

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUO DE TIRA-  
VIRA (*Percophis brasiliensis*)**

**INGRID DAL CIN ALVES**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUO DE TIRA-  
VIRA (*Percophis brasiliensis*)**

**INGRID DAL CIN ALVES**

*Sob a Orientação da Professora Dra.*  
**Ana Iraidy Santa Brígida**

*e Coorientação da Dra.*  
**Angela Aparecida Lemos Furtado**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

Rio de Janeiro, RJ  
Agosto de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474o Alves, Ingrid Dal Cin, 1993-  
Obtenção de hidrolisado proteico de resíduo de Tira Vira (*Percophis brasiliensis*) / Ingrid Dal Cin Alves.  
- Rio de Janeiro, 2019.  
78 f.: il.

Orientadora: Ana Iraidy Santa Brígida.  
Coorientadora: Angela Aparecida Lemos Furtado.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.

1. resíduo de pescado. 2. hidrólise enzimática. 3. atividade antioxidante. 4. atividade emulsificante. 5. estabilidade de emulsão. I. Brígida, Ana Iraidy Santa, 1981-, orient. II. Furtado, Angela Aparecida Lemos, 1963-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

INGRID DAL CIN ALVES

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27 / AGOSTO / 2019.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Iraidy Santa Brígida  
(Embrapa Agroindústria Tropical) (Orientadora)

---

Dr.<sup>a</sup>. Angela Aparecida Lemos Furtado  
(Embrapa Agroindústria de Alimentos) (Coorientadora)

---

Dr.<sup>a</sup>. Caroline Mellinger Silva  
(Embrapa Agroindústria de Alimentos)

---

Dr.<sup>a</sup>. Jeane Santos da Rosa  
(Embrapa Agroindústria de Alimentos)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ter me dado força para superar as dificuldades e não desistir diante dos muitos obstáculos que surgiram no caminho até aqui.

Agradeço à minha mãe Claudete e ao meu pai Antonio, pelos diversos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse subir mais esse degrau na minha vida.

Agradeço aos meus queridos amigos, que me apoiaram e me fizeram acreditar que eu era capaz de concluir este trabalho.

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Iraidy Santa Brígida e à Dr<sup>a</sup>. Angela Aparecida Lemos Furtado pela orientação e suporte dados para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Tamires Carvalho dos Santos, pela amizade e conhecimentos divididos, que foram primordiais durante o mestrado.

Agradeço aos amigos que fiz na universidade e na Embrapa, que tornaram a caminhada mais leve e menos penosa.

Agradeço à todos do Laboratório de Bioquímica e de Processamento de Pescado da Embrapa, pelo apoio oferecido ao longo da execução da pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e à Embrapa Agroindústria de Alimentos, por essa oportunidade de desenvolvimento profissional e pessoal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## RESUMO

ALVES, Ingrid Dal Cin. Obtenção de hidrolisado proteico de resíduo de Tira-Vira (*Percophis brasiliensis*). Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Elevadas taxas de produção de pescado, em especial o pescado beneficiado, vem gerando maiores quantidades de resíduos que tem potencial de se transformar em coprodutos com valor agregado. Dentre os produtos possíveis de se obter a partir de resíduos de pescado, tem-se as proteínas hidrolisadas. Além de ser fonte de aminoácidos essenciais, esse tipo de produto pode apresentar funcionalidades tecnológicas e/ou biológicas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo, via hidrólise enzimática, para obtenção de hidrolisado proteico a partir de resíduo de Tira-Vira (*Percophis brasiliensis*) com capacidade antioxidante e emulsificante. A pasta de Tira-Vira foi obtida a partir do resíduo oriundo da extração de carne mecanicamente separada (CMS) e caracterizada quanto à composição bromatológica e teor de aminoácidos. As condições de hidrólise com Alcalase foram definidas a partir de um planejamento fatorial  $2^3$  onde pH (6 a 9), temperatura (30 a 60 °C) e razão enzima:substrato (E:S, na faixa de 2 a 15%) foram as variáveis independentes e grau de hidrólise, teor de aminoácidos aromáticos livres, atividade antioxidante (ORAC) e capacidade emulsificante foram as variáveis dependentes. O maior grau de hidrólise (45,24%) foi observado sob as condições de pH 6, 45°C e razão E:S 8,5% em 4 horas de reação, permanecendo o mesmo ao final de 5 horas. O teor de aminoácidos aromáticos livres, que também indica o avanço da hidrólise, aumentou em média aproximadamente 5 vezes em um minuto de reação, e após uma hora o aumento médio foi de quase 8 vezes. A atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos apresentou valores que variaram de uma faixa de 397 a 2860  $\mu\text{mol Trolox/g}$  após 5 horas de hidrólise, sendo a atividade máxima obtida (2953  $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) a pH 7,5, temperatura 60 °C e razão E:S 8,5% após 4 horas de hidrólise. As propriedades emulsificantes estudadas foram expressas em índice de atividade emulsificante (EAI – *emulsifying activity index*) e índice de estabilidade da emulsão (ESI – *emulsion stability index*). O EAI máximo (68,9  $\text{m}^2/\text{g}$ ) foi obtido em pH 7,5; 60 °C, E:S 8,5% após 4 horas de hidrólise, e o ESI máximo (42 minutos) foi obtido após 1 minuto de processo em pH 6, 45 °C e E:S 8,5%. A condição em que foram observados os maiores valores de atividade antioxidante e de índice de atividade emulsificante foi 7,5; 60 °C, E:S 8,5%, porém a escolha das condições de hidrólise são dependentes do perfil de produto desejado.

**Palavras-chave:** resíduo de pescado, hidrólise enzimática, Alcalase, atividade antioxidante, atividade emulsificante, estabilidade de emulsão.

## ABSTRACT

ALVES, Ingrid Dal Cin. Obtainment of protein hydrolysate from Brazilian Flathead (*Percophis brasiliensis*) residue. Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

High fish production rates, especially processed fish, have generated high amounts of waste that has the potential to become added value co-products. Among the products that can be obtained from fish residues, there are hydrolysed proteins. In addition to being a source of essential amino acids, this type of product may have technological and/or biological functionalities. In this context, this work objective was to develop a process, via enzymatic hydrolysis, to obtain protein hydrolysate from Brazilian Flathead (*Percophis brasiliensis*) residue with antioxidant and emulsifying capacity. Brazilian Flathead paste was obtained from the residue from mechanically separated meat (MSM) extraction and characterized by its bromatological composition and amino acid content. Hydrolysis conditions with Alcalase were defined from a  $2^3$  factorial design where pH (6 to 9), temperature (30 to 60 °C) and enzyme:substrate ratio (E:S, in the range of 2 to 15%) were independent variables and degree of hydrolysis, free aromatic amino acid content, antioxidant activity (ORAC) and emulsifying capacity were dependent variables. The highest degree of hydrolysis (45,24%) was observed under the conditions pH 6, 45 °C and E: S ratio 8.5% at 4 hours of reaction, remaining the same after 5 hours. Free aromatic amino acid content, which also indicates the progress of hydrolysis, on average, increased approximately fivefold in one minute of reaction, and after one hour the average increase was almost eightfold. Antioxidant activity of the obtained hydrolysates ranged from 397 to 2860  $\mu\text{mol Trolox/g}$  after 5 hours of hydrolysis, with the maximum activity (2953  $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) at pH 7,5, temperature 60 °C and E:S ratio 8,5% after 4 hours of hydrolysis.. The emulsifying properties studied were expressed as emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI). The maximum EAI (68.9  $\text{m}^2/\text{g}$ ) was obtained at pH 7,5; 60 °C, E: S 8.5% after 4 hours of hydrolysis, and the maximum ESI (42 minutes) was obtained after 1 minute of process at pH 6, 45 °C and E: S 8.5. The condition in which the highest antioxidant activity and emulsifying activity index values were observed was 7.5; 60 ° C, E: S 8.5%, however the choice of hydrolysis conditions are dependent on the desired product profile.

**Key-Words:** fish residue, enzymatic hydrolysis, Alcalase, antioxidant activity, emulsifying activity, emulsion stability.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O peixe Tira-Vira ( <i>Percophis brasiliensis</i> ) (a) inteiro e (b) descabeçado e filetado (Fonte: Autoria própria). .....	4
Figura 2 - Enzima com o substrato em seu sítio ativo (Fonte: UNIVERSIDAD DE BARCELONA, 2018). .....	6
Figura 3 - Uma das estruturas da subtilisina (EC 3.4.21.62) (Fonte: BRENDA, 2018). .....	8
Figura 4 - Efeito da temperatura na atividade enzimática, onde o ponto A representa o ponto ótimo (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018). .....	10
Figura 5 - Efeito do pH na atividade enzimática (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018). .....	11
Figura 6 - Efeito da concentração enzimática na velocidade da reação enzimática (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018). .....	11
Figura 7 - Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018). .....	12
Figura 8 - Processamento de subproduto de pescado em despoldadeira (Fonte: MAY, 2015). .....	16
Figura 9 - Processamento da pasta para a obtenção da suspensão a ser hidrolisada (Fonte: Autoria própria). .....	18
Figura 10 - (a) Sistema de hidrólise composto por pHmetro, reator encamisado, agitador, bureta e banho ultratermostato. (b) Banho maria para interromper a reação (Fonte: Autoria própria). .....	19
Figura 11 - Espectrofotometro para leitura da absorbância das amostras (Fonte: Autoria própria). .....	20
Figura 12 - Fluorímetro utilizado na análise ORAC (Fonte: Autoria própria). .....	21
Figura 13 - Sistema utilizado para a análise de EAI e ESI (Fonte: Autoria própria). ..	23
Figura 14 - Grau de hidrólise durante hidrólise enzimática de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento. ....	27
Figura 15 - Teor de aminoácidos aromáticos durante hidrólise enzimática de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento. ....	28
Figura 16 - Índice de atividade emulsificante dos hidrolisados de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento. ....	29
Figura 17 - Atividade antioxidante dos hidrolisados de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento. ....	29
Figura 18 - Gráfico de grau de hidrólise dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 20%. ....	31
Figura 19 - Gráfico de grau de hidrólise dos experimentos do planejamento na faixa final entre 20% e 15%. ....	32
Figura 20 - Gráfico de grau de hidrólise dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 15%. .....	32
Figura 21 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise nas condições: (a) 1 hora e E:S 2%, (b) 1 hora e E:S 8,5% e (c) 1 hora e E:S 15%. .....	35
Figura 22 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise nas condições: (a) 3 horas e E:S 2%, (b) 3 horas e E:S 8,5% e (c) 3 horas e E:S 15%. .....	36
Figura 23 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise nas condições: (a) 4 horas e E:S 2%, (b) 4 horas e E:S 8,5% e (c) 4 horas e E:S 15%. .....	37
Figura 24 - Gráficos de teor de aminoácidos aromáticos dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 4 mg/mL. ....	39



Figura 25 - Gráficos de teor de aminoácidos aromáticos dos experimentos do planejamento na faixa final entre 4 e 2 mg/mL.....	39
Figura 26 - Gráficos de teor de aminoácidos aromáticos dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 2 mg/mL.....	40
Figura 27 - Superfícies de resposta para o teor de aminoácidos aromáticos nas condições: (a) 1 hora e E:S 2%, (b) 1 hora e E:S 8,5% e (c) 1 hora e E:S 15%.....	43
Figura 28 - Superfícies de resposta para o teor de aminoácidos aromáticos nas condições: (a) 3 horas e E:S 8,5% e (b) 4 horas e E:S 8,5%.....	44
Figura 29 - Gráficos de atividade antioxidante dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 2000 $\mu\text{mol Trolox/g}$ .....	45
Figura 30 - Gráficos de atividade antioxidante dos experimentos do planejamento na faixa final entre 2000 e 800 $\mu\text{mol Trolox/g}$ .....	46
Figura 31 - Gráficos de atividade antioxidante dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 800 $\mu\text{mol Trolox/g}$ .....	46
Figura 32 - Superfícies de resposta para a atividade antioxidante nas condições: (a) 1 hora e E:S 2%, (b) 1 hora e E:S 8,5% e (c) 1 hora e E:S 15%.....	50
Figura 33 - Superfícies de resposta para a atividade antioxidante nas condições: (a) 3 horas e E:S 2%, (b) 3 horas e E:S 8,5%, (c) 3 horas e E:S 15%.....	51
Figura 34 - Superfícies de resposta para a atividade antioxidante nas condições: (a) 4 horas e E:S 2%, (b) 4 horas e E:S 8,5% e (c) 4 horas e E:S 15%.....	52
Figura 35 - Gráficos de Índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 50 $\text{m}^2/\text{g}$ .....	53
Figura 36 - Gráficos de Índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) dos experimentos do planejamento na faixa final entre 50 e 30 $\text{m}^2/\text{g}$ .....	54
Figura 37 - Gráficos de Índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 30 $\text{m}^2/\text{g}$ .....	54
Figura 38 - Gráficos de Índice de estabilidade da emulsão (ESI - emulsion stability index) dos 17 experimentos do planejamento.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes utilizadas no estudo. ....	23
Tabela 2 - Planejamento experimental $2^3$ para as variáveis escolhidas. ....	24
Tabela 3 - Composição centesimal da pasta de resíduo de Tira-Vira e de CMS de outras espécies de peixe reportadas na literatura. ....	25
Tabela 4 - Perfil de aminoácidos da pasta de resíduo de Tira-Vira. ....	26
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de grau de hidrólise obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos (continua). ....	33
Tabela 6 - Respostas de grau de hidrólise obtidas do planejamento fatorial $2^3$ para os três tempos escolhidos. ....	34
Tabela 7 - Dados experimentais e preditos para a validação dos modelos de grau de hidrólise. ....	38
Tabela 8 - Respostas de teor de aminoácidos aromáticos obtidas do planejamento fatorial $2^3$ para os três tempos escolhidos. ....	41
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de teor de aminoácidos aromáticos obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos. ....	42
Tabela 10 - Dados experimentais e preditos para a validação dos modelos de teor de aminoácidos aromáticos livres (mg/mL). ....	44
Tabela 11 - Respostas de atividade antioxidante obtidas do planejamento fatorial $2^3$ para os três tempos escolhidos. ....	48
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de atividade antioxidante obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos. ....	49
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais do índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos. ....	57
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais do índice de estabilidade da emulsão (ESI - emulsion stability index) obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos. ....	58

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	RESÍDUO DE PESCADO COMO FONTE PROTEICA.....	3
2.1.1	Cenário de produção e comércio de pescado .....	3
2.1.2	Resíduo de processamento de pescado.....	3
2.1.3	Tira-vira.....	4
2.2	ENZIMAS .....	5
2.2.1	Nomenclatura e classificação de enzimas .....	6
2.2.2	Hidrolases.....	7
2.2.3	Proteases.....	8
2.3	PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS .....	9
2.3.1	Fatores que influenciam reações enzimáticas .....	9
2.3.2	Grau de hidrólise .....	12
2.3.3	Atividade antioxidante .....	13
2.3.4	Propriedades emulsificantes.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
3.1	PROCESSAMENTO DO RESÍDUO DE TIRA-VIRA .....	16
3.2	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA PASTA .....	16
3.3	PERFIL DE AMINOÁCIDOS.....	17
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DE TIRA-VIRA .....	17
3.5	GRAU DE HIDRÓLISE.....	19
3.6	TEOR DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIVRES .....	20
3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	20
3.8	PROPRIEDADES EMULSIFICANTES .....	22
3.9	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA PASTA .....	25
4.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PASTA DE TIRA-VIRA COM ALCALASE .....	26
4.2.1	Estudo preliminar das condições de hidrólise .....	26
4.2.2	Otimização da hidrólise de tira-vira com Alcalase .....	30
4.2.2.1	Grau de Hidrólise .....	30
4.2.2.2	Teor de Aminoácidos Aromáticos Livres.....	38
4.2.2.3	Atividade Antioxidante .....	44
4.2.2.4	Propriedades Emulsificantes.....	52
5	CONCLUSÃO .....	60
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

# 1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios que as indústrias de alimentos vêm enfrentando atualmente é a geração de resíduos. A minimização da geração, transporte, descarte correto e aproveitamento desses resíduos são cada vez mais debatidos para que soluções eficazes e de baixo custo sejam encontradas. Nesse cenário, uma indústria que se destaca é a de beneficiamento de pescado. O aumento do consumo de peixes acarreta no aumento da produção e vem gerando quantidades altas de resíduos que tem potencial de se transformar em coprodutos com maior valor agregado. Os resíduos provenientes do processamento de pescado podem ser aproveitados de diversas formas, como produção de farinha e óleo de peixe, silagem e proteína hidrolisada. A hidrólise enzimática se apresenta como uma boa alternativa, visto que a transformação das proteínas em peptídeos menores e aminoácidos pode conferir melhores características nutricionais e funcionais ao material (PACHECO-AGUILAR; RAMÍREZ-SUÁREZ; MAZORRA-MANZANO, 2008). Os hidrolisados proteicos resultantes podem ser utilizados pelas indústrias de alimentos como suplementos proteicos, na produção de surimi e salsichas, como estabilizadores de bebidas e realçadores de sabor (DOS SANTOS et al., 2011).

Proteases de fontes vegetais, animais e microbianas foram utilizadas em diversos estudos de hidrólise de proteínas de pescado, porém de um ponto de vista técnico e econômico, enzimas derivadas de fontes microbianas se mostraram mais promissoras na hidrólise desse tipo de matriz. A Alcalase é uma serino-protease considerada alcalina e obtida a partir do microorganismo *Bacillus licheniformis* por fermentação submersa. Apresenta uma ampla faixa de pH (pH 6 a 10), onde seu ótimo localiza-se entre pH 8 e 9. Essa enzima comercial é termoestável e apresenta seu ótimo entre 55 e 60 °C, mas pode ser aplicada a temperaturas de até 70 °C. Além disso, possui uma especificidade ampla e cliva vários tipos de ligações peptídicas, preferencialmente aquelas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico. (ADLER-NISSEN, 1993; GUERARD et al., 2001)

O pescado se apresenta como um alimento de qualidade, sendo geralmente pobre em gorduras saturadas, carboidratos e colesterol, e proporcionando proteínas de alto valor e uma ampla gama de micronutrientes essenciais, incluindo várias vitaminas, minerais e ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-3. A percentagem comestível do pescado varia entre 30% e 60% dependendo da espécie e o tipo de beneficiamento ao qual foi submetido, e sua composição varia de 60% a 85% de umidade, aproximadamente 20% de proteína bruta, 1% a 2% da fração cinza e 0,6% a 36% de lipídeos. O alto valor nutritivo das proteínas de pescado se deve a um perfil completo de aminoácidos, principalmente de aminoácidos essenciais. (BORGHESI et al., 2013)

Dentre os pescados comercializados em território nacional, a espécie *Percophis brasiliensis*, popularmente conhecida como Tira-Vira, tem uma expressiva captura no Brasil e na Argentina e é comercializada na forma de filés, tendo um baixo valor comercial. No estado do Rio de Janeiro sua produção também se destaca, tendo sido capturados mais de 2000 kg da espécie apenas no município de Macaé em 2016 (FIPERJ, 2017).

Alguns estudos com essa espécie são encontrados na literatura, como a estimativa de parâmetros de crescimento desse peixe em diferentes áreas de captura (PERROTTA; FERNÁNDEZ GIMÉNEZ, 1996); análise da atividade reprodutiva da espécie (MILITELLI; MACCHI, 2001); o uso de parasitas presentes no Tira-Vira como marcadores biológicos (BRAICOVICH; TIMI, 2008) e a avaliação do perfil químico da carne de Tira-Vira (DINIZ et al., 2013). No sentido de encontrar novas formas de aproveitamento dos resíduos de filetagem do peixe Tira-Vira, Guimarães et al. (2018a) estudou o desenvolvimento de salsicha a partir da carne mecanicamente separada (CMS) deste peixe. Nenhum estudo, no entanto, foi encontrado até o momento propondo o uso da carne de *P. brasiliensis* para a

produção de hidrolisados proteicos, tão pouco o aproveitamento de resíduos desta espécie para esta finalidade.

Dentro desse contexto, o objeto do presente estudo foi desenvolver um processo, via hidrólise enzimática, para obtenção de hidrolisado proteico a partir de resíduo do processamento da CMS de Tira-Vira (*Percophis brasiliensis*) com capacidade antioxidante e emulsificante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Resíduo de Pescado como Fonte Proteica

#### 2.1.1 Cenário de produção e comércio de pescado

O consumo de pescado vem apresentando aumento nos últimos anos. O aumento médio anual de consumo alimentício de pescado é de 3,2%, desde a década de 60 até os anos atuais, superando o crescimento da população mundial que é de 1,6% e ultrapassando o de consumo de carne proveniente de todos os animais terrestres combinados. Alguns fatores estimularam esse aumento no consumo, como o aumento da produção de pescado e a redução do desperdício (FAO, 2018).

No ano de 2016, a produção mundial de pescado por meio de captura e de aquicultura foi de 90,9 e 80 milhões de toneladas, respectivamente. A China se destaca como o maior produtor, com uma captura marinha de pouco mais de 15 milhões de toneladas (FAO, 2018).

O fornecimento brasileiro de pescado com destino alimentar teve uma média anual estimada de 1972000 toneladas, entre os anos de 2013 e 2015, sendo a média da produção brasileira de pescado estimada em 1327000 toneladas. Nesse período, as exportações brasileiras de pescado foram inferiores as importações, sendo 40 mil toneladas exportadas e 757 mil toneladas importadas. Até 2025, projeta-se um crescimento de 44,1% no fornecimento e de 48,6% de na produção de pescado (FAO, 2016). Apesar de sua importância econômica e de ser uma atividade tradicional no Brasil, a produção de pescado de origem marinha não é conhecida com precisão (FIPERJ, 2018).

O estado do Rio de Janeiro apresenta uma expressiva produção de pescado tanto pela pesca extensiva quanto pela aquicultura, sendo apontado como o terceiro maior produtor nacional de pescado marinho e estuarino. O monitoramento da pesca começou a ser realizado pela Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) em 21 municípios costeiros em julho de 2017 e de acordo com os dados parciais dos primeiros meses de acompanhamento, divulgados no Relatório Anual de 2017, a produção observada foi superior a 8000 toneladas (FIPERJ, 2018).

#### 2.1.2 Resíduo de processamento de pescado

O processamento de pescado gera grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos. Resíduos de pescado são partes do peixe que não são adequadas para o consumo, como ossos, vísceras e cabeças. A percentagem comestível do pescado varia entre 30% e 60% dependendo da espécie e do tipo de beneficiamento ao qual é submetido (BORGHESI et al., 2013; MO, 2018).

O principal aproveitamento desses resíduos de pescado é a produção de farinha e óleo de peixe, que são muito utilizados em alimentação animal. Peixes frescos e/ou resíduos de processamento de pescado são cozidos em digestor em alta temperatura, aproximadamente 110°C e posteriormente submetidos a uma prensagem que remove o licor, uma mistura de óleo de peixe, água e proteína solúvel. Esse licor é centrifugado obtendo-se o óleo de peixe que posteriormente é refinado. A torta obtida na prensagem passa por secagem e moagem, dando origem a farinha de peixe (SHEPHERD & JACKSON, 2013; VIDOTTI & GONÇALVES, 2006).

Outra forma de se aproveitar os resíduos provenientes de processamento de pescado é a silagem, que também pode ser empregada na alimentação animal. Esse processo é bastante simples e de baixo custo, sendo necessário apenas um triturador, agitador e um silo. O pH da massa de resíduo triturada é acidificado e por meio da ação das enzimas presentes no próprio tecido, o produto é liquefeito. A acidificação pode ser feita pela adição de ácidos minerais ou

orgânicos, ou pela adição de microorganismos produtores de ácido lático juntamente com uma fonte de carboidratos (VIDOTTI & GONÇALVES, 2006).

A carne mecanicamente separada (CMS) de pescado é um coproduto gerado a partir do resíduo de pescado, podendo ser constituído de uma espécie ou uma mistura de espécies. Sua obtenção é através de separação mecânica com o auxílio de máquinas separadoras de carne e ossos. O Regulamento técnico estabelece parâmetros para a fixação de identidade e qualidade de CMS, sendo características necessárias um mínimo de 12% de proteína e um máximo de 30% de gordura. Uma boa alternativa para aumentar o aproveitamento de carcaças e reduzir as perdas no processo produtivo, a CMS é utilizada em diversos produtos como hambúrgueres, salsichas, linguças, empanados, almôndegas, patés, enlatados e outros (GUIMARÃES et al., 2017).

Estudos vêm sendo feitos no sentido de desenvolver alternativas para a utilização desses resíduos como matéria-prima de produtos de maior valor agregado, como alimentos (GUIMARÃES et al., 2018a), biocombustíveis (COSTA et al., 2013; JAYASINGHE & HAWBOLDT, 2013; SANTOS et al., 2015), cosméticos (MORIMURA et al. 2002), soluções enzimáticas (SARANYA et al., 2018), produtos farmacêuticos (HSU; LI-CHAN; JAO, 2011; HALIM, 2018), entre outros.

### 2.1.3 Tira-vira

O peixe tira-vira, como é conhecido popularmente no Brasil a espécie *Percophis brasiliensis*, é encontrado em águas costeiras do sudoeste do Atlântico. Pertencente à família Percophidae, o tira-vira também é conhecido como Brazilian flathead, Pez Palo e Ajourreal e sua distribuição se estende de 23 ° S (Rio de Janeiro, Brasil) para 47 ° S (norte da província de Santa Cruz, Argentina). Com um corpo alongado e fusiforme, a musculatura dessa espécie é clara, como é possível ver na Figura 1 (BARRETTO et al., 2011; SÁNCHEZ PASCUA et al., 2010).



**Figura 1** - O peixe Tira-Vira (*Percophis brasiliensis*) (a) inteiro e (b) descabeçado e filetado (Fonte: Autoria própria).

O principal destino comercial interno do Tira-vira é a venda do peixe fresco, sendo também exportado na forma de files congelados. A captura do *P. brasiliensis* ocorre, frequentemente, como espécie não-alvo na modalidade de pesca de arrasto duplo que tem como espécie alvo o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis* e *F. brasiliensis*), sendo incluído na categoria mistura, que é de baixo valor comercial e que são devolvidos ao mar quando capturados muito jovens e de tamanho reduzido. A crescente captura da espécie pode ser vista no histórico de produção mundial de 1997 a 2015 contido no Quadro 1 (QUIRINO-DUARTE et. al., 2009; SÁNCHEZ PASCUA et al., 2010).

**Quadro 1** - Histórico de produção mundial do Tira-Vira. Fonte: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ano	Produção de Tira-Vira (t)			
	Brasil	Argentina	Uruguai	Total
1997	412	11475	-	11887
1998	514	9670	-	10184
1999	709	7897	1	8607
2000	607	7255	-	7862
2001	633	8324	0	8957
2002	747	5433	0	6180
2003	714	6268	0	6982
2004	696	6101	0	6797
2005	738	7741	0	8479
2006	593	8546	0	9139
2007	941	7636	0	8577
2008	741	8076	-	8817
2009	818	8068	-	8886
2010	772	7784	-	8556
2011	719	7961	-	8680
2012	782	8185	-	8967
2013	675	6276	-	6951
2014	815	7882	-	8697
2015	735	8889	-	9624
2016	735	7188	-	7923

Alguns trabalhos com o tira-vira já foram feitos, no sentido de entender seu desenvolvimento e reprodução, a influência das diferentes áreas onde é encontrado, perfil químico de sua carne e desenvolvimento de formulações de alimentos com seus resíduos, como surimis e salsichas (PERROTTA; FERNÁNDEZ GIMÉNEZ, 1996; MILITELLI; MACCHI, 2001; BRAICOVICH; TIMI, 2008; DINIZ et. al., 2013; GUIMARÃES et al., 2018a). Na literatura pesquisada, no entanto, não foi encontrado até o momento nenhum estudo propondo o uso da carne ou dos resíduos dessa espécie para a produção de hidrolisados proteicos.

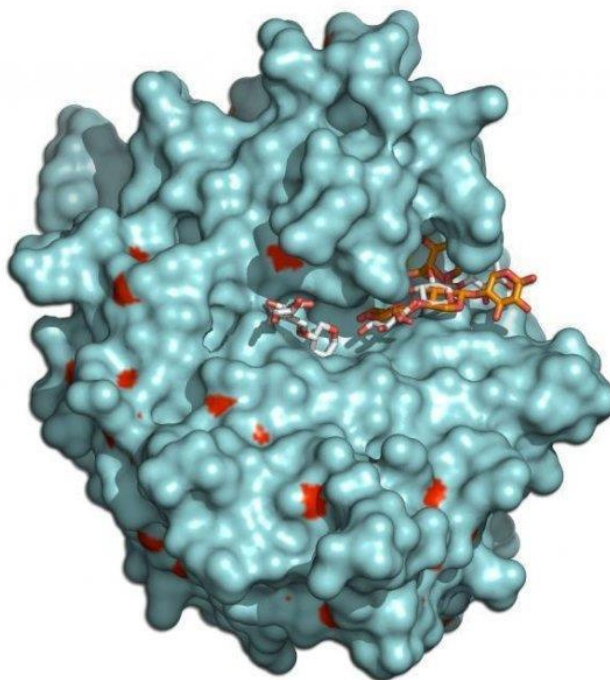
## 2.2 Enzimas

Enzimas são substâncias biológicas que iniciam ou aceleram a velocidade de reações bioquímicas em organismos vivos e não são consumidas durante o processo. Geralmente estruturas proteicas, enzimas também podem ser anticorpos ou moléculas de RNA. Devido a



sua estrutura, as enzimas apresentam uma alta especificidade para reações ou substratos, como pode ser visto na Figura 2, podendo ser uma especificidade (KUDDUS, 2019; NAJAFPOUR, 2015):

- absoluta, onde apenas uma reação é catalisada;
- de grupo, agindo apenas em moléculas que têm grupos funcionais específicos;
- de ligação, agindo em um tipo particular de ligação química;
- estéreo química, agindo em um isômero estérico ou ótico particular.



**Figura 2** - Enzima com o substrato em seu sítio ativo (Fonte: UNIVERSIDAD DE BARCELONA, 2018).

Algumas enzimas necessitam de substâncias ou pequenas moléculas para atingir a sua capacidade catalítica, que são conhecidas como cofatores, que podem ser de dois tipos, coenzimas ou grupos prostéticos. Coenzimas são moléculas orgânicas que se ligam a enzimas através de ligações mais fracas, auxiliando no seu funcionamento e deixando o sítio ativo da enzima ao fim do ciclo catalítico. Grupos prostéticos são considerados porções não aminoacídicas que ligam as enzimas de maneira mais forte, ajudando também em seu desempenho e continuando ligada a enzima ao fim da reação catalítica. A enzima inativada recebe o nome de apoenzima e o conjunto ativo de apoenzima e cofator é nomeado como holoenzima (FISCHER, 2010).

### **2.2.1 Nomenclatura e classificação de enzimas**

Enzimas são comumente nomeadas pela adição do sufixo -ase ao nome dos substratos, como urease, amilase e tirosinase, que catalisam reações envolvendo uréia, amido e tirosina, respectivamente. Sua nomenclatura também pode se referir ao tipo de reação que a enzima catalisa, como desidrogenases e descarboxilases que catalisam a remoção de hidrogênio e radical carboxila de diferentes substratos, respectivamente. Algumas enzimas também recebem nomes arbitrários, como a pepsina e quimotripsina (BLANCO, 2017).

Antes da criação de uma maneira sistemática para a nomeação das enzimas, a mesma enzima poderia receber dois nomes diferentes dependendo do contexto em que foi estudada

ou diferentes enzimas poderiam receber o mesmo nome, o que dificultava a interpretação de resultados publicados. Para fins de melhor identificação, em 1956, a IUB (International Union of Biochemistry, sendo hoje International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) nomeou a Comissão de Enzimas (Enzyme Commission, EC), com a finalidade de criar uma metodologia racional para classificação e nomenclatura de enzimas. Criou-se então o número EC (Enzyme Commission number), que consiste em um código composto por 4 números que identifica as enzimas. A classificação proposta pela EC estabeleceu três níveis hierárquicos: classes, subclasses e sub-subclasses. Cada um desses níveis foi estabelecido atendendo características específicas da reação a ser catalisada, como a natureza do substrato e os grupos químicos envolvidos na reação. O primeiro, segundo e terceiro conjuntos de dígitos referem-se à classe, subclasse e sub-subclasse, respectivamente. O quarto dígito identifica enzimas individuais dentro de uma dada sub-subclasse (TALENS-PERALES et al., 2016).

Foram estabelecidos 6 grandes grupos ou classes, sendo em 2018 adicionada uma nova classe, de acordo com as reações que as mesma catalisam (KUDDUS, 2019; TIPTON, 2018):

- Oxidorredutase (EC 1) – Catalisam reações redox nas quais átomos de hidrogênio ou oxigênio ou elétrons são transferidos entre moléculas. Estão incluídas nessa classe as desidrogenases, que estão envolvidas na transferência de hidreto, as oxidases que são responsáveis pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular, as oxigenases que estão envolvidas na transferência de oxigênio do oxigênio molecular e peroxidases que facilitam a transferência de elétrons para o peróxido.
- Transferase (EC 2) – Catalisam a transferência de grupos funcionais, como grupos alquila e glicosil, entre dois compostos, sendo um doador e a outro receptor. Não entram nessa classe as enzimas classificadas como oxidorredutases e hidrolases.
- Hidrolases (EC 3) – Catalisam reações de clivagem de ligações C-O, C-N, C-C e algumas outras em que ocorre a participação de água.
- Liases (EC 4) – Catalisam reações de clivagem de ligações C-O, C-N, C-C e algumas outras por eliminação, resultando em ligações duplas ou anéis. Pertencem a esta classe as descarboxilases, aldolases, desidratases e algumas pectinases, mas não incluem hidrolases.
- Isomerasas (EC 5) – Catalisam mudanças geométricas ou estruturais dentro de uma molécula. De acordo com o tipo de isomerismo, elas podem ser chamadas de racemases, epimerases, cis-trans-isomerasas, isomerasas, tautomerases, mutases ou cicloisomerasas.
- Ligases (EC 6) – Catalisam a junção de duas moléculas envolvendo a hidrólise de uma ligação difosfato em ATP ou um trifosfato similar.
- Translocase (EC 7) – Catalisam o movimento dos íons ou moléculas através de membranas ou sua separação dentro de membranas, a reação é designada como uma transferência de “um lado” para “outro lado”, e sua adição a classificação de enzimas em 2018 se deu porque as designações “dentro” e “fora” (ou “cis” e “trans”), usadas anteriormente, podem ser ambíguas.

### 2.2.2 Hidrolases

Essas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica de ligações como C-O, C-N, C-C e algumas outras ligações, incluindo ligações de anidrido fosfórico. As especificidades sobrepostas de muitas dessas enzimas dificultam a formulação de regras gerais aplicáveis a todos os membros dessa classe. O nome sistemático geralmente toma a forma “substrato X-hidrolase”, onde X é o grupo removido durante a hidrólise. O nome recomendado é, em

muitos casos, formado pelo nome do substrato com o sufixo -ase. Entende-se que o nome do substrato com este sufixo significa uma enzima hidrolítica. Alguns exemplos de hidrolases são lipases, celulasas, amilases e proteases (BOYCE & TIPTON, 2001).

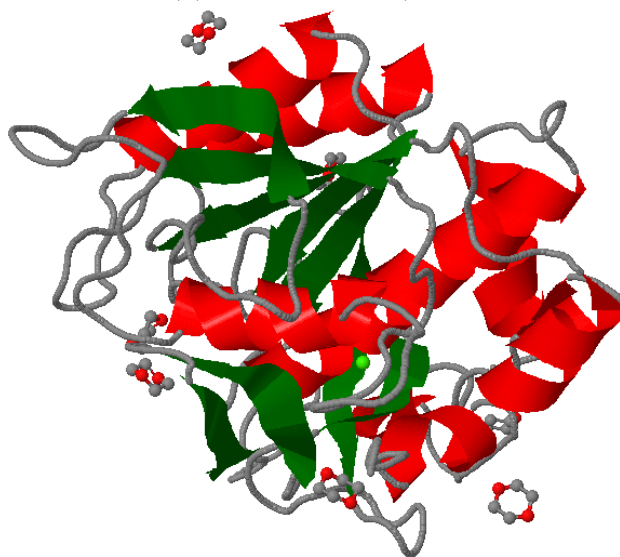
Hidrolases poderiam ser classificadas como transferases, visto que a reação de hidrólise pode ser considerada como uma transferência de um grupo específico para a água como o aceptor. No entanto, na maioria dos casos, a reação com a água como o aceptor foi descoberta antes e é considerada como a principal função fisiológica da enzima. Isso justifica o fato dessas enzimas serem classificadas como hidrolases e não como transferases (BOYCE & TIPTON, 2001).

### 2.2.3 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas presentes em proteínas, polipeptídeos e peptídeos, resultando em seus aminoácidos constituintes ou em outros polipeptídeos e peptídeos menores. Na classificação EC, estas enzimas pertencem a classe 3 das hidrolases e a subclasse 4, mas também pode ser classificadas de acordo com a fonte de obtenção (animal, vegetal ou microbiana), ação catalítica (exopeptidases ou endopeptidases), sítio ativo, carga, tamanho molecular ou especificidade para substrato (DOS SANTOS AGUILAR & SATO, 2018).

Os microorganismos representam uma excelente fonte de proteases, sendo também a principal fonte de produção comercial devido a aspectos como baixo custo de produção, boa estabilidade e especificidade, altas taxas de crescimento levando a curtos períodos de fermentação, sua capacidade de secretar proteínas no ambiente extracelular, e são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA). Muitas bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são importantes produtores de enzimas para indústria e pesquisa, tais como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (DOS SANTOS AGUILAR & SATO, 2018).

Uma importante enzima comercial produzida pelo microorganismo *Bacillus licheniformis* via fermentação submersa é a Alcalase, uma enzima alcalina desenvolvida pela Novozymes para a indústria de detergentes. Esta enzima consiste em uma solução de protease, onde a enzima dominante é uma subtilisina (EC 3.4.21.62), representada na Figura 3 (KRISTINSSON & RASCO, 2000 (b); LI et al., 2016).



**Figura 3** – Uma das estruturas da subtilisina (EC 3.4.21.62) (Fonte: BRENDA, 2018).

Por ter uma ampla especificidade da ação hidrolítica, as proteases têm diversas aplicações industriais, como na indústria alimentícia para fabricação de queijos e amaciamento de carne, em indústria de detergentes para a remoção de manchas de origem proteica, na indústria de couro em várias etapas para a remoção de proteínas indesejáveis, na indústria farmacêutica para o tratamento de doenças e desordens, entre outras (GURUMALLESH et al., 2019).

### **2.3 Produção de Hidrolisados Proteicos**

As proteínas são biopolímeros constituídos por aminoácidos, e esses estão unidos por ligações peptídicas que se dão entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de um aminoácido posterior. As outras partes dos aminoácidos constituem os grupamentos laterais que contribuem para as propriedades estruturais e funcionais das proteínas (ALUKO, 2015).

Para a melhora dessas propriedades estruturais, funcionais, sensoriais, biológicas e nutricionais de proteínas, uma alternativa é a hidrólise proteica. Hidrolisados proteicos podem ser definidos como unidades peptídicas resultantes da clivagem de proteínas, mediante a um processo proteolítico químico (ácido ou básico) ou enzimático. Na hidrólise química, utilizam-se ácidos inorgânicos ou orgânicos e bases fortes para facilitar a reação. Já na hidrólise enzimática, os catalisadores da reação são as enzimas, que podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. O tratamento químico pode ser perigoso para o meio ambiente e pode destruir alguns aminoácidos. Os métodos enzimáticos se mostram mais vantajosos porque ocorrem em condições controladas, garantindo a manutenção da qualidade nutricional dos hidrolisados e um perfil peptídico definido, e a geração de compostos tóxicos é minimizada. Outra vantagem é a reprodutibilidade nas estruturas peptídicas geradas devido a especificidade das reações enzimáticas (GALVÃO; OETTERER, 2014; ÖZOGUL et al. 2019).

A hidrólise enzimática com enzimas isoladas é um método eficiente para melhorar propriedades biológicas de proteínas como atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antitrombótico, anticâncer e anti-inflamatórios. Sua utilização também pode melhorar propriedades funcionais tecnológicas de proteínas como solubilidade, retenção de água, retenção de óleo e capacidade emulsificante (WASSWA et al., 2007; SPERANZA et al., 2019). O potencial desses hidrolisados proteicos vem estimulando estudos para sua aplicação de diversas formas (HSU; LI-CHAN; JAO, 2011; GARCÍA-MORENO et al., 2016; MORALES-MEDINA et al., 2016; XU et al., 2017). Esse bioprocessos sofre influência de diversos fatores, e entre eles podemos destacar a temperatura, pH, razão entre a concentração de enzima e de substrato e tempo (ZAMORA-SILLERO, 2018).

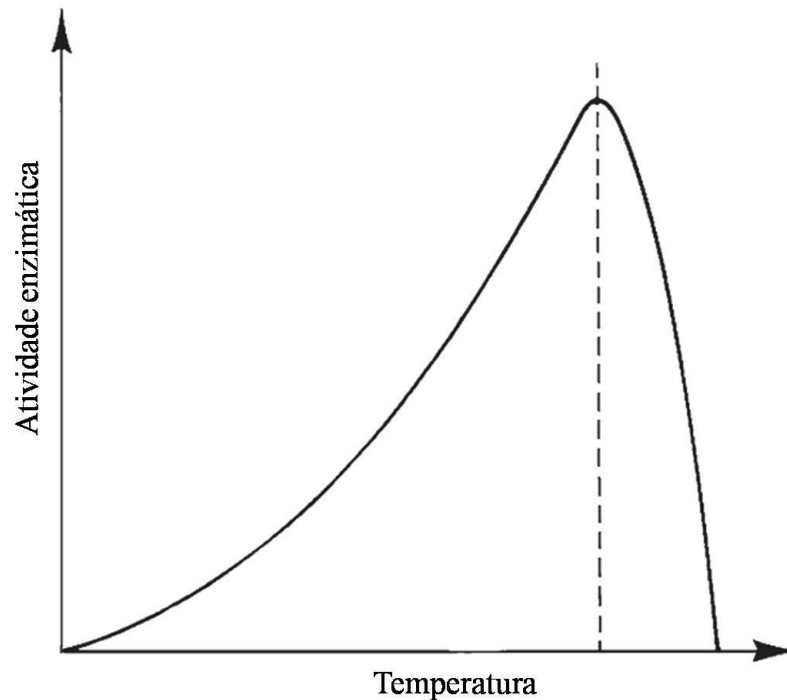
#### **2.3.1 Fatores que influenciam reações enzimáticas**

Esse tipo de reação sofre influência de diversos fatores, que podem modificar sua produtividade, bem como as características dos hidrolisados resultantes.

- Temperatura - Reações enzimáticas são afetadas pela temperatura de duas formas, alterando a taxa de reação e a atividade enzimática. Quando se inicia a reação a uma baixa temperatura, nota-se que se ocorrer um aumento da temperatura, conseqüentemente ocorrerá um aumento da taxa de reação. Isso acontece porque o aumento da temperatura reduz a energia de ativação necessária para reação ocorrer por causa de uma elevação no nível de energia inicial do sistema. Esse aumento é observado até uma determinada temperatura, chamado ponto ótimo e pode ser visto na Figura 4, e após esse ponto ocorre um rápido decréscimo na atividade enzimática.

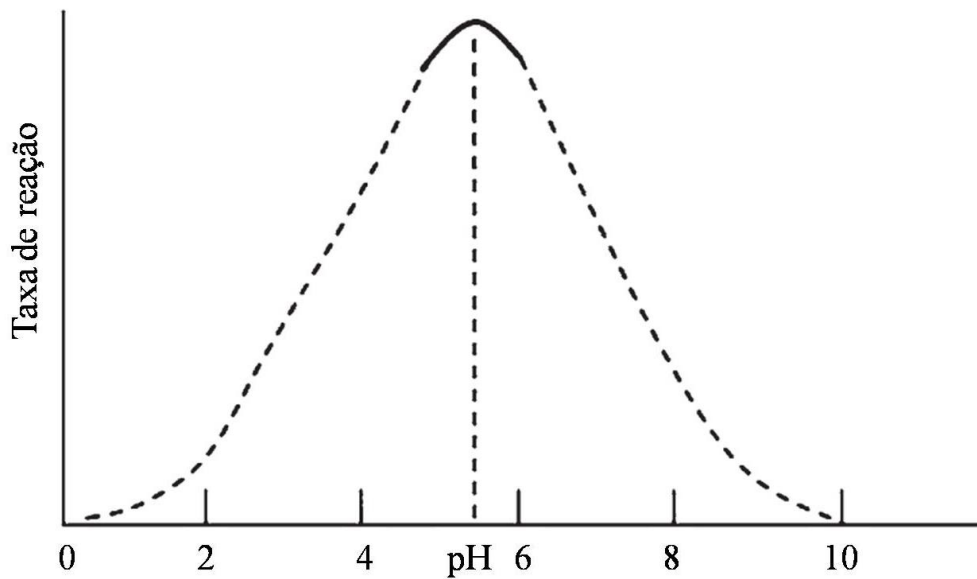
Essa queda se deve ao fato da estrutura protéica ser muito sensível a mudanças de temperatura e o substrato pode não se encaixar corretamente na superfície alterada da enzima (BETTELHEIM et al., 2010; GRAHAME et al., 2015).

Temperaturas levemente maiores ao ponto ótimo levam a alterações reversíveis na conformação da enzima e inativação ocasionada pode ser revertida por uma diminuição da temperatura. Em temperaturas muito superiores, a proteína sofre desnaturação e a cadeia polipeptídica não pode ser rearranjada para sua conformação nativa (BETTELHEIM et al., 2010).



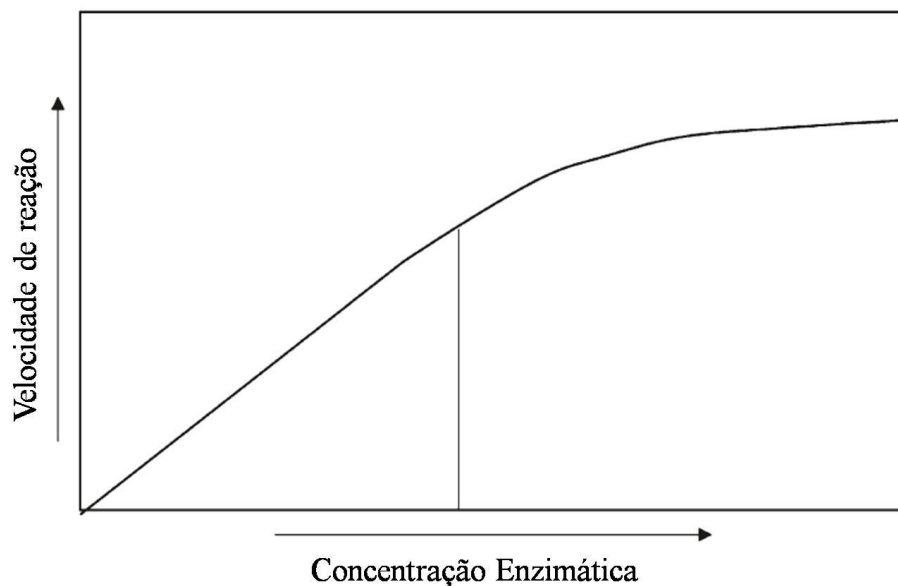
**Figura 4** - Efeito da temperatura na atividade enzimática, onde o ponto A representa o ponto ótimo (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018).

- pH – Assim como na temperatura, as enzimas também tem uma faixa de pH ótimo para seu desempenho, como pode ser visto na Figura 5. O pH influencia reações enzimáticas devido a mudança de carga em grupos ionizáveis presente na enzima ou no substrato, que pode afetar a ligação do substrato ou diretamente a transformação em produto ou ainda a estabilidade enzimática. Mudanças no pH do meio alteram a carga iônica de grupos ácidos e básicos dos aminoácidos que ajudam a manter a estrutura específica da molécula enzimática, particularmente em seu sítio catalítico. Se exposta a extremos de pH, a enzima pode sofrer uma desnaturação e as alterações sofridas pela estrutura da enzima se tornam irreversíveis. A influência do pH nas enzimas também depende da presença ou ausência de íons específicos ou ligantes, temperatura, constante dielétrica, e força iônica (PARKIN, 1993; TRIPATHI, 2010).



**Figura 5** - Efeito do pH na atividade enzimática (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018).

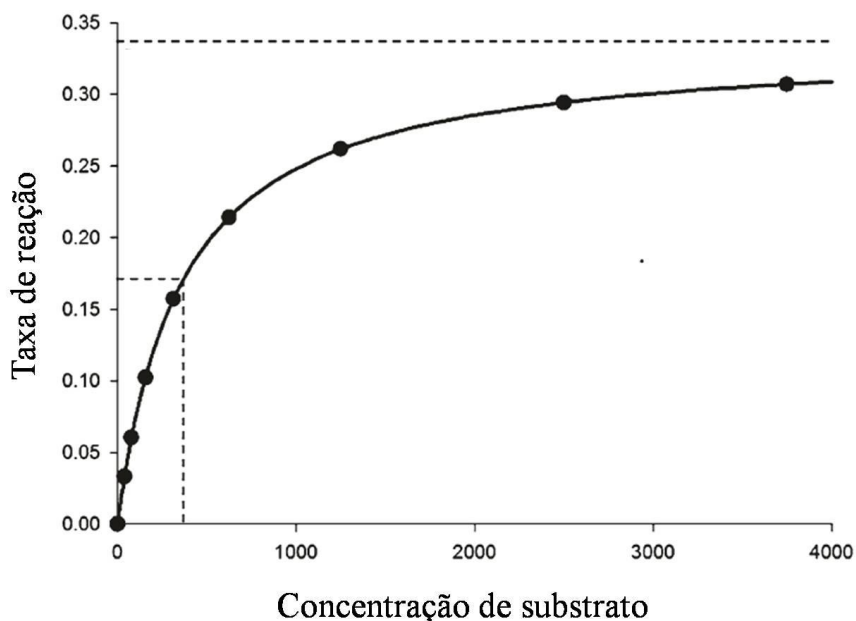
- **Concentração enzimática** – Até determinado ponto, nota-se um crescimento proporcional da taxa de reação com o aumento da concentração enzimática (Figura 6). Isso ocorre porque a concentração de enzima é quase sempre muito menor que a concentração de substrato, o que significa muito mais moléculas de substrato disponíveis do que moléculas de enzima. Porém, a partir de uma concentração de enzima mais elevada, a taxa de reação não é mais afetada com o aumento de enzima no meio e fica estagnada, comportamento esse que pode ser explicado pelo fato da concentração de substrato passar a ser o fator limitante da reação (BETTELHEIM et al., 2010; LEE & DEMAN, 2018).



**Figura 6** - Efeito da concentração enzimática na velocidade da reação enzimática (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018).

- **Concentração de substrato** – Considerando uma determinada quantidade de enzima constante, a velocidade de reação inicial aumenta com o aumento da concentração

inicial de substrato. Sendo a concentração de substrato inicial muito inferior a de enzima, a velocidade inicial cresce de maneira aproximadamente linear porque nem todas as moléculas de enzima disponíveis estão combinadas com moléculas de substrato. Em concentrações de substrato muito elevadas, ocorre um efeito de saturação onde a velocidade de reação cresce muito pouco porque os sítios ativos das enzimas disponíveis já estão todos ocupados, alcançando uma faixa plana de velocidade de reação que é chamada de velocidade máxima, como pode ser visto na Figura 7 (LEE & DEMAN, 2018).



**Figura 7** - Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática (Fonte: Adaptado de LEE & DEMAN, 2018).

### 2.3.2 Grau de hidrólise

A extensão da hidrólise enzimática de proteínas é geralmente quantificada como o grau de hidrólise (GH), que expressa a razão entre as ligações peptídicas clivadas ( $h$ ) e o total de ligações peptídicas ( $h_{total}$ ) existentes na cadeia proteica, representado na Equação 1. O GH é classicamente determinado por métodos baseados em dois princípios diferentes. Um deles é baseado na liberação de aminoácidos livres ao longo da hidrólise. E o outro consiste em uma titulação dos prótons liberados durante a hidrólise das ligações peptídicas, sendo baseado nesse princípio o método pH-stat. Esta técnica é mais simples e permite um acompanhamento do grau de hidrólise em tempo real, porém é limitada a um pH por volta de 7 ou superior e a adição de uma base durante o processo pode ser indesejável dependendo do uso do produto final (BEAUBIER et al., 2019).

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{total}} \times 100 \quad (1)$$

Durante a hidrólise, tanto resíduos carboxi-terminais quanto amino-terminais são liberados, e assim o balanço entre ácidos carboxílicos e bases de amins terciárias fica dependente do pH do meio reacional. Pode-se, então, controlar a reação através de um agente neutralizante para manter o pH constante ao longo da reação. Uma correlação entre o consumo do agente neutralizante e o número de ligações peptídicas clivadas pode ser

estabelecida, tornando possível o monitoramento do grau de hidrólise através desse método conhecido como pH-stat (GUADIX et al.; 2008).

Utilizando o método pH-stat, diversos trabalhos monitoraram e avaliaram a reação de hidrólise enzimática de várias matrizes proteicas, incluindo de pescado, com os mais diversos objetivos. No estudo das propriedades antioxidantes e bioquímicas de hidrolisados proteicos de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), Dong et al. (2008) utilizou a enzima Alcalase em concentração de 0,5% e com condições reacionais de pH 8 e temperatura de 60°C resultando em um grau de hidrólise de aproximadamente 23% após 6 horas de reação. Utilizou também a enzima Flavourzyme em nível de 0,5% e com pH 7 e 50°C resultando em um grau de hidrólise de aproximadamente 9% após 6 horas de reação. Vázquez et al. (2017), estudando propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas de hidrolisados proteicos de descartes do peixe da espécie *Scyliorhinus canícula*, obteve diferentes graus de hidrólise para diferentes condições reacionais de pH e temperatura com 1% de Alcalase por 6 horas, sendo o menor GH (5,61%) a um pH 6,0 e 55 °C e o maior GH (29,26%) a um pH 11,1 e 72,7 °C.

### 2.3.3 Atividade antioxidante

Biomoléculas são sensíveis à oxidação, o que pode gerar diversos problemas. Um dos maiores desafios da indústria alimentícia atual está na oxidação de lipídios durante processamento e estocagem de alimentos, acarretando na produção de compostos tóxicos, além do surgimento de sabores e odores indesejados. Existem estudos que apontam a oxidação de biomoléculas também como uma das causas de várias doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (HSIEH; FERNÁNDEZ-TOMÉ; HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2017; NASRI, 2017).

A oxidação é causada por espécies reativas, que são espécies com um ou mais elétrons desemparelhados no orbital externo e com capacidade de existência independente, conhecidas também como radicais livres. Para se tornarem estáveis, essas espécies recebem ou doam elétrons desemparelhados para outras moléculas, que por sua vez se tornam instáveis. Existem espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, ferro, cobre e enxofre. As espécies reativas de oxigênio englobam moléculas oxigenadas de radicais livres e não livres como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), oxigênio singlete (1/2 O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (·OH) (PISOSCHI; POP, 2015).

Existem compostos que são capazes de interromper, suspender ou retardar a reação prejudicial entre um substrato oxidativo e uma espécie reativa, chamados antioxidantes. Um antioxidante adequado deve gerar, como resultado de uma reação em cadeia, um radical correspondente menos reativo que o radical livre responsável pelo início do estresse oxidativo, caso contrário a reação radicalar não é extinta (LITESCU et al., 2014).

Vários métodos para a medição da capacidade antioxidante são conhecidos, e baseados nos mecanismos de reação química, são divididos basicamente em dois grupos: métodos de titulação redox baseados em reação de transferência de elétrons (electron transfer - ET) e métodos baseados em reação de transferência de átomos de hidrogênio (hydrogen atom transfer - HAT) (HUANG; WONG, 2013).

A maioria dos ensaios baseados no método HAT, determina a atividade antioxidante através de um ensaio cinético de degradação da sonda por um radical. Devido a sua relevância biológica e uma meia-vida longa, o radical peroxila (ROO·) é usualmente empregado nos ensaios. No método de transferência de elétrons, o antioxidante doa um elétron para as espécies reativas (reação redox), e muda a sua coloração de acordo com a concentração de antioxidante. As espécies reativas usadas no método ET não apresentam relevância biológica e as sondas utilizadas são sintéticas. Esses métodos são dependentes de pH e de solvente e sua velocidade de reação é menor que a do ensaio baseado em HAT. A importância do pH é



justificada devido ao fato de em condições ácidas o antioxidante é protonado, diminuindo sua capacidade de redução, e em condições básicas, o antioxidante se dissociaria, o que aumentaria sua capacidade de redução (OLIVEIRA; NEVES; BALLUS, 2019).

Os métodos mais utilizados para a medição da atividade antioxidante são o FRAP (poder de redução do ferro), ABTS (captura do radical orgânico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio, que se baseia na captura do radical peroxila induzido pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato) e DPPH (captura do radical orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Todos esses métodos podem ser medidos por espectrofotometria (OLIVEIRA; NEVES; BALLUS, 2019).

Diante dos problemas causados pela oxidação de biomoléculas, muitas pesquisas têm sido feitas na busca de agentes antioxidantes provenientes de fontes naturais que possam oferecer menos riscos que os sintéticos. Estudos feitos nos últimos anos, utilizando diversas técnicas, indicam uma boa atividade antioxidante obtida em hidrolisados proteicos de várias espécies de peixes. Klompong et al. (2007) em seu estudo com hidrolisado proteico utilizando como matriz a espécie *Selaroides leptolepis* obtiveram, em um grau de hidrólise de 5%, a atividade antioxidante de 98% e 80%, para hidrolisados produzidos com as enzimas comerciais Alcalase e Flavourzyme, respectivamente. A espécie *Oreochromis niloticus* foi utilizada no trabalho de Foh et al. (2010) para a produção de hidrolisados proteicos com grau de hidrólise de 23%, 3% e 5% e com atividade antioxidante de 86,67%, 70,20% e 82%, utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Neutrase, respectivamente. O trabalho feito com a espécie *Catla catla* para produzir hidrolisados com diferentes enzimas resultou em grau de hidrólise de 6,7%, 7,8%, 12,61% e 10,62% e atividade antioxidante de 64,65%, 70,45%, 67,9% e 77,92%, sendo as enzimas usadas a Alcalase, Flavourzyme, Protamex e Bromelina, respectivamente (ELAVARASAN; NAVEEN KUMAR; SHAMASUNDAR, 2014).

### 2.3.4 Propriedades emulsificantes

Além de propriedades nutricionais e biológicas importantes, os hidrolisados proteicos também possuem propriedades funcionais tecnológicas de alto interesse para indústria, que são definidas como propriedades físico-químicas gerais de proteínas em sistemas alimentares durante o processamento, armazenamento e consumo. Algumas propriedades funcionais das proteínas que podem ser citadas são solubilidade, formação de espuma, capacidade emulsificante e retenção de água (ANANEY-OBIRI; MATTHEWS; TAHERGORABI, 2019).

Uma emulsão pode ser definida como um sistema heterogêneo, composto por duas ou mais fases líquidas imiscíveis, dispersas uma na outra na forma de gotículas. Devido a sua natureza anfifílica (existência de resíduos de aminoácidos polares e não polares), proteínas agem como emulsificadores, onde suas terminações hidrofóbicas se orientam para a fase apolar oleosa e seus segmentos polares hidrofílicos se estendem para a fase aquosa, diminuindo a tensão superficial entre as duas fases e formando uma membrana protetora que impede que as gotículas se unam (KRISTINSSON; RASCO, 2000 (b); ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018).

As propriedades emulsificantes das proteínas são geralmente expressas como atividade emulsificante, capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão. A atividade emulsificante refere-se à área interfacial máxima por unidade de peso de proteína de uma solução estabilizada. A capacidade emulsificante indica a quantidade máxima de óleo que pode ser emulsionado sob condições especificadas por um peso unitário da proteína. A estabilidade da emulsão descreve a capacidade de uma proteína para formar uma emulsão que permanece inalterada durante um determinado período de tempo a uma dada temperatura e campo gravitacional (PANYAM; KILARA, 1996)

Uma forma de melhorar as propriedades emulsificantes dos hidrolisados proteicos é pelo controle cuidadoso da extensão da hidrólise, visto que uma hidrólise extensiva resulta em uma queda drástica dessas propriedades. Pequenos peptídeos se difundem rapidamente e adsorvem na interface, porém eles mostram uma menor eficiência em reduzir a tensão interfacial, pois não conseguem se desenovelar e reorientar na interface como proteínas de maiores pesos moleculares podem. Estudos encontraram uma relação entre o comprimento do peptídeo e atividade superficial, e para terem boas propriedades emulsificantes e interfaciais, peptídeos devem ter um comprimento mínimo de 20 resíduos (KRISTINSSON; RASCO, 2000b).

As propriedades emulsificantes de hidrolisados proteicos produzidos a partir de diversas matrizes vem sendo estudada devido a sua aplicação que auxilia na melhora estrutural de alimentos processados e estabilização de outros componentes. Diversos estudos com matrizes de pescado já foram realizados. Klompong et al. (2007), em seu trabalho utilizando como matriz proteica a espécie *Selaroides leptolepis* e a enzima Alcalase, obteve capacidades emulsificantes em pH 6 de cerca de 40 m<sup>2</sup>/g e 25 m<sup>2</sup>/g, em graus de hidrólise de 5% e 25% respectivamente. O hidrolisado obtido com a espécie *Merluccius productus* e a enzima Alcalase, apresentou uma capacidade emulsificante em pH 7 de aproximadamente 130 m<sup>2</sup>/g e 90 m<sup>2</sup>/g, em um grau de hidrólise de 10% e 20%, respectivamente (PACHECO-AGUILAR; MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUÁREZ, 2008).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Processamento do Resíduo de Tira-Vira

Neste trabalho, utilizou-se a espécie *Percophis brasiliensis*, mais conhecida no Brasil pelo nome Tira-Vira. Obtido junto a FIPERJ em Niterói (RJ, Brasil), o peixe foi descabeçado e eviscerado. O restante do corpo do peixe foi submetido à filetagem. O subproduto proveniente da filetagem foi processado para a separação da carne mecanicamente separada (CMS) de Tira-Vira em uma despoldadeira de pescado (Mec Pescado®, Brasil), como pode ser visto na Figura 8. O resíduo resultante foi novamente processado na despoldadeira para retirada de uma pasta mais rústica que a CMS, pasta essa que foi a matriz proteica para a hidrólise enzimática investigada neste trabalho.



**Figura 8** - Processamento de subproduto de pescado em despoldadeira (Fonte: MAY, 2015).

#### 3.2 Composição Centesimal da Pasta

Para as análises de composição centesimal (umidade, cinzas, proteína, extrato etéreo) foi utilizada a metodologia descrita pela AOAC (2010). A umidade foi determinada conforme

método gravimétrico (estufa à 70°C e pressão à 70mm de Hg). A proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl, empregando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio em proteína. Para a obtenção do extrato etéreo, foi utilizado o método de Soxhlet (gravimétrico). O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado submetendo-se as amostras a 550°C.

### **3.3 Perfil de Aminoácidos**

As análises dos aminoácidos presentes nas amostras foram realizadas no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos e feitas de acordo com os métodos AOAC 994.12/2000 e Liu et al. (1995), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Três hidrólises distintas foram necessárias: hidrólise ácida (HCl 6M) para a determinação de aminoácidos resistentes, hidrólise básica (NaOH 4,2M) para a quantificação do triptofano, e a prévia oxidação (ácido perfórmico) e posterior hidrólise ácida para a quantificação dos aminoácidos sulfurados. As hidrólises foram conduzidas em ampolas de vidro seladas sob vácuo e mantidas à 110 °C por 20h. A separação do triptofano foi feita em coluna C<sub>18</sub> com detecção fluorimétrica. Os aminoácidos sulfurados e os resistentes à hidrólise ácida foram derivatizados com 6-aminoquinolil-succimidil-carbamato (AQC), separados em fase reversa e detectados por fluorescência.

### **3.4 Hidrólise Enzimática das Proteínas de Tira-Vira**

A obtenção dos hidrolisados proteicos de tira-vira foi realizada de acordo com o descrito por Fonseca et al. (2016), com algumas modificações, conforme descrito a seguir.

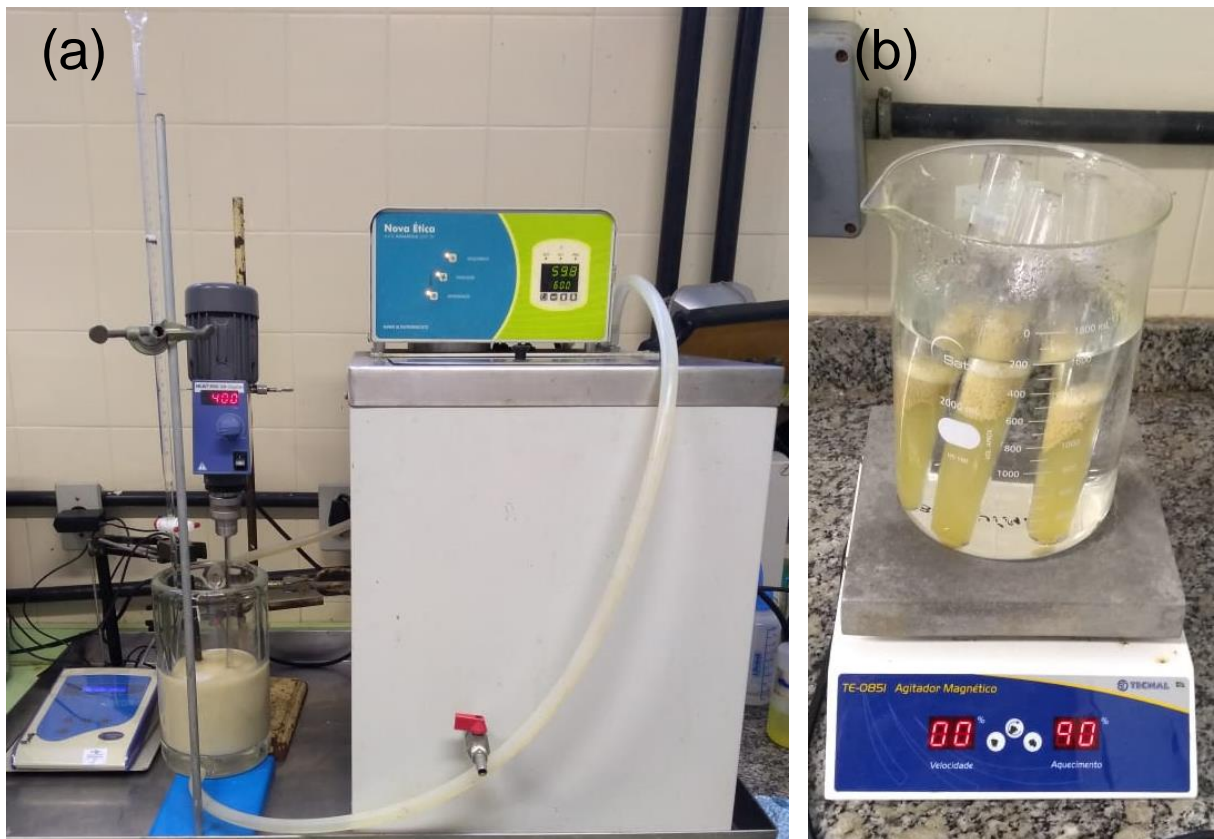
Para um estudo preliminar sobre a influência da potência do homogeneizador utilizada no preparo da suspensão de resíduo de Tira-Vira na qualidade dos hidrolisados, foram realizados dois experimentos onde duas suspensões diferentes foram preparadas, cada uma a partir de 100 g de pasta e 400 mL de água destilada por 10 minutos, sendo uma homogeneizada em liquidificador a média potência (TV-1) e a outra a baixa potência (TV-2). As condições de hidrólise dos dois experimentos foram pH 8, 50 °C e razão E:S 12,5%. O restante do preparo da hidrólise e a amostragem foram feitas assim como descrito abaixo, para os experimentos do planejamento de otimização.

Na condução dos experimentos para a otimização da hidrólise, uma massa de 100 g pasta foi processada em homogeneizador (Nutri Ninja Auto-IQ PRO®, mostrado na Figura 9) com 400 mL de água destilada por 10 minutos para a obtenção da suspensão a ser hidrolisada. O branco foi uma amostra coletada após o preparo da suspensão e antes do ajuste da mesma para as condições de hidrólise.



**Figura 9** - Processamento da pasta para a obtenção da suspensão a ser hidrolisada (Fonte: Autoria própria).

Para a hidrólise, 450 mL de suspensão e uma alíquota determinada de acordo com o planejamento da enzima Alcalase 2.4 L foram adicionadas no reator encamisado, que estava ligado ao Banho Ultratermostato criostato 521/D (Nova Ética®) para manter a temperatura do meio reacional. A hidrólise se deu sob uma agitação de 400 rpm com o auxílio do agitador RW 20 digital (IKA®), e a medição do pH realizada com pHmetro NI PHM (Nova Instruments®) para controle deste por adição de solução de NaOH 5M contida em bureta. O ponto de zero hora (0h) foi definido como a amostra coletada após 1 minuto de reação. Também foram coletadas amostras com 0,5 hora, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 5 horas de reação. A reação foi interrompida através de aquecimento das amostras em banho utilizando a placa de aquecimento TE-0851 (Tecnal®) a 90°C por 15 minutos e posterior congelamento das mesmas. O sistema de hidrólise utilizado está apresentado na Figura 10.



**Figura 10** - (a) Sistema de hidrólise composto por pHmetro, reator encamisado, agitador, bureta e banho ultratermostato. (b) Banho maria para interromper a reação (Fonte: Autoria própria).

### 3.5 Grau de Hidrólise

O método pH-stat, descrito por Adler-Nissen (1982), foi utilizado para monitorar as reações através da degradação proteolítica expressa em grau de hidrólise, representada pela Equação 1. Através do volume e da normalidade da base, nesse caso NaOH 5M, titulada para manter o pH do meio reacional estável, foi possível calcular o grau de hidrólise em porcentagem de acordo a Equação 2:

$$GH (\%) = \frac{V_{NaOH} \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}} \quad (2)$$

onde  $V_{NaOH}$  é o volume de NaOH gasto para manter o pH estável ao longo da reação,  $N_b$  é a normalidade da base usada,  $\alpha$  é o grau de dissociação médio dos grupos  $\alpha\text{-NH}_2$  liberados durante a hidrólise,  $MP$  é a massa de proteína e  $h_{total}$  é o número total de ligações peptídicas no substrato proteico (ADLER-NISSEN, 1982).

O grau de dissociação é calculado através da Equação 3:

$$\alpha = \frac{10^{(pH - pK)}}{1 + 10^{(pH - pK)}} \quad (3)$$

onde  $pK$  é o valor médio de dissociação para os grupos amino liberados durante a hidrólise e é dependente da temperatura, do comprimento da cadeia peptídica e da natureza do aminoácido terminal. Para calcular seu valor, a Equação 4 foi utilizada:



$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (4)$$

O parâmetro  $h_{\text{total}}$  é expresso como miliequivalentes de ligações peptídicas por grama de proteína (meqv/g) e pode ser calculado a partir da composição de aminoácidos da proteína utilizada, somando o mmol de cada aminoácido individual por grama de proteína (ADLER-NISSEN, 1982).

### 3.6 Teor de Aminoácidos Aromáticos Livres

O teor de aminoácidos aromáticos livres foi quantificado pelo método espectrofotométrico criado por Goodwin e Morton (1946). Uma curva padrão foi gerada a partir de soluções com concentrações conhecidas de tirosina: 33,2 µg/ml; 66,4 µg/ml; 132,8 µg/ml; 199,2 µg/ml; 265,6 µg/ml. A leitura da absorbância da curva foi feita em 280 nm em espectrofotômetro modelo AJX-3002PC (Micronal®) e o equipamento zerado com água destilada.



**Figura 11** - Espectrofotometro para leitura da absorbância das amostras (Fonte: Autoria própria).

Uma solução de hidrolisado proteico e ácido tricloroacético 10% (p/v) foi preparada com uma razão 1:1, e após 10 minutos de descanso, foi transferida para tubo de 2 mL e centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos em centrífuga Minispim Plus (Eppendorf®). O sobrenadante foi separado e diluído com água destilada e a leitura da absorbância feita nas mesmas condições estabelecidas para a leitura da curva, em triplicata.

### 3.7 Atividade Antioxidante

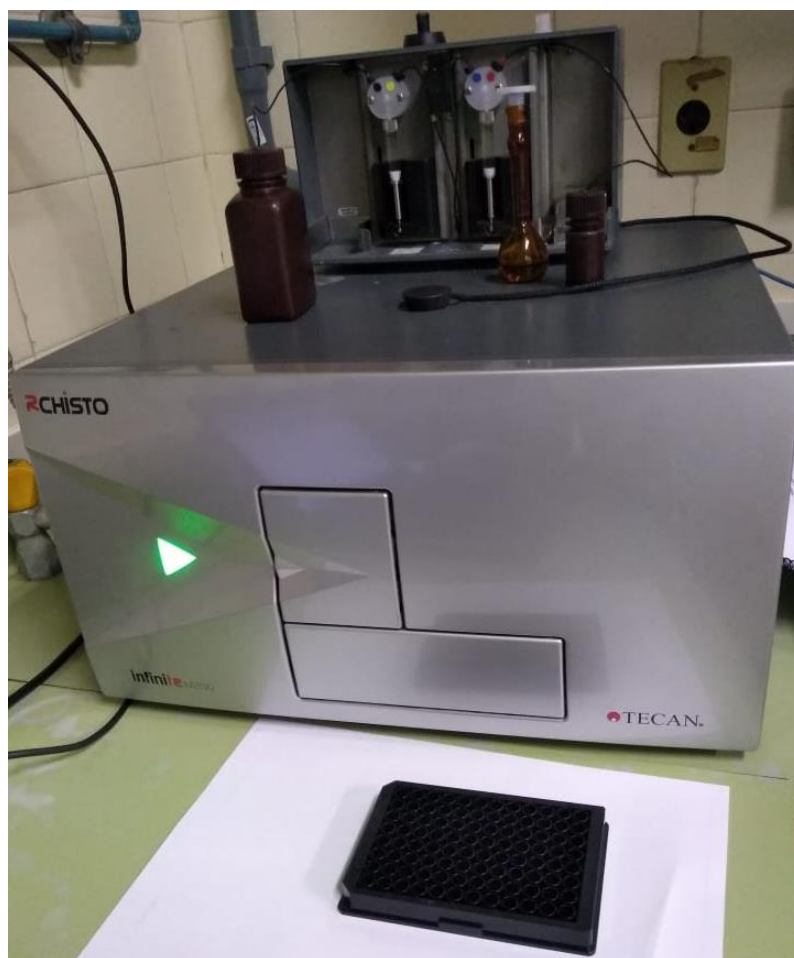
O método ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*) foi o escolhido para avaliar a atividade antioxidante das amostras e foi baseado no descrito por Zueleta, Esteve e Frígola (2009).

A curva padrão de Trolox foi construída com pontos de concentração de 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120  $\mu\text{M}$ , obtidos a partir de uma solução-mãe de Trolox 500  $\mu\text{M}$  e diluídos em solução tampão fosfato de sódio 75 mM pH 7,4.

As amostras foram diluídas em razão 1:10 em tampão fosfato de sódio 75 mM pH 7,4 e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos em centrífuga Minispim Plus (Eppendorf®). Em seguida o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato tanto quanto necessário para que a concentração final estivesse entre os pontos inicial e final da curva padrão.

No dia da análise, foram preparadas soluções de fluoresceína 78 nM e de AAPH [dicloridrato de 2,2-Azobis (2-metilpropionamida)] 221 mM, diluídas em solução tampão fosfato de sódio 75 mM em pH 7,4.

O equipamento utilizado foi o R Chisto (Infinite M200, Tecan®, Suíça) com leitor de microplacas de poliestireno com 96 poços de aplicação na cor preta (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol), que pode ser visto na Figura 12. Foram pipetados manualmente 80  $\mu\text{L}$  das soluções de Trolox (curva padrão) ou de amostra preparada e dispensados pelo equipamento 80  $\mu\text{L}$  de fluoresceína e 40  $\mu\text{L}$  de AAPH, perfazendo um volume total de 200  $\mu\text{L}$  em cada poço. Como branco para a análise, foram utilizados 80  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 75 mM em pH 7,4. O equipamento adicionou 200  $\mu\text{L}$  de fluoresceína 78 nM nas posições de referência da fluorescência. A leitura da fluorescência foi feita a 37 °C e em comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 535 nm, durante 90 ciclos que resultaram em aproximadamente 2 horas e 30 minutos de leitura.



**Figura 12** - Fluorímetro utilizado na análise ORAC (Fonte: Autoria própria).



A área abaixo da curva (AUC – *area under curve*) das leituras de fluorescência ao longo do tempo das soluções de Trolox de concentração conhecida, das amostras e do branco foi calculada com o auxílio do programa Prisma (GraphPad Software, Califórnia, EUA). As diferenças entre os valores de AUC das diferentes concentrações de Trolox e AUC do branco foram utilizadas para a construção da curva analítica. Para a quantificação das amostras, foi utilizada a Equação 5, em que são empregados os coeficientes linear e angular, obtidos na curva analítica.

$$\text{ORAC } (\mu\text{mol Trolox/g}) = \frac{(\text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{branco}}) - b}{C_{\text{amostra}}} \quad (5)$$

onde  $\text{AUC}_{\text{amostra}}$  é a área abaixo da curva calculada para a amostra,  $\text{AUC}_{\text{branco}}$  é área abaixo da curva calculada para o branco,  $b$  é o coeficiente linear,  $a$  é o coeficiente angular e  $C_{\text{amostra}}$  é a concentração da amostra em solução em mg/L. A curva cinética das amostras foi feita em triplicata e a atividade é expressa em  $\mu\text{mol Trolox/g}$  de amostra seca.

### 3.8 Propriedades Emulsificantes

O índice de atividade emulsificante (EAI - *emulsifying activity index*) e o índice de estabilidade de emulsão (ESI - *emulsion stability index*) foram determinados de acordo com o método de Pearce e Kinsella (1978) com algumas modificações.

As amostras de hidrolisado foram diluídas com tampão fosfato de sódio 75 mM em pH 7,0, afim de manter a uniformidade do pH entre as análises, resultando em soluções de concentração de 2 mg/mL de proteína. Em 30 mL dessa solução proteica foram adicionados 10 mL de óleo de soja, e a mistura foi homogeneizada em homogeneizador Ultra Turrax (IKA T25 digital IKA WORKS do Brasil) a 10.000 rpm por 1 minuto. Logo após a formação da emulsão, foram retiradas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , pipetadas do fundo da mistura, para diluição em 5 mL de solução de docecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 500 nm em espectrofotometro e o EAI e ESI foram calculados pelas Equações 6 e 7:

$$\text{EAI } (\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2,303 \times 100 \times A}{c \times 0,25 \times 10000} \quad (6)$$

onde  $A$  é a absorbância da emulsão logo após o fim da homogeneização e  $c$  é a concentração de proteína que nesse caso é 0,002 g/mL.

$$\text{ESI } (\text{min}) = \frac{A_0 - 10}{A_0 - A_{10}} \quad (7)$$

onde  $A_0$  é a absorbância da emulsão logo após o fim da homogeneização e  $A_{10}$  é a absorbância da emulsão após 10 minutos.

O sistema utilizado para a análise pode ser visto na Figura 13. As análises de EAI e ESI foram feitas em triplicata.



**Figura 13** - Sistema utilizado para a análise de EAI e ESI (Fonte: Autoria própria).

### 3.9 Planejamento Experimental e Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar a hidrólise enzimática da pasta de resíduo de Tira-Vira com Alcalase, e realizar uma modelagem do processo, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR). As variáveis independentes do processo foram os parâmetros pH, temperatura e razão enzima:substrato, e as variáveis dependentes foram o grau de hidrólise, a concentração de aminoácidos aromáticos livres, a atividade antioxidante e propriedades emulsificantes. Os níveis escolhidos para a condução dos experimentos, que se encontram na Tabela 1, foram baseados nas faixas ótimas conhecidas para a Alcalase e em trabalhos sobre hidrolisados protéicos com outras matrizes de pescado.

**Tabela 1** - Níveis das variáveis independentes utilizadas no estudo.

Níveis	-1,682	-1	0	1	1,682
<b>pH</b>	6,0	6,6	7,5	8,4	9,0
<b>Temperatura (°C)</b>	30	36	45	54	60
<b>E:S (%)</b>	2,0	4,7	8,5	12,4	15,0

O planejamento experimental resultante foi um fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central e composto por 17 experimentos, como pode ser visto na Tabela 2.

**Tabela 2** - Planejamento experimental  $2^3$  para as variáveis escolhidas.

Experimentos	Variáveis independentes					
	Codificado			Real		
	pH	T (°C)	E:S (%)	pH	T (°C)	E:S (%)
<b>1</b>	-1	-1	-1	6,6	36	4,7
<b>2</b>	1	-1	-1	8,4	36	4,7
<b>3</b>	1	1	-1	8,4	54	4,7
<b>4</b>	1	-1	1	8,4	36	12,4
<b>5</b>	-1	1	1	6,6	54	12,4
<b>6</b>	-1	-1	1	6,6	36	12,4
<b>7</b>	-1	1	-1	6,6	54	4,7
<b>8</b>	1	1	1	8,4	54	12,4
<b>9</b>	1,682	0	0	9,0	45	8,5
<b>10</b>	0	1,682	0	7,5	60	8,5
<b>11</b>	0	0	1,682	7,5	45	15,0
<b>12</b>	-1,682	0	0	6,0	45	8,5
<b>13</b>	0	-1,682	0	7,5	30	8,5
<b>14</b>	0	0	-1,682	7,5	45	2,0
<b>15</b>	0	0	0	7,5	45	8,5
<b>16</b>	0	0	0	7,5	45	8,5
<b>17</b>	0	0	0	7,5	45	8,5

A Análise de Variância (ANOVA), a determinação dos coeficientes de regressão para os modelos quadráticos expressos de acordo com a Equação 8 e a obtenção das superfícies de resposta foram realizadas com o auxílio do software Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (8)$$

A otimização da hidrólise enzimática foi realizada através da Metodologia de Superfície de Resposta, de modo a obter maiores valores de grau de hidrólise, concentração de aminoácidos aromáticos, atividade antioxidante e capacidade emulsificante.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da Pasta

O conteúdo de umidade, proteína, lipídios e cinzas da pasta de resíduo de Tira-Vira está apresentado na Tabela 3. A umidade observada foi de 74,7%, enquanto o teor de proteínas e lipídeos foi de 15,7 e 7,8, respectivamente. Comparando aos resíduos estudados por Guimarães et al. (2018b) para a mesma matriz de pescado, observou-se um menor teor de proteína frente a um aumento no teor de lipídeos. Essa diferença observada pode ser decorrente do tipo de resíduo que se tratam os trabalhos e a forma do processamento dos mesmos. O resíduo de Guimarães et al. (2018b) é proveniente da filetagem e passa por um processamento para a retirada da carne mecanicamente separada (CMS), já o resíduo do presente trabalho é obtido após o processamento da CMS, sendo processado uma segunda vez e resultando em uma pasta mais rústica. Borgogno et al. (2017), em seu trabalho com três espécies de água salgada, utilizou o peixe descabeçado e eviscerado para a obtenção da carne mecanicamente separada (CMS) de pescado, sendo processada toda a carne contida no peixe, o que justifica também o teor de proteína superior ao observado nesse estudo. Alto teor de lipídeos também foi observado na matriz de *Sparus aurata* (7,8%) e de *Dicentrarchus labrax* (10,5%), que pode ser explicado pela diferença entre as espécies e suas dietas. O teor de umidade foi próximo ao teor de umidade médio observado para os trabalhos referenciados, um pouco maior devido a diferenças no processamento que podem levar uma ruptura celular (Borgogno et al. 2017). O teor de cinzas observado nos trabalhos é bem próximo, principalmente o observado para o *Percophis brasiliensis* (2,6%) de Guimarães et al. (2018b) e desse estudo (2,3%), podendo os diferentes teores serem relativos a diferença entre as matrizes. Um teor de proteína satisfatório foi obtido com esse processamento, justificando o uso desse material para a produção de hidrolisado proteico.

**Tabela 3** - Composição centesimal da pasta de resíduo de Tira-Vira e de CMS de outras espécies de peixe reportadas na literatura.

	Umidade	Proteína	Lipídios	Cinzas	Referência
<i>Percophis brasiliensis</i>	74,7	15,7	7,8	2,3	Presente estudo
<i>Dicentrarchus labrax</i>	68,8	19,2	10,5	1,2	Borgogno et al. (2017)
<i>Sparus aurata</i>	71,1	19,3	7,8	1,3	Borgogno et al. (2017)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	70,6	21	6,6	1,5	Borgogno et al. (2017)
<i>Percophis brasiliensis</i>	72,2	19,2	5,5	2,6	Guimarães et al. (2018b)
<i>Pagrus pagrus</i>	72,2	19,4	6,1	1,1	Guimarães et al. (2018b)

O perfil de aminoácidos da pasta de Tira-Vira está exposto na Tabela 4. O ácido glutâmico (17,11%) está presente em maior quantidade, seguido do ácido aspártico (9,57%) e da lisina (9,24%). Além da lisina, outros aminoácidos também apresentaram teores de destaque: a fenilalanina, leucina, valina, isoleucina, treonina e metionina. Embora, diferentemente do esperado para a maioria dos pescados, o teor de triptofano foi muito baixo (0,52%). A carne de peixe tem alto valor nutricional, sendo suas proteínas altamente digeríveis e sua composição de aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina,

metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) completa e balanceada (BRASIL, 2009). Observamos que o resíduo de Tira-Vira mantém essas características nutricionais da carne, com bons teores de aminoácidos essenciais, tendo uma potencial aplicação nutricional.

Alto teor de ácido glutâmico (17,8 g/100g) também foi observado em surimi preparado a partir do mix de duas espécies marinhas (“Maria-Luíza” (*Paralichthys brasiliensis*) e “Perna-de-moça” (*Cynoscion virescens*)) em trabalho realizado por Mira e Lanfer-Marquez (2005). A espécie *Selaroides leptolepis*, utilizada para a produção de hidrolisado proteico por Klompong et al. (2009), apresentou um perfil onde os aminoácidos em maior quantidade foram a glicina (16,48%) seguida do ácido aspártico (10,01%). Analisando os perfis de aminoácidos de diversas espécies, Diniz et al. (2013) observou maiores de ácido glutâmico (13,9 g/100g), lisina (9,85 g/100g) e leucina (9,35 g/100g) na carne de *Percophis brasiliensis*. Nos três trabalhos, os perfis de aminoácidos foram parecidos ao perfil obtido para a pasta de Tira-Vira. Essas diferenças podem ser justificadas pelo fato da composição do pescado e conseqüentemente o seu valor nutricional variarem em função de numerosos fatores como espécie, idade, habitat, alimentação, época de captura, peso, entre outros (BRASIL, 2009).

**Tabela 4** - Perfil de aminoácidos da pasta de resíduo de Tira-Vira.

<b>Aminoácidos</b>	<b>g/ 100g<sup>a</sup></b>	<b>%<sup>b</sup></b>
<b>Ácido Aspártico</b>	2,03	9,57
<b>Serina</b>	1,03	4,86
<b>Ácido Glutâmico</b>	3,63	17,11
<b>Glicina</b>	1,23	5,80
<b>Histidina</b>	0,42	1,98
<b>Arginina</b>	1,21	5,70
<b>Treonina</b>	0,85	4,01
<b>Alanina</b>	1,36	6,41
<b>Prolina</b>	0,96	4,53
<b>Tirosina</b>	0,86	4,05
<b>Valina</b>	0,96	4,53
<b>Lisina</b>	1,96	9,24
<b>Isoleucina</b>	0,85	4,01
<b>Leucina</b>	1,54	7,26
<b>Fenilalanina</b>	0,84	3,96
<b>Cisteína</b>	0,06	0,28
<b>Metionina</b>	1,31	6,18
<b>Triptofano</b>	0,11	0,52
<b>Total</b>	21,21	100,00

<sup>a</sup> Gramas de aminoácido em relação a 100 gramas de pasta.

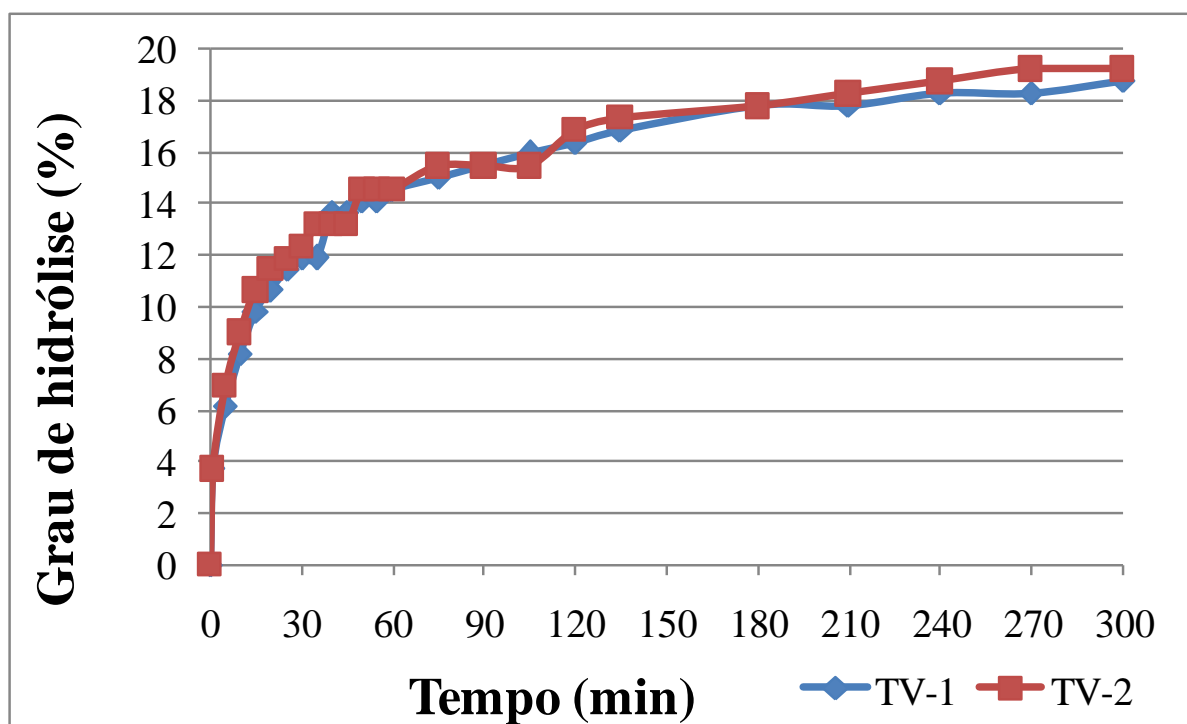
<sup>b</sup> Porcentagem do aminoácido em relação ao total de aminoácidos presentes na pasta.

## **4.2 Hidrólise Enzimática da Pasta de Tira-Vira com Alcalase**

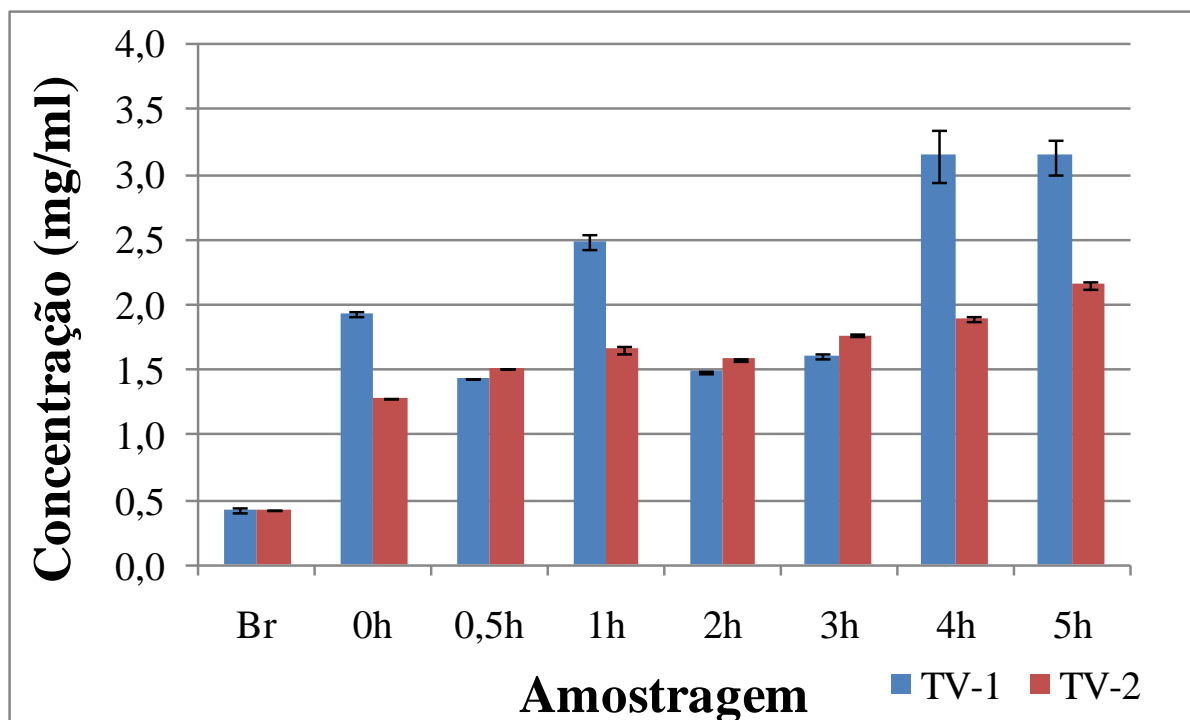
### **4.2.1 Estudo preliminar das condições de hidrólise**

Um estudo preliminar foi feito com a intenção de avaliar a influência do modo de preparo da suspensão proteica resíduo de Tira-Vira na hidrólise enzimática com Alcalase, e para tal, mudou-se a potência de processamento da suspensão. Essa influência foi avaliada no grau de hidrólise da reação, no teor de aminoácidos aromáticos livres, na atividade antioxidante e no índice de atividade emulsificante (EAI) do hidrolisado obtido.

O acompanhamento da cinética de reação foi realizado pelo grau de hidrólise e pelo teor de aminoácidos aromáticos liberados durante a hidrólise (Figuras 14 e 15). Observou-se que o perfil do grau de hidrólise manteve-se independente da potência aplicada no processamento da suspensão de Tira-Vira durante a hidrólise catalisada por Alcalase (Figura 14). Maior velocidade de reação ocorreu na primeira hora e o grau de hidrólise máximo foi de 19% após 5 horas de reação. Na literatura são encontrados resultados de grau de hidrólise semelhantes, como no estudo de Fonseca et al. (2016) sobre hidrólise de carne e resíduos de cobia (*Rachycentron canadum*), que obteve um grau de hidrólise de cerca de 10% na carne e de cerca de 8% no resíduo de cobia, após 5 horas de reação com Alcalase. Quanto ao teor de aminoácidos aromáticos livres, embora de forma oscilante, observou-se um aumento na concentração de aminoácidos na amostra TV-1, referente à amostra que foi obtida utilizando uma potência maior no processador. O motivo desse aumento pode ser o fato de que uma maior potência no homogeneizador pode relaxar as cadeias polipeptídicas presentes no aglomerado proteico formador da pasta de Tira-Vira obtida, facilitando a atuação da enzima durante a reação de hidrólise.

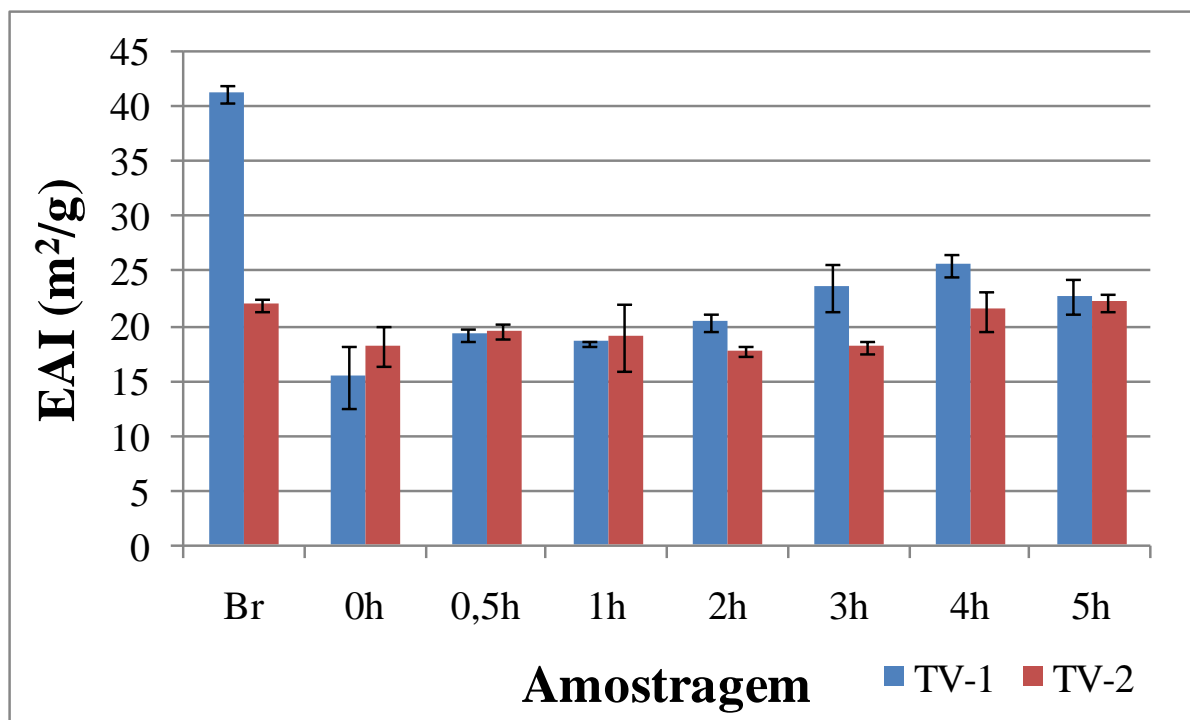


**Figura 14** - Grau de hidrólise durante hidrólise enzimática de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento.

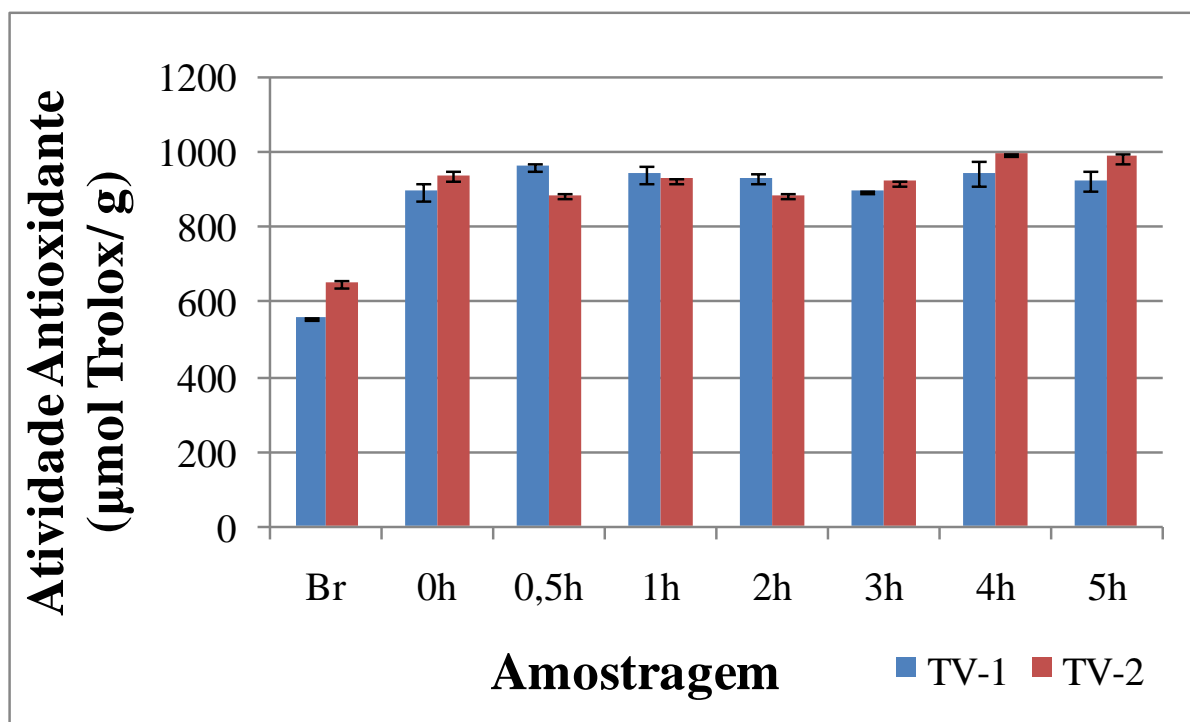


**Figura 15** - Teor de aminoácidos aromáticos durante hidrólise enzimática de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento.

Visando avaliar o efeito da potência de processamento na qualidade dos hidrolisados obtidos, determinou-se o índice de atividade emulsificante em óleo de soja e a atividade antioxidante por ORAC do hidrolisado ao longo da reação para os dois tipos de amostras (Figuras 16 e 17). Para a amostra TV-1, o EAI apresenta uma queda logo no primeiro minuto de reação, mas ao longo do tempo de hidrólise, este não mostra uma diferença intensa. O motivo pode ser a variação que ocorre no tamanho e no peso molecular dos hidrolisados, já tendo sido reportado na literatura que existe um tamanho molecular ótimo para peptídeos serem bons emulsificantes, sendo que os peptídeos com peso molecular baixo podem não ser anfifílicos o suficiente para apresentarem boas propriedades emulsificantes (LIU et al., 2014; KLOMPONG et al., 2007). A amostra preparada com uma potência menor (TV-2), antes da reação apresentou metade da capacidade emulsificante da amostra TV-1. Ao longo da reação, TV-2 não apresentou diferença. Logo, independente da forma de preparo da amostra, os valores de atividade emulsificante dos hidrolisados obtidos são similares.



**Figura 16** - Índice de atividade emulsificante dos hidrolisados de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento.



**Figura 17** - Atividade antioxidante dos hidrolisados de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento.

Analisando os efeitos quanto à atividade antioxidante utilizando ORAC, observaram-se perfis similares de atividade ao longo da reação, independente da forma de obtenção. O ganho de atividade frente ao valor inicial (Br) foi mais expressivo apenas no primeiro minuto



reacional (0h), alcançando pouco mais de 800  $\mu\text{mol}$  Trolox/g, frente aos 600 iniciais. Alguns fatores como enzima utilizada, condições de hidrólise, composição de aminoácidos e pequenos peptídeos livres afetam a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos (KLOMPONG et al., 2007) e podem ter contribuído para o resultado obtido.

Para as condições estudadas, a potência de processamento da suspensão de tira-vira não demonstra influência na qualidade do hidrolisado obtido. O uso de potência mais elevada só se faz necessário caso haja necessidade de obter um hidrolisado com maior teor de aminoácidos aromáticos livres. Desta forma, selecionou-se o uso de uma potência média na execução dos experimentos para otimização da hidrólise.

#### 4.2.2 Otimização da hidrólise de tira-vira com Alcalase

Os efeitos dos parâmetros reacionais pH, temperatura e razão E:S sobre a hidrólise enzimática da proteína de tira-vira com Alcalase e as propriedades dos hidrolisados produzidos foi avaliado de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^3$  com triplicata no ponto central, conforme visto na Tabela 2. No total, foram feitos 17 experimentos, onde as respostas avaliadas foram o grau de hidrólise (GH), teor de aminoácidos aromáticos livres (AmAr), atividade antioxidante (AA) e as propriedades emulsificantes através do índice de atividade emulsificante (EAI – *Emulsifying activity index*) e do índice de estabilidade de emulsão (ESI – *Emulsion stability index*). Além da avaliação e determinação dos parâmetros significativos do processo para cada resposta, o processo também foi modelado para essas respostas de acordo com a equação quadrática expressa na Equação 8. Analisando as superfícies de resposta geradas por cada modelo, foi possível encontrar uma condição ótima para o processo.

##### 4.2.2.1 Grau de Hidrólise

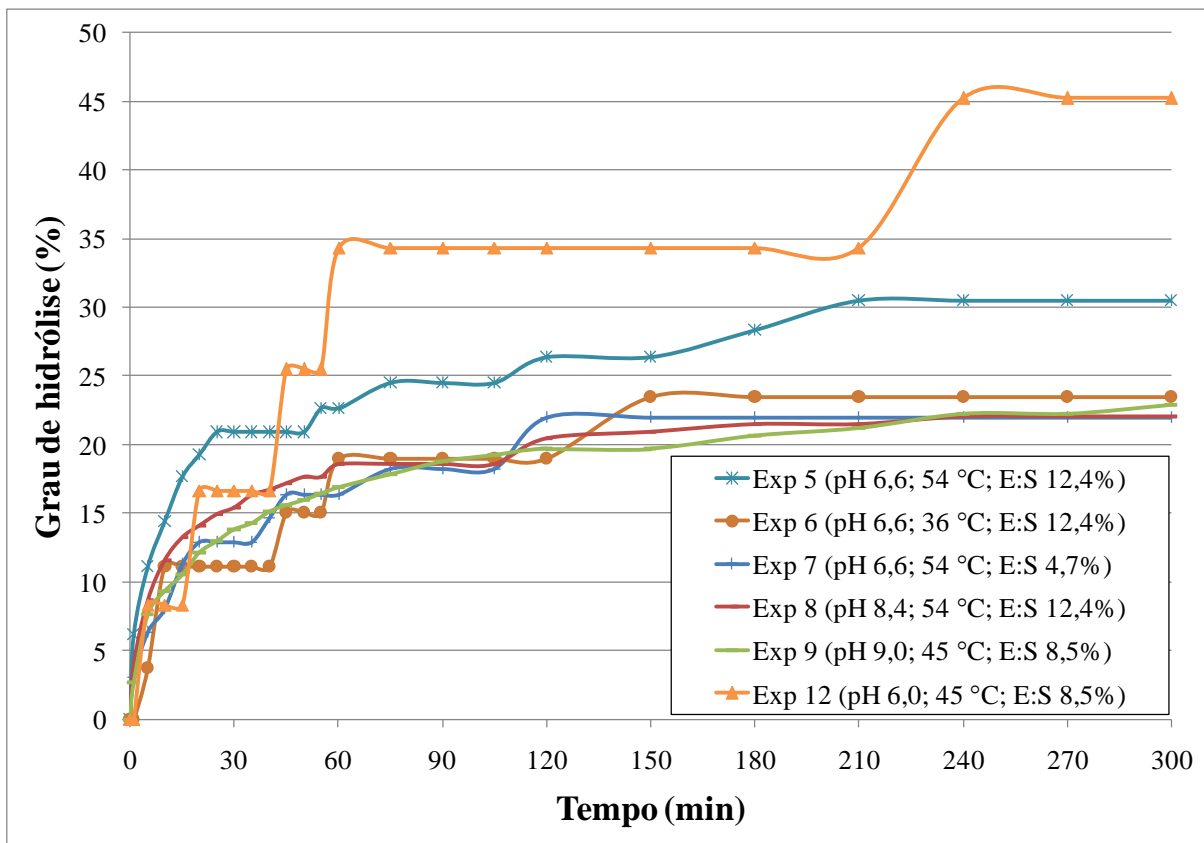
Para cada condição estudada, a hidrólise da pasta de resíduo de Tira-Vira foi acompanhada ao longo de 5 horas e os resultados podem ser vistos nos gráficos das Figuras 18, 19 e 20. O grau de hidrólise em 5 horas apresentou uma variação de 13,9% a 45,2%, não sendo possível avaliar o ponto 10 (pH 7,5; 60 °C, E:S 8,5%) em 5 horas devido à grande perda de água por evaporação que levou a uma concentração da amostra e, conseqüente, redução do volume, forçando o encerramento do experimento em 4 horas.

O comportamento da reação, onde é observada uma elevada taxa de reação no início da hidrólise (maior velocidade observada nos 30 primeiros minutos) devido à grande quebra de ligações peptídicas e posterior decaimento tendendo a uma constante, é o mesmo descrito na literatura para hidrólises enzimáticas de proteína utilizando diversas matrizes e diversas enzimas (KRISTINSSON; RASCO, 2000a; DE HOLANDA; NETTO, 2006; NOMAN et al., 2018; TAN; CHANG; MENG, 2019).

González-Tello et al. (1994) em seu trabalho com hidrolisado de soro de leite indicou que essa queda na taxa de reação poderia ser relacionada à queda da concentração de ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise, à uma possível inibição das enzimas causada pelos produtos gerados e à desnaturação da enzima.

Os maiores graus de hidrólise, acima de 20%, se encontram na Figura 18. Na Figura 19, se encontram as reações cujos graus de hidrólise alcançaram valores intermediários entre 20% e 15%. E na Figura 20 estão as reações que tiveram graus de hidrólise máximos abaixo de 15%. Observou-se que a hidrólise do resíduo de Tira-Vira foi maior em condições de pH mais baixo (entre 6 e 6,6). Maior grau de hidrólise (45,24%) foi observado a pH 6, 45 °C e razão E:S 8,5%, alcançado em 4 horas de reação. Nessas mesmas condições, 34,35% de grau de hidrólise foi obtida em uma hora de processo. Uma hidrólise com 30% de GH foi possível

a pH 6,6, 54°C e razão E:S 12,4% em 4 horas de reação. Outro fato observado foi que o grau de hidrólise alcançou variações maiores nas 2 primeiras horas de reação, apresentando pequenos ganhos após esse tempo até 3 ou 4h de reação (dependendo da condição estudada), onde, após esse tempo observou-se estabilização. Utilizando uma mistura das enzimas Alcalase e PTN 6.0S (subtilisina e tripsina, respectivamente) para hidrolisar proteína de *Trachurus mediterraneus* ao longo de 4 horas, Morales-Medina et al. (2016) observou o mesmo comportamento reacional de ganhos menores no grau de hidrólise após 2 horas de processo. A razão enzima:substrato usada foi de 1% em peso, e sua justificativa foi que razões E:S maiores podem encurtar o tempo necessário para o valor estável.



**Figura 18** - Gráfico de grau de hidrólise dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 20%.

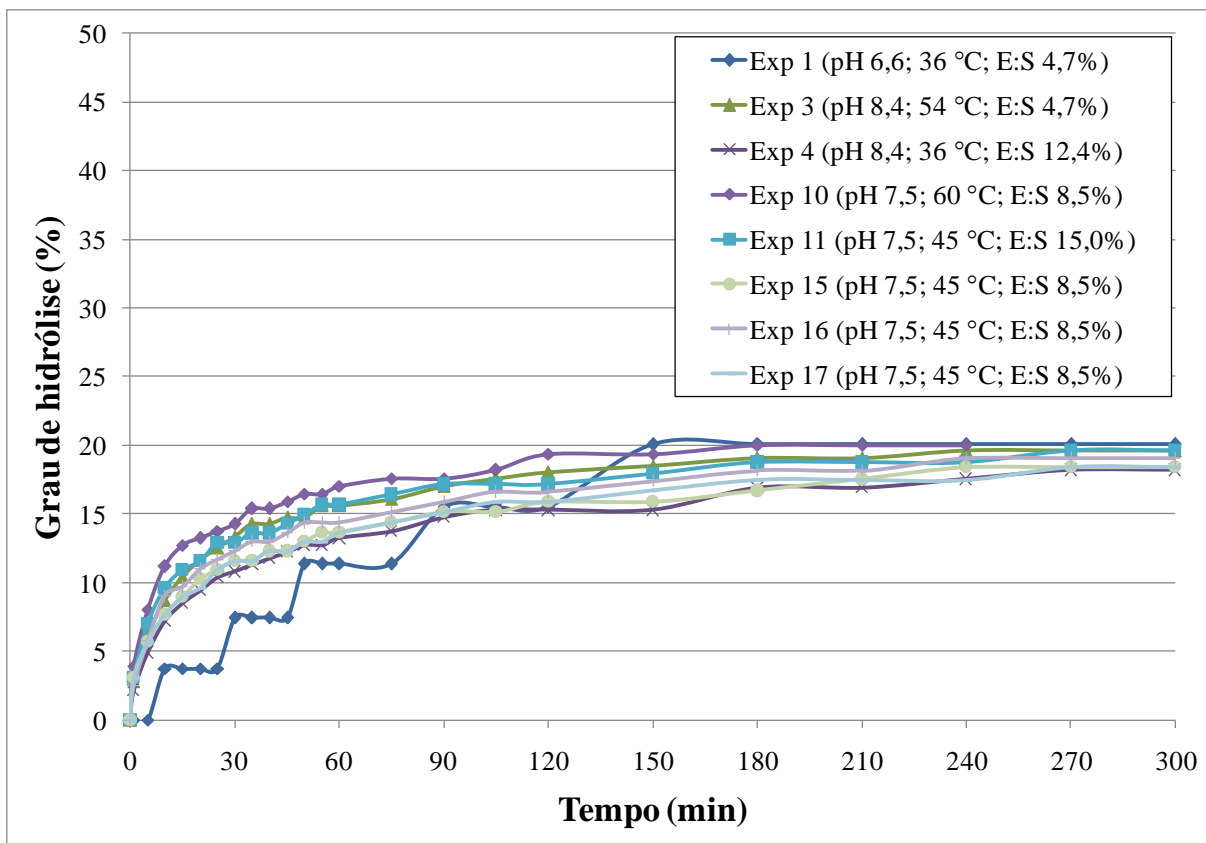


Figura 19 - Gráfico de grau de hidrólise dos experimentos do planejamento na faixa final entre 20% e 15%.

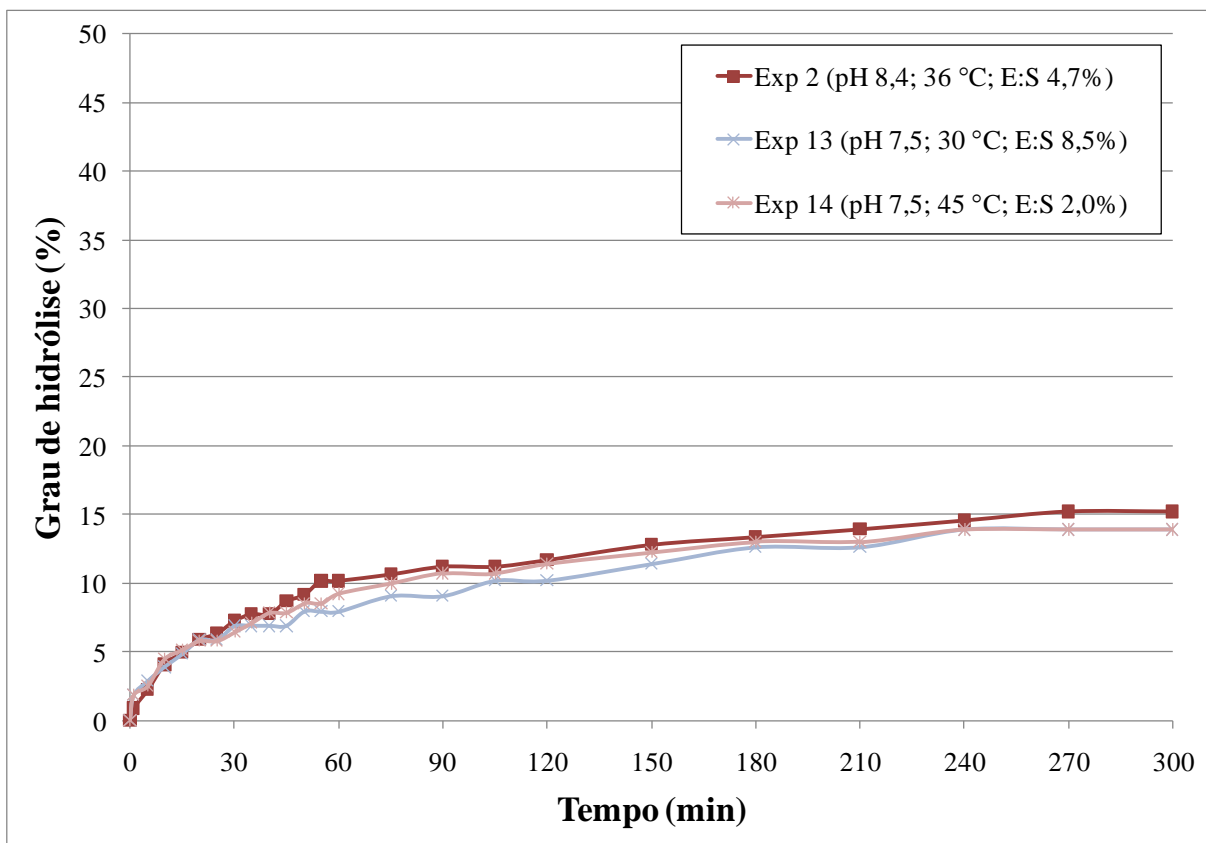


Figura 20 - Gráfico de grau de hidrólise dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 15%.

Em seu estudo com carne e resíduo de Cobia (*Rachycentron canadum*), Fonseca et al. (2016), utilizando Alcalase em condições de pH 8, 50 °C e E:S 0,1%, obteve grau de hidrólise de aproximadamente 10% tanto para carne quanto para resíduo após 5h de reação. Apesar do grau de hidrólise alcançado neste trabalho ser superior, o que pode ser atribuído às diferenças do meio reacional (a razão E:S muito menor), o comportamento da hidrólise ao longo do tempo foi parecido. Também foi observado um avanço de reação menor após 3 horas de reação. A redução da taxa de reação ao longo do tempo ocorre, pois as proteínas mais longas são hidrolisadas mais lentamente, concomitantemente ao substrato disponível que diminui ao longo do tempo de reação.

Uma análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e modelagens matemáticas foram realizadas para três tempos de reação (1h, 3h e 4h) com o objetivo de determinar quais são os parâmetros significativos e prever o grau de hidrólise de acordo com as condições desses parâmetros (pH, temperatura e razão E:S), e assim também se estabelecer um ponto ótimo para essas condições reacionais. De acordo com o planejamento fatorial estabelecido, que pode ser visto na Tabela 2, foi possível ajustar os dados em uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 8). A ANOVA (Tabela 5) feita para cada tempo mostra, através do teste F de Fisher e do p-valor ( $p < 0,05$ ), que os três parâmetros estudados foram significativos em uma e três horas de reação, porém, em quatro horas de reação a razão E:S deixa de ser significativa no processo. Como já foi dito, com o passar do tempo, a enzima pode sofrer inativação e a quantidade de substrato no meio também se torna menor, o que pode explicar a perda de significância desse parâmetro em 4 horas.

**Tabela 5** - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de grau de hidrólise obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos (continua).

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>1 hora de reação</b>					
<b>pH (L)</b>	124,60	1	124,60	16,85	0,005
<b>pH (Q)</b>	170,14	1	170,14	23,01	0,002
<b>T (L)</b>	88,72	1	88,72	12,00	0,010
<b>T (Q)</b>	6,57	1	6,57	0,89	0,377
<b>E:S (L)</b>	69,48	1	69,48	9,40	0,018
<b>E:S (Q)</b>	6,73	1	6,73	0,91	0,372
<b>pH x T</b>	0,54	1	0,54	0,07	0,795
<b>pH x E:S</b>	7,76	1	7,76	1,05	0,340
<b>T x E:S</b>	0,29	1	0,29	0,04	0,849
<b>Resíduo</b>	51,75	7	7,39		
<b>Total</b>	587,09	16			
<b>3 horas de reação</b>					
<b>pH (L)</b>	155,18	1	155,18	119,23	0,000
<b>pH (Q)</b>	152,53	1	152,53	117,20	0,000
<b>T (L)</b>	63,51	1	63,51	48,80	0,000
<b>T (Q)</b>	0,94	1	0,94	0,72	0,425
<b>E:S (L)</b>	47,72	1	47,72	36,66	0,001
<b>E:S (Q)</b>	2,12	1	2,12	1,63	0,243
<b>pH x T</b>	1,48	1	1,48	1,14	0,321
<b>pH x E:S</b>	1,78	1	1,78	1,37	0,280
<b>T x E:S</b>	0,41	1	0,41	0,32	0,591
<b>Resíduo</b>	9,11	7	1,30		
<b>Total</b>	474,03	16			

**Tabela 5** - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de grau de hidrólise obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos (continuação).

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
<b>4 horas de reação</b>					
pH (L)	271,44	1	271,44	27,99	0,001
pH (Q)	300,41	1	300,41	30,98	0,001
T (L)	60,40	1	60,40	6,23	0,041
T (Q)	6,93	1	6,93	0,71	0,426
E:S (L)	48,12	1	48,12	4,96	0,061
E:S (Q)	11,47	1	11,47	1,18	0,313
pH x T	0,05	1	0,05	0,01	0,945
pH x E:S	5,30	1	5,30	0,55	0,484
T x E:S	2,59	1	2,59	0,27	0,621
Resíduo	67,87	7	9,70		
Total	874,53	16			

Na Tabela 6, estão os dados de grau de hidrólise obtidos no planejamento experimental para os três tempos de reação escolhidos, além das respostas previstas de acordo com a modelagem matemática.

**Tabela 6** - Respostas de grau de hidrólise obtidas do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para os três tempos escolhidos.

Exp	Grau de hidrólise – GH (%)					
	1 hora de reação		3 horas de reação		4 horas de reação	
	Obs	Pred	Obs	Pred	Obs	Pred
1	11,35	13,62	20,05	19,90	20,05	22,07
2	10,14	9,03	13,35	13,24	14,54	14,62
3	15,61	15,03	19,03	17,96	19,58	17,85
4	13,23	11,95	16,95	15,58	17,55	15,61
5	22,66	24,68	28,35	28,03	30,49	31,50
6	18,99	20,49	23,49	24,13	23,49	26,31
7	16,39	18,58	21,96	22,90	21,96	24,98
8	18,55	17,19	21,49	21,21	22,05	21,11
9	16,87	19,88	20,67	22,15	22,28	25,49
10	17,02	16,10	19,99	20,22	19,99	19,71
11	15,67	15,58	18,74	19,33	18,74	18,69
12	34,35	30,04	34,35	33,48	45,24	40,49
13	7,92	7,53	12,59	12,97	13,89	12,63
14	9,21	8,00	13,02	13,04	13,87	12,38
15	13,67	13,97	16,69	17,41	18,40	18,39
16	14,36	13,97	18,17	17,41	19,03	18,39
17	13,67	13,97	17,48	17,41	17,48	18,39

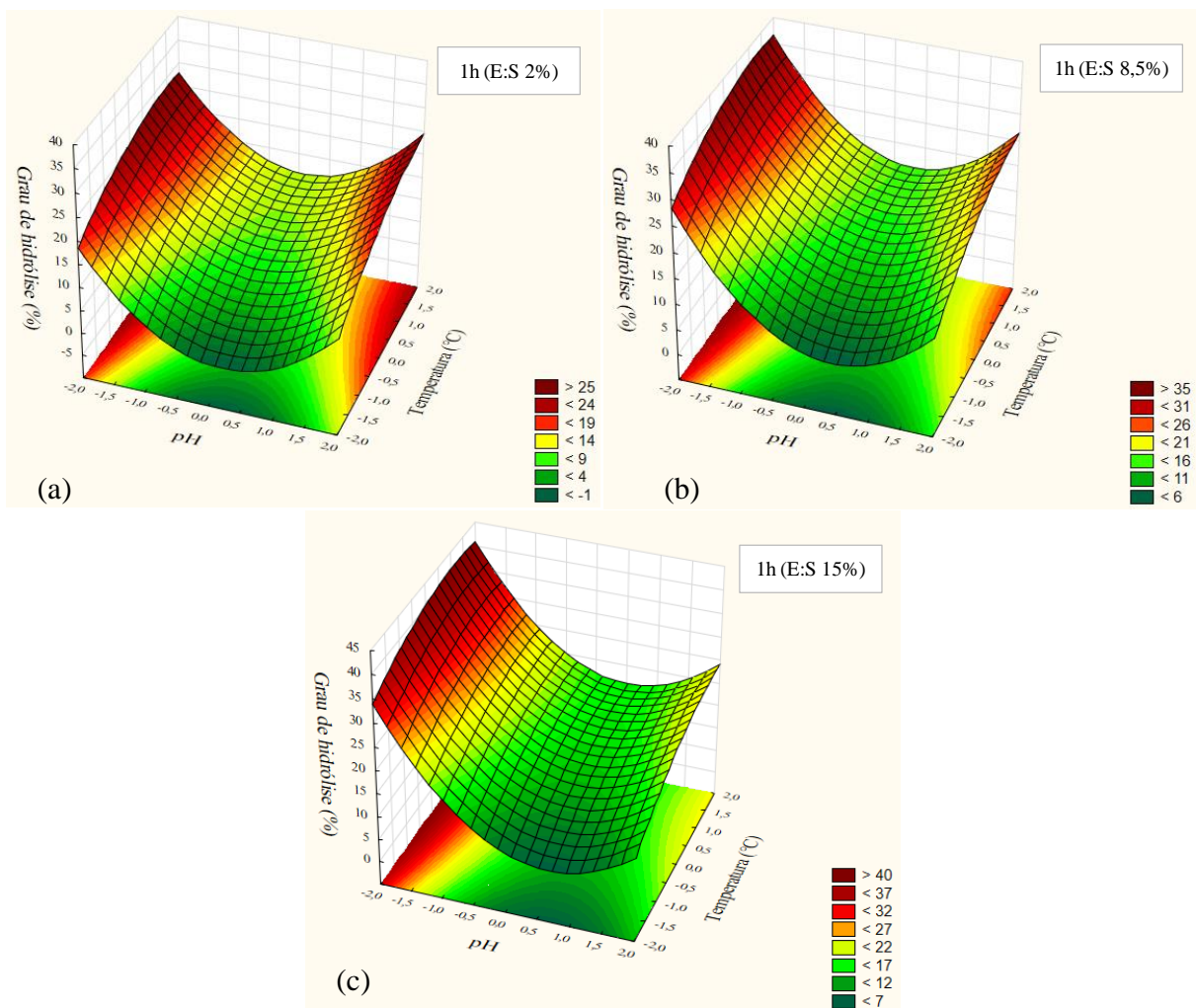
A modelagem matemática foi baseada no modelo quadrático expresso na Equação 8. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos foram 0,9118 para 1 hora de reação; 0,9808 para 3 horas de reação e 0,9224 para 4 horas de reação. Para um processo biológico, estes  $R^2$  estão satisfatórios e as Equações 9, 10 e 11 descrevem bem o processo.

$$GH1h = 13,97 - 3,02 \times \text{pH} + 3,88 \times \text{pH}^2 + 2,55 \times T + 2,25 \times \text{E:S} \quad (9)$$

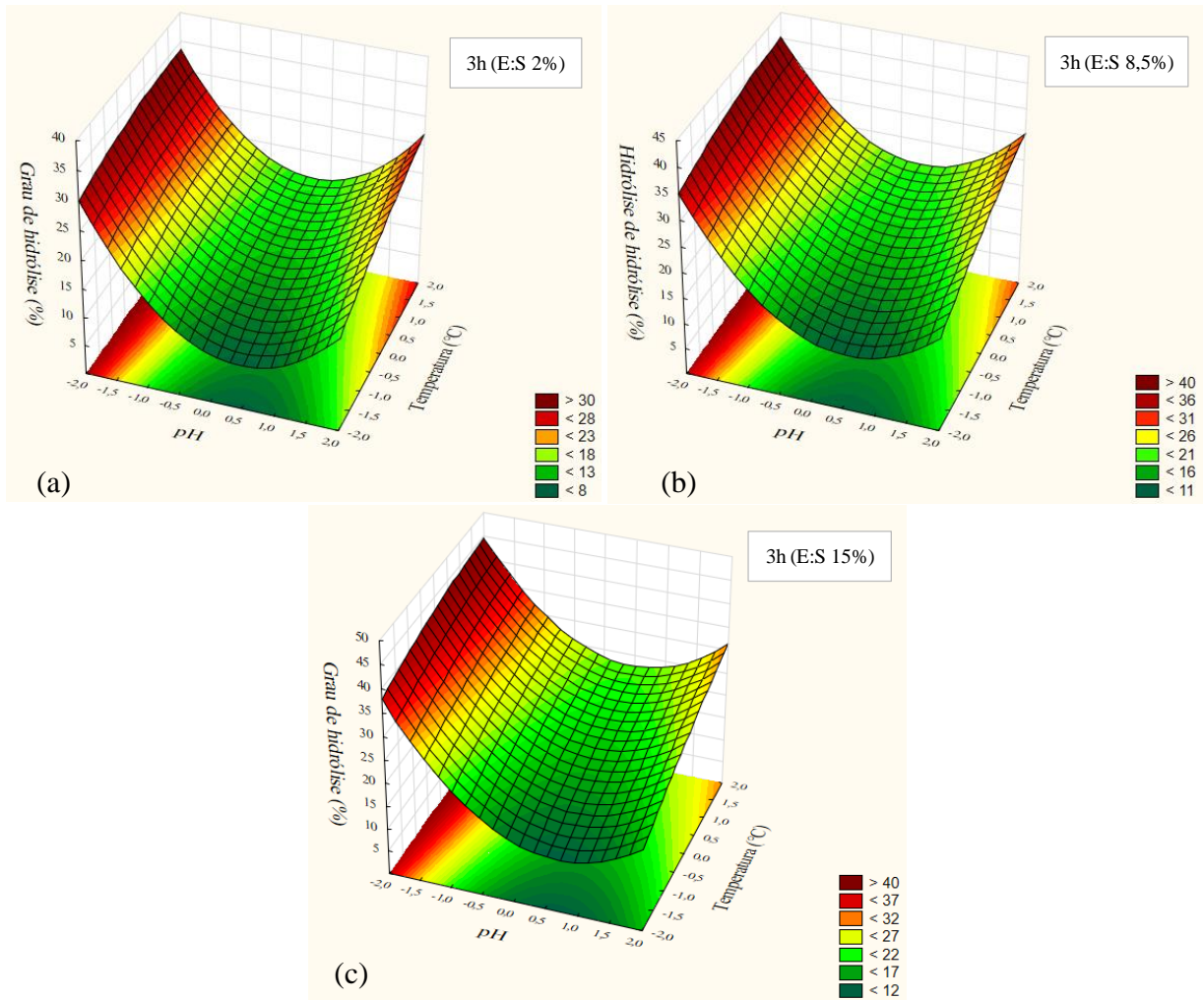
$$GH3h = 17,41 - 3,37 \times \text{pH} + 3,68 \times \text{pH}^2 + 2,16 \times T + 1,87 \times \text{E:S} \quad (10)$$

$$GH4h = 18,39 - 4,46 \times \text{pH} + 5,16 \times \text{pH}^2 + 2,10 \times T \quad (11)$$

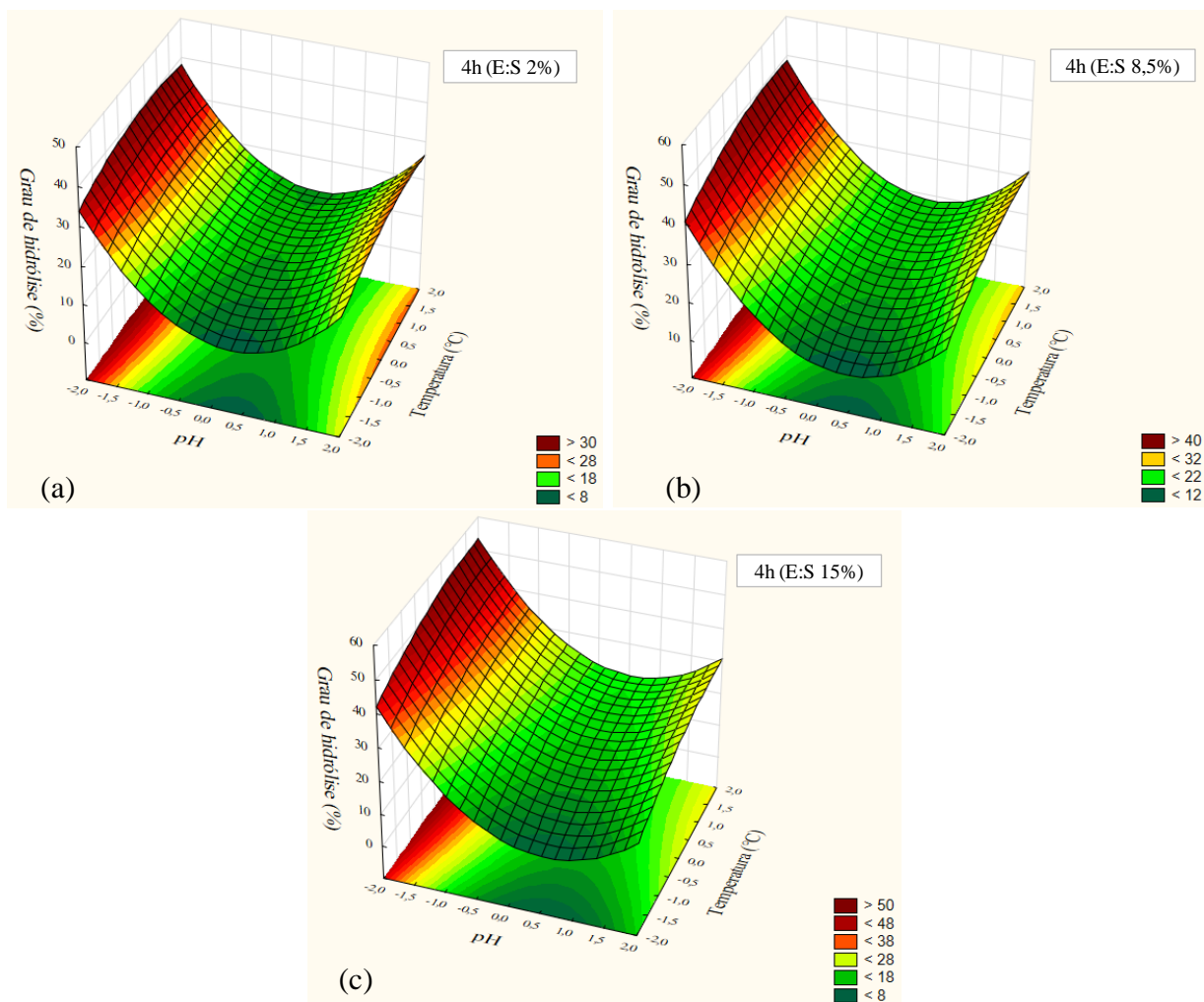
As superfícies de resposta geradas a partir dos modelos obtidos estão apresentadas nas Figuras 21, 22 e 23. Com a finalidade de se encontrar uma condição ótima para que o processo retorne o maior grau de hidrólise possível, foi feita uma análise das superfícies, levando em consideração o custo operacional do processo. Observa-se nos três tempos que para um pH menor e uma temperatura maior o grau de hidrólise aumenta, sendo indicado manter essas características para a otimização do processo. Apesar do aumento da razão E:S também acarretar no aumento do grau de hidrólise, o aumento dessa resposta é discreto não justificando um gasto muito superior com enzima.



**Figura 21** - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise nas condições: (a) 1 hora e E:S 2%, (b) 1 hora e E:S 8,5% e (c) 1 hora e E:S 15%.



**Figura 22** - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise nas condições: (a) 3 horas e E:S 2%, (b) 3 horas e E:S 8,5% e (c) 3 horas e E:S 15%.



**Figura 23** - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise nas condições: (a) 4 horas e E:S 2%, (b) 4 horas e E:S 8,5% e (c) 4 horas e E:S 15%.

Saidi et al. (2016) estudou a otimização dos parâmetros pH, temperatura, razão E:S e tempo para hidrólise enzimática de carne escura de atum com Alcalase. No modelo gerado para o grau de hidrólise, foi observado um efeito significativo para todos os parâmetros, assim como o visto nesse trabalho. Porém a variável que se mostra mais importante para o hidrolisado de carne escura de atum é a temperatura e algumas interações entre os parâmetros são significativas nesse processo, enquanto que para o hidrolisado de resíduo de tira-vira, o pH se mostra mais importante e as interações entre os parâmetros não foram significativas. Nos dois estudos, temperaturas e razões E:S mais elevadas levam a maiores graus de hidrólise, porém o pH 6 se mostra o melhor para resíduo de tira-vira e pH próximo a 8,5 é apontado como melhor para a carne escura de atum. Como a enzima utilizada em ambos trabalhos é a mesma, as faixas de pH diferentes podem ser devido a estrutura das matrizes usadas.

Diniz e Martin (1996) estudou a influência dos parâmetros pH, temperatura e razão E:S para hidrólise enzimática da espécie de tubarão *Squalus acanthias* com Alcalase. Todos os parâmetros foram significativos nesse estudo também, porém apenas interação entre temperatura e razão E:S se mostrou significativa. O aumento nos três parâmetros leva a um aumento no grau de hidrólise, sendo o ótimo obtido em pH 8,3, 53,6 °C e razão E:S 3,6%. Novamente observa-se a diferença entre faixas de pH com tubarão e com resíduo de tira-vira.



A faixa de pH obtida para tira-vira foi inesperada, visto que as faixas ótimas de pH da Alcalase, uma protease alcalina, estão próximas a um pH 8.

Baseado na análise feita, o ponto ótimo selecionado foi nas condições de pH 6, 60 °C e E:S 8,5% para os três tempos de hidrólise selecionados. Esse ponto foi testado experimentalmente com o objetivo de validar os modelos. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 7, e os modelos para 1 e 4 horas foram validados, porém o modelo para 3 horas apresenta um grande desvio e não foi validado por esse ponto experimental.

**Tabela 7** - Dados experimentais e preditos para a validação dos modelos de grau de hidrólise.

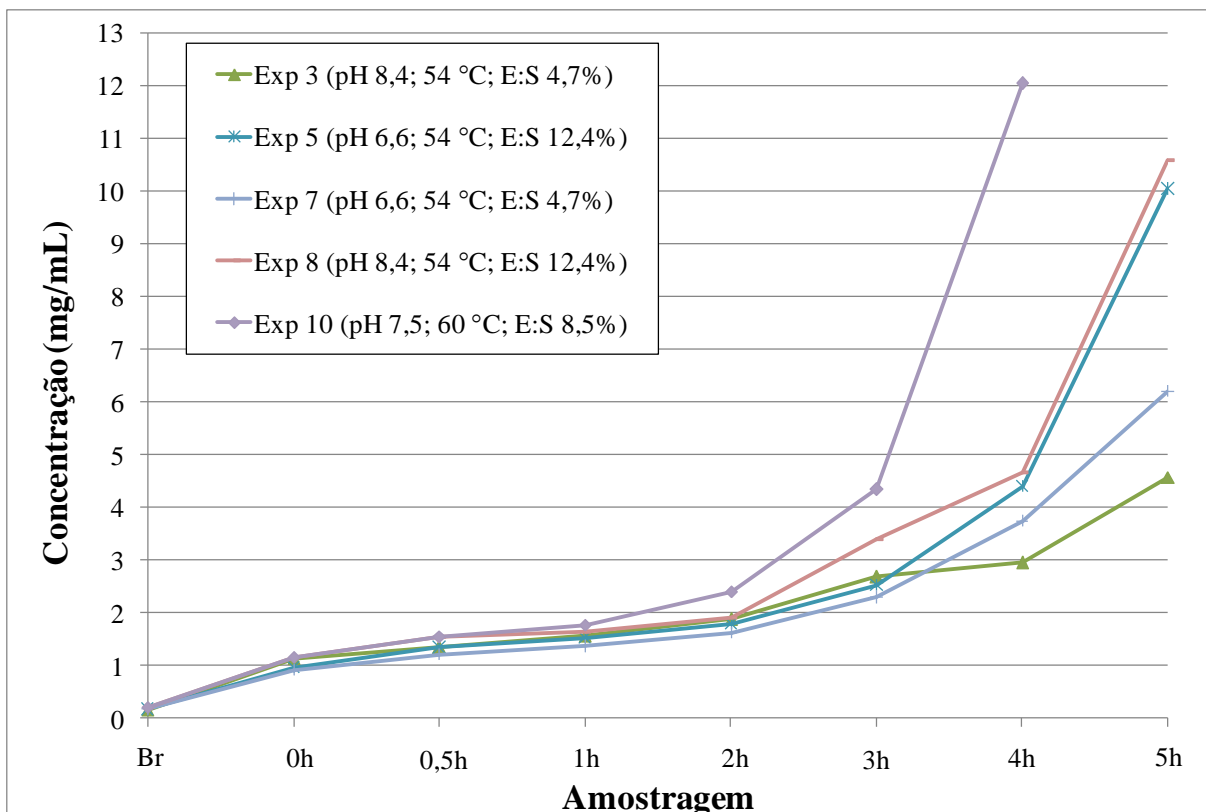
	<b>GH observado</b>	<b>GH predito</b>	<b>Valor residual</b>
<b>1 hora de reação</b>	36,12	34,33	1,79
<b>3 horas de reação</b>	42,53	37,11	5,42
<b>4 horas de reação</b>	43,76	44,03	0,27

Observando os dados experimentais de grau de hidrólise obtidos, nota-se um modesto ganho com o avanço da reação de 1 para 3 horas e ainda menor de 3 para 4 horas, em praticamente todos os pontos do planejamento. Essa observação se confirma no ponto de validação do modelo. Em uma hora de processo, a resposta de grau de hidrólise obtida foi 34,35% para pH 6, 45 °C e razão E:S 8,5%, e GH de 36,12% para pH 6, 60 °C e razão E:S 8,5%, indicando que seria possível usar condições com gasto energético menor para se atingir um GH de 30%. Algumas aplicações de hidrolisados protéicos demandam um grau de hidrólise mais baixo (entre 5 a 10%), como as que demandam melhores propriedades funcionais (solubilidade, capacidade emulsificante e formação de espuma), que poderia ser satisfeito com apenas uma hora de processo em condições reacionais mais brandas e com um uso menor de enzima, diminuindo o gasto energético e operacional, e tornando o processo mais rentável.

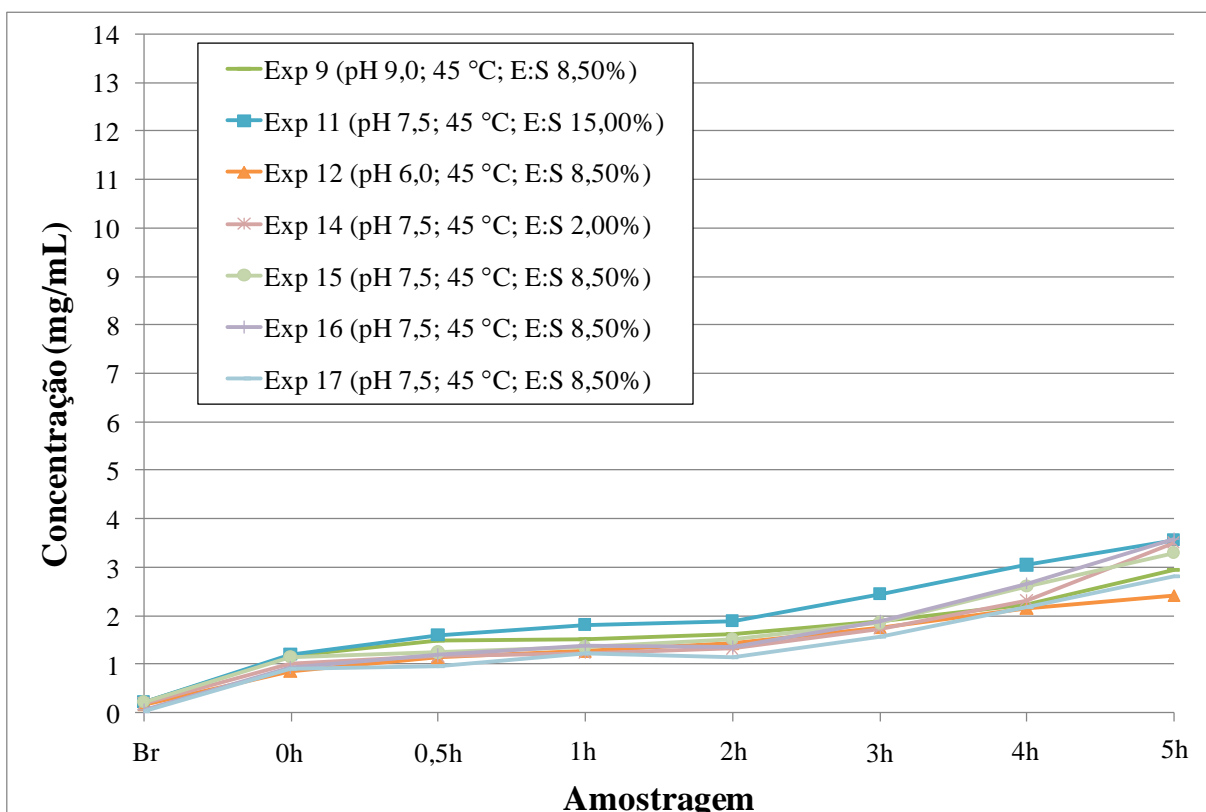
#### **4.2.2.2 Teor de Aminoácidos Aromáticos Livres**

O teor de aminoácidos aromáticos livres foi acompanhado ao longo da hidrólise do resíduo de Tira-Vira com duas finalidades. Além de confirmar o avanço da reação ao longo do tempo, o teor de aminoácidos aromáticos pode ser um indicativo relacionado a atividade antioxidante observada nos hidrolisados, visto que aminoácidos com cadeias laterais contendo enxofre nucleofílico (cisteína e metionina) ou cadeias laterais aromáticas (triptofano, tirosina e fenilalanina) se mostram mais reativos (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008). Nimalaratne et al., (2011) relatou que aminoácidos aromáticos livres (triptofano e tirosina) de gema de ovo tem habilidade de inibir a oxidação de lipídeos em alimentos. A concentração observada em 5 horas varia entre 1,71 a 10,04 mg/mL. Para o ponto 10 (pH 7,5; 60 °C, E:S 8,5%), onde não foi possível conduzir experimento até 5 horas, o valor foi de 12,04 mg/mL em 4 horas de processo.

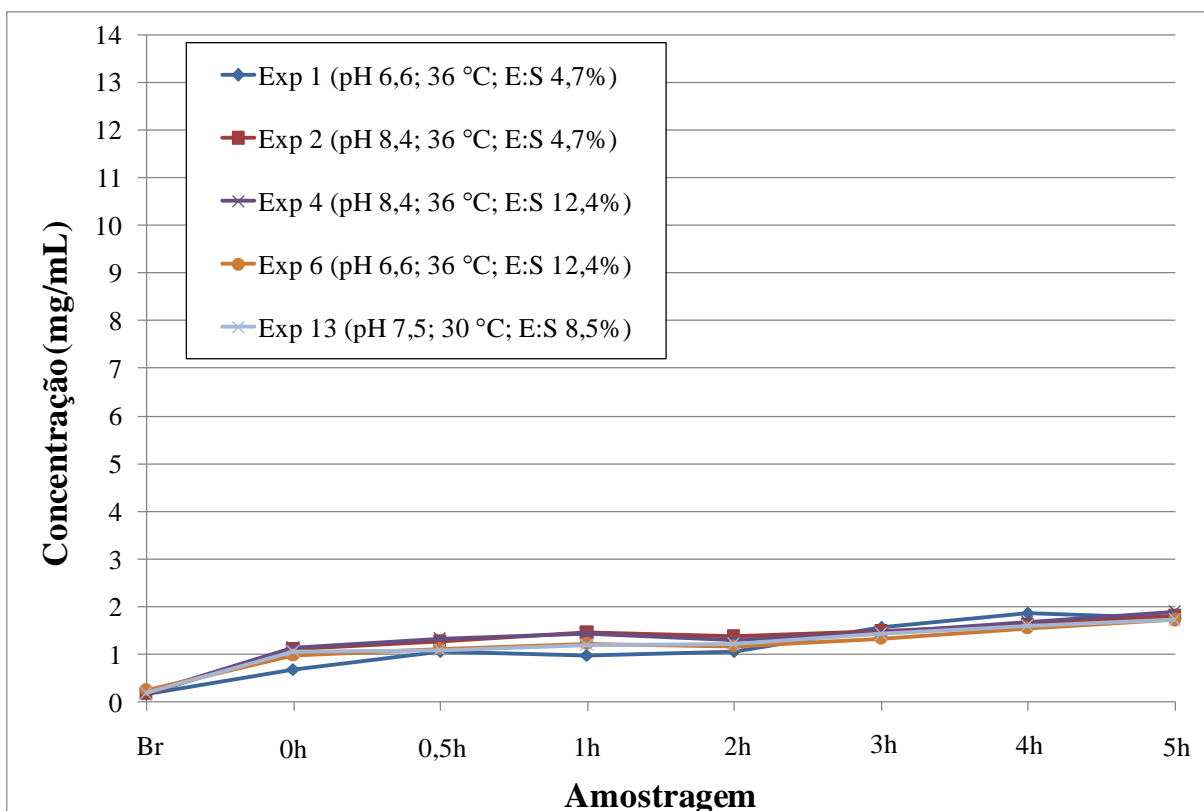
A média da concentração de aminoácidos aromáticos na suspensão antes do processo de hidrólise enzimática é de 0,17 mg/mL. Em um minuto de processo é possível se observar um aumento de aproximadamente 5 vezes nesse teor, e após uma hora de reação ocorre um aumento médio de 8 vezes do teor visto no branco. Porém, com o avanço da reação, um efeito de concentração das amostras, decorrente da perda de água em temperaturas mais elevadas, é sentido. Como exposto nos gráficos das Figuras 24, 25 e 26, vemos que os maiores teores de aminoácidos aromáticos em tempos avançados ocorrem nas maiores temperaturas do planejamento.



**Figura 24** - Gráficos de teor de aminoácidos aromáticos dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 4 mg/mL.



**Figura 25** - Gráficos de teor de aminoácidos aromáticos dos experimentos do planejamento na faixa final entre 4 e 2 mg/mL.



**Figura 26** - Gráficos de teor de aminoácidos aromáticos dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 2 mg/mL.

Utilizando carne mecanicamente separada de Tilápia, Antunes et. al. (2016) encontrou, após 5 horas de hidrólise com Alcalase, uma concentração de aminoácidos aromáticos livres de 0,15 mg/mL, sendo a concentração do branco aproximadamente 0,04 mg/mL, ou seja, um aumento de 3,75 ao fim da reação. Mellinger-Silva et. al. (2015), em seu estudo com hidrolisado de proteína isolada de soro de leite bovino com pepsina obteve, após 5 horas de processo, um teor de aminoácidos aromáticos livres próximo a 0,85 mg/mL, sendo o teor do branco igual a 0,25 mg/mL (aumento de 3,4x). Esses resultados observados na literatura corroboram com a hipótese de que os valores muito altos obtidos para tempos maiores de 2h de reação nesse estudo com Tira-Vira podem ser decorrentes da perda de água observada.

Mesmo cientes desse possível interferente, mantendo a lógica para o grau de hidrólise para avaliação estatística da significância dos parâmetros (pH, temperatura e razão E:S) e para a modelagem matemática, foram escolhidos três tempos de reação (1h, 3h e 4h). Os teores de aminoácidos aromáticos livres obtidos nesses tempos de acordo com o planejamento experimental da Tabela 2 e os valores preditos pelos modelos gerados se encontram na Tabela 8.

**Tabela 8** - Respostas de teor de aminoácidos aromáticos obtidas do planejamento fatorial 23 para os três tempos escolhidos.

Exp	Teor de aminoácidos aromáticos - AmAr (mg/mL)					
	1 hora de reação		3 horas de reação		4 horas de reação	
	Obs	Pred	Obs	Pred	Obs	Pred
1	0,98	0,98	1,57	1,59	1,85	1,57
2	1,44	1,36	1,49	1,33	1,62	1,25
3	1,56	1,56	2,68	2,79	2,95	4,39
4	1,44	1,50	1,44	1,46	1,67	1,43
5	1,52	1,66	2,52	2,84	4,40	5,71
6	1,21	1,27	1,33	1,38	1,54	1,05
7	1,37	1,37	2,29	2,44	3,74	4,92
8	1,64	1,70	3,39	3,54	4,67	5,89
9	1,51	1,52	1,89	1,89	2,23	1,47
10	1,77	1,68	4,34	3,99	12,04	9,43
11	1,82	1,65	2,46	2,21	3,04	2,43
12	1,27	1,17	1,76	1,52	2,16	1,59
13	1,19	1,19	1,41	1,53	1,59	2,87
14	1,23	1,30	1,73	1,75	2,32	1,61
15	1,35	1,33	1,85	1,78	2,60	2,56
16	1,39	1,33	1,88	1,78	2,67	2,56
17	1,23	1,33	1,56	1,78	2,18	2,56

Os resultados obtidos a partir da análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 95%, feita para o teor de aminoácidos aromáticos livres nos três tempos escolhidos se encontram na Tabela 9. Através do teste F de Fisher e do p-valor ( $p < 0,05$ ), observa-se em uma hora a significância dos três parâmetros estudados, ocorrendo um aumento do teor de aminoácidos com o aumento tanto do pH, quanto da temperatura e da razão E:S. Em três e quatro horas, apenas a temperatura foi um parâmetro significativo para o processo, mostrando um peso maior ainda para quatro horas. Não foram encontradas referências na literatura sobre a influência do pH, da temperatura e da razão E:S no teor de aminoácidos aromáticos, porém alguns estudos correlacionaram o grau de hidrólise obtido pelo método pH-stat e o teor de tirosina livre, com o objetivo de observar o avanço da reação. Em seu trabalho com hidrolisado da espécie de peixe *Micropogonias furnieri* com três enzimas (Alcalase, Flavourzyme e Protamex), Silva, Fonseca e Prentice (2014) quantificaram a porcentagem de tirosina livre por um método diferente que o apresentado neste trabalho e observaram que o hidrolisado com maior porcentagem de tirosina livre também era o hidrolisado com maior grau de hidrólise. Fonseca et al. (2016), em um trabalho similar ao feito com *Micropogonias furnieri* e utilizando a espécie *Rachycentron canadum* com as mesmas enzimas, observou que o hidrolisado que apresentava uma maior porcentagem de tirosina livre não era o mesmo que apresentava o maior grau de hidrólise, assim como neste trabalho, mostrando que entre cada substrato e cada enzima existem comportamentos diferentes. Com o resíduo de tira-vira, observamos que não há uma relação direta entre grau de hidrólise e teor de aminoácidos aromáticos, sendo o pH visto como o fator mais importante para o GH e a temperatura para o teor destes aminoácidos.

**Tabela 9** - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de teor de aminoácidos aromáticos obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos.

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>1 hora de reação</b>					
pH (L)	0,15	1	0,15	10,24	0,015
pH (Q)	0,00	1	0,00	0,02	0,880
T (L)	0,30	1	0,30	20,77	0,003
T (Q)	0,02	1	0,02	1,11	0,327
E:S (L)	0,15	1	0,15	10,62	0,014
E:S (Q)	0,03	1	0,03	2,18	0,184
pH x T	0,02	1	0,02	1,30	0,291
pH x E:S	0,01	1	0,01	0,79	0,403
T x E:S	0,00	1	0,00	0,00	0,987
<b>Resíduo</b>	0,10	7	0,01		
<b>Total</b>	0,76	16			
<b>3 horas de reação</b>					
pH (L)	0,16	1	0,16	2,26	0,176
pH (Q)	0,01	1	0,01	0,09	0,772
T (L)	7,30	1	7,30	100,51	0,000
T (Q)	1,36	1	1,36	18,71	0,003
E:S (L)	0,25	1	0,25	3,46	0,105
E:S (Q)	0,06	1	0,06	0,78	0,407
pH x T	0,19	1	0,19	2,59	0,152
pH x E:S	0,06	1	0,06	0,79	0,402
T x E:S	0,19	1	0,19	2,57	0,153
<b>Resíduo</b>	0,51	7	0,07		
<b>Total</b>	10,21	16			
<b>4 horas de reação</b>					
pH (L)	0,02	1	0,02	0,01	0,935
pH (Q)	1,48	1	1,48	0,59	0,468
T (L)	51,93	1	51,93	20,71	0,003
T (Q)	18,20	1	18,20	7,26	0,031
E:S (L)	0,81	1	0,81	0,32	0,587
E:S (Q)	0,41	1	0,41	0,16	0,698
pH x T	0,02	1	0,02	0,01	0,928
pH x E:S	0,25	1	0,25	0,10	0,762
T x E:S	0,86	1	0,86	0,34	0,576
<b>Resíduo</b>	17,55	7	2,51		
<b>Total</b>	98,43	16			

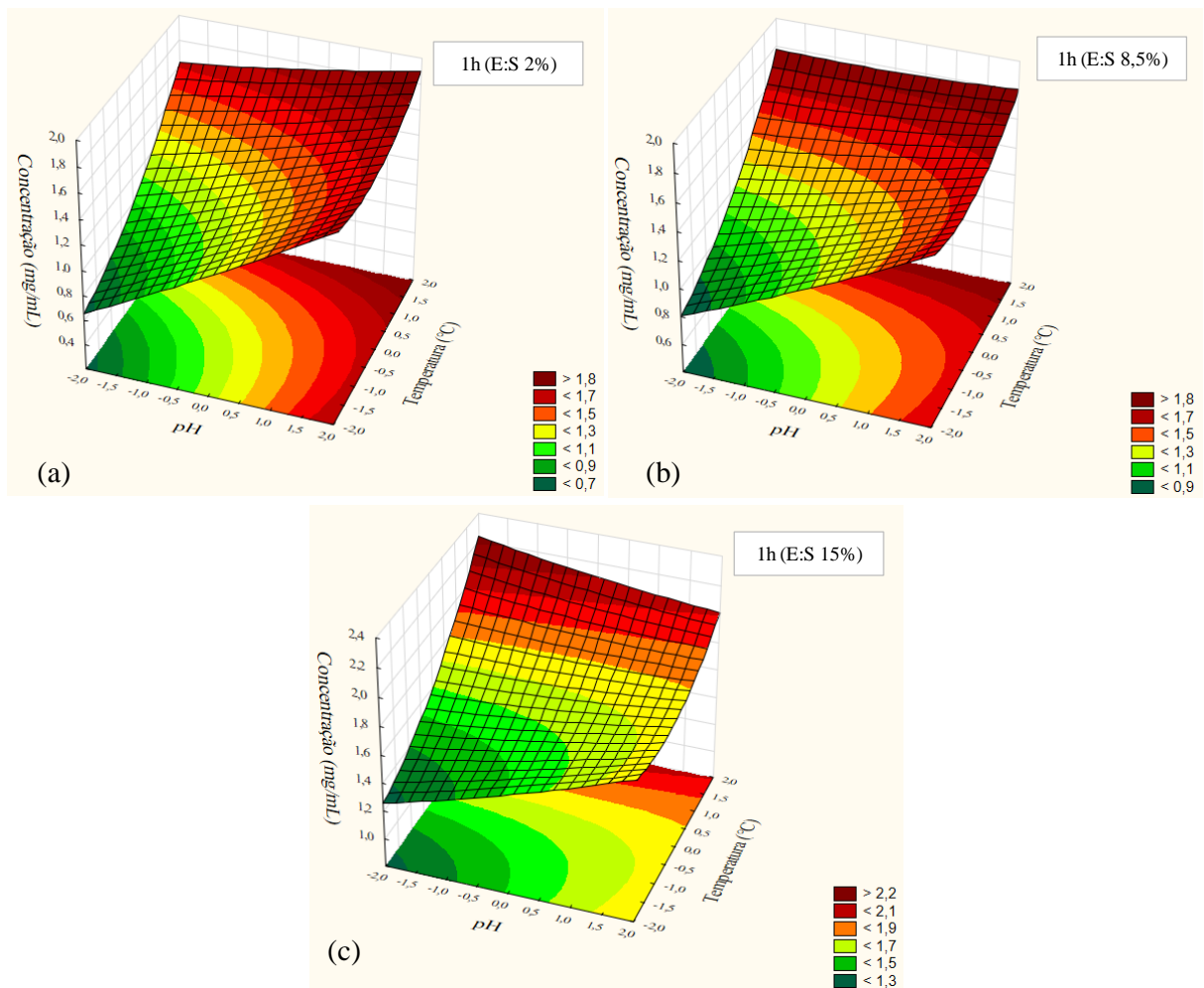
A modelagem matemática, feita com base nos dados obtidos no planejamento para 1, 3 e 4 horas, resultou nas Equações 12, 13 e 14, respectivamente. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos foram 0,8692 para 1 hora de reação; 0,9502 para 3 horas de reação e 0,8217 para 4 horas de reação. Se baseado nestes valores de  $R^2$ , as equações gerada poderiam ser consideradas satisfatórias para descrever o processo.

$$\text{AmAr1h} = 1,33 + 0,10 \times \text{pH} + 0,15 \times \text{T} + 0,10 \times \text{E:S} \quad (12)$$

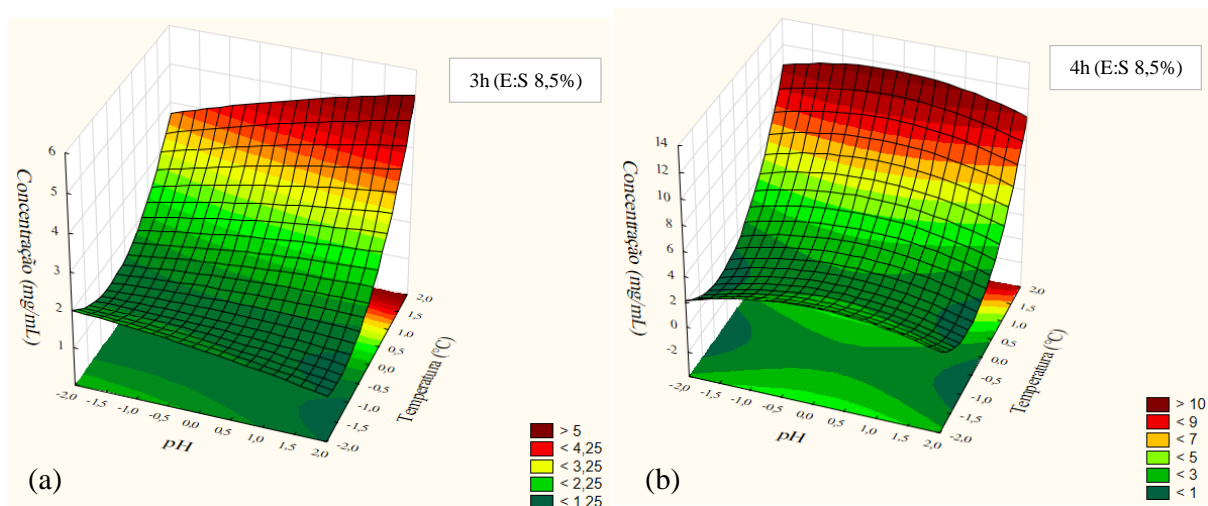
$$\text{AmAr3h} = 1,78 + 0,73 \times \text{T} + 0,35 \times \text{T}^2 \quad (13)$$

$$\text{AmAr4h} = 2,56 + 1,95 \times T + 1,27 \times T^2 \quad (14)$$

As superfícies de resposta geradas a partir dos modelos obtidos para o teor de aminoácidos aromáticos livres estão apresentadas nas Figuras 27 e 28. Com a finalidade de se encontrar uma condição ótima para que o processo retorne a maior concentração de aminoácidos aromáticos possível, foi feita uma análise das superfícies, levando em consideração o custo operacional do processo. Observa-se nos três tempos que o aumento na temperatura leva a um aumento na concentração, logo essa é uma variável sensível para processo. Como o aumento na concentração obtido com a variação do pH e da razão E:S é muito discreto, utilizou-se para validar o modelo as mesmas condições consideradas ótimas para o grau de hidrólise (pH 6, 60°C e E:S 8,5%).



**Figura 27** - Superfícies de resposta para o teor de aminoácidos aromáticos nas condições: (a) 1 hora e E:S 2%, (b) 1 hora e E:S 8,5% e (c) 1 hora e E:S 15%.



**Figura 28** - Superfícies de resposta para o teor de aminoácidos aromáticos nas condições: (a) 3 horas e E:S 8,5% e (b) 4 horas e E:S 8,5%.

O ponto de pH 6, 60 °C e E:S 8,5% foi testado experimentalmente e os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 10. O único modelo validado experimentalmente foi o gerado para uma hora de reação. Para os outros dois modelos observamos um desvio muito alto, sendo o valor observado muito abaixo do predito, porém dentro do normal visto na literatura.

**Tabela 10** - Dados experimentais e preditos para a validação dos modelos de teor de aminoácidos aromáticos livres (mg/mL).

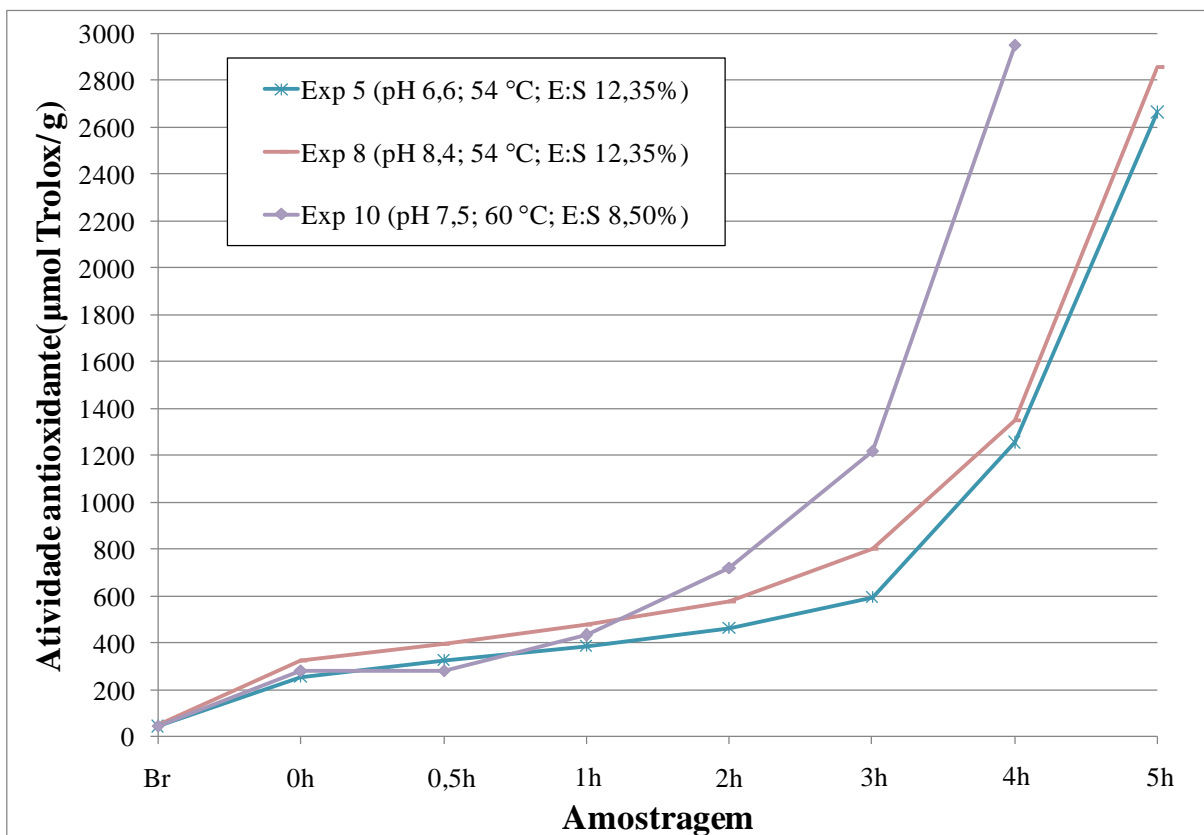
	AmAr observado	AmAr predito	Valor residual
<b>1 hora de reação</b>	1,45	1,40	0,05
<b>3 horas de reação</b>	1,64	3,99	2,35
<b>4 horas de reação</b>	1,89	9,43	7,54

Através dos dados experimentais obtidos no ponto ótimo, onde o branco apresentou um valor de 0,19 mg/mL, vemos o avanço da hidrólise, onde o teor de aminoácidos aromáticos cresce mais de 7 vezes após uma hora de reação, chegando a crescer quase 10 vezes após 4 horas. Como já citado, nos valores observados não há uma relação direta entre grau de hidrólise e teor de aminoácidos aromáticos. No entanto, observa-se uma queda do avanço dessas duas respostas a partir de uma hora de processo e também uma influência positiva de temperatura e da razão E:S. A principal diferença vista entre essas respostas é o pH, em que faixas próximas a 6 apresentam os maiores valores de grau de hidrólise e em faixas próximas a 8,4 ocorre um ganho no teor de aminoácidos aromáticos. Para a Alcalase, uma protease alcalina, espera-se que as maiores respostas de atividade sejam em pH próximo a 8, o que pode justificar esse comportamento no teor de aminoácidos aromáticos.

#### 4.2.2.3 Atividade Antioxidante

A atividade biológica de interesse neste estudo foi a capacidade antioxidante que o hidrolisado proteico de resíduo de Tira-Vira apresenta. Para isso as amostras de hidrolisado foram analisadas pelo método de seqüestro de radical peroxila (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity* - ORAC). A atividade antioxidante observada em 5 horas de processo varia entre 397 e 2860  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Para o ponto 10 (pH 7,5; 60 °C, E:S 8,5%) que só atingiu 4 horas

de processo e a atividade antioxidante foi de 2953  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , conforme visto nas Figuras 29, 30 e 31.



**Figura 29** - Gráficos de atividade antioxidante dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 2000  $\mu\text{mol Trolox/g}$ .



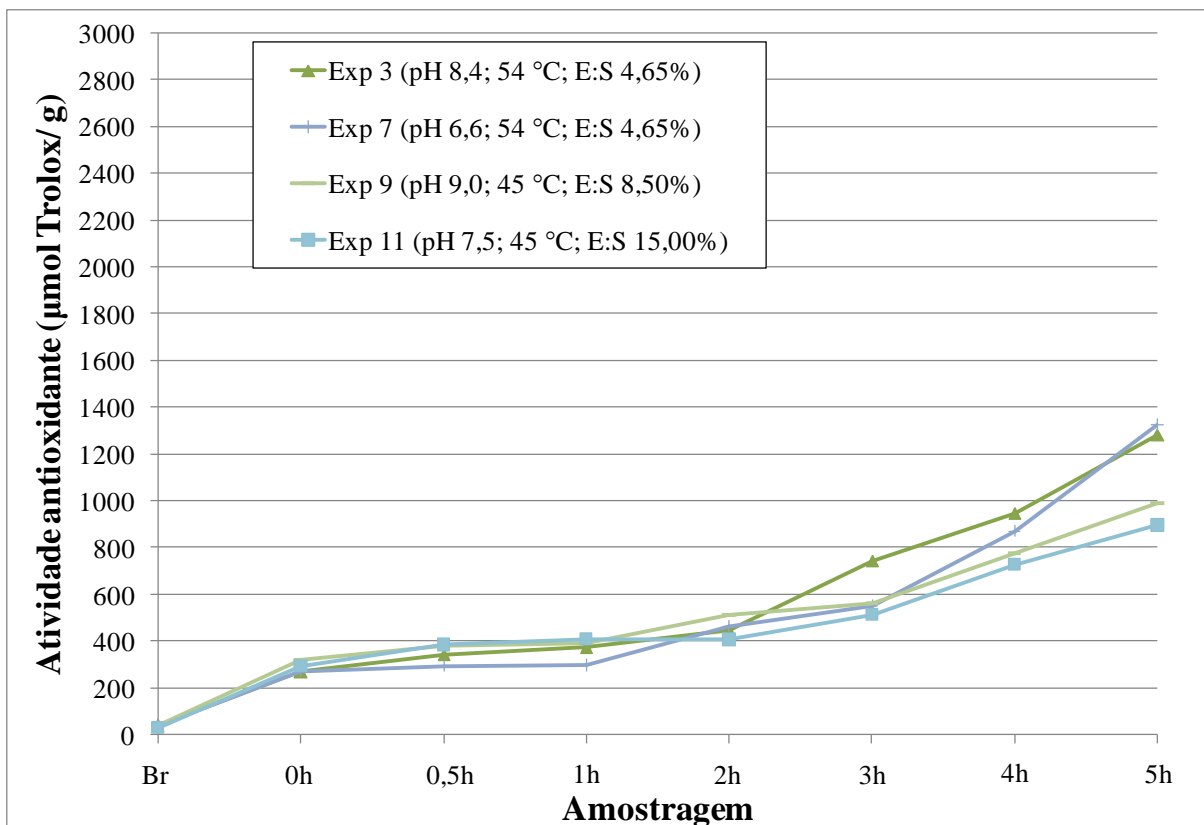


Figura 30 - Gráficos de atividade antioxidante dos experimentos do planejamento na faixa final entre 2000 e 800  $\mu\text{mol Trolox/g}$ .

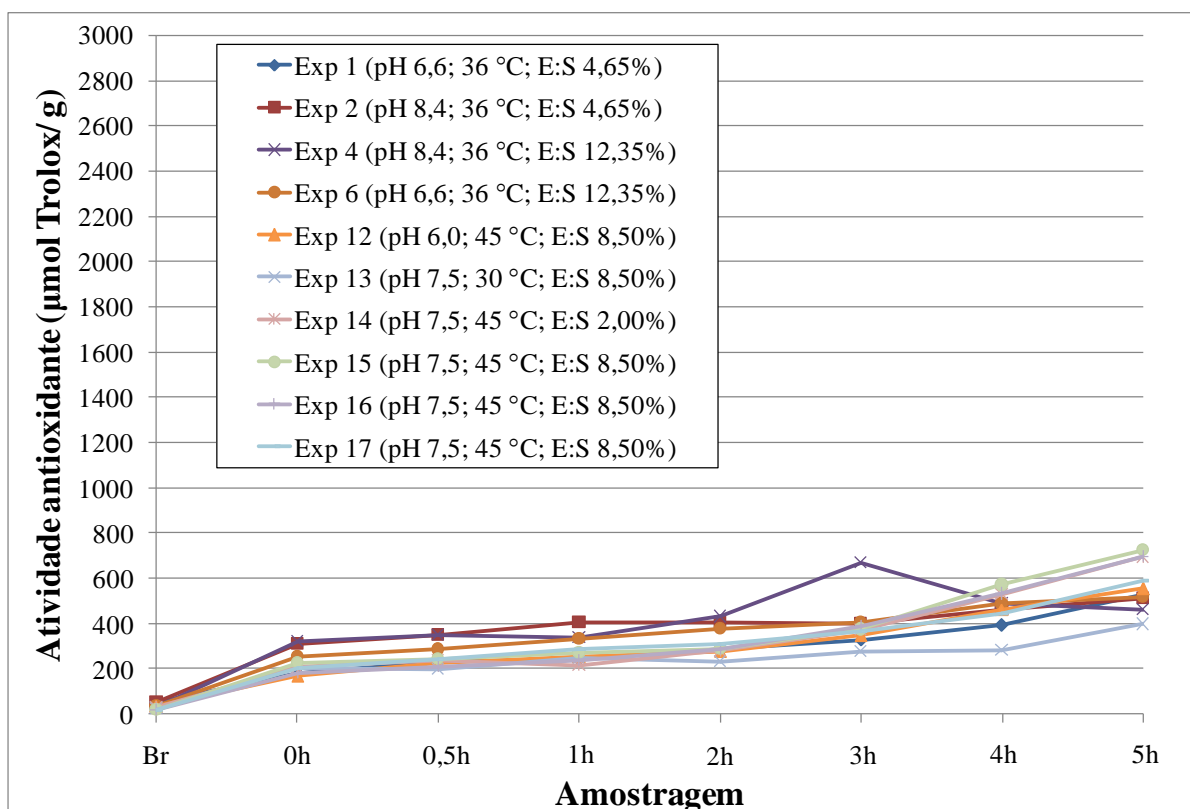


Figura 31 - Gráficos de atividade antioxidante dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 800  $\mu\text{mol Trolox/g}$ .

A atividade antioxidante inicial observada é em média 35  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , subindo aproximadamente 7 vezes com um minuto de hidrólise e 9 vezes com uma hora de hidrólise. Com o avanço do tempo de reação, nota-se o aumento da atividade antioxidante das amostras, porém resultados em altas temperaturas se mostraram muito acima do valor obtido nesse estudo em temperaturas mais baixas e valores observados na literatura. A média de atividade antioxidante obtida nesse estudo, no entanto, se mostra dentro do já observado para outras matrizes proteicas e enzimas utilizadas.

Bernardi et al. (2016) produziu hidrolisado proteico a partir de cabeças e carcaças evisceradas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com a enzima Alcalase. Através do método ORAC, foi observada uma atividade antioxidante de 338  $\mu\text{mol Trolox/g}$  após 3 horas e 20 min de reação. Diante da boa resposta obtida pelo método ORAC, que apresenta uma melhor correlação com condições fisiológicas, o efeito antioxidante do hidrolisado foi testado em mini hamburger feito de carne e gordura de porco. Apesar do efeito antioxidante do hidrolisado ser menor que o de um antioxidante sintético, o hidrolisado conseguiu atrasar a oxidação após 7 dias de armazenamento. Em 3 horas de reação, valores superiores de atividade antioxidante foram alcançados para os hidrolisados proteicos de tira-vira, o que indica que os mesmos têm potencial para aplicação em formulações de alimentos.

Estudando a atividade antioxidante in vitro de hidrolisado de bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*), Girgih et al. (2015) submeteram o bacalhau mecanicamente desossado a uma hidrólise com pepsina por 12h e posteriormente uma hidrólise com uma mistura de tripsina e quimotripsina por 4h. Após esse processo, a atividade antioxidante do hidrolisado resultante foi de 613  $\mu\text{mol Trolox/g}$  pelo método ORAC. Com resíduo de tira-vira, que foi conduzido com a protease Alcalase, em um tempo de hidrólise de muito menor (5 horas) do que o total de 16 horas do estudo com bacalhau, foram alcançados valores superiores. Em condições brandas (pH 7,5, 45 °C e E:S 2%), após 5 horas, foi atingindo o valor de 695  $\mu\text{mol Trolox/g}$  utilizando o resíduo de tira-vira e a Alcalase.

Utilizando carne mecanicamente separada de Tilápia, Antunes et al. (2016) obtiveram, após 5h de hidrólise com Alcalase, um grau de hidrólise de 41% e a atividade antioxidante de 700  $\mu\text{mol Trolox/g}$  utilizando o método ABTS, sendo a atividade do branco aproximadamente 25  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Apesar do radical e método serem diferentes, é possível observar que o aumento da atividade antioxidante em ambas as matrizes foi parecido, demonstrando que a enzima Alcalase leva a uma melhoria nessa atividade biológica dos hidrolisados.

Neves et al. (2017), em seu estudo com extração proteica de aparas de salmão (*Salmo salar*) e posterior hidrólise por 4 horas, obtiveram uma atividade antioxidante de 198  $\mu\text{mol Trolox/g}$  por ORAC na proteína extraída. Após a hidrólise com Alcalase, obtiveram um grau de hidrólise de 18,3% e a atividade antioxidante de 640  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (ganho de 3,2x). Com uma mistura de Alcalase e Flavourzyme, o grau de hidrólise e a atividade antioxidante obtidos foram 16% e 620  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (3,1 x). Já com a utilização da Corolase, observou-se um grau de hidrólise de 24,3% e uma atividade antioxidante de 659  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (3,3x). E finalmente a hidrólise com a enzima Promod resultou em um grau de hidrólise de 22,1% e uma atividade de 883  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (4,6x). Comparando os dados de Neves com os obtidos na hidrólise de tira-vira, utilizando Alcalase, em tira-vira foi possível alcançar maiores ganhos de GH e atividade antioxidante. Essas diferenças podem estar relacionadas às condições de hidrólise, que para a produção de hidrolisado de salmão foram pH 7, 50 °C e razão E:S 1%. As matrizes utilizadas em cada trabalho também podem influenciar, visto que o resíduo de tira-vira é constituído em sua maior parte de músculo, já as aparas de salmão contêm osso, pele e músculo.

Outro efeito interessante que pode ser observado é a relação da atividade antioxidante com o teor de aminoácidos aromáticos. Todos os aminoácidos obtidos biologicamente são potencialmente oxidáveis, porém aminoácidos com cadeias laterais contendo enxofre

nucleofílico (cisteína e metionina) ou cadeias laterais aromáticas (triptofano, tirosina e fenilalanina) se mostram mais reativos, pois o hidrogênio é facilmente retirado (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008). Neste estudo, observou-se que as condições reacionais com um maior crescimento do teor de aminoácidos aromáticos geralmente apresentavam também um crescimento na atividade antioxidante.

Os tempos de 1, 3 e 4 horas de reação foram utilizados para a avaliação dos parâmetros pH, temperatura e razão E:S e posterior modelagem matemática utilizando o modelo da Equação 8. A atividade antioxidante obtida para o planejamento experimental exposto na Tabela 2 nesses tempos e os valores preditos pelos modelos estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Respostas de atividade antioxidante obtidas do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para os três tempos escolhidos.

Exp	Atividade Antioxidante – AA (µmol Trolox/ g)					
	1 hora de reação		3 horas de reação		4 horas de reação	
	Obs	Pred	Obs	Pred	Obs	Pred
1	242	228	328	252	393	286
2	406	348	401	346	463	386
3	373	381	743	785	946	1281
4	339	349	671	561	489	389
5	385	420	594	646	1253	1490
6	332	302	408	365	487	312
7	297	264	553	661	871	1131
8	474	466	799	873	1352	1618
9	390	407	564	592	777	601
10	432	419	1219	1053	2953	2377
11	408	393	514	529	728	669
12	254	268	348	323	461	410
13	248	292	279	447	283	633
14	214	261	373	360	531	364
15	271	263	375	376	572	529
16	238	263	388	376	533	529
17	286	263	365	376	443	529

A ANOVA, com nível de confiança de 95%, feita para a atividade antioxidante nos três tempos escolhidos se encontra na Tabela 12. Através do teste F de Fisher e do p-valor ( $p < 0,05$ ), observa-se em uma hora a significância dos três parâmetros estudados, sendo que pH e razão E:S apresentam apenas efeitos lineares e a temperatura apresenta efeitos linear e quadrático. Em 3 e 4 horas observa-se o crescente efeito da temperatura, sendo em 3 horas o pH e a temperatura significativos e em 4 horas apenas a temperatura significativa. A redução dos efeitos das demais variáveis analisadas, permanecendo apenas a temperatura, reforça a teoria observada para o teor de aminoácido, de que em altas temperaturas, a concentração da amostra provocada pela alta temperatura pode interferir na análise de efeitos definida pelo planejamento experimental. A única variável resposta que não foi prejudicada com essa concentração foi o grau de hidrólise, pois o método pH-stat leva em conta o número de ligações peptídicas existentes no substrato e quantas dessas ligações são quebradas, o que não é alterado pela perda de água por evaporação no processo.

**Tabela 12** - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais de atividade antioxidante obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos.

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>1 hora de reação</b>					
pH (L)	23320,2	1	23320,2	12,33	0,010
pH (Q)	7819,7	1	7819,7	4,14	0,081
T (L)	19714,8	1	19714,8	10,43	0,014
T (Q)	12021,7	1	12021,7	6,36	0,040
E:S (L)	21303,1	1	21303,1	11,27	0,012
E:S (Q)	5756,4	1	5756,4	3,04	0,125
pH x T	2,7	1	2,7	0,00	0,971
pH x E:S	2608,8	1	2608,8	1,38	0,279
T x E:S	3444,3	1	3444,3	1,82	0,219
<b>Resíduo</b>	13237,6	7	1891,1		
<b>Total</b>	100183,2	16			
<b>3 horas de reação</b>					
pH (L)	87542,5	1	87542,5	5,99	0,044
pH (Q)	9269,0	1	9269,0	0,63	0,452
T (L)	443399,3	1	443399,3	30,36	0,001
T (Q)	197102,4	1	197102,4	13,49	0,008
E:S (L)	34262,4	1	34262,4	2,35	0,169
E:S (Q)	6577,7	1	6577,7	0,45	0,524
pH x T	444,4	1	444,4	0,03	0,866
pH x E:S	5263,2	1	5263,2	0,36	0,567
T x E:S	8109,9	1	8109,9	0,56	0,480
<b>Resíduo</b>	102240,6	7	14605,8		
<b>Total</b>	881745,2	16			
<b>4 horas de reação</b>					
pH (L)	44028	1	44028	0,35	0,575
pH (Q)	728	1	728	0,01	0,942
T (L)	3670876	1	3670876	28,79	0,001
T (Q)	1342651	1	1342651	10,53	0,014
E:S (L)	112191	1	112191	0,88	0,379
E:S (Q)	203	1	203	0,00	0,969
pH x T	1287	1	1287	0,01	0,923
pH x E:S	243	1	243	0,00	0,966
T x E:S	55909	1	55909	0,44	0,529
<b>Resíduo</b>	892688	7	127527		
<b>Total</b>	6355003	16			

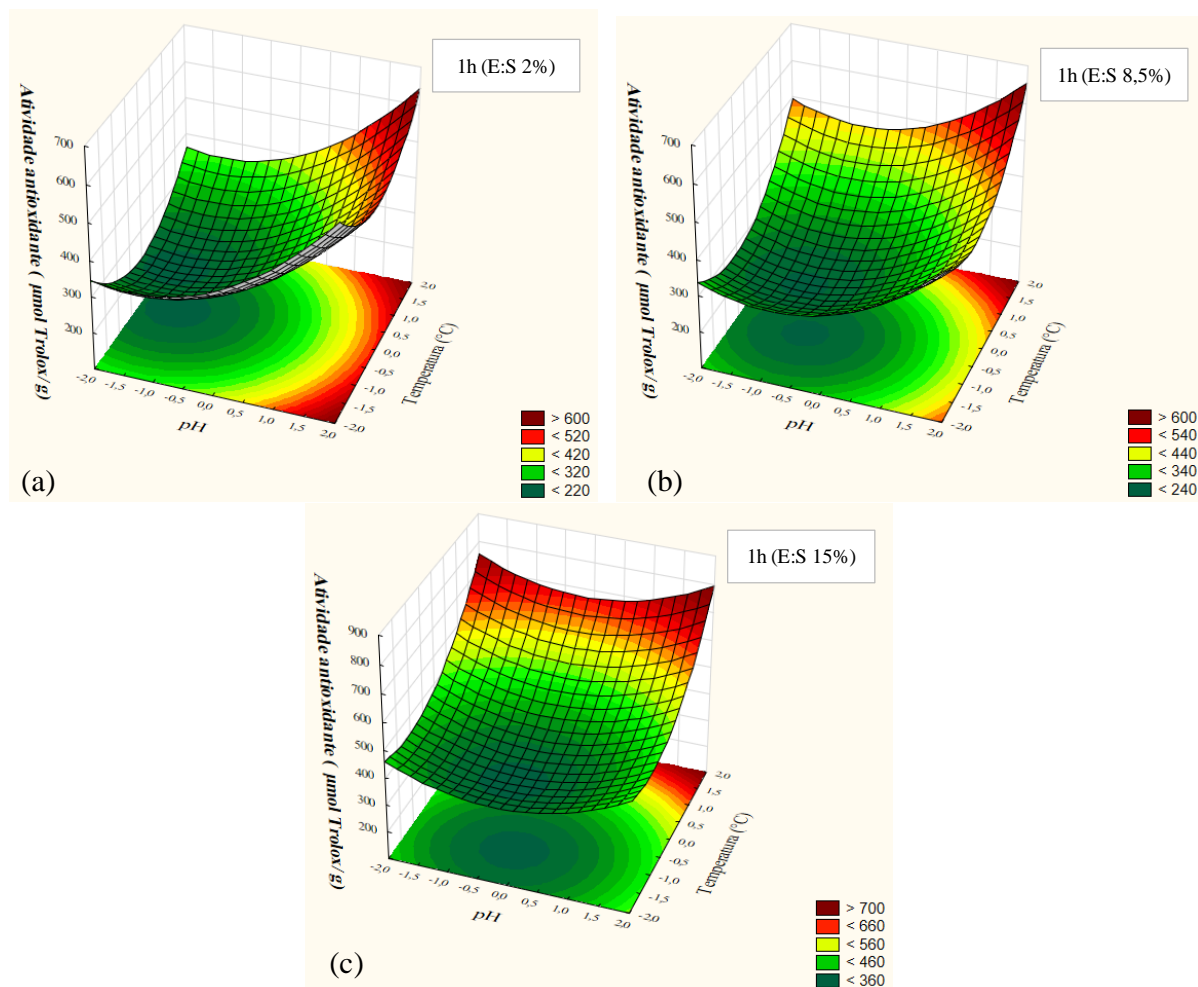
Nas Equações 15, 16 e 17, estão apresentados os modelos gerados a partir dos dados obtidos no planejamento para 1, 3 e 4 horas, respectivamente. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos foram 0,8679 para 1 hora de reação; 0,8840 para 3 horas de reação e 0,8595 para 4 horas de reação. Diante desses coeficientes de determinação, os três modelos podem ser considerados satisfatórios para descrever o processo.

$$AA1h = 263 + 41 \times \text{pH} + 38 \times T + 33 \times T^2 + 39 \times E:S \quad (15)$$

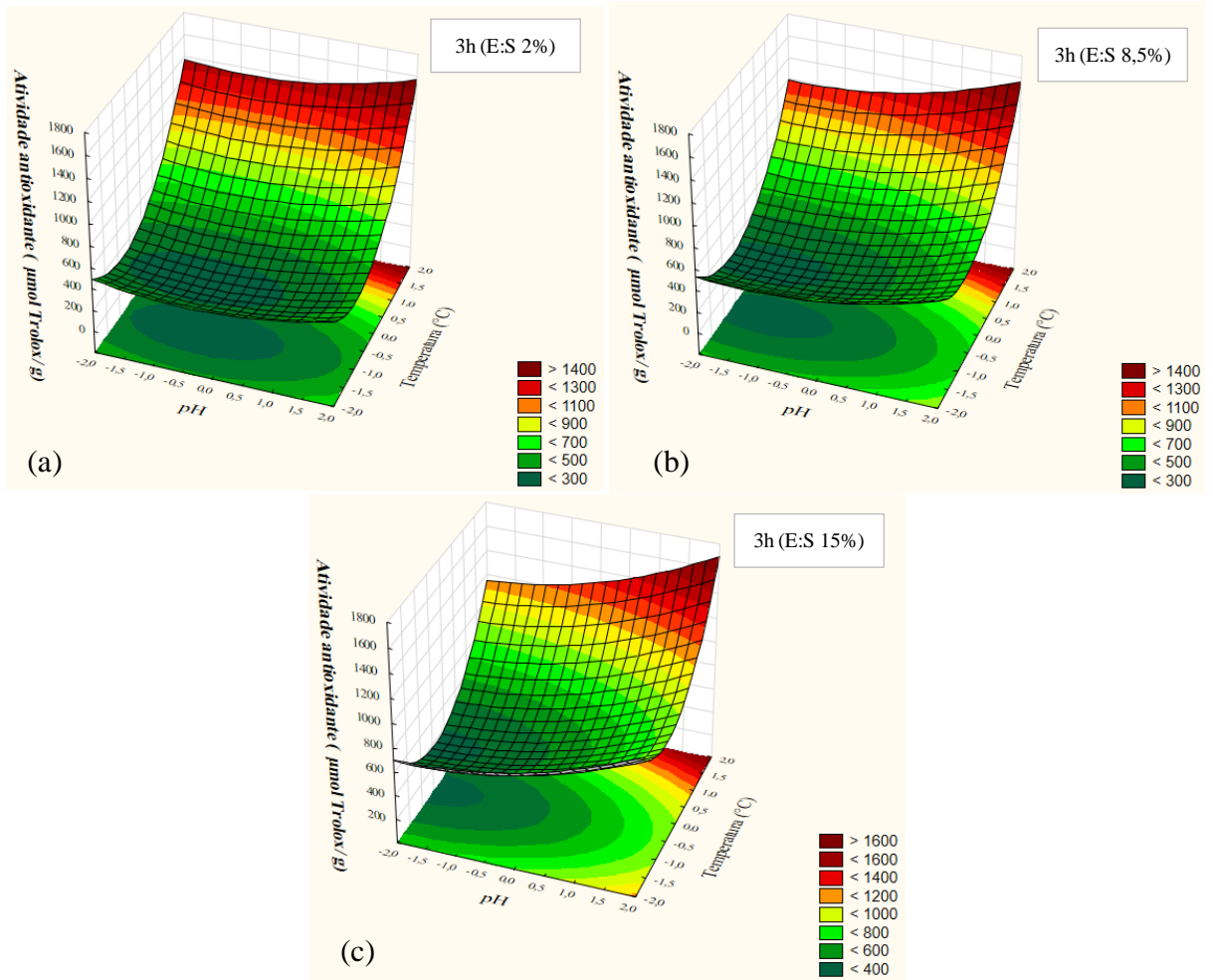
$$AA3h = 376 + 80 \times \text{pH} + 180 \times T + 132 \times T^2 \quad (16)$$

$$AA_{4h} = 529 + 518 \times T + 345 \times T^2 \quad (17)$$

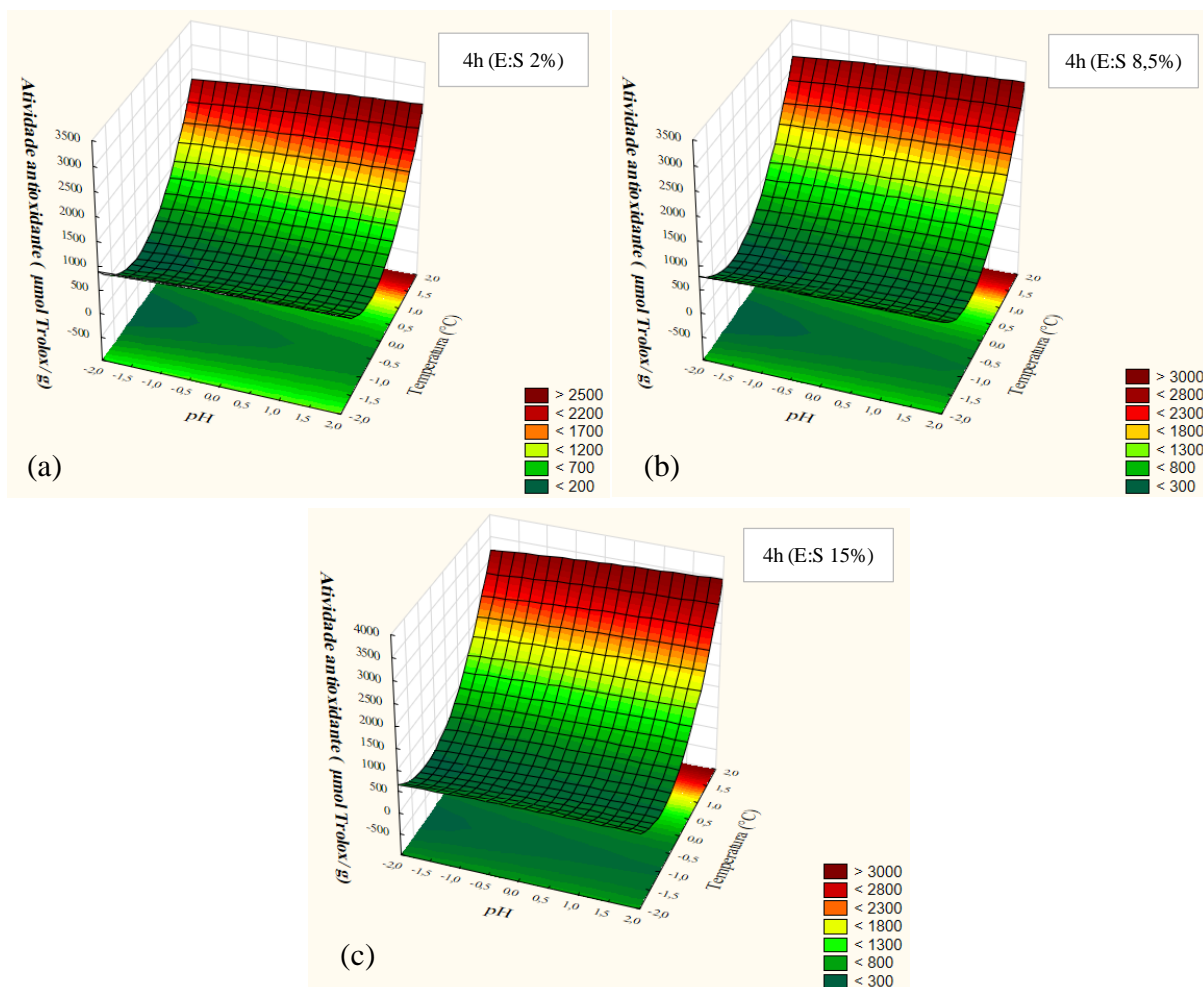
A partir dos modelos obtidos para atividade antioxidante, foram geradas superfícies de resposta que podem ser vistas nas Figuras 32, 33 e 34. Analisando as superfícies, é possível observar que em pH em torno de 8 a 9 e uma temperatura de 60 °C uma maior atividade antioxidante pode ser obtida. Para a razão E:S, apesar de seu aumento acarretar num crescimento da atividade antioxidante, é suficiente 8,5% para se obter bons resultados. Esse comportamento foi observado também na concentração de aminoácidos aromáticos, reforçando a teoria de uma relação entre essas duas características dos hidrolisados.



**Figura 32** - Superfícies de resposta para a atividade antioxidante nas condições: (a) 1 hora e E:S 2%, (b) 1 hora e E:S 8,5% e (c) 1 hora e E:S 15%.



**Figura 33** - Superfícies de resposta para a atividade antioxidante nas condições: (a) 3 horas e E:S 2%, (b) 3 horas e E:S 8,5%, (c) 3 horas e E:S 15%.



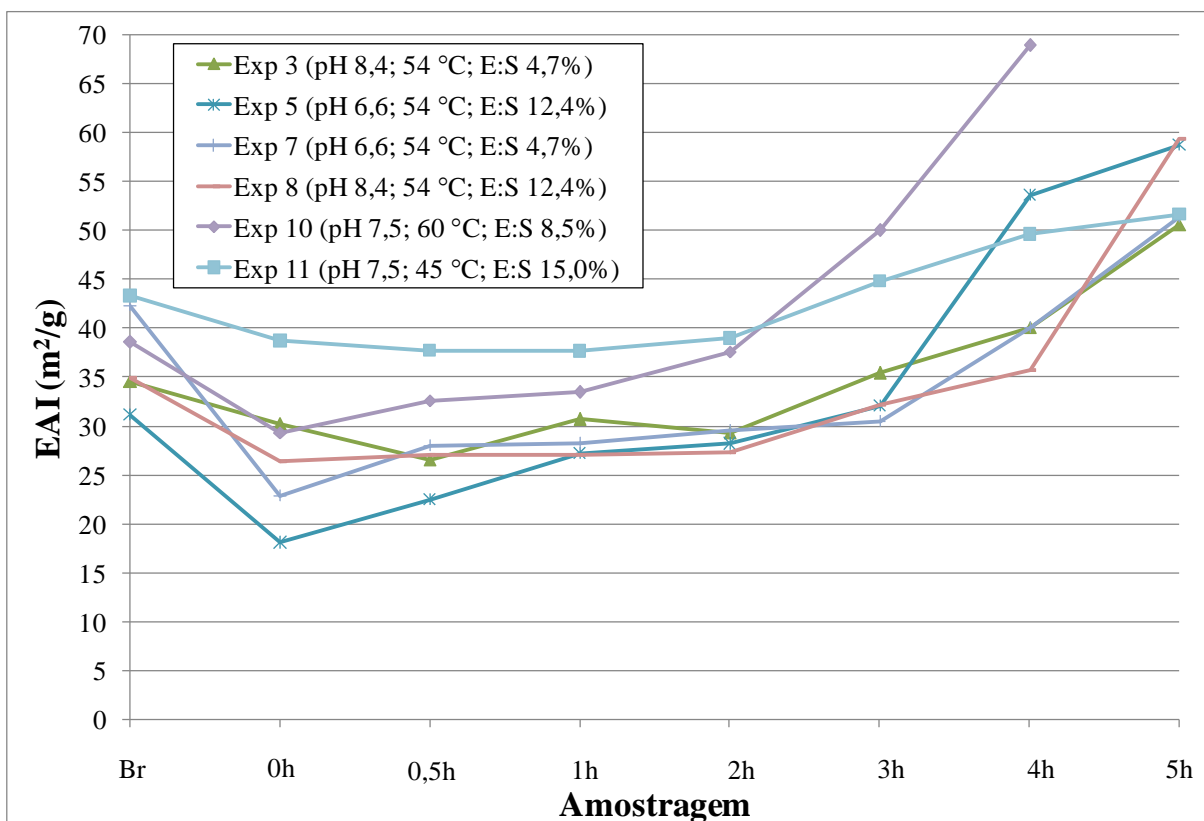
**Figura 34** - Superfícies de resposta para a atividade antioxidante nas condições: (a) 4 horas e E:S 2%, (b) 4 horas e E:S 8,5% e (c) 4 horas e E:S 15%.

O ponto de pH 6, 60 °C e E:S 8,5%, assim como nas outras respostas, foi escolhido para a verificação da validade dos modelos. Um problema técnico com o equipamento R Chisto (Infinite M200, Tecan®, Suíça), utilizado para a análise, inviabilizou essa confirmação. A análise do teor aminoácidos aromáticos apontou que o efeito da concentração das amostras devido à perda de água ao longo da reação provavelmente ocorreu. O esperado para as amostras do ponto de validação seria obter valores menores de atividade antioxidante que os vistos para 60 °C no planejamento, que se apresentaram acima de 2000 µmol Trolox/g, porém, mantendo ainda uma boa atividade antioxidante.

#### 4.2.2.4 Propriedades Emulsificantes

Propriedades emulsificantes são importantes funcionalidades de proteínas e de alguns dos hidrolisados proteicos. Neste estudo, a capacidade que proteína/polipeptídeos/peptídeos de CMS de tira-vira possuem em auxiliar na formação e na estabilização da emulsão foram estudadas utilizando o índice de atividade emulsificante (EAI - *emulsifying activity index*) e o índice de estabilidade da emulsão (ESI - *emulsion stability index*), medidos através do método turbidimétrico a um comprimento de onda de 500 nm de Pearce e Kinsella (1978) e um pH 7 ajustado por meio de tampão fosfato de sódio. O EAI observado em 5 horas de processo varia entre 25,7 e 59,3 m<sup>2</sup>/g de amostra (Figuras 35, 36 e 37). Para o ponto 10 (pH 7,5; 60 °C, E:S 8,5%), em que a reação foi interrompida em 4 horas, obteve-se 68,9 m<sup>2</sup>/g. Os brancos dos

experimentos (apenas o resíduo diluído e processado) tiveram uma média de 36,5 m<sup>2</sup>/g de EAI. O comportamento esperado para o EAI seria um aumento nas amostras retiradas no início da reação e conforme a hidrólise avançasse, ocorreria o decaimento dos valores. Isso porque, até um determinado grau de hidrólise, o aumento do mesmo levaria a uma maior exposição de grupos hidrofóbicos internos facilitando sua interação com os lipídeos (CHOBERT; BERTRAND-HARB; NICOLAS, 1988). Apesar dessa influência positiva até certo ponto, um avanço muito grande na hidrólise pode levar a quedas bruscas na capacidade emulsificante das proteínas, visto que pequenos peptídeos se difundem e absorvem rapidamente na interface, porém eles são menos eficientes em diminuir a tensão interfacial, visto que não possuem a mesma capacidade que peptídeos maiores tem de se desdobrar e reorientar na interface (PACHECO-AGUILAR; RAMÍREZ-SUÁREZ; MAZORRA-MANZANO, 2008). Esse comportamento esperado, no entanto, não é observado para todas as amostras. O provável aumento na concentração de proteína nos hidrolisados ao longo do tempo de reação, decorrente das perdas de água por evaporação, não foi acompanhado na execução da análise, onde a diluição 1:10 foi padronizada para todas as amostras. Provavelmente, essa foi a causa dos ganhos muito altos de EAI observados nas amostras retiradas nas horas finais de reação.



**Figura 35** - Gráficos de Índice de atividade emulsificante (EAI - *emulsifying activity index*) dos experimentos do planejamento na faixa final maior que 50 m<sup>2</sup>/g.



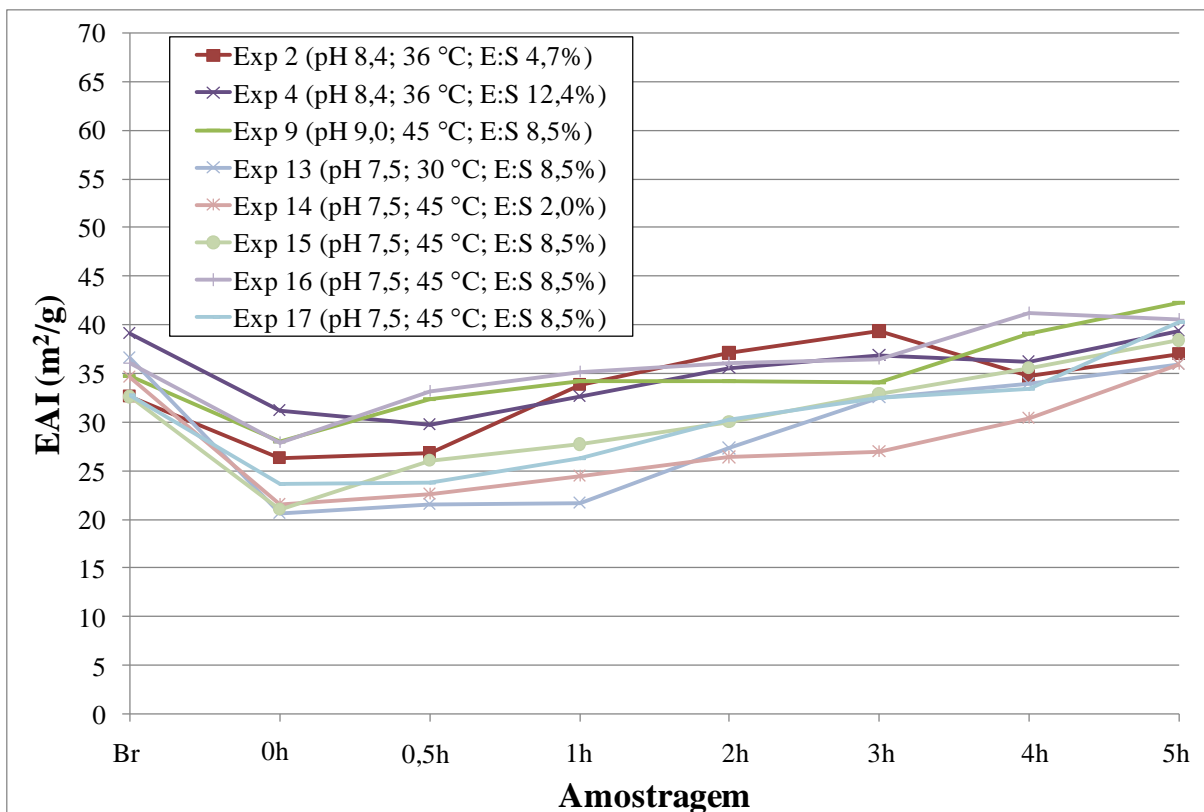


Figura 36 - Gráficos de Índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) dos experimentos do planejamento na faixa final entre 50 e 30 m<sup>2</sup>/g.

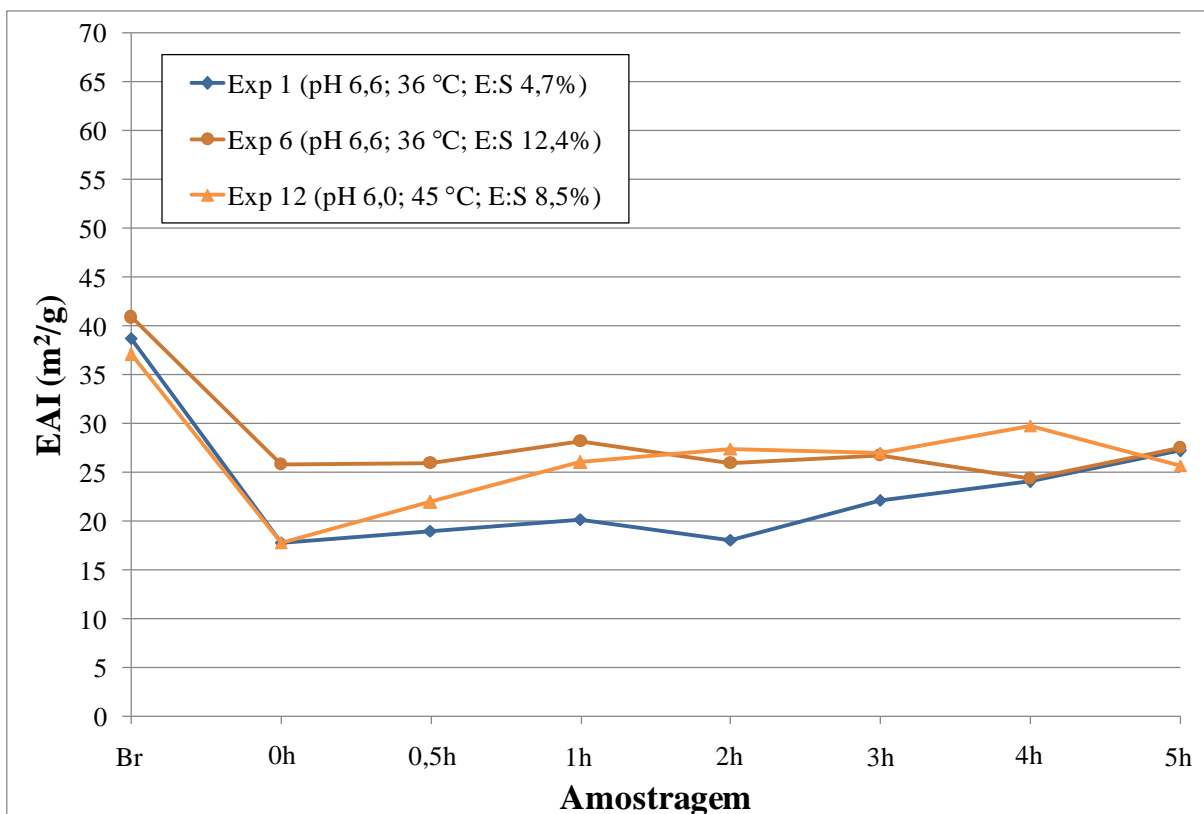
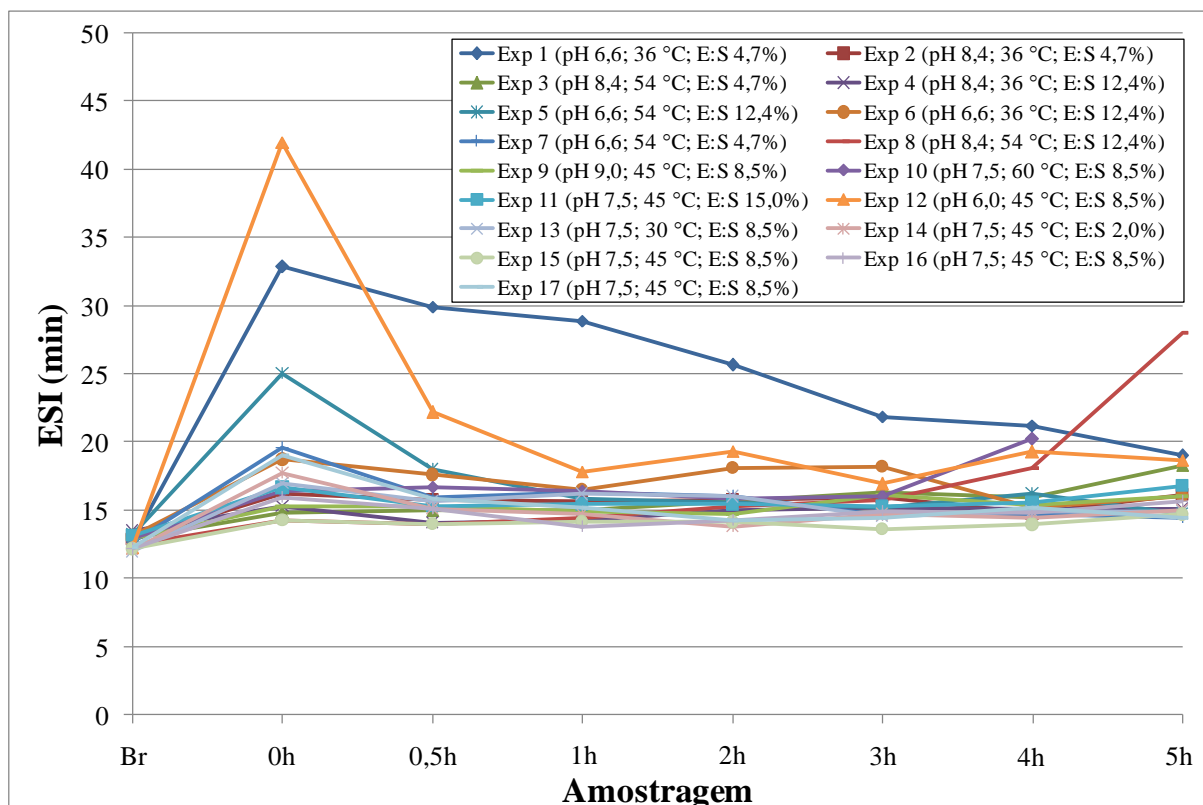


Figura 37 - Gráficos de Índice de atividade emulsificante (EAI - emulsifying activity index) dos experimentos do planejamento na faixa final menor que 30 m<sup>2</sup>/g.

Já o índice de estabilidade (ESI) variou de 14,4 a 28,0 minutos após 5 horas de processo, porém o máximo obtido foi 42 minutos após 1 minuto de processo nas condições de pH 6, 45 °C e E:S 8,5%. Para a maioria dos experimentos, entretanto, não se apresentaram grandes mudanças ao longo do tempo, ficando na média de 15 minutos (Figura 38). A média de ESI dos brancos dos experimentos foi de 12,7 minutos. A baixa estabilidade observada pelos ESI pode ser relacionada ao pH utilizado para a análise, que pode estar próximo ao ponto isoelétrico da proteína, fazendo com que algumas moléculas grandes dos hidrolisados precipitem ou as cargas líquidas das grandes moléculas sejam reduzidas, o que leva à diminuição das propriedades emulsionantes, como observado por Liu et al. (2014).



**Figura 38** - Gráficos de Índice de estabilidade da emulsão (ESI - *emulsion stability index*) dos 17 experimentos do planejamento.

Os valores observados na literatura variam bastante e vários fatores podem interferir nas propriedades emulsificantes dos hidrolisados, como o avanço da hidrólise, a concentração de proteína na solução e o pH.

Em seu estudo com hidrolisado proteico de carne submetida a um processo de retirada de gordura do peixe da espécie *Decapterus maruadsi* produzido com a enzima Flavourzyme com grau de hidrólise de 60%, Thiansilakul et al. (2007) obteve um EAI de 37,3 m<sup>2</sup>/g e um ESI de 35,9 minutos para uma solução de hidrolisado de concentração 0,1% e óleo de soja, de acordo com o método de Pearce and Kinsella (1978). Para uma solução de hidrolisado de concentração de 0,5% foi observado um EAI e ESI de 23,7 m<sup>2</sup>/g e 12 minutos, respectivamente. Uma faixa bem próxima a observada nesse trabalho, cuja concentração da solução de hidrolisado foi de 0,2% em proteína. Conforme é visto na literatura, a concentração de proteínas na solução pode afetar as propriedades emulsificantes. Em baixas concentrações, a adsorção das proteínas na interface é controlada pela difusão. Em altas concentrações, entretanto, essa dependência da difusão não ocorre devido à barreira da

energia de ativação, fazendo com que as proteínas se acumulem na fase aquosa (GIMÉNEZ et. al., 2009).

Pacheco-Aguilar et al. (2008) estudou as propriedades emulsificantes de hidrolisados proteicos produzidos a partir de carne da espécie de peixe *Merluccius productus* com a enzima Alcalase. O método de determinação do índice de atividade emulsificante foi também o de Pearce and Kinsella (1978), com algumas modificações, sendo utilizado óleo de milho comestível. Com um grau de hidrólise de 10%, e uma solução de hidrolisado de concentração 0,1% em proteína, o EAI foi de aproximadamente 125 m<sup>2</sup>/g tanto em pH 4 quanto em pH 7, e 280 m<sup>2</sup>/g em pH 10. Para GH de 15%, o EAI observado foi de 80, 90 e 275 m<sup>2</sup>/g para os pH de 4, 7 e 10, respectivamente. Quando o GH foi de 20%, o EAI obtido foi de 75, 95 e 260 m<sup>2</sup>/g para os pH de 4, 7 e 10, respectivamente. O pH usado nesse estudo foi 7,0, e os valores observados foram menores que os observados nesse mesmo pH para o hidrolisado de *Merluccius productus*, isso pode ser explicado menor pelo maior grau de hidrólise neste trabalho e diferença na estrutura protéica.

Outro trabalho que utilizou o método de Pearce and Kinsella (1978) e óleo de milho foi de Dos Santos et. al. (2011). Nesse estudo com hidrolisados proteicos de *Prionotus punctatus* utilizando a enzima Alcalase, o grau de hidrólise obtido foi de 34,7%. Os EAIs observados (solução de hidrolisado de concentração 0,2% em proteína) para a carne 26,2; 71,3; 56,7; 162,2 e 123,2 m<sup>2</sup>/g para os pHs 3, 5, 7, 9, e 11, respectivamente. Os hidrolisados produzidos com Alcalase apresentaram EAIs de 54,4; 28,1; 25,29; 20,5 e 19,9 m<sup>2</sup>/g para os pHs 3, 5, 7, 9, e 11, respectivamente. Nota-se que a carne do peixe *Prionotus punctatus* tem um EAI superior ao do resíduo utilizado nesse estudo, porém os hidrolisados têm valores próximos. O presente estudo, com hidrolisado de tira-vira, foi conduzido apenas em pH 7, pois o foco era entender como o avanço da hidrólise influenciava nas propriedades emulsificantes, sem levar em consideração as diferenças de condição para aplicação. Mudanças no pH e na força iônica podem alterar a conformação protéica, que afeta por consequência propriedades hidrofóbicas das proteínas. Geralmente, proteínas que apresentam altos níveis de hidrofobicidade superficial exibem boas propriedades emulsificantes. Em pHs alcalinos, um desdobramento estrutural dos polipeptídeos, causado por cargas negativas podem causar uma repulsão e permitir uma melhor orientação dos polipeptídeos na interface. Assim, pode ocorrer uma exposição mais eficaz dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos existentes nesses peptídeos, levando a uma maior interação na interface óleo/água (FLIGNER; MANGINO, 1991; PACHECO-AGUILAR; RAMÍREZ-SUÁREZ; MAZORRA-MANZANO, 2008).

Liu et. al. (2014) utilizou subprodutos como carne deixada na carcaça, cabeça, pele e vísceras da espécie de peixe *Hypophthalmichthys molitrix* para processamento de surimi e posterior hidrólise proteica com Protamex e Alcalase. Para os hidrolisados produzidos com Alcalase, o EAI observado foi de 36,2; 34,9 e 30,2 m<sup>2</sup>/g e o ESI foi de 23,2; 19,6 e 18,2 minutos para os graus de hidrólise de 10, 20 e 30%, respectivamente. Os hidrolisados obtidos com Protamex apresentaram EAI de 54,9; 39,2 e 33,9 m<sup>2</sup>/g e ESI de 25,3; 18,7 e 17,7 minutos para os graus de hidrólise de 10, 20 e 30%, respectivamente. Esses resultados confirmam a teoria, já explicada, de que um avanço da hidrólise leva uma queda nas propriedades emulsificantes, o que também foi visto neste trabalho, salvos efeitos de concentração das amostras nos últimos tempos de hidrólise.

A ANOVA, com nível de confiança de 95%, feita para o EAI nos tempos 1, 3 e 4 horas de reação, como visto na Tabela 13. Através do teste F de Fisher e do p-valor (p < 0,05), foi possível observar que apenas em 4 horas um parâmetro estudado teve significância no processo, que foi a temperatura. Em 1 e 3 horas, nenhum parâmetro se mostrou significativo.

**Tabela 13** - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais do índice de atividade emulsificante (EAI - *emulsifying activity index*) obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos.

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>1 hora de reação</b>					
pH (L)	86,7	1	86,7	4,23	0,079
pH (Q)	0,1	1	0,1	0,01	0,945
T (L)	23,7	1	23,7	1,16	0,317
T (Q)	11,2	1	11,2	0,55	0,483
E:S (L)	43,7	1	43,7	2,14	0,187
E:S (Q)	0,7	1	0,7	0,03	0,864
pH x T	31,6	1	31,6	1,54	0,254
pH x E:S	17,6	1	17,6	0,86	0,385
T x E:S	16,4	1	16,4	0,80	0,401
<b>Resíduo</b>	143,4	7	20,5		
<b>Total</b>	377,9	16			
<b>3 horas de reação</b>					
pH (L)	143,8	1	143,8	4,24	0,078
pH (Q)	50,5	1	50,5	1,49	0,262
T (L)	87,8	1	87,8	2,59	0,152
T (Q)	31,1	1	31,1	0,92	0,370
E:S (L)	68,4	1	68,4	2,02	0,198
E:S (Q)	0,6	1	0,6	0,02	0,897
pH x T	62,0	1	62,0	1,83	0,218
pH x E:S	17,7	1	17,7	0,52	0,494
T x E:S	1,8	1	1,8	0,05	0,825
<b>Resíduo</b>	237,2	7	33,9		
<b>Total</b>	733,9	16			
<b>4 horas de reação</b>					
pH (L)	30,1	1	30,1	0,63	0,452
pH (Q)	53,5	1	53,5	1,13	0,324
T (L)	869,6	1	869,6	18,33	0,004
T (Q)	166,4	1	166,4	3,51	0,103
E:S (L)	138,4	1	138,4	2,92	0,131
E:S (Q)	0,5	1	0,5	0,01	0,922
pH x T	202,6	1	202,6	4,27	0,078
pH x E:S	34,8	1	34,8	0,73	0,420
T x E:S	6,8	1	6,8	0,14	0,715
<b>Resíduo</b>	332,2	7	47,5		
<b>Total</b>	1920,9	16			

Uma análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 95%, também foi feita para o ESI nos tempos 1, 3 e 4 horas de reação, e está apresentada na Tabela 14. Através do teste F de Fisher e do p-valor ( $p < 0,05$ ), observa-se que em 3 horas de processo a interação entre pH e temperatura se mostrou significativa, sendo que o restante dos parâmetros não apresentou significância. Em 1 e 4 horas, nenhum parâmetro se mostrou significativo.

**Tabela 14** - Análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais do índice de estabilidade da emulsão (ESI - *emulsion stability index*) obtidos no planejamento nos três tempos escolhidos.

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>1 hora de reação</b>					
pH (L)	39,0	1	39,0	5,29	0,055
pH (Q)	10,4	1	10,4	1,40	0,275
T (L)	13,1	1	13,1	1,77	0,225
T (Q)	9,7	1	9,7	1,32	0,289
E:S (L)	13,7	1	13,7	1,86	0,214
E:S (Q)	2,7	1	2,7	0,37	0,562
pH x T	20,2	1	20,2	2,74	0,142
pH x E:S	14,6	1	14,6	1,98	0,202
T x E:S	20,7	1	20,7	2,81	0,138
Resíduo	51,6	7	7,4		
Total	188,6	16			
<b>3 horas de reação</b>					
pH (L)	4,9	1	4,9	2,05	0,195
pH (Q)	10,9	1	10,9	4,57	0,070
T (L)	3,3	1	3,3	1,40	0,275
T (Q)	3,3	1	3,3	1,40	0,276
E:S (L)	0,9	1	0,9	0,36	0,568
E:S (Q)	2,2	1	2,2	0,92	0,370
pH x T	15,5	1	15,5	6,50	0,038
pH x E:S	0,4	1	0,4	0,17	0,696
T x E:S	2,5	1	2,5	1,05	0,339
Resíduo	16,7	7	2,4		
Total	55,9	16			
<b>4 horas de reação</b>					
pH (L)	7,4	1	7,4	2,87	0,134
pH (Q)	8,6	1	8,6	3,33	0,111
T (L)	4,2	1	4,2	1,63	0,242
T (Q)	10,2	1	10,2	3,97	0,087
E:S (L)	0,0	1	0,0	0,00	0,963
E:S (Q)	0,0	1	0,0	0,01	0,919
pH x T	11,3	1	11,3	4,36	0,075
pH x E:S	6,2	1	6,2	2,38	0,166
T x E:S	10,7	1	10,7	4,15	0,081
Resíduo	18,1	7	2,6		
Total	74,1	16			

Mesmo sem significância, observa-se uma maior relevância do pH para os dois índices (EAI e ESI), em 1 e 3 horas de processo. Já em 4 horas, observa-se que o pH deixa de ser

relevante e a temperatura passa a ter uma influência maior nas respostas. Uma hipótese para esse comportamento é que nas primeiras horas de reação, os efeitos observados nas propriedades emulsificantes foram em função da hidrólise e seu avanço, visto que o fator que mais influenciou o grau de hidrólise foi o pH. Já nas últimas horas de reação, o efeito de concentração das amostras pela perda de água estava sendo percebido.

Diante da análise desses dados, modelos para descrever o EAI e o ESI ao longo do tempo para os três parâmetros estudados (pH, temperatura e razão E:S) não seriam interessantes com esses resultados experimentais. Seria mais relevante um estudo das propriedades emulsificantes desses hidrolisados com uma extensão de hidrólise menor, onde essas características são melhoradas. Melhorias no desenvolvimento da análise também são necessárias, visto que a concentração de proteína na solução analisada é estimada, usando como base a análise de proteína bruta feita para a pasta antes do processo de hidrólise, o que pode levar a alguns equívocos nos resultados. Além disso, vários outros fatores interferem nessas propriedades, o que também pode minimizar os efeitos dos três parâmetros estudados neste trabalho.

## 5 CONCLUSÃO

A composição centesimal e o perfil de aminoácidos desse resíduo, que apresentou um teor de proteínas de 15,7%, indicaram que o resíduo de Tira-Vira possui potencial como fonte proteica para aplicação em formulações alimentícias.

A hidrólise enzimática com Alcalase se mostrou uma alternativa promissora para o aproveitamento de resíduos provenientes da filetagem e processamento do peixe tira-vira (*Percophis brasiliensis*) e as condições de hidrólise a serem selecionadas mostraram-se dependentes do perfil de produto desejado.

A análise estatística das respostas mostrou um comportamento inesperado do grau de hidrólise (GH) diante do pH. A Alcalase, sendo uma enzima alcalina, tem seu ótimo em torno do pH 8, confirmado por outros trabalhos na literatura. Neste estudo, entretanto, foi possível observar que os maiores graus de hidrólise são obtidos em pH próximo a 6, definindo este como pH ótimo da Alcalase para a matriz Tira-Vira. O grau hidrólise máximo obtido experimentalmente neste estudo foi de 45,24% em pH 6, 45°C e razão E:S 8,5% após 4 horas de reação, contudo, nas mesmas condições de hidrólise, após 1 hora de reação, já é possível obter 35% de GH. Desta forma conclui-se que, mesmo visando apenas um hidrolisado (sem atentar para propriedades funcionais), o tempo de reação deve ser escolhido com base no tipo de produto de interesse.

Um comportamento diferente foi observado nos aminoácidos aromáticos, que encontram maiores valores em pH próximo a 8,4. O crescimento no teor de aminoácidos aromáticos também indicou o progresso da reação. O valor máximo do teor de aminoácidos aromáticos (12,04 mg/mL) foi observado em pH 7,5, 60°C e razão E:S 8,5%. Sob esta condição o GH máximo é de 20%, logo, conclui-se que não há uma relação direta entre GH e teor de aminoácidos aromáticos.

O avanço da hidrólise levou a um aumento na atividade antioxidante do hidrolisado, a qual teve um ganho de ao menos 7 vezes em apenas um minuto de reação. Maior capacidade antioxidante foi observada na hidrólise conduzida a pH 7,5, 60°C e razão E:S 8,5%. Nesta condição, maior atividade e produtividade foram alcançadas após 4h de reação (2953  $\mu$ mol Trolox/g e 738  $\mu$ mol Trolox/g/h, respectivamente), sendo estas as condições de processo necessárias para obter um hidrolisado com alta atividade antioxidante. Esse aumento na produtividade se deve, principalmente, a um efeito de concentração observado durante o processo de hidrólise, especialmente em relação a 4 horas. Assim como no teor de aminoácidos aromáticos, não há uma relação direta entre GH e atividade antioxidante, mas foi notada uma relação entre teor de aminoácidos aromáticos e atividade antioxidante.

As propriedades emulsificantes não se mostraram altas no pH escolhido para análise (pH 7), mas estão na faixa das reportadas na literatura. Um avanço grande na hidrólise levou a uma queda nas propriedades emulsificantes, o que mostra que essas propriedades estão relacionadas ao grau de hidrólise. Porém, em tempos avançados, um crescimento da atividade emulsificante é notado, que se deve ao efeito de concentração das amostras e não a melhora real das propriedades emulsificantes do hidrolisado.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar hidrolisados proteicos de tira-vira obtidos nas condições: (i) pH 6, 45°C e razão E:S 8,5%, 4h de reação; (ii) pH 6, 45°C e razão E:S 8,5%, 1h de reação; (iii) pH 7,5, 60°C e razão E:S 8,5%, 4h de reação; visando identificar potenciais aplicações deste como insumo em formulações alimentícias;
- Realizar scale-up em reator de 5L visando obter dados para um estudo técnico-econômico deste processo;
- Avaliar o efeito da temperatura e da perda de água por evaporação através de um estudo da hidrólise em sistema aberto e fechado.
- Fazer um acompanhamento da concentração de proteínas ao longo do tempo de hidrólise, para uma maior precisão das análises de teor de atividade antioxidante e das propriedades emulsificantes.
- Conduzir experimentos em mesmas condições e sem adição de enzima, para verificar a ocorrência de possível autólise no processo.
- Estudar as propriedades emulsificantes em hidrolisados com menor grau de hidrólise (entre 5 a 10%).
- Estudar a influência do pH nas propriedades emulsificantes dos hidrolisados proteicos.
- Avaliar a hidrólise enzimática de resíduo de tira-vira com outras enzimas comerciais, e o comportamento das propriedades biológicas e funcionais dos hidrolisados obtidos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER-NISSEN, J. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 138-156, 1982.
- ADLER-NISSEN, Jens. Proteases. In: **Enzymes in Food Processing**. Academic Press, p. 159-203, 1993.
- ALUKO, R. E. Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. In: **Handbook of antioxidants for food preservation**. Woodhead Publishing, p. 105-140, 2015.
- ANANEY-OBIRI, D.; MATTHEWS, L. G.; TAHERGORABI, R. Proteins From Fish Processing By-Products. In: **Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications**. Academic Press, p. 163-191, 2019.
- ANTUNES, A. B. et al. Capacidade hidrolítica de alcalase versus novo pro D na hidrólise de CMS de tilápia. In: **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25.; CIGR SESSION 6 INTERNATIONAL TECHNICAL SYMPOSIUM, 10., 2016, Gramado. Alimentação: árvore que sustenta a vida. Anais. Gramado: SBCTA Regional, 2016., 2016.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. Washington, methods 994.12, 2000.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18 ed., ver. 3, Gaithersburg, 2010.
- ARYEE, A. N. A.; AGYEI, D.; UDENIGWE, C. C. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In: **Proteins in Food Processing**. Woodhead Publishing, p. 27-45, 2018.
- BARRETTO, A. C. et al. Age determination, validation, and growth of Brazilian flathead (*Percophis brasiliensis*) from the southwest Atlantic coastal waters (34°-41°S). **Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 2, 2011.
- BEAUBIER, S. et al. Simultaneous quantification of the degree of hydrolysis, protein conversion rate and mean molar weight of peptides released in the course of enzymatic proteolysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1105, p. 1-9, 2019.
- BERNARDI, D. M. et al. Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 709-716, 2016.
- BETTELHEIM, F. A. et al. Enzymes. In: **Introduction to Organic and Biochemistry**. Cengage Learning, 2010, 7<sup>a</sup> ed, p. 344-368.
- BLANCO, G.; BLANCO, A. Enzyme. In: **Medical biochemistry**. Academic Press, 2017, p. 153-175.
- BORGHESI, R. et al. **Influência da nutrição sobre a qualidade do pescado: especial referência aos ácidos graxos**. Corumbá: Embrapa Pantanal – MAPA, 2013. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/981590>>. Acesso em: 30 de Setembro de 2019.
- BORGOGNO, M. et al. Technological and nutritional advantages of mechanical separation process applied to three European aquacultured species. **LWT**, v. 84, p. 298-305, 2017.
- BOYCE, S.; TIPTON, K. F. Enzyme classification and nomenclature. **eLS**, 2001.
- BRAICOVICH, P. E.; TIMI, J. T. Parasites as biological tags for stock discrimination of the Brazilian flathead *Percophis brasiliensis* in the south-west Atlantic. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 3, p. 557-571, 2008.

- BRASIL, Food Ingredients. Propriedades funcionais das proteínas do peixe. **Revista-fi**, v. 8, p. 23-32, 2009.
- BRENDA. **3D-Structure of 3.4.21.62 (1af4)**. Disponível em : <<https://www.brenda-enzymes.org/Mol/jsmol/index.php?pdb=1af4&ecno=3.4.21.62&selectedPos=undefined&colorScheme=undefined>>. Acessado em 02/07/2018.
- CHOBERT, J. M.; BERTRAND-HARB, C.; NICOLAS, M. G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 883-892, 1988.
- COSTA, J. F. et al. Biodiesel production using oil from fish canning industry wastes. **Energy Conversion and Management**, v. 74, p. 17-23, 2013.
- DE HOLANDA, H. D.; NETTO, F. M. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. C298-C303, 2006.
- DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International journal of food science & technology**, v. 31, n. 5, p. 419-426, 1996.
- DINIZ, G. S. et al. Gross chemical profile and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for nine species of fishes from coastal waters of Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 254-264, 2013.
- DONG, S. et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1485-1493, 2008.
- DOS SANTOS, S. D. et al. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399-1406, 2011.
- DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- ELAVARASAN, K.; NAVEEN KUMAR, V.; SHAMASUNDAR, B. A. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1207-1214, 2014.
- ELIAS, Ryan J.; KELLERBY, Sarah S.; DECKER, Eric A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 - Contributing to food security and nutrition for all**. Roma, 2016.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Roma, 2018.
- FIPERJ. Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. **Relatório Anual 2016**. Niterói, 180p, 2017.
- FIPERJ. Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. **Relatório Anual 2017**. Niterói, 108p, 2018.
- FISCHER, J. D. et al. The structures and physicochemical properties of organic cofactors in biocatalysis. **Journal of molecular biology**, v. 403, n. 5, p. 803-824, 2010.
- FLIGNER, K. L.; MANGINO, M. E. Relationship of composition to protein functionality. **In: Interactions of food proteins**. ACS symposium series 1991, p. 1-12,1991.

FOH, M. B. K. et al. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 4, p. 1851-1869, 2010.

FONSECA, R. A. S. et al. Enzymatic hydrolysis of cobia (*Rachycentron canadum*) meat and wastes using different microbial enzymes. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 1, p. 152, 2016.

FURTADO, M. A. M. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 625-639, 2001.

GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. **Qualidade e Processamento de Pescado**. Elsevier Brasil, 2014.

GARCÍA-MORENO, P. J. et al. Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: Effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 299-308, 2016.

GIMÉNEZ, B. et al. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 976-983, 2009.

GIRGIH, A. T. et al. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. **Food chemistry**, v. 173, p. 652-659, 2015.

GOODWIN, T. W.; MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochemical Journal**, v. 40, n. 5-6, p. 628, 1946.

GONZÁLEZ-TELLO, P. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 523-528, 1994.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. **In: Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality**. Woodhead Publishing, p. 11-55, 2015.

GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PRIETO, C. A. Protein hydrolysis with enzyme recycle by membrane ultrafiltration. **In: New Food Engineering Research Trends**. Nova Science Publisher, p. 169-194, 2008.

GUERARD, F. et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 1051-1059, 2001.

GUIMARÃES, J. L. B.; CALIXTO, F. A. A.; MESQUITA, E. F. M. Produção e utilização da carne mecanicamente separada de pescado: uma revisão. **Higiene alimentar**, v. 31, n. 268/269, p. 31-35, 2017.

GUIMARÃES, J. L. B. et al. Development of a low commercial value fish-sausage from the fish trawling “mix” category. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2018a.

GUIMARÃES, J. L. B. et al. Quality of mechanically separated meat (MSM) and surimi obtained from low commercial value fish. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, 2018b.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

HALIM, N. R. A. et al. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic eel (*monopterus sp*) protein hydrolysate as influenced by different molecular weight. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 10-16, 2018.

HSIEH, C. C.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Functionality of Soybean Compounds in the Oxidative Stress-Related Disorders. **In: Gastrointestinal Tissue**. Academic Press, p. 339-353, 2017.

HSU, K. C.; LI-CHAN, E. C.; JAO, C. L. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 617-622, 2011.

HUANG, D.; WONG, I. C. Antioxidant evaluation and antioxidant activity mechanisms. **In: Lipid Oxidation**. AOCS Press, p. 323-343, 2013.

- JAYASINGHE, Punyama; HAWBOLDT, Kelly. Biofuels from fish processing plant effluents—waste characterization and oil extraction and quality. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 4, p. 36-44, 2013.
- JOST, R.; MONTI, J. C. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 9, p. 1387-1393, 1977.
- KLOMPONG, V. et al. 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**, v. 102, n. 4, p. 1317-1327, 2007.
- KLOMPONG, V. et al. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). **Journal of food science**, v. 74, n. 2, p. C126-C133, 2009.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 657-666, 2000a.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000b.
- KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. **In: Enzymes in Food Biotechnology. Academic Press**, p. 1-18, 2019.
- LEE, C. Y.; DEMAN, J. M. Enzymes. **In: Principles of Food Chemistry**. Springer, Cham, p. 397-433, 2018.
- LI, Y. et al. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. **Food chemistry**, v. 196, p. 1338-1345, 2016.
- LITESCU, S. C. et al. The use of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' antioxidant properties. **In: Processing and impact on antioxidants in beverages**. Academic press, p. 245-251, 2014.
- LIU, H. J.; CHANG, B. Y.; YAN, H. W.; YU, F. H.; LIU, X. X. Determination of Amino-Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Separation. **Journal of Aoac International**, v. 78, n. 3, p. 736-744, 1995.
- LIU, Y. et al. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food chemistry**, v. 151, p. 459-465, 2014.
- MAY, T. **Despolpamento de resíduo de filé de tilápia**. Multimídia: Banco de Imagens – Embrapa, 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2598002/despolpamento-de-residuo-de-file-de-tilapia>>. Acessado em 05/08/2018.
- MELLINGER-SILVA, C. et al. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. **International dairy journal**, v. 48, p. 73-79, 2015.
- MILITELLI, M. I.; MACCHI, G. J. Reproducción del pez palo (*Percophis brasiliensis*) en aguas costeras de la provincia de Buenos Aires. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, v. 14, p. 5-21, 2001.
- MIRA, N. V. M.; LANFER-MARQUEZ, U. M.. Avaliação da composição centesimal, aminoácidos e mercúrio contaminante de surimi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 665-671, 2005.
- MO, W. Y.; MAN, Y. B.; WONG, M. H.. Use of food waste, fish waste and food processing waste for China's aquaculture industry: Needs and challenge. **Science of the Total Environment**, v. 613, p. 635-643, 2018.
- MORALES-MEDINA, R. et al. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. **Food chemistry**, v. 194, p. 1208-1216, 2016.

MORIMURA, S. et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 1403-1412, 2002.

NAJAFPOUR, Ghasem. Enzyme Technology. **Biochemical engineering and biotechnology**, p. 19-49, 2015.

NASRI, M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health Benefits. A review. **In: Advances in food and nutrition research**. Academic Press, p. 109-159, 2017.

NEVES, Adriana C. et al. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 218, p. 396-405, 2017.

NIMALARATNE, C. et al. Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 155-161, 2011.

NOMAN, A. et al. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 19-28, 2018.

OLIVEIRA, W.; NEVES, D. A.; BALLUS, C. A. Mature chemical analysis methods for food chemical properties evaluation. **In: Evaluation Technologies for Food Quality**. Woodhead Publishing p. 63-90, 2019.

ÖZOGUL, F. et al. Crustacean By-products. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 33-38, 2019.

PACHECO-AGUILAR, R.; MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMÍREZ-SUÁREZ, J. C. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 782-789, 2008.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in food science & technology**, v. 7, n. 4, p. 120-125, 1996.

PARKIN, KIRK L. Environmental effects on enzyme activity. **In: Enzymes in Food Processing**. Academic Press: San Diego, CA, p. 39-70, 1993.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PERROTTA, R. G.; FERNÁNDEZ GIMÉNEZ, A. Estudio preliminar sobre la edad y el crecimiento del pez palo (*Percophis brasiliensis* Quoy et Gaimard 1824). **INIDEP Informe Técnico**, v. 10, p. 25-36, 1996.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

QUIRINO-DUARTE, G. et al. Composição quali-quantitativa da categoria "mistura" na pesca de arrasto duplo de portas médio desembarcada nos Municípios de Santos e Guarujá, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 461-474, 2009.

SAIDI, S. et al. Production of interesting peptide fractions by enzymatic hydrolysis of tuna dark muscle by-product using alcalase. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 2, p. 251-264, 2016.

SÁNCHEZ PASCUA, G. L.; CASALES, M. R.; YEANNES, M. I. Psychophysical estimation of acid intensity and determination of sweet-acid interaction in a fish paste containing glycerol. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 260-263, 2010.

SANTOS, Carlos Eduardo et al. Oil from the acid silage of Nile tilapia waste: Physicochemical characteristics for its application as biofuel. **Renewable energy**, v. 80, p. 331-337, 2015.

SARANYA, R. et al. Purification, characterization, molecular modeling and docking study of fish waste protease. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 569-583, 2018.

SHEPHERD, C. J.; JACKSON, A. J. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. **Journal of fish biology**, v. 83, n. 4, p. 1046-1066, 2013.

SILVA, C. M.; DA FONSECA, R. A. S.; PRENTICE, C. Comparing the hydrolysis degree of industrialization byproducts of Withemout croaker (*Micropogonias furnieri*) using microbial enzymes. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 1757, 2014.

SPERANZA, P.; LOPES, D. B.; MARTINS, I. M. Development of Functional Food From Enzyme Technology: A Review. **In: Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, p. 263-286, 2019.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Enzyme with industrial applications characterized. **ScienceDaily**. Disponível em: <[www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100211090757.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100211090757.htm)>. Acesso em: 19 de julho de 2018.

TALENS-PERALES, D.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: Functions and Characteristics. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 532-538, 2016.

TAN, Y.; CHANG, S. K.; MENG, S. Comparing the kinetics of the hydrolysis of by-product from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillet processing by eight proteases. **LWT**, v. 111, p. 809-820, 2019.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1385-1394, 2007.

TIPTON, K. Translocases (EC 7): A new EC Class. **Enzyme Nomenclature News**, 2018. Disponível em: <<https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/2790/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>>. Acesso em: 16 de maio de 2019.

TRIPATHI, G. Catalytic molecules in cell. **In: Cellular and Biochemical Science**. IK International Pvt Ltd, p. 95-124, 2010.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. **Instituto de Pesca**, 2006.

WASSWA, J. et al. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1698-1704, 2007.

XU, H. et al. Application of different types of protein hydrolysate in high plant protein diets for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture research**, v. 48, n. 6, p. 2945-2953, 2017.

ZAMORA-SILLERO, J.; GHARSALLAOUI, A.; PRENTICE, C. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: an overview. **Marine biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 118-130, 2018.

ZULUETA, Ana; ESTEVE, Maria J.; FRÍGOLA, Ana. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.