produção no Brasil, com boa aceitação no mercado consumidor, destacando-se das demais espécies, por apresentar crescimento rápido (BRASIL, 2013).

Segundo a FAO, o consumo mundial, per capita, de pescado quintuplicou nos últimos 40 anos, com projeção de demanda global até 2030, da ordem de 151,7 milhões t de pescado, favorecendo, consequentemente, a geração e acúmulo de resíduos (FAO, 2013).

Cerca de um terço do total da produção mundial de pescado se constitui em resíduos. Mais de 50% dos resíduos gerados no processamento do pescado são descartados no ambiente sem qualquer tratamento (JUN et al., 2004).

O rendimento do processamento é baixo, particularmente quando é realizada a filetagem prévia ao congelamento, e cerca de 60% do pescado utilizado como matéria prima não é aproveitado. Souza e Maranhão (2001) avaliaram o rendimento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) que possuíam peso corpóreo entre 300 e 400 g e entre 401 e 500 g; os resultados apresentaram 36,45% de rendimento médio em filés e 76,89% de rendimento médio em espinhaço (carcaça sem cabeça). O reaproveitamento da carne aderida ao espinhaço pela ação mecânica de desossadora dá origem à CMS - carne mecanicamente separada (PESSATTI, 2001).

A partir da CMS é obtido o *Minced*, no qual é realizada a etapa de lavagem para clarificação do tecido muscular, caracterizada como a primeira etapa de isolamento das proteínas musculares hidrossolúveis do pescado (LANIER, 1986; OETTERER, 2006).

O número de ciclos de lavagem e o volume de água utilizada dependem da espécie e do tipo de produto final desejado (PARK; LIN, 2005). Assim, há indústrias que adotam a cada ciclo de lavagem a relação água:tecido muscular de 3:1, como também 9:1, repetindo o mesmo ciclo de três a quatro vezes, favorecendo o arraste de lipídeos, pigmentos e substâncias odoríferas (AFONSO; BÓRQUEZ, 2002; SATO; TSUCHIA, 1992) e, principalmente, assegurando a completa remoção das proteínas sarcoplasmáticas (PARK; MORRISSEY, 2000).

Aliado a isso, estudos têm demonstrado que o reaproveitamento de resíduos de pescado, via hidrólise de proteínas musculares, gera como coprodutos substratos de fonte nitrogenada que podem subsidiar o crescimento de microrganismos, sendo assim, uma alternativa viável às peptonas convencionais (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005; CLAUSEN;

GILDBERG; RAA, 1985; DUFOSSÉ; DE LA BROISE; GUERARD, 2001; GILDBERG; BATISTA; STROM, 1989; HAARD, 1995; VIEIRA et al., 2005).

Assim, devido ao potencial proteico existente na água residual, a prática do reuso poderá trazer vantagens econômicas para as indústrias processadoras de *Minced*, como a elaboração de coprodutos de alto valor agregado que aumentem a receita da indústria; e permitam o aproveitamento de energia e a mitigação de problemas ambientais, evitando o desperdício de água e a geração de efluentes ricos em carga orgânica (BORGHESI; ARRUDA; OETTERER, 2008; FERRAZ DE ARRUDA et al., 2006).

1.1 Objetivos

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade ambiental da água residual de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*), promover o fracionamento deste efluente e caracterizá-lo por meio da extração de peptídeos, análise da capacidade antioxidante e do seu potencial como fonte de nitrogênio para cultivo de culturas microbianas. Havendo o reaproveitamento da água residual em coprodutos será possível classificar a empresa como eco eficiente.

Referências

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**, Amsterdam, v. 142, p. 29-45, 2002.

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 3714-3722, 2005.

BORGHESI, R.; ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. Fatty acid composition of acid, biological and enzymatic fish silage. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 205-212, 2008.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Informações e estatísticas:** balanço 2013 da pesca e aquicultura. 2013. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/monitoramento-e-controle/informacoes-e-estatisticas>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CLAUSEN, E.; GILDBERG, A.; RAA, J. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1556-1557, 1985.

DUFOSSÉ, L.; DE-LA-BROISE, D.; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 32-38, 2001.

FAO. **Fish to 2030:** prospects for fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2013. 102p.

FAO. **Outlook of the state of world fisheries and aquaculture.** Rome: FAO, 2014. 30p.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; D'ARCE, M.A.B.R.; OETTERER, M. Nutritional aspects of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 749-753, 2006.

GILDBERG, A.; BATISTA, I.; STROM, E. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 11, n. 4, p. 413-423, 1989.

HAARD, N. F. Composition and nutritive value of fish proteins and other nitrogen compounds. In: RUITER, A. (Ed.). **Fish and fishery products:** composition, nutritive properties and stability. Wallingford: CAB International, 1995. p. 77-115.

JUN, S. Y.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 219, p. 20-26, 2004.

LANIER, T. C. Functional properties of *surimi*. **Food Technology**, Chicago, p. 107-124, 1986.

OETTERER, M. Proteínas do pescado: processamento com intervenção protéica. In: OETTERER, M.; REGINATO D'ARCE, M. A.; SPOTO, M. H. F. (Eds.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 3, 632p.

PARK, J. W.; LIN, J. T. M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi sea food**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 33-106.

PARK, J. W.; MORRISSEY, M. T. Manufacturing of surimi from light muscle fish. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi seafood**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 23-58.

PESSATTI, M.L. **Aproveitamento dos sub-produtos do pescado**. Brasília: MAPA, 2001. 130p.

SATO, S.; TSUCHIA, T. Microstruture of surimi based products. In: LANIER, T. C. & LEE, C. M. (Eds.). **Surimi technology**. New York, Marcel Dekker, 1992. p. 501-519.

SOUZA, M. L. R.; MARANHÃO, T. C. F. Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, p. 897-901, 2001.

VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V. Peptone preparation from fishing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, p. 1235-1237, 2005.

2 EFLUENTES INDUSTRIAIS DE PESCADO E SEU POTENCIAL PROTEICO COMO PEPTÍDEOS BIOATIVOS

RESUMO

O consumo de água potável é imprescindível em indústrias de alimentos, principalmente, em indústrias de processamento de pescado, e particularmente no processamento do *Minced*, quando as sucessivas etapas de lavagem e extração de proteínas sarcoplasmáticas descartam efluentes de elevada concentração proteica. Esta revisão trata dos recursos hídricos e da geração de águas residuais no processamento de pescado, bem como informa as características e propriedades das proteínas e peptídeos de pescado. Várias possibilidades e métodos de extração de peptídeos antioxidantes e peptonas são apresentadas, assim como as características destes componentes sugerindo adoção destes coprodutos na linha de produção do *Minced*.

Palavras-chave: Água; Efluentes industriais; *Minced*; Proteínas de pescado; Peptídeos antioxidantes; Peptonas; Peptídeos bioativos.

2 INDUSTRIAL WASTEWATER OF FISH AND ITS POTENTIAL PROTEIN AS BIOACTIVE PEPTIDES

ABSTRACT

The consumption of drinking water is essential in the food industry, especially in fish processing industries, and particularly in processing minced, when successive washing steps and extraction of sarcoplasmic proteins discard high protein concentration effluents. This review deals with water resources and generation of wastewater in the fish processing and informs the characteristics and properties of proteins and fish peptides. Several possibilities and methods of extraction of antioxidants of peptides and peptones are presented, as well as the characteristics of these components suggesting the adoption of these co-products in Minced production line.

Keywords: Water; Industrial effluents; Minced; Fish protein; Antioxidant peptides; Peptones; Bioactive peptides.

2.1 Introdução

O aumento da população mundial, somado à crescente demanda por alimentos, os múltiplos usos da água e a utilização dos recursos naturais são fatores que influenciam a disputa por recursos hídricos e o surgimento de conflitos entre as populações (MIERZWA, 2002).

A demanda nacional de consumo de água potável por vazão, em 2014, foi de 1.209,64m^3/s, sendo os principais setores responsáveis pelo consumo hídrico a agricultura, o uso doméstico, e a indústria (ANA, 2015). Embora o setor industrial seja o terceiro consumidor desse volume hídrico, está diretamente relacionado aos problemas de escassez de água, devido à poluição de corpos hídricos com o despejo de diversas substâncias altamente estáveis e persistentes que ficam retidas no meio ambiente (MIERZWA, 2002).

Nas indústrias de pescado, além do descarte de considerável quantidade de resíduos sólidos como pequenos pedaços de tecido muscular, escamas, nadadeiras, cabeças, conchas, carcaças, vísceras e pele; é também gerada, a água residual resultante das operações de assepsia da matéria prima na recepção, escaldamento, cozimento, resfriamento e da higienização dos equipamentos e utensílios em cada troca de turno (MATOS, 2004; SUCASAS, 2011).

Durante o processamento do *Minced* e *Surimi* são efetuados sucessivos ciclos de lavagem para a retirada das proteínas sarcoplasmáticas que, além de conferir coloração ao tecido muscular, impedem a estabilidade e a formação de gel. Geralmente, em indústrias processadoras de *Minced*, são adotados 2 ciclos de lavagem, com proporção água:tecido muscular de 2L:1kg (PARK; LIN, 2005), assim, para obtenção 1 t de *Minced* são gastos 4 mil litros de água potável. A concentração de proteínas solúveis em águas residuais de *Minced*, no primeiro ciclo de lavagem, pode variar de 2 a 8$g.L^{-1}$, representando cerca de 30% da proteína presente na CMS (WATANABE et al., 1982).

Estudos relatam a extração de peptonas a partir de proteínas musculares de pescado e sua eficiência como fonte de nitrogênio para o crescimento de microrganismos (HAARD, 1995), bem como, identificaram peptídeos bioativos que atuam como agente imunomodulador, anti-hipertensivo e anti-trombótico (KIM; MENDIS, 2006) e, ainda, evidenciaram o potencial antioxidante de hidrolisados proteicos de resíduos de pescado, com atuação em diferentes sistemas oxidativos (RAJAPAKSE et al., 2005).

A transformação de resíduos industriais de pescado em novos produtos propicia vantagens econômicas com o aproveitamento de energia, redução de custos operacionais e a

mitigação de problemas ambientais (BORGHESI; ARRUDA; OETTERER, 2008; FERRAZ DE ARRUDA et al., 2006).

Neste contexto, esta revisão objetiva apresentar informações sobre a geração de efluentes em indústrias processadoras de pescado e o processo de extração da água residual do *Minced*, caracterizar as proteínas e peptídeos, deste resíduo, apresentar as suas propriedades bioativas e antioxidantes, e discutir a elaboração da peptona de pescado como coproduto.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Recursos hídricos

2.2.1.1 Poluição aquática

A origem dos nutrientes presentes na água é influenciada, principalmente, por três fatores: escoamento superficial e/ou erosão de áreas agrícolas fertilizadas; erosão por desmatamento; e lançamento de água residual, de uso doméstico e industrial (FUNASA, 2003).

O despejo inadequado de dejetos nos rios e mananciais propiciam a proliferação de algas azuis ou cianobactérias, que se desenvolvem principalmente em locais de elevados níveis de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, podendo produzir toxinas prejudiciais à saúde humana e aos animais silvestres que se utilizam desta água (BRASIL, 2005). As toxinas provenientes de cianobactérias são denominadas cianotoxinas, que agem no organismo de forma sistêmica, como neurotoxinas, citotoxinas, hepatotoxinas e dermatoxinas (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Com a decomposição da matéria orgânica é favorecido o crescimento de algas tóxicas em excesso, que também causam alterações na estrutura do ecossistema, pois alguns peixes se alimentam dessas algas, que por estarem presentes no segundo nível trófico podem causar mortalidade em massa na cadeia alimentar, caracterizando dessa forma, a problemática do processo de eutrofização (BONSDORFF et al., 1997; RIEGMAN,1995).

Ademais, a redução de oxigênio dissolvido na água causa detrimento de espécies aquáticas aeróbias e aumenta a população de organismos anaeróbicos, favorecendo a hidrólise proteica e de compostos nitrogenados presentes nos efluentes. Os produtos do metabolismo desses compostos promovem a liberação de sulfureto de hidrogênio, amoníaco e metano;

todas estas moléculas são poluentes tóxicos ao ecossistema, mesmo em baixas concentrações (BONSDORFF et al., 1997; RIEGMAN,1995).

Em ambientes marinhos, outros fatores que contribuem para a poluição são as propriedades físicas dos compostos, especialmente, a lipofilicidade, pressão de vapor e estabilidade química. Como exemplo, tem-se os compostos organoclorados que quando fixados em um determinado local passam a ser bioacomulados durante a cadeia alimentar (WALKER et al., 2006).

Os sedimentos encontrados no fundo de lagos, rios e oceanos, têm influência direta em espécies que vivem nas profundezas, em razão de sua composição orgânica e inorgânica. Entretanto, o despejo indevido de compostos orgânicos poluentes favorece a adesão dessas partículas ao sedimento, o que limita a mobilidade, disponibilidade e troca dos compostos naturais antes presentes, afetando os organismos que vivem no fundo do oceano (WALKER et al., 2006).

O processo de remoção do poluente depende da natureza do produto químico, dos tipos de ligação na superfície da molécula, da força de ligação, dos produtos que podem ser formados na reação, além da temperatura, pH, e do oxigênio presente na água (WALKER et al., 2006).

Dessa forma, o conhecimento da composição da água residual do processamento de pescado é necessário para efetiva proteção do ecossistema, como também, para garantir a sustentabilidade do setor produtivo do pescado. Conforme relatado por Islam et al. (2004), a maioria dos resíduos de pescado são despejados na proximidade de águas costeiras por meio de canais e, dessa maneira, poluem e sobrecarregam os ecossistemas naturais com fertilização indesejada; além de diminuírem drasticamente as chances de recuperação do ambiente aquático.

2.2.1.2 Escassez

A deficiência em recursos hídricos deixou de ser episódica e de ocorrer *in loco*; e, atualmente, é um real problema de difícil solução. De acordo com a Organização das Nações Unidas, a escassez de água já afeta todos os continentes, sendo 1,2 bilhões de habitantes que vivem em regiões de escassez, e outros 1,6 bilhões que enfrentam o problema devido à escassez de água econômica (países com baixos investimentos na infraestrutura de redes de abastecimento). O consumo de água cresce duas vezes mais que o aumento da população, e a projeção para o ano de 2025 é a de que 1,8 bilhões de pessoas estarão vivendo em países ou regiões com absoluta escassez de água (ONU, 2006).

No Brasil, a água tornou-se um recurso cada vez mais escasso nas grandes regiões metropolitanas e industrializadas, em razão de diversos fatores como a demanda excessiva, ocupação desordenada de áreas urbanas, poluição de mananciais, mau gerenciamento do volume nos reservatórios e baixo índice pluviométrico. A tendência é a de que consumidores possam captar apenas o necessário, e que as indústrias que geram efluentes poluídos paguem pela quantidade descartada, segundo o conceito de "usuário poluidor pagador" (BRASIL, 1997).

Dentre as normas vigentes no Brasil concernentes aos recursos hídricos está a Política Nacional de Recursos Hídricos (Lei nº 9.433/97) que apresenta as normas e os procedimentos gerais para o gerenciamento de recursos hídricos, como os instrumentos de gestão de enquadramento e classificação dos corpos hídricos estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 20/86. Outra norma é a Resolução nº 357/05, que atualiza a Resolução nº 20/86, e dispõe dos padrões de qualidade de cada recurso hídrico, além da padronização do lançamento de efluentes de acordo com o corpo receptor (BRASIL, 2005; GRANZIERA, 2014).

Em âmbito estadual, as normas gerais apresentam algumas especificações, sendo de responsabilidade dos órgãos fiscalizadores de cada estado da União, verificar o cumprimento das leis. Contudo, em alguns casos a lei não é efetiva devido à falta de fiscalização, realidade ainda mais frequente em estados da nação com reduzido número de agentes ambientais (GRANZIERA, 2014).

A relação desproporcional entre a demanda e a disponibilidade de água converge para um quadro de estresse hídrico, a exemplo, a crise que atingiu o Estado de São Paulo e apresentou ao país a problemática na segurança hídrica, na capacidade de reserva e no acesso à água (ANA, 2014).

Assim, a procura por fontes alternativas de água, via reutilização de águas residuais, águas salobras e águas do mar, serão questões prementes nas próximas décadas devido à escassez e/ou dificuldade para acessar fontes tradicionais de água (BRUGGEN; VANDECASTEELE, 2002).

2.2.1.3 Reutilização

A adesão às técnicas de reutilização da água e a diminuição do desperdício na agricultura, indústria e em domicílio, bem como, a implementação de projetos de conservação aos mananciais terão maior destaque nas próximas décadas (ANA, 2014).

De acordo com a Agência Nacional de Águas, em relatório divulgado em 2013, o setor industrial é considerado o terceiro maior do país em retirada de vazão de água dos rios, e o

quarto em relação ao consumo (ANA, 2013). Como exemplo, em indústrias químicas e alimentícias o consumo de água potável representa aproximadamente 50% do volume total utilizado em todas as etapas de produção (CASANI; ROUHANY; KNOCHEL, 2005).

O conceito de reutilização da água residual ainda é relativamente novo, porém já é aplicado em algumas indústrias para as etapas de limpeza, abastecimento de sanitários, água para caldeiras, sistemas de resfriamento, e para uso como potável após ser purificada (WALHA et al., 2008). Entretanto, no Brasil ainda não é permitido o reuso da água para fins potáveis, de acordo com a Resolução nº 54/2005 e a Resolução nº 430/2011 do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

Matsumura e Mierzwa (2008) apresentaram estudo com indústrias de abate e processamento de aves que, diariamente, são responsáveis pelo consumo de 2.621,71m^3 de água potável. Com a identificação das falhas operacionais e perdas físicas por vazamentos e desperdícios, e após a adoção de medidas corretivas, foram alcançados 29,3% de redução de consumo de água e um aumento de 41,4% da produção.

A tendência é montar um sistema de tratamento acoplado às etapas de processamento da indústria, com a junção de tecnologias que permitem o abastecimento e tratamento de águas residuárias em circuito fechado (CASANI; KNOCHEL, 2002). Assim, nas últimas décadas destaca-se o interesse de pesquisas voltadas aos sistemas alternativos de tratamento de matéria orgânica, como o uso de sistemas biológicos de tratamento anaeróbicos ou aeróbicos; e adicionalmente a combinação com tratamentos com membranas ultra e nanofiltrantes ou osmose reversa (LEFEBVRE; MOLETTA, 2006).

A introdução desse sistema favorece a redução de custos, diminuição do consumo de água, e, por conseguinte, a reciclagem das águas residuais (CASANI; KNOCHEL, 2002) sem comprometer a qualidade e higiene do produto final (CHOWDHURY; VIRARAGHAVAN; SRINIVASAN, 2010).

2.2.2 Indústrias processadoras de pescado, descartes e consumo de água

Cerca de 30-40% da produção pesqueira mundial são consumidos *in natura* ou no “estado de frescor”, apenas sob a ação do gelo; os 60-70% restantes são processados para consumo humano e outros fins (CARAWAN, 1991; PARK; MORRISSEY, 2000). Em vista do crescimento da aquicultura surgiram novas indústrias processadoras de pescado. Considerando o reduzido rendimento e aproveitamento do pescado, à medida que são processadas elevadas quantidades, são produzidos grandes volumes de material residual (SUCASAS, 2011).

Aliados ao baixo aproveitamento encontram-se a falta de informação, fiscalização inadequada e o não cumprimento dos requisitos estabelecidos pela legislação ambiental. Este somatório de aspectos indesejáveis contribui para o agravamento dos problemas ambientais, sanitários e econômicos já característicos da cadeia produtiva do pescado no Brasil (GRANZIERA, 2014; OETTERER, 2002).

Apesar da tendência recente de transformações de resíduo em coprodutos, ainda são descartadas consideráveis quantidades de efluentes do processamento (ISLAM et al., 2004). Comparados ao esgoto doméstico, os efluentes das indústrias de pescado chegam a ser até 10 vezes mais concentrados em quantidade de matéria orgânica (CHOWDHURY; VIRARAGHAVAN; SRINIVASAN, 2010; MAUDIN; SZABO, 1974).

O resíduo de pescado apresenta elevada quantidade de matéria orgânica, com destaque para sua composição proteica, que representa cerca de 58% do resíduo (ESTEBAN et al., 2007). Em plantas de processamento de pescado os efluentes são caracterizados, em sua maioria, pela elevada demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais (SST), óleo e gordura (FOG), matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio e fósforo (CHOWDHURY; VIRARAGHAVAN; SRINIVASAN, 2010; INTRASUNGKHA; KELLER; BLACKALL, 1999; ISLAM et al., 2004; PALENZUELA-ROLLON et al., 2002; SIKORSKI, 1990).

Nas indústrias de processamento de pescado em geral, as etapas de processamento que utilizam água são: filetagem, resfriamento, lavagem, fermentação, conservação e defumação; com destaque para os frigoríficos, que geram efluentes de elevado conteúdo orgânico, podendo apresentar de 5 a 12% de proteínas (AFONSO; BÓRQUEZ, 2002; CHOWDHURY; VIRARAGHAVAN; SRINIVASAN, 2010; PALENZUELA-ROLLON, 1999; SIKORSKI, 1990).

As indústrias processadoras de pescado são caracterizadas pelo elevado volume de água consumido durante as etapas tecnológicas, gerando ao final uma alta quantidade de água residual rica em matéria orgânica e compostos minerais (como o cloreto de sódio) (DROST et al., 2014).

Uma determinada unidade processadora de pescado com capacidade de 100 t.peixe.h^{-1} pode gerar diariamente, 10 a 40 $m^3.h^{-1}$ de efluentes, sendo que cerca de 0,5 a 2,0g.L^{-1} desse efluente equivalem à matéria proteica dependendo da espécie de pescado (AFONSO; FERRER; BÓRQUEZ, 2004).

Em um dos países de maior atividade pesqueira, o Chile, as indústrias em regiões próximas à cidade de Concepción apresentaram um descarte anual de 55.900 t de matéria

orgânica, que é proporcional ao efeito poluidor de 1,5 milhão de habitantes. Nessa região, o processamento de pescado é de 100 $t.h^{-1}$, e o descarte de material orgânico representa 13 a 39 kg de $DQO.t^{-1}$ (ASPÉ; MARTÍ; ROECKEL, 1997).

O conteúdo da água residual varia conforme a indústria e o efluente pode ser classificado de acordo com o potencial poluidor, sendo baixo nas operações de lavagem, médio na filetagem, e alto na água residual proveniente da etapa de sangria. Efluentes da evisceração e sangria podem propiciar elevada DQO (CARAWAN, 1991; CHOWDHURY; VIRARAGHAVAN; SRINIVASAN, 2010; KUCA; SZANIAWSKA, 2009; ISLAM et al., 2004).

A água residual pode ser gerada nas seguintes situações:

- Água do mar que é trazida por meio da despesca. Em descarregamentos de 1-10$m^3.t^{-1}$ de pescado, são despejados 200$m^3.h^{-1}$ de água do mar, considerando uma indústria com capacidade de 100 t de pescado.h^{-1}. Além disso, essa água tem elevada carga orgânica com uma DQO de 7 a 49g $O_2.l^{-1}$;
- Efluentes gerados ao longo da produção de farinha de peixe, com taxas de fluxo de 20-40$m^3.h^{-1}$ para indústrias de 100 t de pescado.h^{-1}, e que contém carga orgânica consideravelmente alta. Assim, antes do descarte, a taxa de fluxo total deve ser de 1000-1200 $m^3.h^{-1}$ e com DQO de 3 a 9g $O_2.l^{-1}$;
- Efluentes gerados na produção de *Surimi* (produto obtido a partir do *Minced*). A água residual proveniente do processamento do *Surimi* possui elevada concentração proteica e de forma semelhante à produção da farinha de peixe, necessita de grande quantidade de água para a lavagem. São gastos cerca de 27m^3 de água por tonelada de *Surimi* produzido. Devido ao material proteico, compostos graxos, vitaminas, aminas, pigmentos e enzimas arrastadas na lavagem do músculo do pescado, esse efluente possui elevada carga orgânica, e apresenta-se turvo, com coloração amarelo esverdeada e odor forte e desagradável (AFONSO; BÓRQUEZ, 2002; DEL-VALLE; AGUILERA, 1990; OMIL; MENDEZ; LEMA, 1995).

Em relação ao nível de periculosidade, Afonso e Bórquez (2002) afirmaram que nenhum dos efluentes supracitados possui substâncias tóxicas e/ou substâncias potencialmente cancerígenas, quando comparados aos encontrados nos efluentes urbanos e em outros efluentes industriais; porém, se descartados incorretamente e descontroladamente, em grandes volumes, podem causar sérios impactos ambientais.

Diante deste cenário, está o desafio para as indústrias processadoras: harmonizar a relação entre a produção de bens e serviços, juntamente com um crescimento sustentável, tanto econômico como social (SUCASAS, 2011).

2.2.2.1 Alternativas para recuperação da água e de proteínas

Devido às perdas econômicas com gastos energéticos, excessiva geração de efluentes, ações punitivas da legislação e pressão social frente à responsabilidade ambiental (BARBOSA et al., 2010); têm sido investigadas novas tecnologias para recuperação parcial ou integral de moléculas de interesse presentes nos efluentes industriais. Um dos exemplos é a aplicação de membranas filtrantes (WALHA et al., 2008).

Concernente a isso, em estudo realizado em uma indústria processadora de filés de arenque do atlântico (*Clupea harengus*), foi avaliada a eficiência de membranas ultrafiltrantes e realizado o monitoramento da qualidade da água de salmoura a ser reutilizada no processamento. Como resultado, os autores relataram a eficiência do processo de separação, que possibilitou a eliminação de parte considerável da matéria orgânica e contaminantes microbiológicos, além de demonstrar que a recirculação da água para a salmoura obedecia aos requisitos estabelecidos para a garantia da qualidade e segurança do produto final do sistema APPCC (DROST et al., 2014).

Outro exemplo da eficiência dessa técnica está no estudo realizado por Huidobro, Montero e Borderías (1998), em que a ultrafiltração foi utilizada para recuperar as proteínas perdidas durante a etapa de lavagem do *Minced* de sardinha (*Sardina pilchardus*). Após a extração, os autores sugerem a reintrodução dessas proteínas ao produto final, ou o reuso como ingredientes destinados a indústrias farmacêuticas e alimentícias, em que a proteína é a principal matéria prima.

Outras tecnologias, apesar de ainda incipientes, também são opções para aproveitamento de efluentes e a transformação destes em coprodutos de valor agregado. Manetti et al. (2011) realizaram tratamento de água residual de processamento de pescado, associando tratamentos biológicos, com cianobactérias, e químicos, com controle do pH. Na condição de 300mg.L^{-1} de cloreto férrico e pH 7,0, os autores obtiveram a máxima eficiência para a remoção de impurezas (93% de sólidos suspensos, 97% de turbidez, 85% de DQO).

Em trabalho realizado por Kanjanapongkul et al. (2009), as proteínas sarcoplasmáticas presentes na água residual gerada no processamento de *Surimi* foram submetidas ao processo de extração ôhmico e obtiveram eficiência de 60% de coagulação de proteína, nas seguintes condições: intensidade do campo elétrico 30V.cm^{-1}, velocidade de fluxo de 100ml.min^{-1} e temperatura de 60-70ºC. Dessa forma, os autores relataram diminuição da DBO no efluente.

A mudança do pH também pode ser considerada como um processo de separação das proteínas presentes na água residual de *Surimi*. Bourtoom et al. (2009) verificaram melhores

resultados para precipitação de proteínas de *Surimi* do peixe nemipteridae (*Nemipterus hexodon*), com a adição de solvente orgânico na proporção de 60g de etanol / 100g de água residual. A solubilidade mínima de proteínas foi realizada em pH 3,5, sendo observado que o aumento da temperatura diminuía a solubilidade. Os autores também sugerem a caracterização das proteínas extraídas em cada ciclo de lavagem, sugerindo que estas poderiam ser recuperadas e direcionadas à indústria de alimentos para a elaboração de filmes comestíveis, emulsificantes e agentes formadores de espuma.

Para extração das proteínas descartadas nos ciclos de lavagem do *Surimi*, Wibowo et al. (2007) ajustaram o pH da água residual para 6, e adicionaram quitosana complexada a ânios de alginato. Os autores testaram seis tipos de amostras de quitosana, com desacetilação e pesos moleculares diferentes, e uma amostra comercial. Como resultado, a concentração mais baixa da amostra de quitosana obteve resultado cinco vezes mais elevado quando comparada à amostra comercial. A melhor resposta foi encontrada na amostra de quitosana com 94% de desacetilação e peso molecular de $1{,}5x10^6$ Da, que propiciou 79-86% de adsorção das proteínas (WIBOWO et al., 2007).

2.2.3 CMS e *Minced*

A CMS é obtida pela retirada do tecido muscular separado dos ossos e da carcaça, através de uma ação mecânica da desossadora, sendo a massa muscular resultante, posteriormente congelada por processos rápidos ou ultra-rápidos (PESSATTI, 2001).

A partir do CMS é obtido o *Minced*, que caracteriza a primeira etapa de isolamento ou o fracionamento das proteínas presentes no pescado (OETTERER, 2006). Para isso, é realizada a lavagem ou a clarificação da CMS que proporciona a remoção de pigmentos, proteínas solúveis, enzimas, parte dos lipídeos e componentes flavorizantes, conferindo estabilidade à biomassa (HULTIN et al., 2005; LANIER, 1986; PARK; LIN, 2005; VENUGOPAL, 2009).

Utilizando o *Minced* como matéria prima podem ser elaborados produtos como *Nuggets*, *Fishburgers*, *Fishfinger*, análogos, *Quenelles*, entre outros. Em estudo realizado com *Minced* de tilápia, as características físicas do produto permaneceram estáveis, quando armazenado à temperatura de -18ºC por 180 dias, apresentando 100% de aceitabilidade sensorial. Desse modo, além de serem produtos duráveis, atendem as necessidades dos consumidores, como conveniência e praticidade (BISCALCHIN-GRYSCHEK; OETTERER; GALLO, 2003; ANGELINI et al., 2013).

Para a obtenção do *Minced*, a CMS de pescado é lavada com água potável refrigerada, sendo o número de ciclos de lavagem determinado conforme a qualidade requerida ao produto final (PARK; LIN, 2005). O emprego de água refrigerada está relacionado à sensibilidade das proteínas a elevadas temperaturas. Assim, em condições de altas temperaturas, proteínas sarcoplasmáticas se aderem às proteínas miofibrilares, impedindo a formação de um gel de alta estabilidade, acarretando diminuição na capacidade de retenção de água (SUZUKI, 1987). Em decorrência das baixas temperaturas, ocorre relaxamento da estrutura sarcoplasmática, possibilitando a interação com a água (PENNEY; GOLDSPINK, 1980).

A quantidade de água adicionada na operação de lavagem ou clarificação, o tempo de contato com o tecido muscular e o número de ciclos de lavagem variam de acordo com a matéria prima e a finalidade do processo, visando um determinado produto (PARK; LIN, 2005).

Assim, os primeiros *Surimis* desenvolvidos na década de 1990 utilizavam proporções de água e *Minced* muito elevadas, como 5:1 ou 10:1 em até 3 a 4 lavagens. Park e Lin (2005) relatam processamentos em que foram gerados até 29,1 L de água para cada 1 kg de *Surimi* produzido.

O processo de lavagem excessivo causa a perda de umidade do produto, perda de partículas finas do tecido e de nutrientes solúveis. Em contrapartida, a lavagem insuficiente, pode resultar em perdas da qualidade do gel durante o armazenamento do produto congelado (PARK; LIN, 2005).

Visando minimizar o volume de efluente e os custos de produção é sugerida a proporção de 2 L para cada 1 kg de *Minced* em dois ciclos de lavagem (PARK; LIN, 2005).

2.2.4 Substratos de crescimento microbiano

O crescimento microbiano é favorecido por meio de cultura rico em energia, contendo carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e demais moléculas orgânicas que sejam digeríveis pelo organismo. Os meios de cultivo microbiano comercializados para laboratório são denominados meios complexos e são elaborados, principalmente, com nutrientes extraídos de carnes, plantas e leveduras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A formulação básica de um ágar nutriente de bactérias heterotróficas é apresentada na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição do ágar nutriente de bactérias heterotróficas

Componente	Quantidade
Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1 L

(TORTORA; FUNKE; CASE, 2012)

Nos meios complexos, a proteína é a principal molécula responsável pelo fornecimento de energia, carbono, nitrogênio e enxofre para os microrganismos. Por ser uma molécula grande e, em alguns casos insolúvel, as proteínas podem ser metabolizadas por microrganismos que produzem proteases e peptidases extracelulares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Com a hidrólise enzimática ou ácida de proteínas, são produzidas cadeias de aminoácidos mais curtas denominadas peptonas (RENHORAN et al., 2011). A formação de cadeias peptídicas e sua solubilidade são características vantajosas por serem facilmente digeríveis pela maioria das bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As peptonas podem ser obtidas a partir de matérias primas vegetais como farinha de soja, levedura e sementes de algodão; e animais, como carne, gelatina e caseína. O processo de hidrólise pode ser enzimático ou ácido, sendo que a eficiência da peptona depende do tipo de proteína e método hidrolítico empregado (RENHORAN et al., 2011).

A principal característica da peptona é ser fonte de nitrogênio suficiente para subsidiar o crescimento bacteriano, sendo considerada peptona de qualidade a que possui quantidade elevada de nitrogênio, especialmente os presentes em ligações proteicas (JOHNSON; PETERSON, 1974).

Os microrganismos necessitam de nitrogênio orgânico para seu crescimento, assim são incorporados aos meios de cultura, nitrogênio proveniente de hidrolisado proteico, bactopeptona, triptona e casitona (extraídos da caseína), extrato de carne e levedura (GREEN; PASKELL; GOLDMINTZ, 1977; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2004). Segundo Martone, Borla e Sánchez (2005), na formulação dos meios de cultura, os compostos nitrogenados são considerados os ingredientes mais onerosos.

Em busca de outras fontes, pesquisadores têm demonstrado que as bactérias crescem bem em peptonas elaboradas com tecidos de pescado (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005;

CLAUSEN; GILDBERG; RAA, 1985; DUFOSSÉ; DE LA BROISE; GUERARD, 2001; GILDBERG; BATISTA; STROM, 1989; VIEIRA et al., 2005), além de apresentarem melhor desempenho do que as peptonas disponíveis comercialmente. Uma possível justificativa reside no fato de que a composição dos tecidos de pescado apresenta mais compostos nitrogenados solúveis, do que a maioria dos outros tecidos biológicos (HAARD, 1995), e além da elevada quantidade de nitrogênio total, estudos relacionam a eficiência à sequência de aminoácidos presentes nos peptídeos de pescado (DUFOSSÉ; DE LA BROISE; GUERARD, 2001; RENHORAN et al., 2011).

2.2.4.1 Peptonas de pescado

Os primeiros relatos do uso de produtos do pescado, ou de espécies subutilizadas, para a elaboração de meios de cultura são do final da década de 1940, com a hidrólise dos músculos de espécies de pescado, e transformação de meio base para o crescimento de microrganismos anaeróbicos (TARR; DEAS, 1949). Logo depois, Snieszko, Griffin e Friddle (1950) prepararam meio de cultura extraindo peptona a partir da hidrólise do tecido muscular de truta, e observaram o crescimento do *Hemophilus piscium*. Os autores apresentaram a peptona de pescado como uma possível alternativa de baixo custo para subsidiar o crescimento de microrganismos. Desde então, surgiram várias pesquisas visando testar o potencial do pescado como matéria prima para elaboração de meios de cultura (BEUCHAT, 1974; GREEN; PASKELL; GOLDMINTZ, 1972; GREEN et al., 1973; GREEN; PASKELL; GOLDMINTZ, 1977; HALE, 1969; HALE, 1972; HALE, 1974; KRISHNASWAMY; LAHIRY, 1963; PRAZNICK; ROSENBERG, 1973; STEPHENS et al., 1976;).

Geralmente, peptonas destinadas para fins comerciais têm origem bovina ou suína, extraídas da carne, órgãos internos, gelatina e leite (BRIDSON; BRECKER, 1970). Entretanto, em razão de surtos de encefalopatia espongiforme bovina e gripe suína, o mercado tornou-se mais exigente na aquisição de matérias primas com certificação atestando sanidade, portanto, buscou-se outras alternativas (WELLS et al., 1987).

Estudos recentes apontam que a peptona de pescado possui melhor desempenho como substrato, ao sustentar o crescimento e desenvolvimento microbiano por mais tempo, quando comparados às peptonas comerciais (FALLAH; BAHRAM; JAVADIAN, 2015; GILDBERG et al., 2010; SAFARI et al., 2011; SARAFI et al., 2012).

Devido às características apresentadas pelos hidrolisados proteicos extraídos do pescado e a variedade de espécies existentes, foram elaborados diversos testes comparando a eficiência das peptonas de resíduos em relação às peptonas comerciais, sendo utilizados como

matéria prima os seguintes resíduos: vísceras (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005; DERAZ et al., 2011; DUFOSSÉ; DE LA BROISE; ELLOUZ et al., 2001; GILDBERG et al., 2010; GUERARD, 2001; HUSIN et al., 2015; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2004; VÁZQUEZ et al., 2009), tecido muscular (DUFOSSÉ; DE LA BROISE; GUERARD, 2001; FALLAH; BAHRAM; JAVADIAN, 2015; GHORBEL et al., 2005; KLOMPONG et al., 2012; MARTONE; BORLA; SÁNCHEZ, 2005; TRIKI-ELLOUZ et al., 2003; VIEIRA et al., 2005), cabeça (ELLOUZ et al., 2001; HUSIN et al., 2015; ROBERT et al., 2015; SAFARI et al., 2011; SAFARI et al., 2012; VIEIRA et al., 2005), e água residual (H-KITTIKUN; BOURNEOW; BENJAKUL, 2012; VÁZQUEZ; MURADO, 2008).

Ademais, outras pesquisas realizadas tiveram intuito de avaliar o potencial da peptona de pescado como meio nutriente para o desenvolvimento de determinado microrganismo e, posteriormente, quantificaram a produção de proteases, bacteriocinas, ácidos, e outros substratos de importância na indústria alimentícia e farmacêutica (VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2004; VÁZQUEZ et al., 2009).

Dessa forma, é possível fechar o ciclo de produção de alimentos, quando o desperdício de alimentos torna a ser utilizado como fonte de nutrientes, e com a reciclagem de resíduos há valorização dos coprodutos (VÁZQUEZ; MURADO, 2008).

2.2.5 Proteínas do pescado

2.2.5.1 Características e propriedades

As proteínas são os componentes funcionais encontrados em maior quantidade na estrutura das células do corpo. Os aminoácidos são precursores de ácidos nucléicos, hormônios, vitaminas e outras funções moleculares (VENUGOPAL, 2009).

O músculo do pescado é definido como um tecido heterogêneo, composto por vários tipos de fibras musculares, uma matriz extracelular e sangue. As principais proteínas presentes no músculo são: miofibrilares (60-70%), solúveis em soluções salinas, formadas pela actina e miosina e responsáveis pela contração muscular; sarcoplasmáticas (20-30%), hidrossolúveis, proteínas ligadas aos ácidos nucleicos, lipoproteínas, cromoproteínas do músculo e do sangue; e as proteínas do estroma (2-4%), menos solúveis, constituídas pelo colágeno e a elastina (OETTERER, 2006; OGAWA; MAIA, 1999; ZAYAS, 1997). Apesar das proteínas sarcoplasmáticas serem consideradas as mais solúveis do tecido muscular; algumas proteínas miofibrilares também podem ser removidas com água (ZAYAS, 1997).

As proteínas sarcoplasmáticas estão localizadas no fluído intersticial e intracelular e são constituídas por mais de 100 tipos de proteínas diferentes, sendo que a maioria apresenta ponto isoelétrico entre pH 6,0 e 7,0, e peso molecular variando entre 10.000 e 100.000 kDa. As principais proteínas são as enzimas glicolíticas que participam do processo de degradação da glicose na célula e representam cerca de 70% das proteínas hidrossolúveis; as parvalbuminas de baixo peso molecular presentes nas espécies de peixes de carne branca, como a tilápia e merluza, e mioglobina (OGAWA; MAIA, 1999; PARK; LIN, 2005; REHBEIN, 2009) e a transglutaminase que atua na ligação cruzada de moléculas, formando polímeros tridimensionais de textura firme (LANIER; CARVAJAL; YONGSAWATDIGUL, 2004).

O grupo de proteínas sarcoplasmáticas compreende cerca de 500 proteínas individuais incluindo enzimas metabólicas. A maioria das proteínas pertencentes a esse grupo possui estrutura globular de alta densidade, devido à exposição de carga polar na extremidade lateral da cadeia. Um exemplo são as mioglobinas, responsáveis pela pigmentação da carne (XIONG, 2004).

Dentre as propriedades físico-químicas das proteínas musculares do pescado, são atribuídas às proteínas miofibrilares a capacidade de retenção de água e de ligação entre as fibras do músculo, a formação da emulsão de gordura, e atuação na textura. As sarcoplasmáticas realizam a ligação com moléculas de água, coloração e emulsão de gordura; e o colágeno atua na retenção de água, suculência e rendimento do produto (VENUGOPAL, 2009; XIONG, 2004).

As propriedades funcionais de proteínas estão relacionadas à sua estrutura, como a sequência e composição de aminoácidos, peso molecular, conformação, carga distribuída na molécula e ligações cruzadas entre inter e intrapeptídeos (CASARIN; CLADERA-OLIVEIRA; BRANDELLI, 2008; VENUGOPAL, 2009; ZAYAS, 1997); são influenciadas por fatores moleculares como a estabilidade conformacional, flexibilidade, posição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos em estruturas primárias, e fatores externos, como o pH, força iônica, temperatura, e competição por adsorção com outras proteínas ou lipídeos (VENUGOPAL, 2009).

A solubilidade das proteínas é considerada o principal parâmetro indicador de sua funcionalidade, além de ser o primeiro aspecto determinado durante o desenvolvimento de testes para novos ingredientes proteicos. A solubilização é determinada pela porção de nitrogênio presente na proteína, que é solúvel em condições específicas (ZAYAS, 1997).

A solubilidade é influenciada pela composição e sequência de aminoácidos, peso molecular, conformação e presença de grupos de aminoácidos polares ou apolares, das proteínas; e fatores ambientais: força iônica, tipos de solvente, pH, temperatura, agentes oxidantes e a adição de ingredientes não cárneos (XIONG, 2004; ZAYAS, 1997).

Dessa forma, com a perda da funcionalidade é afetada a solubilidade, capacidade de ligação com a água, emulsificação e, por conseguinte, a textura e capacidade de retenção de água (XIONG, 2004).

2.2.5.2 Hidrolisados proteicos

A hidrólise enzimática de proteína de pescado produz um conjunto de aminoácidos livres, di-, tri-, e oligo-péptidos, o que faz aumentar o número de grupos polares e a solubilidade dos compostos do hidrolisado. Esse fato altera as características das proteínas e melhora sua qualidade funcional e disponibilidade (MULLALLY et al., 1995).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm apontado a variedade na composição de aminoácidos de hidrolisados de pescado, em razão da matéria prima, tipo de enzima, e condições da hidrólise (KLOMPONG et al., 2009).

Os hidrolisados das proteínas de pescado como ingredientes em alimentos auxiliam nas propriedades estruturais, como capacidade de retenção de água, capacidade de absorção de óleo, solubilidade de proteína, geleificação, capacidade de produzir espuma e emulsificação (CHALAMAIAH et al., 2012).

Os aminoácidos encontrados em maiores quantidades, em hidrolisados de diversas espécies de pescado, são o ácido aspártico e o ácido glutâmico (BENJAKUL; KISHIMURA, 2012; GHASSEM et al., 2011; KHANTAPHANT; KLOMPONG et al., 2009; WASSWA et al., 2007; YIN et al., 2010).

Com a hidrólise é possível obter diversos tipos de peptídeos e, assim, grande variedade de bioatividade, sendo importante o controle do processo para que sejam obtidos os compostos bioativos estabelecidos antes da clivagem proteica (PICOT et al., 2006).

2.2.5.3 Peptídeos bioativos

Há várias técnicas para isolar os peptídeos de pescado: extração química, com adição de ácido ou base; hidrólise enzimática; fermentação microbiana e precipitação de proteínas com adição de solução salina (URAKOVA et al., 2012).

Utilizar resíduos industriais de pescado como fonte de compostos bioativos, peptídeos, ácidos graxos poli-insaturados, hidrocarbonetos e microelementos, é necessário tanto pelos fatores econômicos como ambientais (AKIHISA et al., 2004; URAKOVA et al., 2012).

As pesquisas sobre peptídeos bioativos têm sido intensificadas devido ao seu potencial em contribuir para uma nutrição saudável (HARTMANN; MEISEL, 2007). Assim, cientistas classificaram como "Cryptome", um subconjunto de proteínas com capacidade de gerar peptídeos bioativos. As proteínas (crypteins) e peptídeos (cryptides) dessa classe podem apresentar propriedades semelhantes ou superiores quando comparadas às moléculas de origem (PIMENTA; LEBRUN, 2007).

Desse modo, diversos ensaios químicos e biológicos estão sendo aplicados e desenvolvidos para rastrear os efeitos e a função regulatória dos peptídeos bioativos no corpo humano (HARTMANN; MEISEL, 2007). Em estudo farmacológico foram avaliados os efeitos dos peptídeos de pescado como agentes anti-hipertensivos, antitumorais, imunomoduladores, antioxidantes e antimicrobianos (URAKOVA et al., 2012).

Com base nisso, hidrolisados de produtos e coprodutos provenientes de animais aquáticos podem apresentar boa atividade antioxidante devido à composição e sequência de seus peptídeos (LEE et al., 2010). No entanto, os testes de bioatividade de hidrolisados proteicos de pescado são realizados na maioria *in vitro*, sendo então, necessários estudos detalhados *in vivo* que possam elucidar os mecanismos de ação dos peptídeos e seus efeitos fisiológicos (CHALAMAIAH et al., 2012; HARNEDY; FITZGERALD, 2012).

2.2.6 Antioxidantes

A formação de radicais livres nas células ou no interior das mitocôndrias ocorre devido às reações endógenas, enzimáticas/não enzimáticas, ou também em razão das respostas de estímulos externos e produtos químicos (SHEU; NAUDURI; ANDERS, 2006). Sendo inevitável a presença de radicais livres em organismos aeróbicos em função da respiração (KUMAR; NAZEER; JAIGANESH, 2011).

Contudo, espécies reativas ao oxigênio (ERO) anômalas têm sido associadas ao desenvolvimento do câncer e doenças cardiovasculares, pois são gerados descontroladamente e em quantidade elevada de radicais livres no organismo, que podem ocasionar danos oxidativos às moléculas de DNA, proteínas e lipídeos (SEIFRIED et al., 2007).

A ingestão de alimentos ricos em compostos antioxidantes é uma alternativa promissora para a prevenção e tratamento destas doenças (SEIFRIED et al, 2007). De acordo com a definição de Halliwell et al. (1995), antioxidante é uma substância que, em baixas

concentrações, retarda significativamente ou evita a oxidação de um substrato. Assim, não são todas as substâncias redutoras envolvidas em uma reação química que são consideradas antioxidantes, e sim apenas os compostos que atuam protegendo o alvo biológico (MAGALHÃES et al., 2008).

Na indústria alimentícia, são utilizados com muita frequência antioxidantes sintéticos butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) devido a elevada capacidade antioxidante em comparação aos compostos naturais (α-tocoferol e ácido ascórbico), porém, atualmente foram apontados em estudos como os prováveis causadores de potenciais riscos à saúde (BOTTERWECK et al., 2000; ITO et al., 1986; SEIFRIED et al., 2007).

Desse modo, a necessidade e a busca por antioxidantes naturais como alternativa ao uso dos antioxidantes sintéticos, levou ao desenvolvimento de várias pesquisas na última década (LEE et al., 2010).

2.2.6.1 Peptídeos antioxidantes de pescado e suas características

A partir da hidrólise proteica são obtidas diferentes cadeias peptídicas sendo caracterizados como peptídeos antioxidantes aqueles normalmente compostos de 3-16 resíduos de aminoácidos (LI et al., 2007). Sendo essa atividade relacionada ao sequestro do radical oxidante, a inibição da peroxidação lipídica e a capacidade de quelar íons metálicos (YOU et al., 2010). A estrutura dos peptídeos, bem como a sua sequência de aminoácidos, determinam suas propriedades antioxidantes (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Shahidi, Han e Synowiecki (1995) foram os primeiros autores a relatar a atividade antioxidante de hidrolisado de proteína de pescado, e a partir de então diversos estudos foram realizados em várias espécies.

A maioria dos peptídeos antioxidantes de proteínas de pescado apresenta moléculas de baixo peso molecular, fácil absorção, baixo custo e alta atividade (SARMADI; ISMAIL, 2010). Os tipos de enzimas aplicadas na hidrólise e seus respectivos graus de hidrólise determinam a estrutura dos peptídeos e sua funcionalidade (LIU et al., 2014).

Segundo estudos recentes, peptídeos de baixo peso molecular (<3 KDa) são os que apresentam maior atividade antioxidante, mesmo em diferentes tipos de resíduo, espécies e métodos hidrolíticos (CENTENARO et al., 2014; FAN et al., 2012; FARVIN et al., 2014; JE et al., 2007; REN et al., 2008; SAIDI et al., 2014; WU; CHEN; SHIAU, 2003; YANG et al., 2008; ZHANG; DUAN; ZHUANG, 2012). Esses resultados sugerem que frações <3 kDa contém peptídeos ou aminoácidos que são bons doadores de hidrogênio e desse modo convertem radicais livres em produtos estáveis (FARVIN et al., 2014; JE et al., 2007).

Outras propriedades que caracterizam os peptídeos antioxidantes são a presença de aminoácidos hidrofóbicos e alguns resíduos de histidina, prolina, metionina, cisteína, tirosina, triptofano e fenilalanina (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995; CHEN et al., 1996; CHEN et al., 1998). A sequência de aminoácidos hidrofóbicos contribui para a interação do peptídeo com moléculas de lipídeos, proporcionando proteção contra a peroxidação e liberação de radicais livres derivados de lipídeos (JE et al., 2007). Outros estudos apontam que resíduos de peptídeos formados pelos aminoácidos glicina e leucina, e aminoácidos aromáticos como a tirosina e fenilalanina, também são eficazes no sequestro de radicais livres. No caso da tirosina, a eficiência é atribuída à presença de grupos fenólicos e à capacidade destes de servirem como doadores de hidrogênio (JUN et al., 2004).

Segundo Tsuge et al. (1991), a histidina, metionina e cisteína, atuam na atividade de sequestro de radicais, devido às características de suas estruturas espaciais pertencentes ao grupo imidazol – compostos heterocíclicos formados por anel aromático, porém com vários substituintes -, o que justifica a capacidade da histidina de doar prótons. A metionina possui tendência de ser oxidada a sulfóxido metionina, e a cisteína de doar o enxofre ao oxigênio (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005). E os aminoácidos ácidos, como a glutamina e a asparagina, quelam íons metálicos (ZHANG et al., 2010).

A diversidade na composição de organismos marinhos, entre outras razões, está relacionada ao fato de que estes vivem em ambientes mais exigentes, competitivos e agressivos quando comparados ao meio terrestre, o que demanda uma produção deveras específica de moléculas potencialmente ativas (KHALED et al., 2014). Sendo, atualmente, a análise do proteoma uma valiosa ferramenta para a identificação de proteínas específicas, seja na descoberta de mecanismos causadores de alergias (YU et al., 2003) ou na diferenciação de espécies, evitando práticas fraudulentas onde espécies de baixa qualidade são apresentadas como espécies comercialmente mais valiosas (BARIK et al., 2013).

2.3 Conclusão

Indústrias processadoras de pescado, principalmente as processadoras de *Minced*, apresentam efluentes ricos em proteínas, que podem ser sugeridos como matéria prima para elaboração de coprodutos. Compostos bioativos e de elevada capacidade antioxidante, ou peptonas para crescimento de microrganismos, são viáveis para reaproveitar o material residual de várias espécies de pescado. Ao ser praticado o descarte incorreto, são provocados

danos ao ambiente que prejudica a imagem das empresas processadoras de pescado que, no geral, apresentam baixa adoção a inovações.

Referências

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**, Amsterdam, v. 142, p. 29-45, 2002.

AFONSO, M. D.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. An economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 15, p. 506-512, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil**. Brasília, 2013. 434p. Disponível em: < http://arquivos.ana.gov.br/institucional/spr/conjuntura/ANA_Conjuntura_Recursos_Hidricos_Brasil/ANA_Conjuntura_Recursos_Hidricos_Brasil_2013_Final.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Encarte especial sobre a crise hídrica:** conjuntura dos recursos hídricos no Brasil. Brasília, 2014. 30p. Disponível em: <http://conjuntura.ana.gov.br/docs/crisehidrica.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.

Agência Nacional das Águas (ANA). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil** Informe Brasília, 2015. 88p. Disponível em: <http://www3.snirh.gov.br/portal/snirh/snirh-1/conjuntura-dos-recursos-hidricos/conjuntura_informe_2015.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2015.

AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; OGATA, M.; UKIYA, M.; IIZUKA, M.; SUZUKI, T.; METORI, K.; SHIMIZU, N.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive effects of polyunsaturated fatty acids. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 205, n. 1, p. 9-13, 2004.

ANGELINI, M. F. C.; GALVÃO, J. A.; VIEIRA, A. F.; SILVA, L. K. S.; SHIRAHIGUE, L. D.; CABRAL, I. S. R.; GALLO, C. R.; MODESTA, R. C. D.; OETTERER, M. Shelf life and sensory assessment of tilapia quenelle during frozen storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 8-17, 2013.

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

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 3714-3722, 2005.

BARBOSA, L.; MADI, L.; TOLEDO, M.A.; REGO, R.A. As tendências da alimentação. In: ITAL. **Brasil food trends 2020.** Campinas: ITAL, 2010. p. 39-46.

BARIK, S. K.; BANERJEE, S.; BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, S. K. D.; MOHANTY, S.; MOHANTY, B. P. Proteomic analysis of sarcoplasmic peptides of two related fish species for food authentication. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 171, n. 4, p. 1011-1021, 2013.

BENITES, C.I. **Farinha de silagem de resíduo de pescado**: elaboração, complementação com farelo de arroz e avaliação biológica em diferentes espécies. 2003. 159f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2003.

BEUCHAT, L. R. Preparation and evaluation of a microbiological growth medium formulated from catfish waste peptone. **Journal of Milk and Food Technology**, Shelbyville, v. 37, p. 277-281, 1974.

BISCALCHIN-GRYSCHEK, S. F.; OETTERER, M.; GALLO, C. R. Characterization and frozen storage stability of minced Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, New York, v. 12, n. 3, p. 57-69, 2003.

BONSDORFF, E.; BLOMQVIST, E. M.; MATTILA, J.; NORKKO, A. Coastal eutrophication: causes, consequences and perspectives in the Archipelago areas of the northern Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 44, supplement 1, p. 63-72, 1997.

BORGHESI, R.; ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. Fatty acid composition of acid, biological and enzymatic fish silage. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 205-212, 2008.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN-DEN-BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S.; JANTAWAT, P.; SANGUANDEEKUL, R. Recovery and characterization of proteins precipitated from surimi wash-water. **Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 599-605, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 jan. 1997. p. 470.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar. 2005. p. 58-63.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 maio 2011. p. 89.

BRIDSON, E. Y.; BRECKER, A. Design and formulation of microbial culture media. In: RIBBONS, N. A. (Ed.). **Methods in microbiology**. New York: Academic Press, 1970. p. 229-292.

BRUGGEN, B. V. D.; VANDECASTEELE, C. Distillation vs. membrane filtration: overview of process evolutions in seawater desalination. **Desalination**, Amsterdam, v. 143, p. 207-218, 2002.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: Editora Rima, 2006. 109p.

CARAWAN, R. E. Processing plant waste management guidelines for aquatic fishery products: seafood and the environment. 1991. 36p. Disponível em: < http://infohouse.p2ric.org/ref/02/01796.pdf >. Acesso em: 15 jan. 2016.

CASANI, S.; ROUHANY, M.; KNOCHEL, S. A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. **Water Research**, London, v. 39, n. 6, p. 1134-1146, 2005.

CASANI, S.; KNOCHEL, S. Application of HACCP to water reuse in the food industry. **Food Control**, Guildford, v. 13, 4-5ed., p. 315-327, 2002.

CASARIN, F.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 1, n. 3, p. 301-305. 2008.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRETICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 172, p. 2877-2893, 2014.

CHABEAUD, A.; VANDANJON, L.; BOURSEAU, P.; JAOUEN, P. CHAPLAIN-DEROUINIOT, M.; GUERARD, F. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: application to the refining of bioactive peptidic fractions. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 66, p. 463-471, 2009.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications; a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 3020-3038, 2012.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 574-578, 1995.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 2619-2623, 1996.

CHEN, H.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 1, p. 49-53, 1998.

CHOWDHURY, P.; VIRARAGHAVAN, T.; SRINIVASAN, A. Biological treatment processes for fish processing wastewater: a review. **Bioresource Technology**, Barking, v. 101, p. 239-449, 2010.

CLAUSEN, E.; GILDBERG, A.; RAA, J. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1556-1557, 1985.

DEL-VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. Recovery of liquid by-products from fish meal

factories: a review. **Process Biochemistry**, Barking, v. 25, n. 4, 122–131, 1990.

DERAZ, S. F.; EL-FAWAL, G. F.; ABD-ELLATIF, S. A.; KHALIL, A. A. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* fish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 51, n. 2, p. 171-175, 2011.

DROST, A.; NEDZAREK, A.; BOGUSLAWSKA-WAS, E.; TÓRZ, A.; BONISLAWSKA, M. UF application for innovative reuse of fish brine: product quality, CCP management and the HACCP system. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 31, p. 396-401, 2014.

DUFOSSÉ, L.; DE-LA-BROISE, D.; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 32-38, 2001.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 430-441, 2008.

ELLOUZ, Y.; BAYOUDH, A.; KAMMOUN, S.; GHARSALLAH, N.; NASRI, M. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. **Bioresource Technology**, Barking, v. 80, p. 49-51, 2001.

ESTEBAN, M. B.; GARCÍA, A. J.; RAMOS, P.; MÁRQUEZ, M. C. Evaluation of fruit-vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. **Waste Management,** New York, v. 27, n. 2, p. 193-200, 2007.

FALLAH, M.; BAHRAM, S.; JAVADIAN, S. R. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. **Food Science & Nutrition**, Malden, v. 3, n. 2, p. 153-157, 2015.

FAN, J.; HE, J.; ZHUANG, Y.; SUN, L. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) frame protein. **Molecules**, Basel, v. 17, ed. 11, p.12836-12850, 2012.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: i*n vitro* assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, Barking, v. 149, p. 326-334, 2014.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; D'ARCE, M. A. B. R.; OETTERER, M. Nutritional aspects of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 749-753, 2006.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Cianobactérias tóxicas na água para o consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília: Funasa, 2003. 56p.

GHASSEM, M.; FEM, S. S.; SAID, M.; ALI, Z. M.; IBRAHIM, S.; BABJI, A. S. Kinetic characterization of *Channa striatus* muscle sarcoplasmic and myifibrillar protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Technology**, Heidelberg, v. 51, p. 467-475. 2011.

GHORBEL, S.; SOUISSI, N.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; DUFOSSÉ, L.; GUÉRARD, F.; NASRI, M. Preparation and testing of *Sardinella* protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 33-38, 2005.

GILDBERG, A.; DAHL, R.; MIKKELSEN, H.; NILSEN, K. Peptones from Atlantic cod stomach as nitrogen sources in growth media to marine bacteria. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, v. 19, p. 75-83, 2010.

GILDBERG, A.; BATISTA, I.; STROM, E. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 11, n. 4, p. 413-423, 1989.

GRANZIERA, M. L. M. **Direito de águas**: disciplina jurídica das águas doces. São Paulo: Atlas, 2014. 237p.

GREEN, J. H.; PASKELL, S. L.; GOLDMINTZ, D. Soluble fish peptones and fish extract used in media for growth of microorganisms. **Bacteriological Proceedings**, Washington, E82, 1972.

GREEN, J. H.; GOLDMINTZ, M. B.; HALE, M. B., FLYNN, D. J. Exploration of experimentally produced fish peptones for growth of microorganisms. **Developments in Industrial Microbiology**, Washington, v. 14, p. 310-316, 1973.

GREEN, J. H.; PASKELL, S. L.; GOLDMINTZ, D. Fish peptones for microbial media developed from red hake and from fishery by-product. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 40, p. 181-186, 1977.

HAARD, N. F. Composition and nutritive value of fish proteins and other nitrogen compounds. In: RUITER, A. (Ed.). **Fish and fishery products**: composition, nutritive properties and stability. Wallingford: CAB International, 1995. p. 77-115.

HALE, M. B. Relative activies of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish. **Food Technology,** Washington, v. 23, n. 1, p. 107-110, 1969.

HALE, M. B. **Making fish protein concentrates by enzymatic hydrolysis:** a status report on research and some processes and products studies by NMFS. Washington: National Marine Fisheries Service, 1972. 32p.

HALE, M. B. Using enzymes to make fish protein concentrates. **Marine Fisheries Review**, Washington, v. 36, n. 2, p. 15-18, 1974.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** Boca Raton, v. 35, 1-2ed., p. 7-20, 1995.

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

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 2, p. 163-169, 2007.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; AMIGO, L. Preparation of antioxidante enzymatic hydrolysates from α-lactalbumin and β-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 588-593, 2005.

H-KITTIKUN, A.; BOURNEOW, C.; BENJAKUL, S. Hydrolysis of surimi wastewater for production of transglutaminase by *Enterobacter* sp. C2361 and *Providencia* sp. C1112. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 1183-1191, 2012.

HUIDOBRO, A.; MONTERO, P.; BORDERÍAS, A. J. Emulsifying properties of an ultrafiltered protein from minced fish wash water. **Food Chemistry**, Barking, v. 61, n. 3, p. 339-343, 1998.

HULTIN, H. O.; KRISTISSON, H. G.; LANIER, T. C.; PARK, J. W. Process for recovery of functional proteins by pH shifts. p. 107-139. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi sea food**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 500p.

HUSIN, N.; KAMAL, S. M. M.; CHUAN, L. T.; MUHAMMAD, N. F.; JUSOH, N. Comparison of microbial growth on fish waste peptones from different hydrolysis methods. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY, 5., 2015, Shanghai. **Abstracts…** Shanghai: IACSIT Press, 2015. v. 81, p. 1-4.

INTRASUNGKHA, N.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. Biological nutrient removal efficiency in treatment of saline wastewater. **Water Science and Technology**, Brisbane, v. 39, n. 6, p. 183–190, 1999.

ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 49, p. 103-110, 2004.

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 24, n. 10-11, p. 1071-1082, 1986.

JE, J.; QIAN, Z.; BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 840-846, 2007.

JOHNSON, A. H.; PETERSON, M. S. **Encyclopedia of food technology and food science series**. Westport: Avi, 1974. v.2, 1008p.

JUN, S. Y.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 219, p. 20-26, 2004.

KANJANAPONGKUL, K.; TIA, S.; WONGSA-NGASRI, P.; YOOVIDHYA, T. Coagulation of protein in surimi wastewater using a continuous ohmic heater. **Journal of Food Engineering**, London, v. 91, p. 341-346, 2009.

KIM, S.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts: a review. **Food Research International**, Amsterdam v. 39, p. 383-393, 2006.

KHALED, H. B.; KTARI, N.; BELLAAJ, O. G.; JRIDI, M.; LASSOUED, I.; NASRI, M. Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. **Journal of Food Science and Technology**, Heidelberg, v. 51, n. 4, p. 622-633, 2014.

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, p. 318-327. 2012.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Use of protein hydrolysate from yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as microbial media. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, p. 1317-1327, 2012.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; YACHAI, M.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F.; HAYES, K. D. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, p. 126-133. 2009.

KRISHNASWAMY, M. A.; LAHIRY, N. L. Fish hydrolysates. IV. Microbiological evaluation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 28, n. 3, p. 358-365, 1963.

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.

KUMAR, N. S. S.; NAZEER, R. A.; JAIGANESH, R. Purification and biochemical characterization of antioxidante peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. **Peptides**, New York, v. 32, n. 7, p. 1496-1501, 2011.

LANIER, T. C. Functional properties of *surimi*. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 107-124, 1986.

LANIER, T. C.; CARVAJAL, P.; YONGSAWATDIGUL, J. Surimi gelation chemistry. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi seafood**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 435-489.

LEE, J. K.; YUN, J. H.; JEON, J. K.; KIM, S. K.; BYUN, H. G. Effect of antioxidant peptide isolated from *Brachionus calyciflorus*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, Seoul, v. 53, n. 2, p. 192-197, 2010.

LEFEBVRE, O.; MOLETTA, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. **Water Research**, London, v. 40, p. 3671-3682, 2006.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B. P.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, p. 1135-1143, 2007.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, Barking, v. 151, p. 459-465, 2014.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidante properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MANETTI, A. G. S.; HORNES, M. O.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Fish processing wastewater treatment by combined biological and chemical processes aiming at water reuse. **Desalination and Water Treatment**, Hopkinton, v. 29, p. 196-202, 2011.

MARTONE, C. B.; BORLA, O. P.; SÁNCHEZ, J. J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, p. 383-387, 2005.

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

MATSUMURA, E. M.; MIERZWA, J. C. Water conservation and reuse in poltry processing plant: a case study. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 52, p. 835-842, 2008.

MAUDIN, A.; SZABO, A. J. **Shrimp canning waste treatment study**. Washington: EPA, 1974. 130p.

MIERZWA, J. C. **O uso racional e o reúso como ferramentas para o gerenciamento de águas e efluentes na indústria estudo de caso da Kodak brasileira**. 2002. 399f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MULLALLY, M. M.; OCALLAGHAM, D. M.; FITZGERALD, R. J.; DONNELLY, W. J.; DALTON, J. P. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey-protein hydrolysate characteristics. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, p. 227-233. 1995.

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

OETTERER, M. Proteínas do pescado: processamento com intervenção protéica. In: OETTERER, M.; REGINATO D'ARCE, M. A.; SPOTO, M. H. F. (Eds.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 3, 632p.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca:** ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, 1999. 423p.

OMIL, F.; MENDEZ, R. J.; LEMA, J. M. Characterization of biomass from a pilot-plant digester treating saline waste-water. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Hoboken, v. 63, p. 384-392, 1995.

PALENZUELA-ROLLON, A. **Anaerobic digestion of fish processing wastewater with special emphasis on hydrolysis of suspended solids**. London: Taylor & Francis, 1999. 123p.

PALENZUELA-ROLLON, A.; ZEEMAN, G.; LUBBERDING, H. J.; LETTINGA, G.; ALAERTS, G. J. Treatment of fish processing wasterwater in a one- or two-step upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Water Science Technology**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 207-212, 2002.

PARK, J. W.; LIN, J. T. M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi sea food**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 33-106.

PARK, J. W.; MORRISSEY, M. T. Manufacturing of surimi from light muscle fish. p. 23-58. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and Surimi Seafood**. New York: Marcel Dekker, 2000. 500p.

PENNEY, R. K.; GOLDSPINK, G. Temperature adaptation of sarcoplasmic reticulum of fish muscle. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 63-68, 1980.

PESSATTI, M.L. **Aproveitamento dos sub-produtos do pescado**. Brasília: MAPA, 2001. 130p.

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

PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I. Cryptides: Buried secrets in proteins. **Peptides**, New York, v. 28, p. 2403-2410, 2007.

PRAZNICK, J.; ROSENBERG, F. A. Characterization of marine mycoplasmas. **Bacteriological Proceedings**, Washington, M44, 1973.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 16, n. 9, p. 562-569, 2005.

REHBEIN, H. Protein-based methods p. 349-362. In: REHBIN, H; OEHLENSCHLÄGER, J. (Eds.). Fishery products: quality, safety and authenticity. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. 477p.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, p. 727-736, 2008.

RENHORAN, M.; SARASWATI, A.; AKTINIDIA, Y.; SYUKRON, F.; RUKMANA, R. K. Utilization of trash fish solid waste as peptone for additional material for potential bacteria's growth medium. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL, BIOLOGICAL AND ENVIRONMENT SCIENCES, 2011, Bangkok. **Abstracts…** Bangkok: PSRC, 2011. p. 334-336.

RIEGMAN, R. Nutrient-related selection mechanisms in marine phytoplankton communities and impact of eutrophication on the planktonic food web. **Water Science and Technology**, Brisbane, v. 32, n. 4, p. 63-75, 1995.

ROBERT, M.; ZATYLNY-GAUDIN, C.; FOURNIER, V.; CORRE, E.; CORGUILLÉ, G. L.; BERNAY, B.; HENRY, J. Molecular characterization of peptide fractions of a tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and *in vitro* evaluation of antibacterial activity. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 50, p. 487-492, 2015.

SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J. M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, p. 73-79, 2012.

SAFARI, R.; SARAVI, H. N.; POURGHOLAM, R.; MOTALEBI, A. A.; GHOROGHI, A. Use of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) head as peptone for *Vibrio anguillarum* and optimization using response surface method (RSM). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Oxford, v. 20, p. 247-257, 2011.

SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE, M.; AMAR, R. B. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. **Food Research International,** Amsterdam, v. 65, p. 453-461, 2014.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, New York, v. 31, 1949-1956, 2010.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SHAHIDI, F.; HAN, X.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, Barking, v. 53, p. 285-293, 1995.

SHEU, S.; NAUDURI, D.; ANDERS, M. W. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1762, n. 2, p. 256-265, 2006.

SIKORSKI, Z. **Seafood resources:** nutrient composition and preservation. Boca Raton: CRC Press, 1990. 256p.

SNIESZKO, S. F.; GRIFFIN, P. J.; FRIDDLE, S. B. A new bacterium (*Hemophilus piscium* n. sp.) from ulcer disease of trout. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 59, p. 699-710, 1950.

STEPHENS, N. L.; BOUGH, W. A.; BEUCHAT, L. R.; HEATON, E. K. Preparation and evaluation of two microbiological media from shrimp heads and hulls. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, p. 1-6, 1976.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SUZUKI, T. **Tecnologia de las proteínas de pescado y krill**. Zaragoza: Acribia, 1987. 240p.

TARR, H. L. A.; DEAS, C. P. Bacteriological peptones from fish flesh. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Toronto, v. 7, p. 552-560, 1949.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.

TRIKI-ELLOUZ, Y.; GHORBEL, B.; SOUISSI, N.; KAMMOUN, S.; NASRI, M. Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeroginosa* MN7 grown on fish substrate. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 41-45, 2003.

TSUGE, N.; EIKAWA, Y.; NOMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; SUGISAWA, K. Antioxidant activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. **Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 1635-1641, 1991.

UNITED NATIONS ORGANIZATION (UN). **International decade for action 'Water for Life' 2005-2015**. NovaYork: UN, 2006. 29p.

URAKOVA, I. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; DEMCHENKO, D. V.; SHIKOV, A. N.; MAKAROV, V. G. The biological activities of fish peptides and methods of their isolation. **Russian Journal of Marine Biology**, New York, v. 38, n. 6, p. 417-422, 2012.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 112, p. 299-311, 2004.

VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 43, p. 66-72, 2008.

VÁZQUEZ, J. A.; MONTEMAYOR, M. I.; FRAGUAS, J.; MURADO, M. A. High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.44, p. 125-130, 2009.

VENUGOPAL, V. **Seafood processing**: adding value throught quick freezing, reportable packaging, and cook-chilling. Boca Raton: CRC Press, 2009. 527p.

VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V. Peptone preparation from fishing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, p. 1235-1237, 2005.

WALHA, K.; AMAR, R. B.; QUEMENEUR, F.; JAOUEN, P. Treatment by nanofiltration and reverse osmosis of high salinity drilling water for seafood washing and processing. **Desalination**, Amsterdam, v. 219, p. 231-239, 2008.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 303p.

WASSWA, J.; TANG, J.; GU, X.; YUAN, X. Influence of the extent enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, p. 1698-1704. 2007.

WATANABE, H.; TAKAI, R.; SEKIGAWA, A.; HASEGAWA, H. An estimation of the amount of protein lost in the effluent from frozen surimi manufacture. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 48, n. 6, p. 869-871, 1982.

WELLS, G. A. H.; SCOTT, A. C.; JOHNSON, C. T.; GUNNING, R. F.; HANCOCK, R. D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M.; BRADLEY, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Veterinary Record**, London, v. 121, n. 18, p. 419-420, 1987.

WIBOWO, S.; VELAZQUEZ, G.; SAVANT, V.; TORRES, J. A. Effect of chitosan type on protein and water recovery efficiency from surimi wash water treated with chitosan-alginate complexes. **Bioresource Technology**, Barking, v. 98, n. 3, p. 539-545, 2007.

WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, n. 9-10, p. 949-957, 2003.

XIONG, Y. L. Muscle proteins. In: YADA, R. Y. (Ed.). **Proteins in food processing**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 100-117.

YANG, J.; HO, H.; CHU, Y.; CHOW, C. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 1, p. 128-136, 2008.

YIN, H., PU, J., WAN, Y., XIANG, B., BECHTEL, P. J.; SATHIVEL, S. Rheological and functional properties of catfish skin protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, p. E11-E17. 2010.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgumus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Research International**, Amsterdam, v. 43, p. 1167-1173, 2010.

YU, C.; LIN, Y.; CHIANG, B.; CHOW, L. Proteomics and immunological analysis of novel shrimp allergen, Pen m 2. **Journal of Immunology**, Rockville, v. 170, n. 1, p. 445-453, 2003.

ZAYAS, J. F. Solubility of proteins. In: ZAYAS, J. F. **Functionality of proteins in food**. Heidelberg: Springer, 1997. p. 6-75.

ZHANG, J. H.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X. N.; WANG, X. G.; YAO, H. Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 1, p. 226-234, 2010.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; ZHUANG, Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. **Peptides**, New York, v. 38, n. 1, p. 13-21, 2012.

3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PEPTÍDEOS DA ÁGUA RESIDUAL DE MINCED DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

Ao utilizar o resíduo do processamento da filetagem de tilápias, as empresas obtém a CMS, que passa pelo processo de clarificação objetivando a extração de proteínas musculares hidrossolúveis, as sarcoplasmáticas e assim, garantindo a textura necessária ao *Minced*. O efluente gerado nesta etapa é descartado sem qualquer aproveitamento. O objetivo desse estudo foi fracionar, via centrifugação, a água residual obtida na elaboração de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e avaliar seu potencial em componentes bioativos. A fração aquosa foi liofilizada e submetida à análise de composição em aminoácidos e perfil eletroforético, verificando-se que a maior parte das proteínas estava concentrada entre 47-60 kDa. A atividade antioxidante destes peptídeos foi avaliada em diferentes concentrações utilizando ensaios *in vitro* como os métodos ABTS e DPPH, sendo que, em ambos, a intensidade da atividade antioxidante acompanhou o aumento da concentração, com destaque para o extrato de concentração 15 mg/ml que correspondeu a 46,23% de inibição do radical ABTS e 83,22% do DPPH. Concluiu-se que a fração aquosa do efluente exibe potencial de reaproveitamento na forma de peptídeos antioxidantes, podendo se constituir em um coproduto com valor agregado.

Palavras-chave: Proteínas; Peptídeos; Aminoácidos; Água residual; Atividade antioxidante; *Minced*; Tilápia.

3 ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPTIDES OF RESIDUAL WATER FROM TILAPIA OF MINCED (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

By using the waste of processing filleting tilapia, businesses get CMS, which passes through the clarification process aimed at extracting soluble muscle proteins, sarcoplasmic and thus ensuring the necessary texture minced. The effluent generated at this stage is discarded without utilization. The aim of this study was to fractionate via centrifugation, the wastewater obtained in the preparation of Minced tilapia (*Oreochromis niloticus*) and evaluate their potential bioactive components. The aqueous fraction was lyophilized and subjected to amino acid composition analysis and electrophoretic profile, checking that most of the protein was concentrated from 47-60 kDa. The antioxidant activity of these peptides was evaluated in different concentrations using in vitro assays such as ABTS and DPPH methods, and, in both, the intensity of antioxidant activity followed increasing concentration, especially the concentration of extract 15 mg / ml to corresponded to 46.23% inhibition of the radical ABTS and 83.22% of DPPH. It was concluded that the aqueous fraction of the effluent has reuse potential in the form of antioxidant peptides, and may be in a co-product with added value.

Keywords: Proteins; Peptides; Amino acids; Wastewater; Antioxidant activity; Minced; Tilapia.

3.1 Introdução

A CMS (carne mecanicamente separada) de tilápia vem se destacando como um processo vantajoso para a indústria, devido à possibilidade de recuperação do músculo aderido à carcaça após a filetagem, sendo hoje uma espécie indicada para a elaboração do *Minced* (CABRAL et al., 2011). A partir da CMS clarificada é obtido o *Minced*, que caracteriza a primeira etapa do fracionamento ou isolamento das proteínas presentes no pescado (OETTERER, 2006).

No processamento do *Minced* as proteínas sarcoplasmáticas são arrastadas pelos ciclos de lavagem, pois possuem afinidade com a água ou tampão de baixa força iônica (OGAWA; MAIA, 1999; NOLLET; TOLDRA, 2010). Esse processo de clarificação da CMS tem como objetivo remover parcial ou totalmente as proteínas sarcoplasmáticas, pigmentos, sangue e arrastar lipídeos que possam causar a oxidação lipídica, melhorando a qualidade do gel e mantendo as características funcionais do produto. A quantidade da água de lavagem, o tempo de contato com o tecido muscular, o número de ciclos de lavagem e a remoção das proteínas solúveis varia de acordo com a matéria prima e a finalidade do processo na obtenção do produto final (PARK; LIN, 2005).

O estudo da fração proteica e peptídica permite caracterizar suas propriedades e funções no alimento, além de avaliar uma possível ação bioativa em etapas fisiológicas do organismo humano (NOLLET; TOLDRA, 2010). Em paralelo, há alguns estudos que relacionam o uso de proteínas de pescado como ingrediente de transformação na indústria alimentícia, sendo determinantes na textura, composição nutricional e, consequentemente, na funcionalidade dos produtos (KRISTINSSON; INGADOTTIR, 2006).

Com base no elevado volume de efluente e o considerável teor proteico presente no efluente do processamento de *Minced*, buscou-se verificar o reaproveitamento da água residual como coproduto, através da análise do perfil eletroforético das proteínas, sua composição em aminoácidos, bem como seu potencial antioxidante, a fim de sugerir às empresas a reciclagem deste resíduo, transformando-o em receita, bem como conferindo à processadora o *status* de “empresa limpa” ou ecoeficiente.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Preparo da amostra

Carcaças de tilápia, obtidas após a operação de filetagem, em empresa sediada no Estado de São Paulo, seguiram para a Planta de Processamento do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), onde foi realizada a separação da cabeça e vísceras, obtendo-se o espinhaço (espinha dorsal do peixe com carne aderida aos ossos). Em seguida procedeu-se à sanitização com $5 mg.L^{-1}$ de hipoclorito, e processamento em desossadora (Usitecnica®, modelo USI 100) para a obtenção de CMS, cujo rendimento em tecido muscular foi de 60%.

As amostras de CMS foram colocadas em recipiente contendo água destilada refrigerada, aproximadamente a 10°C, na proporção 1:3. O material foi homogeneizado por 3 min e, em seguida, permaneceu em repouso por 3 min. Para a drenagem da água residual, a CMS foi acondicionada e prensada em tecido de algodão esterilizado (ANGELINI et al., 2013). A água residual coletada seguiu em fluxo contínuo para a centrifugação (Figura 3.1).

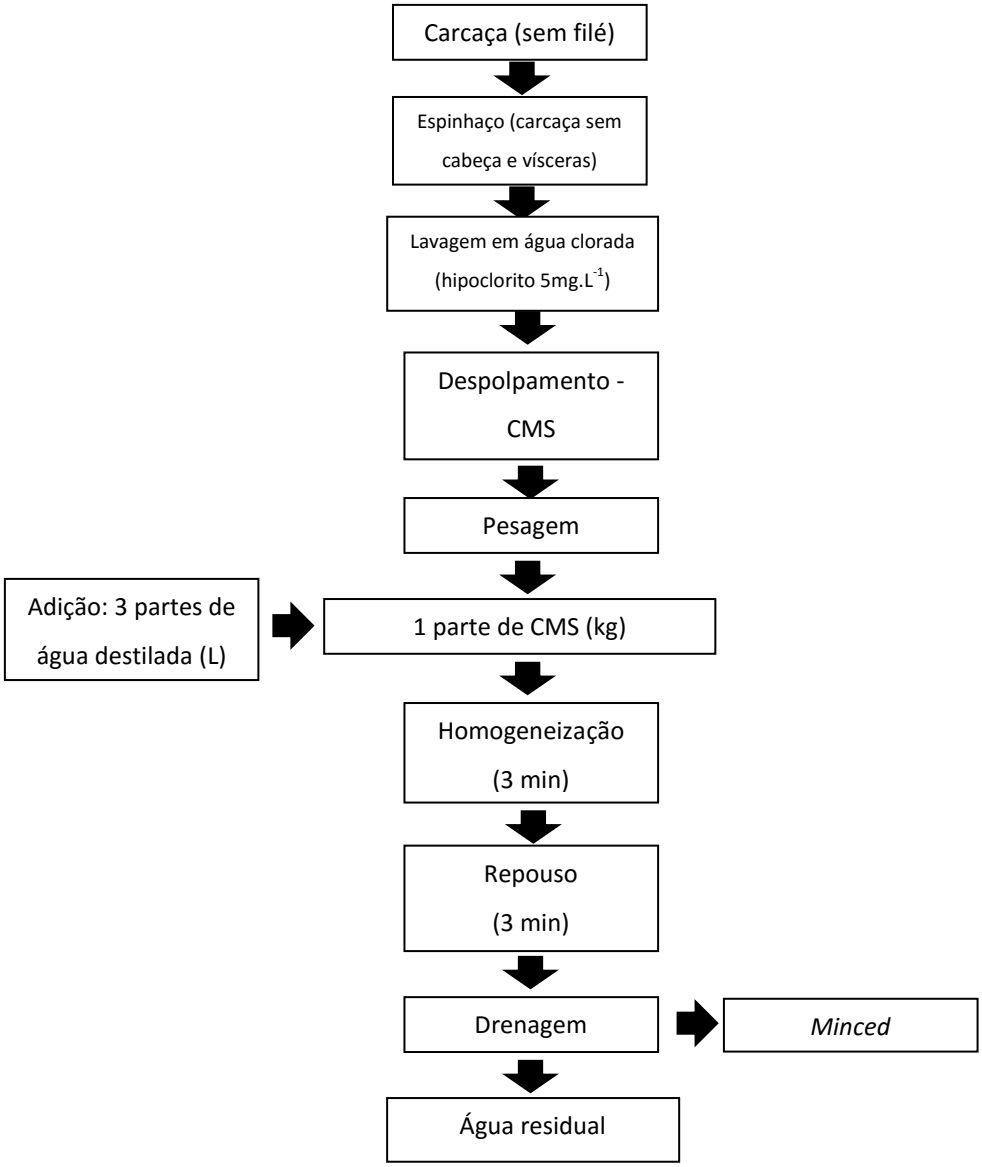


Figura 3.1 - Fluxograma de obtenção da água residual do *Minced* de tilápia.

3.2.2 Fracionamento da água residual do *Minced*

As amostras foram submetidas à centrifugação (centrífuga Eppendorf® refrigerada, modelo 5810 R) a 8.885 G por 20 min, a 0ºC (adaptado de DUMAY et al., 2006). Foram obtidas duas frações, aquosa e sedimento, sendo armazenadas a - 30ºC.

3.2.3 Rendimento das frações

O rendimento da fração aquosa e sedimento foram calculados pela diferença de peso antes e depois do fracionamento, e os resultados foram expressos em porcentagem.

3.2.4 Caracterização físico-química da fração aquosa

A fração aquosa congelada foi liofilizada (liofilizador Liotop®, modelo L101) e o material liofilizado obtido foi armazenado a -30ºC até a realização das análises seguintes. A figura 3.2 ilustra os procedimentos para obtenção da peptona de água residual.

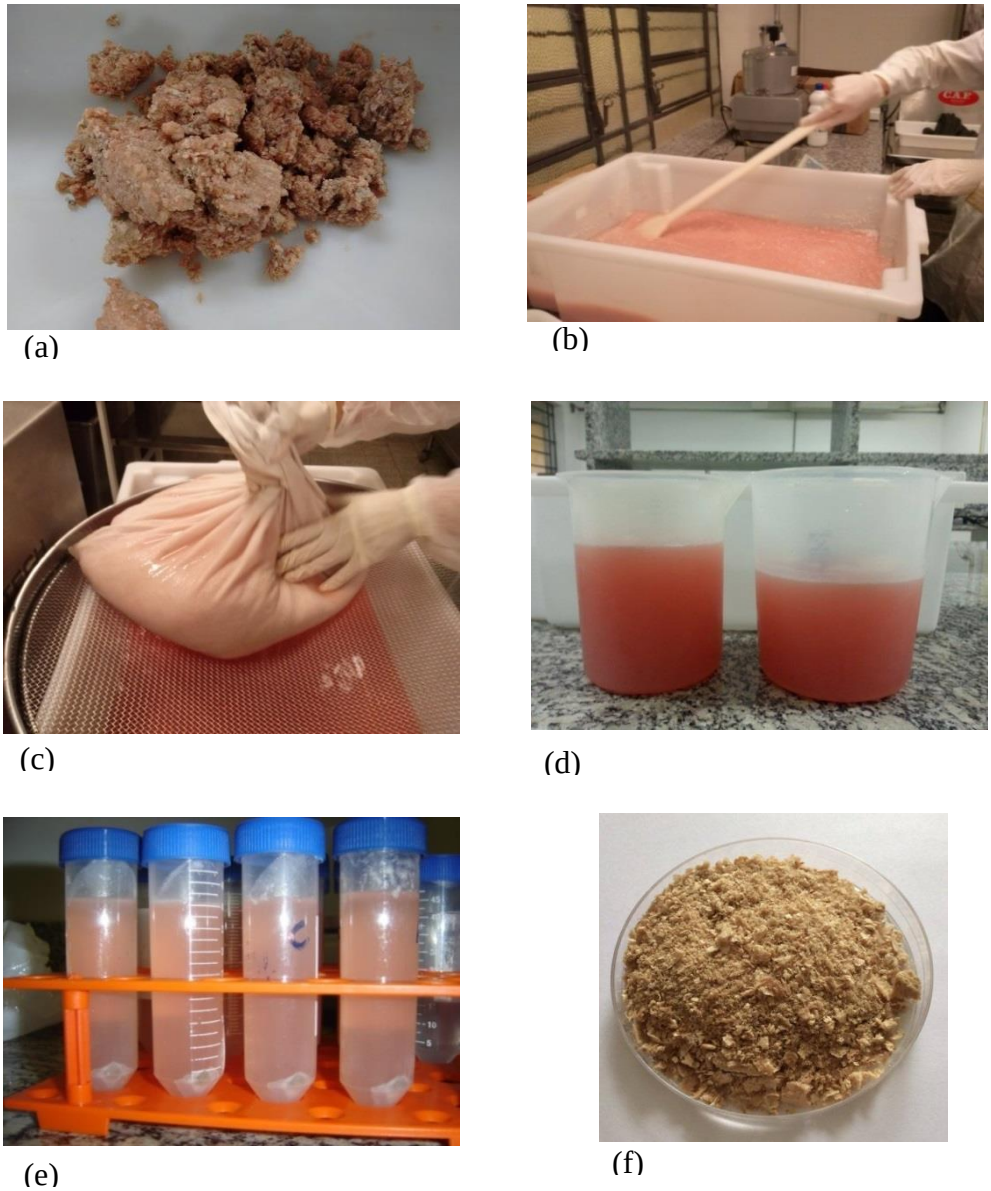


Figura 3.2 - Etapas de extração da água residual liofilizada. (a) CMS de tilápia; (b) Homogeneização, adição de água destilada a 10ºC na CMS (3:1); (c) Drenagem da água residual; (d) Coleta da água residual; (e) Fracionamento via centrifugação; (f) Fração aquosa liofilizada (peptona).

3.2.4.1 Determinação de lipídeos e proteínas

O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente extrator (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985).

Utilizando o método de Johnson e Ulrich (1974) foi determinada a quantidade de nitrogênio total, método de Microkjeldahl, e conversão em proteína, multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25.

3.2.4.2 Caracterização dos aminoácidos da fração aquosa por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida, em colunas de troca catiônica e derivação pós-coluna, com ninhidrina, em auto analisador. Para qualificação de aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N, por 22 h, a 110ºC (MOORE; STEIN, 1963). O triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com pronase, a 40 ºC por 24 h, seguido de reação colorimétrica com 4-dimetil-amino-benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2N e leitura a 590 nm (SPIES, 1967).

3.2.4.3 Quantificação de proteínas e eletroforese (SDS-PAGE)

A quantificação das proteínas presentes na amostra foi realizada utilizando a BSA (albumina bovina sérica) como padrão, segundo metodologia de Bradford (1976). Foi preparada uma solução com 10mg de amostra liofilizada e 500µL de Ambic. Desta, retirou-se 100µL para as diluições seguintes (amostra A: 0,02 mg/µL; amostra B: 0,002mg/µL). Foi preparado um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com 4% (w / v) no gel stacking/gel de entrada [750 µL de Acrilamida/Bis- Acrilamida (30%/2,67%), 3,05 mL água milliQ, 1,25 mL 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 25 Ml de APS 10%, 10 µL de temed] e 12,5% no running/gel de separação [4 mL de Acrilamida/Bis-Acrilamida (30%/2,67%), 3,35 mL água milliQ®, 2,50 mL 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 50 µL de APS 10%, 10 µL de temed]. No gel foram adicionados separadamente ao primeiro poço o marcador Kaleidoscope 1610324 (Bio-rad®), nos seguintes as duas diluições A e B da amostra em duplicata, e nas últimas colunas o padrão BSA 1µg, BSA 2µg e BSA 5µg (*Invitrogen*™®). Como marcador de corrida foi utilizado o azul de bromofenol. Após a corrida, o gel foi colocado em solução fixadora [40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético], e mantido em *overnight* em solução de Coomassie Brilliant Blue (G250) (CANDIANO et al., 2004) para visualização das bandas de proteína. Os géis foram digitalizados em scanner Image Scanner 3 – GE.

3.2.5 Atividade antioxidante

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

O método ABTS determina a atividade antioxidante pelo radical [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) e De Camargo et al. (2012). As amostras foram avaliadas nas concentrações 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, em triplicata. Foram pipetados em cada tubo de ensaio 20 µL do extrato, e adicionado 2 mL do radical ABTS. Para o branco foram pipetados 20 µL de etanol P.A. e 2 mL do radical ABTS. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV mini-1240) a 734nm após 6 min de reação. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical. A atividade dos extratos foi determinada pela Equação (3.1):

$$\%\ \text{sequestro do radical ABTS} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs branco}} \times 100 \qquad \text{Equação (3.1)}$$

3.2.5.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), sendo os resultados comparados ao poder de inibição do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). As amostras foram avaliadas nas concentrações 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, em triplicata. Em tubos de ensaio foram pipetados 0,5 mL do extrato diluído em água, 3,0 mL de etanol P.A. e 0,3 mL do radical DPPH. Para o branco foi utilizado 3,5 mL de etanol P.A. e 0,3 mL de DPPH. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV mini-1240) a 517nm após 45 min de reação. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição. A atividade dos extratos foi determinada por meio da Equação (3.2):

$$\%\ \text{DPPH reduzido} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs branco}} \times 100 \qquad \text{Equação (3.2)}$$

3.2.6 Análise estatística

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão, com análise estatística de variância (ANOVA) por meio do *software* R e *Assistat* Beta 7.7. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de *Tukey*, com nível de significância igual a 5%.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Rendimento das frações

Após centrifugação, fracionamento e análise de lipídeos totais, constatou-se que a amostra é composta por 0,01% de sedimento, 0,04% de lipídeos e 98,77% de fração líquida. Com a liofilização da fração aquosa (líquida com lipídeos suspensos) foram obtidos 1,22% de material liofilizado (peptona).

3.3.2 Composição de aminoácidos da água residual liofilizada

De acordo com a tabela 3.1, os aminoácidos presentes em maior quantidade são ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e glicina. Os aminoácidos essenciais representam 42% do total de aminoácidos presentes, com destaque para o teor de lisina (4,64%) e leucina (4,24%).

Há resultados expressivos também de aminoácidos hidrofóbicos, como a leucina, alanina, fenilalanina, valina, isoleucina, prolina e metionina. A amostra é constituída de 44% de aminoácidos hidrofóbicos.

Tabela 3.1 - Composição em aminoácidos da água residual liofilizada, expressos em $g.100g^{-1}$*

Aminoácidos	**Água residual liofilizada**
Ácido Aspártico	5,84
Ácido Glutâmico	5,52
Alanina	3,59
Cisteína	0,69
Glicina	4,60
Prolina	1,92
Serina	2,25
Taurina	2,83
Tirosina	1,44
Aminoácidos não essenciais	*58%*
Arginina	3,12
Fenilalanina	3,13
Histidina	2,03
Isoleucina	2,29
Leucina	4,24
Lisina	4,64
Metionina	1,02
Treonina	2,25
Triptofano	0,65
Valina	2,47
Aminoácidos essenciais	*42%*
Proteína Bruta	63,0

Valores representam a média, sendo n=3.
*100g de amostra liofilizada são obtidas em 9L de água residual.

Silva et al. (2014) caracterizaram a composição de aminoácidos de resíduos de cabeça, tecido muscular, pele, ossos, escamas e vísceras de hidrolisado enzimático de tilápia. Dentre os aminoácidos encontrados destacam-se o ácido glutâmico (8,94%), glicina (8,0%), ácido aspártico (5,56%), alanina (4,98%), arginina (4,87%) e prolina (4,55%). Arruda et al. (2006) trabalharam com silagem ácida de tilápia, e apresentaram como maiores teores os de ácido glutâmico (12,02%), ácido aspártico (10,92%) e glicina (8,82%).

Em vista disso, a diversidade no teor de aminoácidos tende a ocorrer em razão dos métodos de extração aplicados, e a composição da matéria prima utilizada pelos autores, haja vista que as diversas fontes de proteína disponíveis para formulação de ração animal, nem sempre apresentam o mesmo valor nutricional ou composição de aminoácidos (ARRUDA et al., 2006; CYRINO, 2005).

Em relação ao teor de proteína bruta, o valor de 63g.100g^{-1} na peptona é superior aos de outros resíduos de tilápia encontrados na literatura; tem-se 59,27g.100g^{-1} para silagem ácida (ARRUDA et al., 2006), 58,48g.100g^{-1} para hidrolisado enzimático do peixe inteiro, 42,36g.100g^{-1} para carcaça (SILVA et al., 2014), e 62,39 g.100g^{-1} em concentrado proteico de resíduos de CMS (VIDAL et al., 2011). Aliado ao teor proteico considerável há a relevante composição de aminoácidos. Esta é uma constatação que justifica a recuperação e uso deste material.

3.3.3 Eletroforese (SDS-PAGE)

Com base no perfil eletroforético (Figura 3.3) nas colunas 4 e 5, correspondente à amostra B de concentração de 0,002mg/µL, é possível notar bandas mais intensas e a separação destas em diferentes massas moleculares. De maneira geral, os peptídeos em maior quantidade no gel são os de baixo peso molecular, e correspondem às seguintes bandas do padrão eletroforético: 37kDa, 40kDa, 60kDa e 100kDa.

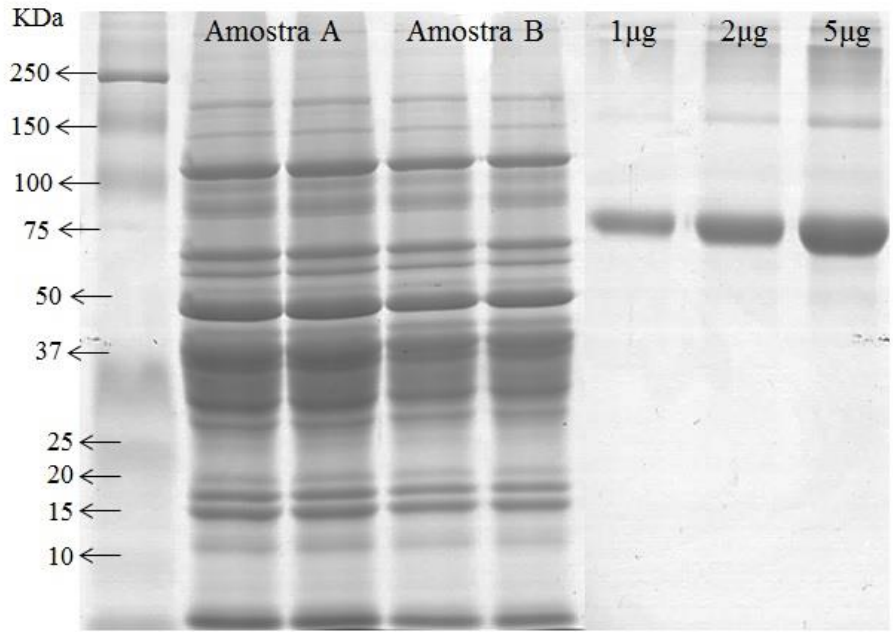


Figura 3.3 - Gel de proteína da fração aquosa liofilizada da água residual de *Minced*. Coluna 1: Marcador Kaleidoscope 1610324; Coluna 2 e 3: Amostra A (0,02 mg/µL); Coluna 4 e 5: Amostra B (0,002mg/µL); Coluna 6, 7 e 8: Padrão BSA 1µg, 2µg e 5µg, respectivamente.

Yarnpakdee, Benjakul e Kristinsson (2012) realizaram eletroforese de proteínas de *Minced* de tilápia após diferentes etapas de lavagem, e depois da primeira lavagem os autores verificaram que a concentração de proteínas sarcoplasmáticas no gel, diminuiu; o que justifica a maior intensidade de bandas correspondentes às proteínas miofibrilares, actina, tropomiosina e troponina, logo após a lavagem e obtenção do primeiro *Minced*. Os autores relataram que proteínas de baixo peso molecular, como 49,8, 39,3, e 37,0 kDa, foram arrastadas na etapa de lavagem e desapareceram, gradativamente, no gel.

Da mesma forma é possível observar que as proteínas encontradas na água residual de *Minced* possuem maior concentração na faixa correspondente a essas proteínas, 37kDa a 60kDa, destacando a extração das proteínas sarcoplasmáticas do *Minced*. Corroborando com Huidobro, Montero e Borderías (1998) que avaliaram água residual de *Minced* de sardinha (*Sardina pilchardus*) e após a eletroforese verificaram que o processo de lavagem extraiu proteínas de peso molecular igual ou menor que 67kDa; o mesmo também observado em *Surimi* de pescada-do-Pacífico-norte (*Merluccius productus*) por Lin; Park e Morrissey (1995).

Outros autores verificaram a extração de proteínas com a aplicação de pré-tratamentos químicos ou mecânicos. Kristinsson e Ingadottir (2006) utilizaram a diferença de pH para extração de proteínas de efluentes de *Surimi* de tilápia, e exibiram um gel do efluente com bandas mais intensas em 100kDa, 69kDa, 56kDa, 41kDa, 38kDa, 17kDa e 6 kDa; sugerindo que durante a etapa de lavagem não são apenas arrastadas proteínas sarcoplasmáticas. Zayas (1997) afirmou que apesar das proteínas sarcoplasmáticas serem consideradas as mais solúveis do músculo, uma parcela de proteínas miofibrilares também pode ser arrastada na etapa de lavagem. Este fato também foi observado nos estudos de Foh et al. (2012) com *Minced* de tilápia, e por Bourtoom et al. (2009) em *Surimi* de nemipteridae (*Nemipterus hexodon*).

Com processo mecânico, através da ultrafiltração, Stine et al. (2012) recuperaram o material proteico eliminado durante os ciclos de lavagem do *Surimi* de escamudo do Alasca (*Theragra chalcogramma*), e analisaram o perfil eletroforético do *Surimi* e do concentrado proteico recuperado. Os autores observaram que no gel referente ao *Surimi* apareceram bandas intensas de miosina com 200 kDa e bandas mais claras de actina com 40kDa; já para o concentrado proteico, foram observadas bandas na faixa de 13 a 65kDa, que seriam correspondentes ao grupo das proteínas sarcoplasmáticas, características também semelhantes às bandas encontradas na água liofilizada de *Minced* de tilápia.

3.3.4 Determinação da atividade antioxidante

A tabela 3.2 apresenta as porcentagens de inibição do radical para atividade antioxidante da água residual liofilizada.

Tabela 3.2 – Atividade antioxidante da amostra de água residual liofilizada, para os métodos ABTS e DPPH, expressos em % de inibição do radical

Concentrações	ABTS	DPPH
0,5 mg/mL	$3,83^{a} \pm 0,06$	$6,21^{a} \pm 0,38$
1,0 mg/mL	$6,99^{b} \pm 0,13$	$6,71^{a} \pm 0,12$
5,0 mg/mL	$15,27^{c} \pm 0,20$	$29,85^{b} \pm 0,44$
10 mg/mL	$25,37^{c} \pm 0,33$	$61,40^{c} \pm 0,69$
15 mg/mL	$46,23^{d} \pm 0,06$	$83,22^{d} \pm 0,07$

Médias (n=3) ± desvio padrão. Letras diferentes na vertical indicam diferença significativa entre as concentrações de uma mesma análise ($P < 0,05$).

Todas as concentrações apresentaram diferenças significativas entre si, com exceção das concentrações 0,5 mg/ml e 1,0 mg/ml pela metodologia do DPPH nas quais ocorreram um aumento pouco considerável na inibição do radical.

Para as duas metodologias os extratos mostraram o mesmo comportamento, sendo que a atividade antioxidante dos extratos aumentou à medida que a concentração era aumentada, corroborando com Balakrishnan et al. (2011), Farvin et al. (2014), Ktari et al. (2012) e Narsi et al. (2013). Os maiores resultados para a porcentagem de inibição do radical foram encontradas na concentração 15 mg/ml, com 46,23% em ABTS e 83,22% em DPPH. Deve-se considerar estes valores expressivos uma vez que não foram aplicados tratamentos enzimáticos para quebra em cadeias peptídicas menores. Amostras contendo pequenas moléculas tem melhor acesso ao sítio de reação com o radical, como exemplo ao radical $DPPH^{\bullet}$, portanto apresentam maior atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Pires, Clemente e Batista (2013) elaboraram *Minced* de pescada (*Merluccius capensis*), e após hidrólise enzimática do músculo e água residual, encontraram na concentração 30 mg/mL 37% e 38% de inibição do radical $DPPH^{\bullet}$, para a água residual e *Minced*, respectivamente; em *Minced* de sardinha (*Sardinella longiceps*) a maior inibição ocorreu na concentração de 5mg/ml, sendo 70,14% para DPPH, e 61,69% para ABTS (JEEVITHA; MOHANA-PRIYA, KHORA, 2014).

A adoção de uma etapa enzimática e diferentes graus de hidrólise também é observada como procedimento vantajoso na obtenção de peptídeos antioxidantes (CENTENARO et al., 2014; FAN et al., 2012; KHALED et al., 2014; KLOMPONG et al. 2007; NGO et al., 2010; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008). Pois são formados peptídeos de sequências diferentes, e certa parcela de proteínas é despolimerizada; assim, a hidrólise enzimática promove a diversidade funcional e estrutural de sítios catalíticos (BORAWSKA et al., 2016; SZABÓ, SAHIN-TÓTH, 2012; WU; CHEN; SHIAU, 2003).

São também associadas à hidrólise enzimática a obtenção de peptídeos de menor peso molecular (<3kDa), e de maior atividade antioxidante (FAN et al., 2012; FARVIN et al., 2014; JE et al., 2007; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008; RAGHAVAN et al., 2008; WU; CHEN; SHIAU, 2003; ZHANG, DUAN; ZHUANG, 2012).

A hidrofobicidade, solubilidade lipídica, e a presença de resíduos de histidina, glicina, prolina, metionina, cisteína, tirosina, triptofano, fenilalanina, ácido glutâmico e leucina, também podem influenciar no aumento da atividade antioxidante dos peptídeos (CHEN et al., 1996; JUN et al., 2004; RAJAPAKSE et al., 2005). Dessa forma, com base nas características apresentadas na água residual liofilizada é possível atribuir um potencial antioxidante à amostra.

Em relação às metodologias empregadas, nota-se que o método DPPH apresentou resultados, significativamente, mais elevados quando comparado ao método ABTS. Uma diferença expressiva entre resultados de ABTS e DPPH, também foi observada por Borawska et al. (2016) e Zhu et al. (2008), e podem ser explicadas pela diferença de seletividade estéreo dos radicais e na estequiometria da reação entre peptídeos antioxidantes e os radicais DPPH/ABTS (CORRÊA et al., 2011). Os valores elevados para DPPH, também são atribuídos aos compostos que reagem mais rapidamente com o radical, em virtude da conformação estrutural dos compostos e da quantidade de hidroxilas disponíveis na reação (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Além disso, as duas metodologias podem ser influencias pela variação do pH, sendo sugeridos em estudos recentes um tempo maior de incubação, garantindo que a reação alcance o equilíbrio (OZGEN et al., 2006; ZHENG et al., 2016).

A relação entre a hidrólise proteica e a geração de cadeias peptídicas com elevada atividade antioxidante tem sido constatada, porém, o conhecimento desse comportamento e os mecanismos de ação ainda não estão plenamente elucidados (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008).

Dessa forma, diante das informações citadas, para trabalhos futuros com análise mais detalhada dos hidrolisados proteicos obtidos da água residual de *Minced*, suas características estruturais e aplicação de peptídeos, é sugerida a combinação de vários ensaios para determinar a atividade antioxidante de forma eficiente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008; SARMADI; ISMAIL, 2010), pois possibilita identificar a ação antioxidante no sequestro específico de cada espécie reativa ao oxigênio (ROS) e/ou nitrogênio (RNS) (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005) que podem estar presentes na amostra.

3.4 Conclusão

O efluente, água residual do processamento do *Minced* de tilápia, apresentou elevado teor proteico, considerável composição em aminoácidos essenciais e hidrofóbicos, peptídeos de baixo peso molecular, e elevada atividade antioxidante. Tais características são positivas para o seu reaproveitamento, por parte das empresas processadoras, visando elaboração de coprodutos com valor agregado.

Referências

ANGELINI, M. F. C.; GALVÃO, J. A.; VIEIRA, A. F.; SILVA, L. K. S.; SHIRAHIGUE, L. D.; CABRAL, I. S. R.; GALLO, C. R.; MODESTA, R. C. D.; OETTERER, M. Shelf life and sensory assessment of tilapia quenelle during frozen storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 8-17, 2013.

ARRUDA, L. F.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; D'ARCE, M. R.; OETTERER, M. Nutritional aspects of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 749-753, 2006.

BALAKRISHNAN, B.; PRASAD, B.; RAI, A. K.; VELAPPAN, S. P.; SUBBANNA, M. N., NARAYAN, B. In vitro antioxidant and antibacterial properties of hydrolysed proteins of delimed tannery fleshings: comparison of acid hydrolysis and fermentation methods. **Biodegradation**, Boston, v. 22, n. 2, p. 287–95, 2011.

BARIK, S. K.; BANERJEE, S.; BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, S. K. D.; MOHANTY, S.; MOHANTY, B. P. Proteomic analysis of sarcoplasmic peptides of two related fish species for food authentication. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 171, n. 4, p. 1011-1021, 2013.

BORAWSKA, J. DAREWICZ, M.; VEGARUD, G. E.; MINKIEWICS, P. Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein *ex vivo* and *in vitro* hydrolysates. **Food Chemistry**, Barking, v. 194, p. 770-779, 2016.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S.; JANTAWAT, P.; SANGUANDEEKUL, R. Recovery and characterization of proteins precipitated from surimi wash-water. **Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 599-605, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CABRAL, I. S. R.; SHIRAHIGUE, L. D.; ANBE, L.; ARRUDA, L. F.; MARTINS, W. S.; CARPES, S. T.; OETTERER, M. Atividade antioxidante de extratos de algas marinhas aplicados em *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*). In: CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, 13., 2011, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: AATA, 2011. p. 16.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitivecolloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Kyoto, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRETICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidante activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 172, p. 2877-2893, 2014.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 2619-2623, 1996.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.; MEIRA, S. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, v. 12, p. 2247–2254, 2011.

CYRINO, J. E. P. **Condicionamento alimentar e exigências nutricionais de espécies carnívoras:** desenvolvimento de uma linha de pesquisa. 2000. 200 f. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

DE CAMARGO, A. C.; VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 3073-3084, 2012.

DISNEY, J. G.; HOFFMAN, A. Development of a fish silage/carbohydrate animal feed for use in the tropics. **Tropical Science**, London, v. 20, p. 129-135, 1978.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGÉ, J.P. Improvement of lipids and phospholipids recoveries from sardine (*Sardina pilchadus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 2327-2332, 2006.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 430-441, 2008.

FAN, J.; HE, J.; ZHUANG, Y.; SUN, L. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) frame protein. **Molecules**, Basel, v. 17, ed. 11, p.12836-12850, 2012.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: i*n vitro* assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, Barking, v. 149, p. 326-334, 2014.

FOH, M. B. K.; KAMARA, M. T.; AMADOU, I.; FOH, B. M.; WENSHUI, X. Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. **International Journal of Biological Chemistry**, Islamabad, v. 5, n. 1, v. 21-36, 2011.

FOH, M. B. K.; WENSHUI, X.; AMADOU, I.; JIANG, Q. Influence of pH shift on functional properties of protein isolated of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscles and of soy protein isolate. **Food Bioprocess Technology**, Heidelberg, v, 5, p. 2192-2200, 2012.

JE, J.; PARK, S. Y.; HWANG, J.; AHN, C. Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, London, v. 16, p. 94-103, 2015.

JE, J.; QIAN, Z.; BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 840-846, 2007.

JEEVITHA, S. S.; MOHANA-PRIYA, S. S.; KHORA, S. S. Antioxidant activity of Fish Protein Hydrolysates from Sardinella longiceps. **International Journal of Drug Development and Research**, New Delhi, v. 6, n. 4, p. 137-145, 2014.

JEMIL, I., JRIDI, M.; NASRI, R.; KTARI, N.; SALEM, R. B. S.; MEHIRI, M.; HAJJI, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 963-972, 2014.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. Analytycal methods. In: SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. (Eds.). **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/LQI, 1974. p. 4-10.

JUN, S. Y.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 219, p. 20-26, 2004.

KHALED, H. B.; KTARI, N.; BELLAAJ, O. G.; JRIDI, M.; LASSOUED, I.; NASRI, M. Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. **Journal of Food Science and Technology**, Heidelberg, v. 51, n. 4, p. 622-633, 2014.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. (a) 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**, Barking, v. 102, p. 1317-1327, 2007.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; HAYES, K. D.; SHAHIDI, F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, p. 1019–1026, 2007.

KRISTINSSON, H. G.; INGADOTTIR, B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 71, n. 3, p. E132-E141, 2006.

KTARI, N.; JRIDI, M.; BKHAIRIA, I.; SAYARI, N.; BEN-SALAH, R.; NASRI, M. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from muscle of zebra blenny (*Salaria basilisca*) obtained with different crude protease extracts. **Food Research International**, Amsterdam, v. 49, p. 747–756, 2012.

LIN, T. M.; PARK, J. W.; MORRISSEY, M. T. Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 4-9, 1995.

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

NASRI, R.; YOUNES, I.; JRIDI, M.; TRIGUI, M.; BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterissessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. **Food Research International**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 552–561, 2013.

NGO, D.; QIAN, Z.; RYU, B.; PARK, J. W.; KIM, S. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods,** London, v. 2, p. 107-117, 2010.

NOLLET, L. M. L.; TOLDRA, F. **Handbook of seafood and seafood products analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 1948p.

OETTERER, M. Proteínas do pescado: processamento com intervenção protéica. In: OETTERER, M.; REGINATO D'ARCE, M. A.; SPOTO, M. H. F. (Eds.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 3, 632p.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca:** ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, 1999. 423p.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OZGEN, M.; REESE, R. N.; TULIO, A. Z.; SCHEERENS, J. C.; MILLER, A. R. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 1151-1157, 2006.

PARK, J. W.; LIN, J. T. M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi sea food**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 33-106.

PIRES, C.; CLEMENTE, T.; BATISTA, I. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three diferente methodologies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 771-780, 2013.

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.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 1434-1441, 2008.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; LEEUWENBURGH, C. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 10359-10367, 2008.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneha, v. 16, p. 562–569, 2005.

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

SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 196, p. 96-106, 2014.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in protein. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, n. 12, p. 1412-1415, 1967.

STINE, J. J.; PEDERSEN, L.; SMILEY, S.; BECHTEL, P. J. Recovery and utilization of protein derived from surimi wash-water. **Journal of Food Quality**, Westport, n. 35, p. 43-50, 2012.

SZABÓ, A.; SAHIN-TÓTH, M. Determinants of chymotrypsin C cleavage specificity in the calcium-binding loop of human cationic trypsinogen. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 279, n. 23, p. 4283-4292, 2012.

TATTERSON, J. N.; WINDSOR, M. L. Fish silage. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 25, n. 1, p. 369-379, 1974.

VIANI, L. D. S. **Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos provenientes do resíduo do processamento de pescado**. 2014. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Concentrado protéico de resíduos da filetam de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 92-99, 2011.

WU, H.; CHEN, H.; SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, n. 9-10, p. 949-957, 2003.

YARNPAKDEE, S.; BENJAKUL, S.; KRISTINSSON, H. Effect of pretreatments on chemical compositions of mince from Nile tilapia (*Oreochomis niloticus*) and fishy odor development in protein hydrolysate. **Internacional Aquatic Research**, London, v. 4, n. 7, p. 1-16, 2012.

ZAYAS, J. F. Solubility of proteins. In: Zayas, J. F. **Functionality of proteins in food**. Heidelberg: Springer, 1997. p. 6-75.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; ZHUANG, Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. **Peptides**, New York, v. 38, n. 1, p. 13-21, 2012.

ZHENG, L.; ZHAO, M.; XIAO, C.; ZHAO, Q.; SU, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 288-294, 2016.

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 of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.

4 EFETIVIDADE DA PEPTONA DE EFLUENTE DO PROCESSAMENTO DE MINCED DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), COMO MEIO DE CULTURA PARA BIOPROCESSOS

RESUMO

O efluente gerado no processamento de *Minced* é descartado sem aproveitamento apesar de apresentar alta concentração de proteínas solúveis. Visando sugerir o reuso desse efluente, este estudo buscou avaliar a água residual do processamento de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*), quanto à sua qualidade ambiental, extrair e caracterizar a fração proteica, e verificar sua eficiência como meio de cultura para o crescimento microbiano. De acordo com os parâmetros de qualidade, os efluentes gerados pela etapa de lavagem do *Minced* apresentam 8854,5 mgO_2/L de DQO e 4656,88 mgO_2/L de DBO, valores consideravelmente altos devido ao elevado teor de matéria orgânica, principalmente, em razão da concentração proteica. A peptona de água residual foi comparada à peptona comercial para avaliação da sua efetividade por meio da curva de crescimento (densidade óptica), produção de biomassa e detecção por plaqueamento da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A performance da peptona de resíduo foi similar ou superior à peptona comercial, evidenciando o vantajoso reuso desse efluente como coproduto, e a consequente produção industrial sustentável.

Palavras-chave: Peptona; Água residual; Efluente; Resíduo de pescado; Meio de cultura; Crescimento microbiano; Biomassa; *Minced*; Tilápia.

4 EFFECTIVENESS OF TILAPIA PEPTONE MINCED PROCESSING WASTEWATER (*Oreochromis niloticus*), AS CULTURE MEDIUM FOR BIOPROCESSES

ABSTRACT

The effluent generated in minced processing is discarded without use despite its high concentration of soluble proteins. Aiming to suggest the reuse of the effluent, this study sought to evaluate the wastewater processing minced tilapia (*Oreochromis niloticus*), as to its environmental quality, extract and characterize the protein fraction, and check its efficiency as a culture medium for microbial growth. According to the quality parameters, effluents generated by minced washing step showed 8854.5 mgO_2 / L of COD and 4656.88 mgO_2 / L BOD, considerably higher values due to the high organic matter content, principally due to the protein concentration. Wastewater peptone was compared to commercial peptone to evaluate its effectiveness by growth curve (optical density), plating and biomass production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The performance of the waste peptone was similar or higher than the commercial peptone, showing the beneficial reuse of the effluent as co-product, and the resulting sustainable industrial production.

Keywords: Peptone; Wastewater; Effluent; Fish residue; Culture medium; Microbial growth; Biomass; Minced; Tilapia.

4.1 Introdução

Em indústrias de pescado, o uso de água tratada durante as etapas de processamento é imprescindível para garantir a qualidade do produto final. No entanto, para o processamento de *Minced* e *Surimi*, o volume de água utilizada é ainda maior, devido à etapa de clarificação do tecido muscular (AFONSO; BÓRQUEZ, 2002), na qual, o número de ciclos de lavagens depende do tipo de produto requerido, com relatos do uso de até 29,1L de água para cada 1kg de *Surimi* produzido (PARK; LIN, 2005).

Durante a etapa de clarificação são extraídas proteínas musculares hidrossolúveis, como as proteínas sarcoplasmáticas, caracterizando em cada *Minced* processado a geração de grandes volumes de efluentes com elevada carga proteica que, sendo descartados incorretamente, são potenciais poluidores dos corpos d'água (AFONSO; BÓRQUEZ, 2002; PARK; LIN, 2005; VENUGOPAL, 2009).

Nas últimas décadas, a prática da reciclagem de águas residuais tem se destacado devido às fontes limitadas de água, à procura por redução de custos operacionais, e problemas de poluição associados ao descarte de efluentes industriais (LIN; PARK, MORRISSEY, 1995).

Hidrolisados de resíduos de pescado, principalmente, os provenientes dos tecidos musculares tem sido apontados como fonte de peptona para subsidiar o crescimento de bactérias e, em muitas vezes, demonstraram melhor desempenho que as peptonas comerciais (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005; CLAUSEN et al., 1985; DUFOSSÉ; DE LA BROISE; GUERARD, 2001; GILDBERG; BATISTA; STROM, 1989; HAARD, 1995; VIEIRA et al., 2005).

Mediante a elevada quantidade de matéria orgânica presente na água residual do *Minced*, a implementação de práticas para o reuso, além de contribuir para a mitigação de problemas ambientais, soma vantagens econômicas com a redução de gastos, e a obtenção de coprodutos de alto valor agregado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a água residual gerada no processamento de *Minced* de tilápia, quanto à sua qualidade ambiental, extrair e avaliar sua composição proteica, e verificar a eficiência da peptona no crescimento microbiano.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material

A matéria prima para elaboração do *Minced* foi proveniente de carcaças da espécie tilápia (*Oreochromis niloticus*), de empresa processadora sediada no Estado de São Paulo. As carcaças restantes após a filetagem seguiram para a Planta de Processamento do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), onde foi realizada a separação da cabeça e vísceras, obtendo-se o "espinhaço" (espinha dorsal do peixe com carne aderida aos ossos). Este seguiu para a operação de sanitização com água clorada a $5 mg.L^{-1}$ de hipoclorito. Após essa etapa, os espinhaços seguiram para desossadora (Usitecnica®, modelo USI 100) sendo assim obtidas as amostras de CMS, com rendimento de 60%.

4.2.2 Métodos para coleta e análise da água residual

4.2.2.1 Elaboração do *Minced* e coleta da água residual

As amostras de CMS foram colocadas em recipiente contendo água destilada refrigerada, aproximadamente a 10°C, na proporção 1:3. O material foi homogeneizado por 3 min e, em seguida, permaneceu em repouso por 3 min. Para a drenagem da água residual, a CMS foi acondicionada e prensada em tecido de algodão esterilizado (ANGELINI et al., 2013), sendo que a água residual coletada seguiu em fluxo contínuo para a análises de DBO e DQO, bem como, para fracionamento via centrifugação (Figura 3.1).

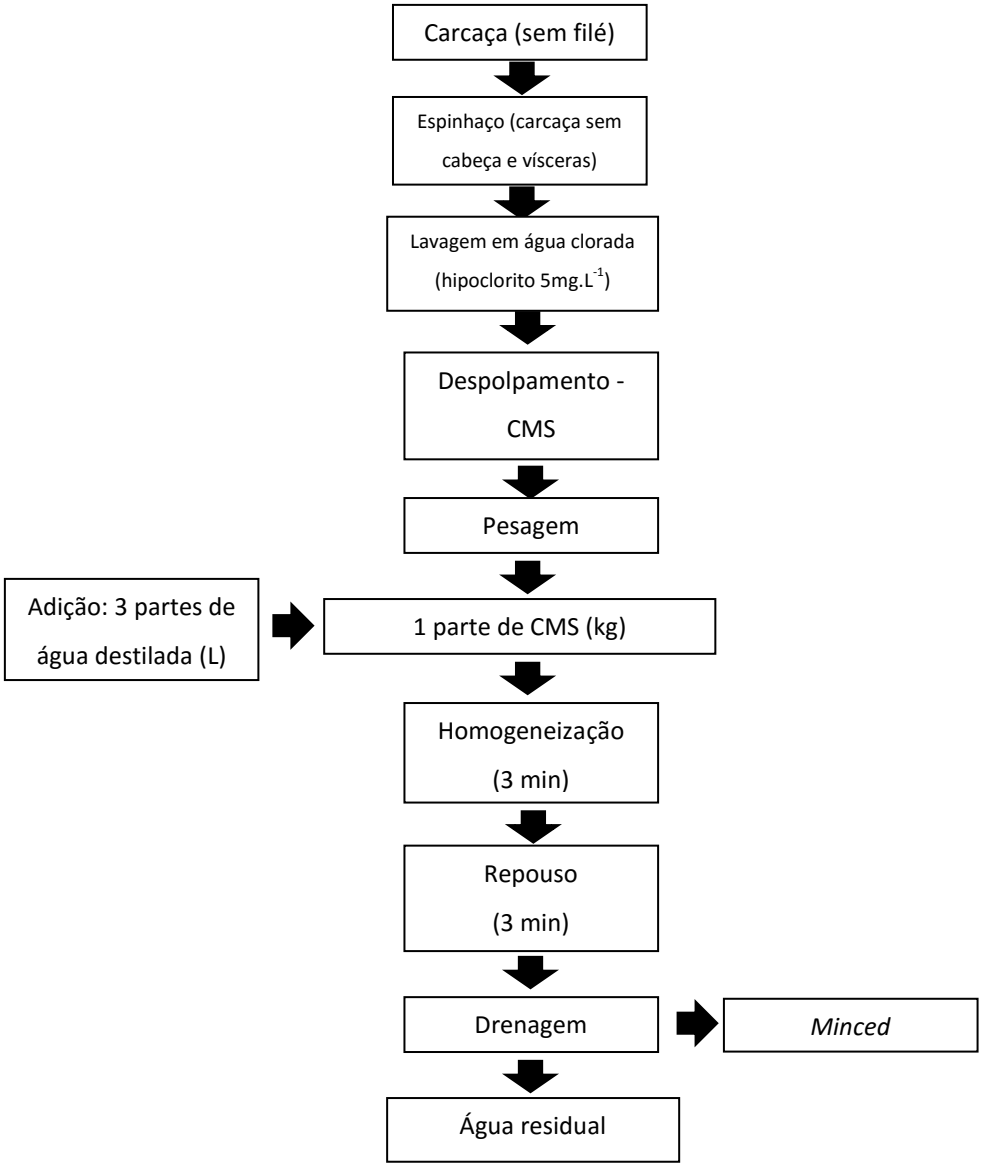


Figura 4.1 - Fluxograma de obtenção da água residual do *Minced* de tilápia.

4.2.3 Análises da água residual antes do fracionamento

4.2.3.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A análise de DQO foi realizada de acordo com a metodologia da APHA-AWWA-WEF (1998), sendo os resultados expressos em mgO_2/L. A amostra de água residual foi previamente diluída em água deionizada, para leitura de uma alíquota representativa dentro da curva de calibração, sendo o fator de diluição igual a 20X. Foram adicionados aos tubos de DQO, 1,5 mL de solução de digestão (dicromato de potássio e sulfato de mercúrio), 3,5 mL da solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata, e 2,5 mL da amostra (com diluição de 20%).

Para o branco foram adicionados 2,0 mL de água destilada, 1,5 mL da solução de digestão e 3,5 mL ácido sulfúrico e prata. Todo o procedimento foi realizado em duplicata. Em seguida os tubos foram homogeneizados, e colocados em bloco digestor (Hach®, modelo Cod Reactor 45600) a 150ºC por 120 min. Após resfriamento, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hach®, modelo DR/4000) a 600 nm. A DQO foi determinada por meio da Equação (4.1):

$$DQO\ (mgO_2/L) = [a.x + b]\ .\ F \qquad \text{Equação (4.1)}$$

onde: a = coeficiente angular

b = coeficiente linear

x = absorbância

F = inverso do fator de diluição

4.2.3.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A DBO foi determinada conforme metodologia da APHA-AWWA-WEF (1998) e a partir dos resultados obtidos na análise de DQO, foram elaboradas as diluições 0,2%, 0,1%, 0,05% e 0,03%, sendo acrescentada água de diluição (antecipadamente aerada por 20 min). Em seguida, as amostras foram transferidas para o frasco de DBO de 300 mL e realizada a leitura da quantidade de oxigênio dissolvido no oxímetro (Orion®, modelo 810). Após a leitura, os fracos foram incubados em estufa (Fanem®, modelo 347) com temperatura controlada de 20 ºC. Após 5 dias de incubação, os frascos foram retirados, e foi realizada novamente a leitura no oxímetro. Os resultados foram expressos em mgO_2/L, e obtidos por meio da Equação (4.2):

$$DBO\ (mgO_2/L) = \frac{(ODi - ODf)}{\%\ de\ diluição}\ X\ 100 \qquad \text{Equação (4.2)}$$

onde: ODi = concentração de O_2 dissolvido inicial

ODf = concentração de O_2 dissolvido final (após 5 dias)

% de diluição = diluição prévia da amostra

4.2.3.3 Análise de pH, nitrogênio total e fósforo

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro digital (Digimed®), com tampão de calibração pH 4,00 e pH 7,00, sendo os resultados expressos com uma casa decimal (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985). Os teores de nitrogênio total e fósforo foram mensurados de acordo com a metodologia de Abreu, Andrade e Falcão (2006).

4.2.4 Análises da água residual após o fracionamento

4.2.4.1 Fracionamento e liofilização da amostra

A água residual foi submetida à centrifugação (centrífuga Eppendorf® refrigerada, modelo 5810 R) a 8.885 G por 20 min a 0ºC (adaptado de DUMAY et al., 2006). Sendo obtidas duas frações, aquosa e sedimento, que foram separadas e congeladas a -30ºC. A fração aquosa foi submetida à liofilização (liofilizador Liotop®, modelo L101), e o material liofilizado (peptona) mantido a -30ºC.

4.2.4.2 Determinação de proteínas e lipídeos

Utilizando o método de Johnson e Ulrich (1974) foi determinada a quantidade de nitrogênio total, método de Microkjeldahl, e a conversão em proteína, multiplicando o valor de nitrogênio obtido pelo fator 6,25. O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente extrator (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985).

4.2.4.3 Métodos de análise de efetividade das peptonas

4.2.4.3.1 Seleção de cepas puras e elaboração da peptona

Os microrganismos utilizados no teste de efetividade das peptonas foram cepas puras de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), provenientes do Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

Os meios de cultura para as cepas puras foram preparados de acordo com Poernomo e Buckle (2002), utilizando dextrose a 0,1% (m/v) (OXOID®) e peptona resíduo/comercial a 0,5% (m/v), completando o volume de 100 mL com água destilada. Para comparação de efetividade, foram utilizadas as peptonas comerciais das marcas BD Difco® (Bacto™Peptone) e Himedia® (Peptone, Bacteriological) (peptonas obtidas por digestão enzimática do tecido muscular de animais), bem como, a peptona proveniente da água residual de *Minced*

liofilizada. O pH foi ajustado para 7, com as soluções de HCl 1M ou NaOH 1M, e as peptonas foram autoclavadas a 121ºC/15 min. Foram realizados testes de esterilidade das peptonas pela contagem padrão de placas em meio PCA, sendo as placas incubadas em estufa a 37ºC por 24h (SILVA et al., 2010).

4.2.4.3.2 Avaliação por Densidade Óptica (Curvas de crescimento)

Os microrganismos foram inicialmente reativados, a partir das culturas estoque, mantidos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - BD®) por 18 a 24 h, a 37 ºC e, posteriormente, cultivados em BHI ágar (BD®). Após o crescimento, as colônias individuais foram removidas com o auxílio de alça de platina e suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril. O inóculo foi previamente padronizado 1 x 10^8 UFC/mL por turbidimetria, de acordo com o padrão 0,5 de turvação Mc Farland e, em seguida, inoculado 100 µL destas na peptona comercial e na peptona da água residual. A confirmação de padronização das colônias foi realizada usando o método de plaqueamento por profundidade em PCA (Plate Count Agar - Acumedia®) (SILVA et al., 2010).

Com uma pipeta multicanal, 200 µL de cada amostra foram pipetadas, em microplaca de 96 poços, e incubadas em espectrofotômetro (Victor™X3, PerkinElmer®) a 37ºC por 48 h, sendo as leituras das absorbâncias realizadas a cada 1 h, no comprimento de onda de 600nm. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Foram pipetadas na microplaca também peptonas sem inoculação microbiana, como controle.

4.2.4.3.3 Produção de Biomassa

A produção de biomassa foi realizada de acordo com Poernomo e Buckle (2002), sendo preparados os meios comerciais e os meios com peptonas do resíduo, e inoculados *S. aureus* e *E. coli* previamente padronizados a 1 x 10^8 UFC/mL. A seguir, foram transferidos 25mL do meio para o tubo *falcon* estéril, em triplicata para cada peptona e microrganismo, e centrifugados a 10.000 G por 15 min. O precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,85% e novamente centrifugado (10.000 G por 15 min). Em seguida, o conteúdo foi transferido para placas de petri e incubados a 105ºC por 24h, sendo anotados os pesos iniciais e finais das placas. Os resultados obtidos foram expressos em g de biomassa.100mL^{-1}.

4.2.4.3.4 Avaliação por plaqueamento

A peptona do resíduo e as comerciais foram padronizadas conforme as etapas descritas anteriormente, e incubadas em estufa a 37ºC por 36 h. A partir destas, foram feitas mais cinco

diluições decimais em tubos, a partir de 1 mL e diluindo-se em 9 mL de água peptonada. Alíquotas de 0,1 mL da diluição de 10^{-1} a 10^{-5} foram inoculadas na superfície, em duplicata, em placas de Petri contendo os meios seletivos para cada microrganismo: Baird-Parker Ágar (Difco®) para *Staphylococcus aureus*, e Violet Red Bile Agar with MUG para *Escherichia coli* (Acumedia®). Após o plaqueamento, as placas foram invertidas em estufa, a 35ºC por 48h, para a contagem padrão, sendo que para as placas de *E. coli* a contagem foi realizada em câmara escura para análise ultravioleta (SILVA et al., 2010).

4.2.5 Análise estatística

A análise da produção de biomassa foi realizada em triplicata, para cada peptona e microrganismo, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão, com análise estatística de variância (ANOVA) por meio do *software* R e *Assistat* Beta 7.7. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de *Tukey*, com nível de significância igual a 5%.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Qualidade da água residual do *Minced*

O valor do pH do efluente de *Minced* foi de 6,7, corroborando com Achour et al. (2000) que mediram água de lavagem do tecido muscular de atum e encontraram valores na faixa de 6,4-6,9. Segundo Gonzalez (1996) o pH dos efluentes de indústrias processadoras de pescado é geralmente próximo ao neutro.

Em relação às demandas de consumo de oxigênio para degradação da matéria orgânica presente na amostra, foram obtidos 8854,5 mgO_2/L para DQO e 4656,88 mgO_2/L para $DBO_{5,20ºC}$. Caracterizando o efluente com elevada quantidade de matéria orgânica, e que apresenta uma DBO com valores bem menores à DQO, evidenciando baixa quantidade de matéria biodegradável.

No resíduo líquido do processamento de *Minced* de pescada-do-Pacífico-norte (*Merluccius productus*), Lin, Park e Morrisey (1995) encontraram resultados para DQO que variaram entre 6000 a 27000 $mg.L^{-1}$. Conforme a espécie de pescado e as várias etapas de processamento nota-se diferentes respostas para a qualidade dos efluentes obtidos (ACHOUR et al., 2000; CARAWAN, 1991; DEL VALLE; AGUILERA, 1990; GREEN et al., 1984; MENDEZ et al., 1992; RIDDLE; SHIKAZE, 1973).

Os corpos de águas doces e salinas são divididos em três classes, diferindo entre si pelos limites máximos de concentração de DBO estabelecidos pelo CONAMA. Os resultados

do presente trabalho, apresentaram o valor de DBO que excede os limites das classes com maiores valores permitidos, como 10 mg/L O_2, na classe 3 de águas doces (BRASIL, 2005).

Segundo a resolução do CONAMA nº 430/2011, os efluentes devem ser tratados antes de ser lançados nos corpos d'água, padronizados com valor de pH entre 5 e 9 e remover, no mínimo, 60% de DBO (BRASIL, 2011).

De acordo com Eckenfelder (1980), para tratamentos biológicos é considerada uma boa relação entre nitrogênio e fósforo, a proporção N/P igual a 5, em razão do favorável crescimento de biomassa. A relação entre a quantidade de nitrogênio e fósforo no efluente foi de 4,5, demonstrando potencial degradável por agentes microbiológicos. Perante isso, avaliando águas residuais da etapa de sangria e filetagem, Souza (2010) também encontrou valores elevados para DQO, com 6300mg.L^{-1}, e demonstrou que o reuso das águas residuais como substrato de reatores anaeróbios apresentam bom desempenho na produção de biogás. Com o mesmo objetivo, avaliando efluentes de empresa processadora de atum, Achour et al. (2000) acoplaram à captação de águas residuais, um sistema de digestão anaeróbia, verificando uma redução de 90% do total da demanda química de oxigênio.

Assim, em razão dessas características, algumas pesquisas sugerem o reaproveitamento de águas residuárias como coprodutos destinados à geração de energia limpa (KANJANAPONGKUL et al., 2009; KRAMER et al., 2011; SHIMOYAMA et al., 2008), ingrediente de ração animal (LIM; KIM; HWANG, 2003), e aditivos na indústria farmacêutica e alimentícia (BOURTOOM et al., 2009; HUIDOBRO; MONTERO; BORDERÍAS, 1998).

Em regiões de difícil acesso aos recursos hídricos, como em indústrias processadoras de pescado da Uganda, destaca-se a importância em reduzir, reciclar e reutilizar a água e, ao mesmo tempo, garantir a qualidade e inocuidade do alimento processado (MCDONALD et al., 1999). Nessa linha há trabalhos que propõem estratégias para reduzir o consumo de água, com a reintrodução desta em etapas de processamento, ou em etapas com menor exigência de qualidade da água, como na limpeza das instalações (CASANI; KNOCHEL, 2002; CASANI; ROUHANY; KNOCHEL, 2005; DROST et al., 2014; MIERZWA, 2002).

Por fim, considerando que o teor de proteína bruta equivale a 63% da amostra liofilizada, e que a cada 1kg de CMS de tilápia foram utilizados 3L de água potável para efetuar a clarificação ou lavagem do *Minced*, a demanda biológica necessária para degradar a matéria orgânica contida na água residual será igual a 13970,64 mgO_2. Assim, uma empresa processadora de tilápia que produz 1 t de *Minced* por mês, necessita de, aproximadamente, 13970.10^9 mg de O_2 para degradar a matéria orgânica presente no efluente (sendo a demanda

estimada com base na água residual proveniente apenas do primeiro ciclo de lavagem do CMS).

Assim, é imprescindível que efluentes gerados durante o processamento do *Minced* sejam reaproveitados como coprodutos de valor agregado, ou, uma vez descartados, tenham sido tratados previamente.

4.3.2 Caracterização da fração aquosa liofilizada

O material obtido após a liofilização da fração aquosa é constituído de 3,28% de lipídeos e 63% de proteína bruta, sendo a quantidade de material liofilizado (peptona) obtida em um ciclo de lavagem de *Minced* igual a 1,22%.

4.3.3 Efetividade de peptonas

4.3.3.1 Curvas de crescimento de microrganismos

O desenvolvimento de microrganismos na peptona da água residual liofilizada foi analisado por meio das curvas de crescimento de *E. coli* e *S. aureus* (Figuras 4.2 e 4.3, respectivamente).

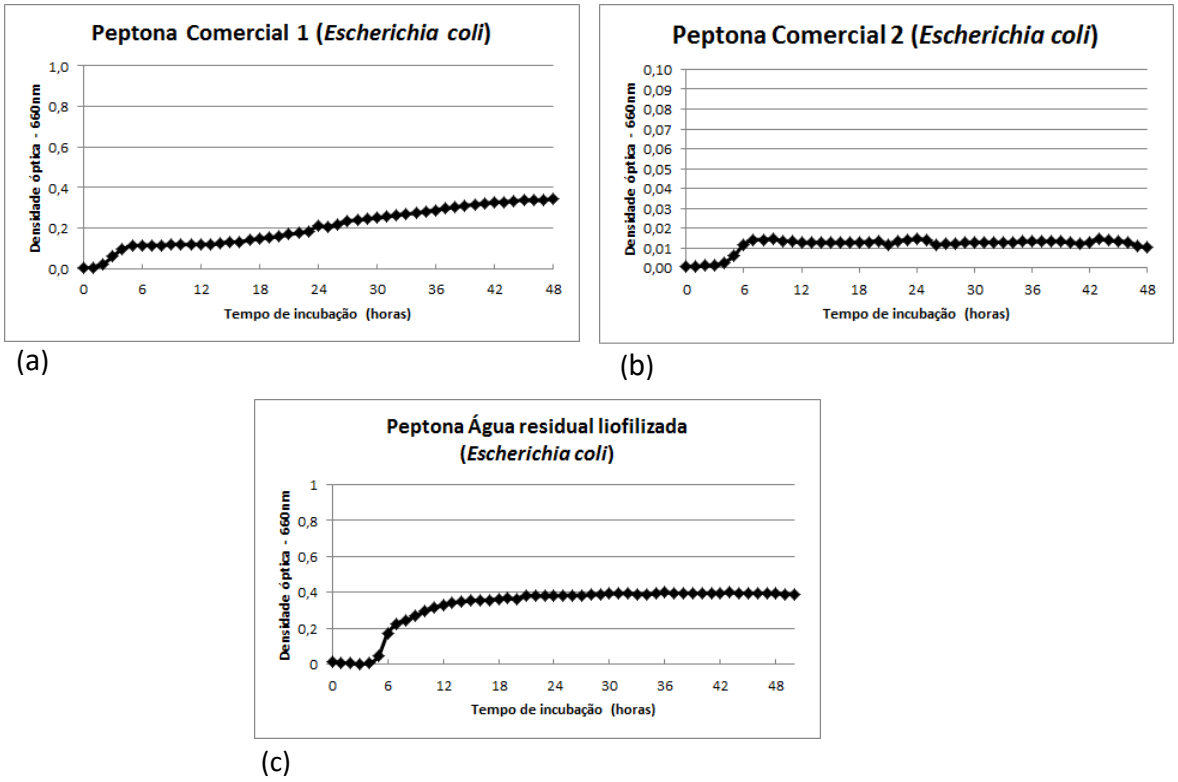


Figura 4.2 - Curvas de crescimento para *Escherichia coli* (a) Peptona Comercial 1 – Himedia®, (b) Peptona Comercial 2 – BD®, (c) Peptona Água residual liofilizada.

Apesar da peptona Himedia® apresentar início da fase log em 4 h de incubação, ocorreu baixo crescimento da bactéria. Desse modo, o meio de cultura que apresentou condições mais favoráveis para o desenvolvimento da *Escherichia coli*, com melhor reprodutibilidade em pouco tempo, foi aquele preparado com a peptona da água residual. É possível observar que a *E. coli* inicia a fase log com 5 h de incubação, e a fase estacionária após 15 h, mantendo-se constante até o final da leitura em 48 h. Em todos os testes não foi possível visualizar a fase de declínio, o mesmo observado em estudo com *Escherichia coli* (ATCC 35150) por Cetin-Karaca e Newman (2015), *Escherichia coli* (ATCC 25922) por Dufossé, De La Broise e Guerard (2001) e Viani (2014). De modo geral, as bactérias cultivadas em peptonas comerciais apresentaram baixo crescimento em relação ao meio contendo peptona residual liofilizada.

Em relação à curva de crescimento apresentada pela peptona comercial Himedia®, a estabilidade (fase estacionária) foi alcançada em 7 h, entretanto, no tempo de 17 h, a *E. coli* continuou a crescer, apresentando um comportamento que se assemelha a uma reta ascendente, porém com baixa velocidade de crescimento. O mesmo comportamento de crescimento de *E. coli* foi observado em estudo com peptonas de hidrolisado de aparas de camarão (*Macrobachium amazonicum*) (VIEIRA et al., 2005), e com peptonas obtidas por hidrólise enzimática da espécie "trevally yellow stripe" (*Selaroides leptolepis*) (KLOMPONG et al., 2012), que sugerem a influência do valor do pH como fator diretamente relacionado ao crescimento, assim, os autores relacionam o aumento do pH ao crescimento da população de microrganismos.

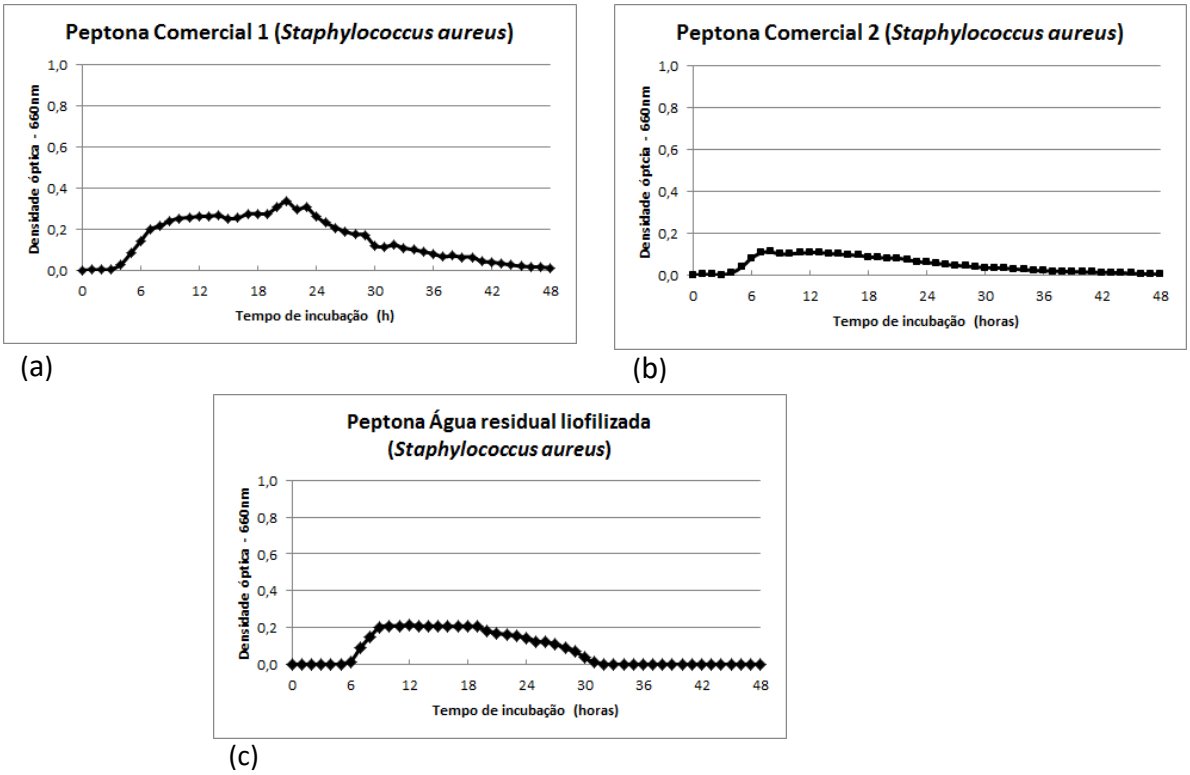


Figura 4.3 - Curva de crescimento para *Staphylococcus aureus*, nas seguintes peptonas: (a) Peptona Comercial 1 – Himedia®, (b) Peptona Comercial 2 – BD®, (c) Peptona Água residual liofilizada.

Nos meios de cultura nos quais foi inoculado o *Staphylococcus aureus* é possível notar que em todas as peptonas, a fase lag foi mais extensa, comportamento diferente do apresentado pela *E. coli*. A mesma performance na curva de *S. aureus* também foi encontrada por Klompong et al. (2012) e Oliveira et al. (2013), que não verificaram mudança na densidade celular nas primeiras 4 h de incubação. Os autores justificaram que durante essa fase o número de células não apresenta alteração considerável, pois em um novo meio não há reprodução imediata dos microrganismos, além das culturas terem sido transferidas de um meio rico, como o BHI, para o meio de cultura elaborada com as peptonas, sendo necessário um tempo para sua adaptação (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

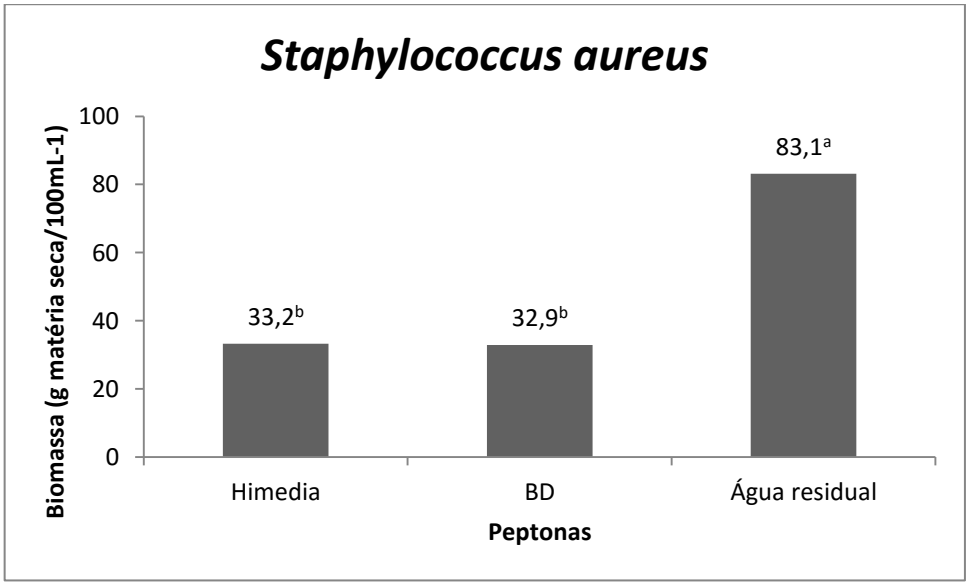
O meio de cultura elaborado com a peptona Himedia® atingiu mais rápido a fase log em 5 h, alcançando a fase estacionária após 14 h e declínio após 24 h. Entretanto, no tempo de 20 h a curva também apresentou um pequeno aumento, como para *E. coli* (peptona Himedia®), mas após 4 h teve início a fase de declínio. Dentre os resultados, a peptona residual completou a fase logarítmica em menor tempo de 7 a 10h, associando também a este fato, à maior densidade celular de *S. aureus* no menor tempo.

Por outro lado, o crescimento da *E. coli* na peptona residual foi mais elevado em relação ao crescimento do *S. aureus*. Além das características morfológicas e estruturais próprias de cada espécie, Klompong et al. (2007) e Klompong et al. (2012) revelaram que os diferentes níveis de densidade celular e valores de pH, estão relacionados aos diferentes tamanhos de peptídeos, tempo de geração (início da fase log) e máxima taxa de crescimento. A redução do peso molecular das proteínas favorece a absorção por parte dos microrganismos (BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2008).

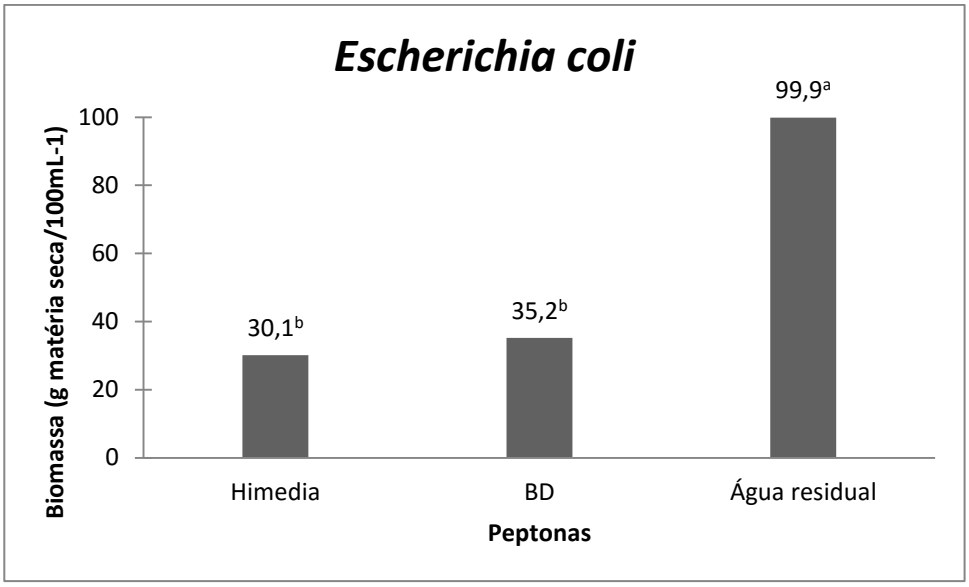
As curvas de crescimento do presente trabalho e as reportadas na literatura indicam que peptonas obtidas de resíduos de pescado possuem melhores desempenhos no crescimento microbiano quando comparadas às peptonas comerciais de qualidade (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005; FALLAH; BAHRAM; JAVADIAN, 2015; GILDBERG et al., 2010; SAFARI et al., 2011; SAFARI et al., 2012; VIEIRA et al. 2005). Uma hipótese para esta efici~encia está no fato de que o tecido muscular do pescado, apresenta mais compostos nitrogenados solúveis, do que outros tecidos biológicos (HAARD, 1995).

4.3.3.2 Produção de Biomassa

A produção de biomassa via crescimento dos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* cultivados em meio líquido contendo peptonas da água residual e peptonas comerciais, está apresentada na figura 4.4.



(a)



(b)

Figura 4.4 - Produção de biomassa do crescimento microbiano de (a) *Staphylococcus aureus* (b) *Escherichia coli*, para as peptonas comerciais e peptona da água residual.

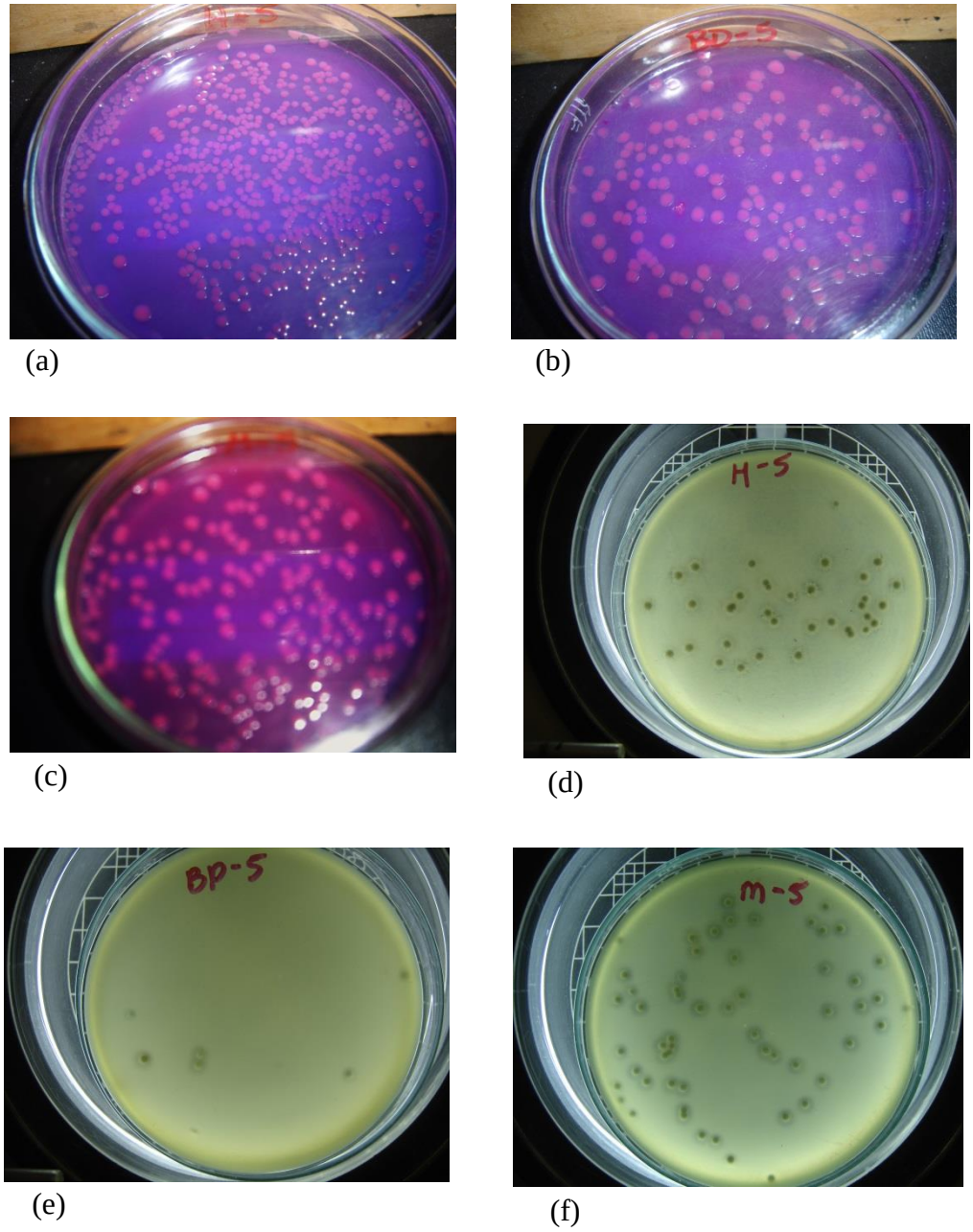
Para *S. aureus* a produção de biomassa variou de 32,9 a 83,1 g de biomassa.100mL^{-1}, e para a *E. coli* os resultados encontraram-se na faixa de 30,1 a 99,9 g de biomassa.100mL^{-1}, sendo que o valor máximo de biomassa produzido por ambos os microrganismos correspondeu à peptona de água residual.

A elaboração de meios de cultura com peptona de resíduo dessa mesma espécie de pescado também foram objeto de estudo de Viani (2014), que avaliou a eficiência da silagem ácida fracionada de vísceras de tilápia no crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, sendo a maior produção de biomassa proveniente da peptona residual.

4.3.3.3 Avaliação por Plaqueamento

A figura 4.5 ilustra o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na peptona de água residual liofilizada e peptonas comerciais.

A peptona comercial Himedia® apresentou melhor desempenho para subsidiar o crescimento de *E. coli*, seguido pela peptona da água residual e Difco® (Tabela 4.1). Porém, em relação a *S. aureus*, a peptona elaborada a partir da água residual liofilizada foi mais efetiva para o crescimento das bactérias, seguida pela peptona da Himedia® e Difco®.



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Figura 4.5 - Plaqueamento de crescimento microbiano cultivados em meio líquido contendo peptona da água residual liofilizada e peptonas comerciais, na diluição 10^{-5}. (a) Peptona Comercial Himedia®, *Escherichia coli*; (b) Peptona Comercial Difco®, *Escherichia coli*; (c) Peptona da Água residual liofilizada, *Escherichia coli*; (d) Peptona Comercial Himedia®, *Staphylococcus aureus*; (e) Peptona Comercial Difco®, *Staphylococcus aureus*; (f) Peptona da Água residual liofilizada, *Staphylococcus aureus*.

Tabela 4.1 – Contagem, em UFC.g^{-1}, para *E. coli* e *S. aureus*, diluídos até 10^{-5}, cultivados em meio líquido contendo peptona de água residual e peptonas comerciais

Peptonas	***E. coli***	***S. aureus***
Himedia®	Incontável	3,2 x 10^7
Difco®	1,27 x 10^8	4,0 x 10^6
Água residual	1,71 x 10^8	5,1 x 10^7

Assim como no presente trabalho, H-Kittikun, Bourneow e Benjakul (2012) e Vázquez e Murado (2008) extraíram peptona de água residual do processamento de tecido muscular de polvo (*Octopus vulgaris*) e nemipteridae (*Nemipterus hexodon*), respectivamente. Comparando peptonas comerciais e peptonas de resíduo, os autores constataram, nas peptonas residuais, a máxima produção de bacteriocinas por *L. lactis* e *P. acidilactici* (VÁZQUEZ; MURADO, 2008) e de transglutaminase por *Enterobacter sp*. e *Providencia sp*. (H-KITTIKUN; BOURNEOW; BENJAKUL, 2012).

Outros trabalhos também demonstraram o desempenho de peptonas obtidas a partir de vísceras (DERAZ et al., 2011; POERNOMO; BUCKLE, 2002; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2004; VIANI, 2014). Aliado a isso, atualmente, pesquisadores consideram que a aplicação de misturas de peptonas confere maior efetividade ao meio de cultura, devido ao sinergismo. A seleção da peptona ou da mistura delas é determinada em relação à taxa de produção e proliferação dos microrganismos (HUSIN et al., 2015). Diante disso, com o preparo do *pool* de peptonas provenientes de hidrolisados de resíduo de tilápia poderiam ser obtidos coprodutos a serem utilizados como substrato de crescimento microbiano.

4.4 Conclusão

Os efluentes da etapa de clarificação do *Minced* de tilápia apresentam elevados valores de DBO e DQO, evidenciando quantidades consideráveis de matéria orgânica.

Peptonas liofilizadas, extraídas da água residual do *Minced* contém considerável teor proteico, da ordem de 63% e demonstraram ser substratos eficientes para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, caracterizando um coproduto que pode ser apresentado como uma alternativa em substituição às peptonas comerciais convencionais.

Referências

ABREU, M. F.; ANDRADE, J. C.; FALCÃO, A. A. Protocolos de análises químicas. cap. 9, p. 121-158. In: ANDRADE, J. C.; ABREU, M. F. **Análise química de resíduos sólidos para monitoramento e estudos agroambientais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2006.

ACHOUR, M.; KHELIFI, O.; BOUAZIZI, I.; HAMDI, M. Design of an integrated bioprocess for the treatment of tuna processing liquid effluents. **Process Biochemistry**, Oxford, p. 1013-1017, 2000.

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**, Amsterdam, v. 142, p. 29-45, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 1998. 733p.

ANGELINI, M. F. C.; GALVÃO, J. A.; VIEIRA, A. F.; SILVA, L. K. S.; SHIRAHIGUE, L. D.; CABRAL, I. S. R.; GALLO, C. R.; MODESTA, R. C. D.; OETTERER, M. Shelf life and sensory assessment of tilapia quenelle during frozen storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 8-17, 2013.

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 3714-3722, 2005.

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**, Barking, v. 99, p. 4105-4111, 2008.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S.; JANTAWAT, P.; SANGUANDEEKUL, R. Recovery and characterization of proteins precipitated from surimi wash-water. **Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 599-605, 2009.

CARAWAN, R. E. Processing plant waste management guidelines for aquatic fishery products. 1991. 36p. Disponível em: < http://infohouse.p2ric.org/ref/02/01796.pdf >. Acesso em: 15 jan. 2016.

CASANI, S.; ROUHANY, M.; KNOCHEL, S. A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. **Water Research**, London, v. 39, n. 6, p. 1134-1146, 2005.

CASANI, S.; KNOCHEL, S. Application of HACCP to water reuse in the food industry. **Food Control**, Guildford, v. 13, 4-5ed., p. 315-327, 2002.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 11, p. 8-16, 2015.

CLAUSEN, E.; GILDBERG, A.; RAA, J. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1556-1557, 1985.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar. 2005. p. 58-63.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 maio 2011. p. 89.

DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. Recovery of liquid by-products from fish meal factories: a review. **Process Biochemistry International**, Barking, v. 25, n. 4, 122–131, 1990.

DERAZ, S. F.; EL-FAWAL, G. F.; ABD-ELLATIF, S. A.; KHALIL, A. A. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* fish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian Journal Microbiology**, New Delhi, v. 51, n. 2, p. 171-175, 2011.

DROST, A.; NEDZAREK, A.; BOGUSLAWSKA-WAS, E.; TÓRZ, A.; BONISLAWSKA, M. UF application for innovative reuse of fish brine: product quality, CCP management and the HACCP system. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 31, p. 396-401, 2014.

DUFOSSÉ, L.; DE-LA-BROISE, D.; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 32-38, 2001.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGÉ, J.P. Improvement of lipids and phospholipids recoveries from sardine (*Sardina pilchadus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 2327-2332, 2006.

ECKENFELDER, W. W. **Principles of water quality management**. Boston: CBI Publishing, 1980. 728p.

FALLAH, M.; BAHRAM, S.; JAVADIAN, S. R. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. **Food Science & Nutrition**, Malden, v. 3, n. 2, p. 153-157, 2015.

GILDBERG, A.; DAHL, R.; MIKKELSEN, H.; NILSEN, K. Peptones from Atlantic cod stomach as nitrogen sources in growth media to marine bacteria. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, v. 19, p. 75-83, 2010.

GILDBERG, A.; BATISTA, I.; STROM, E. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 11, n. 4, p. 413-423, 1989.

GONZALEZ, J. F. **Wastewater treatment in the fishery industry**. Roma: FAO, 1996. (FAO Fisheries Technical Paper, 355). 52p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/v9922e/V9922E03.htm>. Acesso em: 20 jan. 2016.

GREEN, D.; TZOU, L.; CHAO, A. C.; LANIER, T. C. Strategies for handling soluble wastes generated during minced fish (surimi) production. In: INDUSTRIAL WASTE CONFERENCE, 39., 1984, West Lafayett. **Proceedings**… West Lafayett: Purdue University, 1984. p. 565–572.

HAARD, N. F. Composition and nutritive value of fish proteins and other nitrogen compounds. In: RUITER, A. (Ed.). **Fish and fishery products**: composition, nutritive properties and stability. Wallingford: CAB International, 1995. p. 77-115.

H-KITTIKUN, A.; BOURNEOW, C.; BENJAKUL, S. Hydrolysis of surimi wastewater for production of transglutaminase by *Enterobacter* sp. C2361 and *Providencia* sp. C1112. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 1183-1191, 2012.

HUIDOBRO, A.; MONTERO, P.; BORDERÍAS, A. J. Emulsifying properties of an ultrafiltered protein from minced fish wash water. **Food Chemistry**, Barking, v. 61, n. 3, p. 339-343, 1998.

HUSIN, N.; KAMAL, S. M. M.; CHUAN, L. T.; MUHAMMAD, N. F.; JUSOH, N. Comparison of microbial growth on fish waste peptones from different hydrolysis methods. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY, 5., 2015, Shanghai. **Abstracts…** Shanghai: IACSIT Press, 2015, p. 1-4.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. Analytycal methods. In: SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. (Eds.). **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/LQI, 1974. p. 4-10.

KANJANAPONGKUL, K.; TIA, S.; WONGSA-NGASRI, P.; YOOVIDHYA, T. Coagulation of protein in surimi wastewater using a continuous ohmic heater. **Journal of Food Engineering**, London, v. 91, p. 341-346, 2009.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; HAYES, K. D.; SHAHIDI, F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, p. 1019–1026, 2007.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Use of protein hydrolysate from yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as microbial media. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, p. 1317-1327, 2012.

KRAMER, R.; PELTER, L.; KMIOTEK, K.; BRANCH, R.; COLTA, A.; POPA, B.; TING, E.; PATTERSON, J. Modular waste/renewable energy system for production of electricity, heat, and potable water in remote locations. In: IEEE GLOBAL HUMANITARIAN TECHNOLOGY CONFERENCE, 2011. **Abstracts…** Seattle: IEEEXplore, 2011. p. 30-35.

LIN, T. M.; PARK, J. W.; MORRISSEY, M. T. Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 4-9, 1995.

LIM, J.; KIM, T.; HWANG, S. Treatment of fish-processing wastewater by co-culture on *Candida rugopelliculosa* and *Brachionus plicatilis*. **Water Research**, London, v. 37, p. 2228-2232, 2003.

MCDONALD, C.; INCE, M. E.; SMITH, M. D.; DILLON, M. Fish processing in Uganda: waste minimization. In: WEDC CONFERENCE, INTEGRATED DEVELOPMENT FOR WATER SUPPLY AND SANITATION, 25., 1999. **Proceedings...** Addis Abada: WEDC, 1999. p. 52-55.

MENDEZ, R.; OMIL, F.; SOTO, M.; LEMA, J. M. Pilot plant studies on the anaerobic treatment of different wastewater from a fish-canning factory. **Water Science Technology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 37–44, 1992.

OLIVEIRA, A. G.; SUCASAS, L. F. A.; SHIRAHIGUE, L. D.; OETTERER, M.; CAMARGO, A. C.; GARCIA, E. S.; CABRAL, I. S. R.; GALLO, C. R. Eficiência como

meio de cultura do coproduto peptona obtido a partir do fracionamento da silagem de pescado. 2013. **Resumos...** In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 10., 2013. Campinas: UNICAMP, 2013. p. 1-3.

PARK, J. W.; LIN, J. T. M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J. W. (Ed.). **Surimi and surimi sea food**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 33-106.

POERNOMO, A.; BUCKLE, K. A. Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 4, p.333-340, 2002.

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.

RIDDLE, M. J.; SHIKAZE, K. **Characterization and treatment of fish processing plant effluents in Canada**. Ottawa: Canada Environmental Protection Service, 1973. 44p.

SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J. M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, p. 73-79, 2012.

SAFARI, R.; SARAVI, H. N.; POURGHOLAM, R.; MOTALEBI, A. A.; GHOROGHI, A. Use of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) head as peptone for *Vibrio anguillarum* and optimization using response surface method (RSM). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Oxford, v. 20, p. 247-257, 2011.

SHIMOYAMA, T.; KOMUKAI, S.; YAMAZAWA, A.; UENO, Y.; LOGAN, B. E.; WATANABE, K. Electricity generation from model organic wastewater in a cassette-electrode microbial fuel cell. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Heidelberg, v. 80, p. 325-330, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 632p.

SOUZA, M. A. **Eficiência do processo de ultrafiltração seguido de digestão anaeróbia no tratamento de efluente de frigorífico de tilápia**. 2010. 76f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto alegre: Artmed, 2012. 967p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780p.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 112, p. 299-311, 2004.

VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 43, p. 66-72, 2008.

VENUGOPAL, V. **Seafood processing**: adding value throught quick freezing, reportable packaging, and cook-chilling. Boca Raton: CRC Press, 2009. 527p.

VIANI, L. D. S. **Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos provenientes do resíduo do processamento de pescado**. 2014. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V. Peptone preparation from fishing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, p. 1235-1237, 2005.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os efluentes gerados durante a etapa de clarificação do *Minced* de tilápia apresentaram elevados valores para DQO e DBO, sugerindo uma alta quantidade de matéria orgânica, fato que limita o descarte direto do efluente no ambiente.

A água residual liofilizada da operação de clarificação do *Minced* apresentou notória atividade antioxidante em todas as concentrações avaliadas.

A peptona elaborada a partir da água residual foi caracterizada como boa fonte de nitrogênio, subsidiando o crescimento dos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com melhor desempenho em relação às peptonas comerciais.

A água residual do processamento de *Minced* tem potencial de reaproveitamento, tanto como fonte de compostos bioativos de interesse para a indústria alimentícia, como na produção de peptona para uso como meio de cultura microbiana em bioprocessos.