

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

POLIANA DOS SANTOS MENDES

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO
PROTEICO OBTIDO DA CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

CAMPO MOURÃO

2024

POLIANA DOS SANTOS MENDES

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO
PROTEICO OBTIDO DA CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**Enzyme hydrolysis and characterization of protein concentrate obtained from
mechanically separated meat (CMS) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-
Graduação em Tecnologia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador(a): Profª. Drª. Adriana Aparecida Droval.

Coorientador(a): Profª. Drª. Flávia Aparecida Reitz
Cardoso.

CAMPO MOURÃO

2024



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



POLIANA DOS SANTOS MENDES

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO OBTIDO DA CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) DE TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS)

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 15 de Março de 2024

Adriana Aparecida Droval, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Lidiane Borges Dias De Moraes, Doutorado - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
Dra. Marines Paula Corso, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/03/2024.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e meu anjo da guarda, por estarem sempre ao meu lado, me protegendo, me guardando e sempre me amando, agradeço pelos ensinamentos obtidos em toda a minha vida, tornando-me uma pessoa melhor a cada dia e pela maturidade e sabedoria para superar as dificuldades nos âmbitos pessoal e profissional.

À minha família que sempre me incentivou e encorajou. À minha querida filha Alice, seu sorriso recarrega minhas energias, minha maior fonte de amor e de inspiração. Ao meu esposo Henrich, que me deu suporte para eu estudasse. Esta conquista não teria êxito sem você.

À vó Sedonia que me acolheu tão bem em sua casa, me emprestou o carro, me recebeu sempre com tanta doçura, tanto no abraço quanto na mesa!

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª Adriana Aparecida Droval, por seus ensinamentos, paciência e otimismo. Pela oportunidade de realização deste estudo, por todo apoio e confiança, pela dedicação em dividir os seus conhecimentos.

À coorientadora Prof^ª Dr^ª Flavia Aparecida Reitz Cardoso, por toda a partilha de conhecimentos, pelo entusiasmo compartilhado e por toda a ajuda que foram fundamentais para a conclusão deste estudo

Agradeço a todos os professores do PPGTA, por contribuírem para com meu crescimento profissional e pessoal. Aos membros da comissão examinadora pela disponibilidade e sugestões.

Às alunas de IC Verônica, Maria Fernanda e Maria Isabel que estiveram comigo nessa trajetória. A aluna de TCC Vitoria Fantes. pela colaboração

Agradecimento a Amarilis, Anielle, Valéria, Patrícia e Thaysa pelo auxílio nas atividades laboratoriais. O meu maior e sincero obrigado vai direcionado à Jéssica Novelo, pela amizade e apoio. Não tenho palavras que cheguem para agradecer toda a ajuda dada, pela amizade, carinho e motivação quando me sentia desmotivada

Ao Prof. Paulo de ambiental que disponibilizou a estufa quando necessário. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Brasil - Código de Financiamento 001, à UTFPR e ao laboratório Multiusuário (Lab-Multi).

RESUMO

O Paraná é o estado líder na produção de tilápias do Nilo. A indústria de filetagem produz um número significativo de subprodutos. Uma das possibilidades de aproveitamento destes resíduos sólidos é a produção de carne mecanicamente separada (CMS), que é obtida a partir da separação da carne aderida à carcaça de peixe. Dentre os produtos possíveis de se obter a partir destes resíduos estão os hidrolisados proteicos, fontes de aminoácidos essenciais com importantes propriedades funcionais, assim como as características pretendidas para o produto podem ser controladas com base na seleção da enzima e das condições deste processo. O objetivo presente estudo foi extrair proteínas miofibrilares da CMS de tilápia, obtendo um concentrado proteico (CP) com 65,94 % de proteínas. Este CP foi hidrolisado com as enzimas papaína e alcalase definidas a partir do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) onde tempo e concentração de enzima foram as variáveis independentes, e as variáveis dependentes foram grau de hidrólise (GH), solubilidade e capacidade emulsificante. Os hidrolisados da proteína de peixe (*fish protein hydrolysate*, FHP) apresentaram maior GH para alcalase (GH 56,59 g/100g) foi o experimento FHP5 com concentração da enzima utilizada de 0,3975% e tempo de hidrólise de 2,5 horas, e para a papaína (GH 131,47 g/100g) foi na concentração de 1,0% e tempo de 4,0 horas. Pode-se observar que a enzima papaína apresentou maior GH em todos os experimentos avaliados comparado a alcalase. Em relação a solubilidade a mesma foi determinada nos valores de pH 5,0, 7,0 e 9,0, e observou-se que foi menor nos experimentos que tiveram a atividade da enzima papaína em relação a enzima alcalase. As propriedades emulsificantes foram expressas em índice de atividade emulsificante (EAI) e índice de estabilidade da emulsão (ESI). Resultados com a enzima alcalase apresentaram maior EAI nas condições de pH 5,0 e 9,0, enquanto a papaína apresentou melhores resultados em pH 9,0. Foram observados melhores valores de ESI para enzima alcalase em pH 7,0, no experimento HPP3 (90,34 min) e para a papaína experimento FPH6 (914,15 min) e FPH8 (909,95 min) no pH 7,0. As condições de hidrólise são dependentes do perfil do produto desejado, neste estudo as variáveis determinadas apresentaram melhores resultados pela ação da enzima alcalase ao FPH, principalmente para a solubilidade e para a capacidade emulsificante. Foi possível determinar um modelo matemático com a função desejabilidade considerando a concentração e tempo para solubilidade e capacidade emulsificante para otimização do processo de hidrólise com alcalase na concentração de enzima de 1,1025 % e tempo de hidrólise de 4,615 horas. O GH foi observado maior para o FHPC (20,59g/100g) em comparação ao FPHO (13,80g/100g). A solubilidade foi superior para FPHO em relação ao FPHC nos pHs 5,0 e 7,0, no pH 9,0 não houve diferenças significativas. Para ESI maiores valores foram identificados para FPHO, o contrário aconteceu para EAI, que apresentou maiores valores para FPHC. As bandas do FPH foram caracterizadas com a análise de FTIR que permite avaliar as modificações estruturais e as reduções da cadeia proteica forma qualitativa.

Palavras-chave: co-produtos; pescado; hidrolisado proteico; alcalase e papaína.

ABSTRACT

Paraná is the leading state in Nile tilapia production. The filleting industry produces a significant number of by-products. One of the possibilities for using this solid waste is the production of mechanically separated meat (CMS), which is obtained from the separation of meat adhered to the fish carcass. Among the possible products to be obtained from these residues are protein hydrolysates, sources of essential amino acids with important functional properties, as well as the desired characteristics of the product can be controlled based on the selection of the enzyme and the conditions of this process. The objective of this study was to extract myofibrillar proteins from tilapia CMS, obtaining a protein concentrate (PC) with 65.94% proteins. This CP was hydrolyzed with the enzymes papain and alcalase defined from the Rotational Central Composite Design (DCCR), where time and enzyme concentration were the independent variables, and the dependent variables were degree of hydrolysis (GH), solubility, and emulsifying capacity. Fish protein hydrolysates (Fish protein hydrolysate, FHP) showed the highest GH for alcalase (GH 56.59 g/100g) in the FHP5 experiment with a concentration of the enzyme used of 0.3975% and hydrolysis time of 2.5 hours. For papain (GH 131.47 g/100g) it was at a concentration of 1.0% and a time of 4.0 hours. It can be observed that the papain enzyme presented higher GH in all experiments evaluated compared to alcalase. Regarding solubility, it was determined at pH values 5.0, 7.0, and 9.0, and it was observed that it was lower in experiments that had the activity of the papain enzyme in relation to the alcalase enzyme. Emulsifying properties were expressed as emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI). Results with the enzyme alcalase showed higher EAI in pH 5.0 and 9.0 conditions, while papain showed better results at pH 9.0. Better ESI values were observed for alcalase enzyme at pH 7.0 in experiment HPP3 (90.34 min), and for papain in experiment FHP6 (914.15 min) and FHP8 (909.95 min) at pH 7.0. The hydrolysis conditions are dependent on the profile of the desired product. In this study, the variables determined showed better results due to the action of the alcalase enzyme on FHP, mainly for solubility and emulsifying capacity. It was possible to determine a mathematical model with the desirability function considering the concentration and time for solubility and emulsifying capacity to optimize the hydrolysis process with alcalase at an enzyme concentration of 1.1025% and hydrolysis time of 4.615 hours. GH was observed higher for FHPC (20.59g/100g) compared to FHPO (13.80g/100g). Solubility was higher for FHPO compared to FHPC at pH 5.0 and 7.0; at pH 9.0, there were no significant differences. For ESI, higher values were identified for FHPO, the opposite happened for EAI, which presented higher values for FHPC. The HFP bands were characterized using FTIR analysis, which allows structural modifications and reductions in the protein chain to be evaluated qualitatively.

Keywords: co-products; fish; protein hydrolyzate; alcalase and papain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Carcaça de tilápia após a retirada do filé	11
Figura 2 - Amostra de CMS	18
Figura 3 - Concentrado proteico obtido da CMS da tilápia	26
Figura 4 - Hidrolisado proteico liofilizado obtido da CMS da tilápia	27
Figura 5 - Exemplo de hidrolise enzimática.....	31
Figura 6 - Gráfico biplot da PCA para as análises do grau de hidrólise e da solubilidade para as enzimas alcalase e papaína	34
Figura 7 - Gráfico de contorno para a atividade de emulsão	39
Figura 8 - Gráfico de contorno para a estabilidade da emulsão.....	41
Figura 9 - Representação gráfica da função desejabilidade considerando concentração e tempo para solubilidade e capacidade	42
Figura 10 - Gráfico de contorno para a atividade de emulsão.....	43
Figura 11 - Gráfico de contorno para a estabilidade da emulsão.....	44
Figura 12 - Representação gráfica da função desejabilidade considerando concentração e tempo para solubilidade e capacidade emulsificante da enzima papaína	45
Figura 13 - Desenvolvimento da solubilidade	48
Figura 14 - Espectros de FTIR para a amostras hidrolizada enzimaticamente de forma otimizada pela enzima alcalase	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática com os valores codificados e decodificados para os fatores analisados	22
Tabela 2 - Composição centesimal proximal concentrado proteico obtido a partir da CMS de tilápia do Nilo	28
Tabela 3 - Médias e desvios para o grau de hidrólise em função da concentração e tempo das enzimas alcalase e papaína	32
Tabela 4 - Médias e desvios dos experimentos estudados considerando a solubilidade de ambas enzimas	37
Tabela 5 - Médias e desvios para as amostras considerando capacidade emulsificante de ambas as enzimas	46
Tabela 6 - Médias e desvios para o grau de hidrólise em função da concentração e tempo da enzima alcalase.....	47
Tabela 7 - Médias e desvios para as amostras considerando a atividade e a estabilidade da emulção da enzima alcalase	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de Componentes Principais.
ANOVA	Análise de Variância.
CP	Concentrado Proteico.
CMS	Carne Mecanicamente Separada.
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional.
EAI	Índice de Atividade Emulsificante.
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
ESI	Índice de Estabilidade de Emulsão.
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>).
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
PPGTA	Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
HP	Hidrolisado proteico
GH	Grau de hidrolise
FPH	Hidrolisado de proteína de peixe (do inglês <i>Fish protein hydrolysates</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1	Aquicultura	11
3.2	Carne mecanicamente separada (CMS)	12
3.3	Concentrado proteico (CP).....	13
3.4	Proteína dos pescados	15
3.5	Hidrolisados proteicos (HP)	16
3.6	Hidrolise enzimática.....	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Matéria-prima.....	20
4.2	Obtenção do concentrado proteico (CP).....	20
4.3	Determinação da composição centesimal proximal do CP	21
4.4	Processo de hidrólise	21
4.5	Determinação do grau de hidrólise (GH).....	23
4.6	Determinação de solubilidade dos hidrolisados proteicos (FPH).....	23
4.7	Capacidade emulsificante	24
4.8	Análise estatística	24
4.9	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Caracterização físico-química do CP	26
5.2	Solubilidade proteica	31
5.3	Análise de Componentes Principais (PCA).....	33
5.4	Capacidade emulsificante (EAI e ESI)	35
5.5	Otimização das condições de hidrólise enzimática	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos proteicos de origem aquática estão sendo cada vez mais reconhecidos por seu papel nutricional, e sua relevância social e econômica, devido ao seu potencial de crescimento, a disponibilidade de fatores produtivos e demanda. (Pedroza Filho *et al.*, 2021). A aquicultura teve uma rápida expansão e isso se deve principalmente pela introdução de novas técnicas para produzir, com custos acessíveis e ganhos significativos de produtividade e qualidade na produção de proteína animal. Os pescados possuem alto valor nutritivo, por serem fontes de proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, minerais e vitaminas. As proteínas do pescado exibem alta qualidade nutricional contendo uma composição completa de aminoácidos essenciais (Siqueira, 2017; Sila; Bougatef, 2016).

O consumo de pescados tem sido mais elevado graças ao crescimento da aquicultura, da melhoria na gestão de pesca e oferta de variadas espécies de peixes, além da procura crescente dos consumidores em seguir uma alimentação saudável (Souza, 2019). Dentre as espécies de água doce, destaca-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) espécie de peixe onívora, com fácil domínio da sua reprodução e bom rendimento de peso-carcaça e de rápido crescimento. Se adapta tanto ao cultivo extensivo, sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao intensivo de criação em tanques-rede com rações completas e com alta tecnologia de produção (Romanzini, 2023; Ferreira *et al.*, 2015). A tilápia é a segunda espécie de peixe cultivada em água doce de maior importância na aquicultura mundial (Romanzini, 2023). A popularidade do seu cultivo em várias partes do mundo além das características já citadas, é atribuída também devido aos aspectos sensoriais, com carne de alta qualidade e filés sem espinhas intramusculares em forma de "Y" (Stiz *et al.*, 2021).

Porém, é fundamental que o sistema de produção esteja voltado para o desenvolvimento sustentável, de forma a minimizar o impacto ambiental destas criações e a concorrência com outros setores pelo uso da água. A tilápia ampliou a participação na produção brasileira de peixes de cultivo, em 2023, com 579.080 toneladas, mostra levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR). Com esse resultado, a espécie passou a representar 65,3% do total nacional.

Grande parte desta produção se concentra nos estados da região sul e sudeste, com mais de 50% da produção nacional de tilápia. O Paraná lidera o cultivo de tilápia no país, com 209.500 toneladas, constata o Anuário de Peixe BR. A região Oeste do estado concentra 24 entrepostos de pescados de pequeno, médio e grande porte, sendo assim destaque na piscicultura brasileira, especialmente pela proximidade dos entrepostos e da associação cooperada dos piscicultores (Feiden *et al.*, 2022).

Desta forma, um percentual significativo de resíduos é gerado de forma correspondente a produção do filé de tilápia. O peixe quando eviscerado apresenta 8 a 16% de resíduo, já no processo de filetagem estes valores chegam a 60 a 72% (Matiucci *et al.*, 2021). A indústria de filetagem desta espécie gera diariamente um volume significativo de subprodutos constituídos por cabeças, barbatanas, vísceras, escamas, carcaça e peles que constituem cerca de 60% a 70% do peixe (Matiucci, 2021) Esta porcentagem é semelhante à referida por Zamora-Sillero *et al.* (2018) que apontam um valor de 60% da biomassa total.

Estes subprodutos, considerados resíduos orgânicos sólidos gerados pelas indústrias de alimentos, aquicultura e a pesca são sobras, que geralmente deixam de ter utilidade para a fonte geradora. Estes resíduos orgânicos representam um sério problema global devido aos seus impactos econômicos, sociais e ambientais (Khiari, 2022; Vidal-Campello *et al.*, 2020).

Uma das possibilidades de aproveitamento destes resíduos é a produção de carne mecanicamente separada (CMS), material obtido a partir da separação da carne aderida a carcaça de peixe (Borgogno *et al.*, 2017). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2017), entende-se por carne mecanicamente separada (CMS), a carne retirada a partir de ossos, carcaças ou partes de carcaças, com exceção dos ossos da cabeça, submetidos à separação mecânica em equipamentos especiais - máquinas de separação mecânica (MSM) e imediatamente congelada, por processos rápidos ou ultra-rápidos, quando não for utilizada no momento seguinte.

Portanto, estes subprodutos podem servir como uma forma sustentável de aproveitamento, diminuindo os impactos ambientais (Decker *et al.*, 2016). A sustentabilidade e a responsabilidade social, visando cuidar do ecossistema ao seu redor e o aproveitamento de nutrientes destes resíduos sólidos, contribui com o desenvolvimento de técnicas para inovar e reduzir os impactos ambientais. Neste

contexto, a obtenção de hidrolisado proteico a partir dos resíduos da pesca, é uma alternativa de estudo encontrada na literatura como uma forma de recuperação destes nutrientes, agregando retorno econômico (Chalamaiah *et al.*, 2010).

Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos através do peixe inteiro ou de seus subprodutos, resultando da ruptura de ligações peptídicas, por via química ou enzimática, bem como uma combinação entre eles, porém a hidrólise enzimática de proteínas é um dos métodos reconhecido por melhorar e modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas sem prejudicar o seu valor nutritivo (Oliveira, 2013).

A hidrólise enzimática melhora a solubilidade, as propriedades emulsificantes das proteínas, bem como pode aumentar a liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas devido à sua especificidade, segurança e capacidade de modificar uma grande variedade de grupos funcionais. Entretanto, deve ser realizado um controle da hidrólise, uma vez que a melhoria destas propriedades está diretamente relacionada ao tamanho da cadeia peptídica (Duarte, 1998; Pacheco, 2022).

Então, as características pretendidas para o produto podem ser controladas com base na seleção da enzima e das condições deste processo (Kurozawa *et al.*, 2009). Deve-se levar também em consideração outros fatores que incluem, por exemplo, o preço, a disponibilidade no mercado e a garantia da repetitividade da atividade enzimática (Souza, 2019).

Considerando o enorme potencial da tilápia do Nilo no Brasil, e a quantidade de carne que fica aderida à carcaça após a etapa de filetagem, que na maioria das vezes é descartada, gerando desperdício de matéria-prima e contaminação ambiental. O objetivo deste trabalho foi estudar e caracterizar o concentrado proteico hidrolisado enzimaticamente, obtido da carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia do Nilo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e caracterizar o concentrado proteico obtido por diferentes condições de hidrólise enzimática da carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia do Nilo.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o concentrado proteico (CP) da CMS de tilápia do Nilo.
- Determinar a composição centesimal proximal do concentrado proteico (CP): umidade, proteína e lipídios.
- Avaliar a ação das enzimas alcalase e papaína para hidrólise do CP através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).
- Determinar o grau de hidrólise, a solubilidade e a capacidade emulsificante do FPH hidrolisado por cada enzima estudada nas diferentes condições utilizadas.
- Analisar utilizando a correlação existente entre o grau de hidrólise e a solubilidade por meio da Análise de Componentes Principais (ACP).
- Analisar por via DCCR o gráfico de contorno e a desejabilidade dos resultados obtidos para a capacidade emulsificante dos hidrolisados pela ação das enzimas alcalase e papaína.
- Avaliar o hidrolisado proteico significativo obtido em condições otimizadas segundo o modelo matemático, determinando o grau de hidrólise, solubilidade e estabilidade de emulsão
- Obter informações da estrutura do hidrolisado proteico otimizado pela Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR):

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aquicultura

A aquicultura brasileira tem se transformado de modo significativo nos últimos 20 anos, passando de uma atividade extensiva e de pequeno porte para um setor empresarial e com uma alta intensidade tecnológica. Neste contexto, a cadeia produtiva da tilápia tem sido a principal indutora destas transformações (Pedroza Filho *et al.*, 2020).

O estado do Paraná é o maior produtor nacional de tilápia, seguido de São Paulo e Minas Gerais. Este volume produzido se dá em virtude de sua rusticidade, simplicidade tecnológica e abertura de empregos no setor socioeconômico. Atualmente as cidades de Nova Aurora, Palotina e Assis Chateaubriand estão entre as que mais se destacam na aquicultura brasileira no estado do Paraná (Peixe BR, 2023).

A Região Oeste do Paraná concentra 24 entrepostos de pescado de pequeno, médio e grande porte. Sendo assim, destaque na piscicultura brasileira como o maior polo de produção de peixes em viveiros escavados e industrialização na produção de filés. Esta região se consolida como a maior produtora de tilápia do Brasil, especialmente pela proximidade dos entrepostos e da associação cooperada dos piscicultores (Feiden *et al.*, 2022).

Figura 1 - Carcaça de tilápia após a retirada do filé



Fonte: Autoria própria (2023).

Quanto ao processo de industrialização da tilápia, agrega-se valor na matéria-prima, extremamente perecível, ao se ampliar a vida útil do produto e possibilitar novas opções de consumo. Este processo pode ser realizado de diversas formas, obtendo produtos como filé fresco e congelado, defumados e salgados, surimi, empanados, embutidos, farinha de resíduos da filetagem para utilização em rações, produção de óleo e obtenção de silagem dos resíduos da filetagem, entre outros (Schulter, 2018).

Para a transformação dos animais e seus subprodutos em alimentos, existem várias etapas a serem realizadas e algumas delas apresentam riscos de contaminação. Isso se deve ao fato de que altos teores de proteínas e água em carnes, o que torna o alimento altamente perecível, além de apresentarem risco de sobrevivência ou multiplicação de microrganismos. Períodos de longos de estocagens podem também causar degradação dos aminoácidos, que compõem a proteína da carne animal influenciando na qualidade da proteína final (Souza *et al.*, 2017).

A indústria de filetagem da tilápia do Nilo gera diariamente um volume significativo de subprodutos constituídos por cabeças, barbatanas, vísceras, escamas e peles que constituem cerca de 65% do peixe (Zamora-Sillero *et al.*, 2018).

3.2 Carne mecanicamente separada (CMS)

Para atender as necessidades do consumidor quanto aos aspectos sensoriais, preços acessíveis e de fácil preparo de pescados, as indústrias processadoras comercializam filés ao invés do peixe inteiro, o que gera quantidade relevante de coprodutos e subprodutos, entre eles a Carne Mecanicamente Separada (CMS). A CMS é obtida pela extração mecânica da carne aderida à espinha dorsal após a filetagem. No entanto, a CMS *in natura* apresenta alto teor de lipídios e substâncias indesejáveis como por exemplo, pigmentos e sangue, que aceleram sua degradação, conferindo ao produto sabor e odor indesejáveis (Tenuta-Filho; Jesus, 2003; Fogaça, 2015).

Segundo Bernadino-Filho e Xavier (2019), os subprodutos obtidos da filetagem da tilápia do Nilo têm rendimento considerável para produção de CMS com qualidade higiênico-sanitária adequada, características microbiológicas e químicas que atendem a legislação vigente. Com a produção de CMS esses subprodutos do filé de tilápia agregam valor à produção, podendo ser utilizados na elaboração de produtos mais saudáveis e nutritivos.

A destinação dos resíduos de peixe na tecnologia de alimentos pode ser classificada em dois grupos, o primeiro destinado à produção animal, em processo artesanal ou industrial. Geralmente o aproveitamento é feito com a produção de óleo, silagem, farinha de peixe, compostagem de peixes e também como fertilizantes. As partes aproveitadas neste processo são: cabeça, coluna vertebral, parte da carne aderida, pele e as escamas. E o segundo grupo é destinado para a alimentação humana, que são caracterizados pela carcaça com carne aderida e aparas obtidas durante a toailete dos filés, com a produção de CMS, parte comestível, gerada a partir de partículas de musculo, isento de vísceras, escamas, ossos e pele (Ayroza, 2011; Nunes, 2011; Pires *et al.*, 2014).

As inovações tecnológicas na indústria alimentícia desempenham um papel relevante na otimização do aproveitamento da CMS, permitindo a sua transformação em diversos produtos, como *hamburgers* (Costa, 2017) e *nuggets* (Cavalcante, 2018), amenizando o desperdício de resíduos provenientes do processamento.

Elaborar produtos que utilizam a CMS de pescados, além de melhorar o valor nutricional dos alimentos, reduz os custos de produção, também permite maior rendimento e aproveitamento, o que pode ampliar a linha de produtos que podem ser comercializados com enriquecimento proteico (Silva, 2010).

A alta demanda por produtos mais saudáveis impulsionou os estudos que tendem a melhorar o perfil nutricional dos alimentos disponíveis no mercado. A incorporação dos produtos de pescados pode ser uma alternativa neste sentido, visando aumentar o teor de proteínas e ácidos graxos, assim como a digestibilidade (Oliveira *et al.*, 2021, Campelo *et al.*, 2017; Chambó *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2017; Bordignon *et al.*, 2010; Feltes *et al.*, 2010).

3.3 Concentrado proteico (CP)

A criação de estratégias para o aproveitamento de resíduos nas indústrias alimentícias é um desafio que requer inovação, com a correta utilização dos recursos naturais disponíveis e responsabilidade social e econômica. O papel do consumidor, enquanto a sua geração de resíduos, reforça o comprometimento sustentável, não admitindo-se condutas provisórias e sim permanentes, sendo importante a aplicação de conhecimentos científicos específicos, maximizando o aproveitamento de alimentos e a redução do desperdício como prioridade (Nagasaki, 2019).

Os concentrados proteicos obtido a partir da CMS, pode se constituir em uma alternativa promissora ao processamento do pescado, pois consiste em um produto de alto valor proteico (Lima, 2019). Os CP de pescado são produtos desidratados e moídos, com conteúdo variável de proteínas, podendo apresentar ou não sabor e aroma de pescado, dependendo do método de obtenção utilizado (Windsor, 2001; Ordóñez, 2005), apresentam baixos níveis de umidade e gordura, alta digestibilidade, baixo custo de produção e fácil conservação (Souza *et al.*, 2010).

Segundo Prentice *et al.* (2002), os concentrados proteicos de pescado têm como características fundamentais o elevado valor biológico e a fácil conservação. Windsor (2001) distingue fundamentalmente o concentrado proteico de pescado em três tipos denominados tipo A, tipo B e tipo C. O tipo A é caracterizado como um pó insípido que apresenta um conteúdo lipídico de no máximo 0,75%. O tipo B é um pó que não tem nenhum limite específico sobre odor ou sabor de peixe, com conteúdo de gordura de no máximo 3%. Já o tipo C é uma farinha de peixe, produzida sob condições higiênico sanitárias satisfatórias.

A elaboração de concentrado proteico em países desenvolvidos possui uma alta demanda devido ao consumo baixo de energia que é indispensável para a sua produção, armazenagem e transporte se contraposto com o pescado congelado (Pessatti, 2001). Desta maneira, o uso da CMS para obter o concentrado proteico aponta-se, como uma boa alternativa de aplicação de subprodutos do beneficiamento do pescado, promovendo a redução do volume de resíduos sólidos gerados, e minimizando problemas ambientais (Zuffo *et al.*, 2020) e pode ser utilizado como enriquecedor de alimentos.

Apesar dos benefícios do consumo de peixes e coprodutos do pescado para a saúde e da grande produção, o consumo no Brasil continua baixo, sendo que uma das alternativas para alavancar o consumo e também a produção aquícola é a elaboração de novos produtos com a inclusão de pescado, oferecendo ao consumidor opções de escolha (Oliveira *et al.*, 2021; Verdi *et al.*, 2020). Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a hidrólise de proteínas de peixe, de modo a aumentar o consumo desta fonte marinha e concentrar este macro nutriente que possui um potencial substancial como ingredientes para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios (Carvalho Barbosa *et al.*, 2021).

3.4 Proteína dos pescados

A composição química de pescado varia de acordo com fatores como espécie, idade, estado fisiológico, época e região de captura. É relevante o seu conhecimento e compreensão, pois a composição química exerce influência sobre as características de qualidade e estabilidade do pescado, os cuidados de manipulação necessários, as possibilidades de processamento, além de fornecer informações nutricionais ao consumidor (Contreras-Guzmán, 1994; Lahnke, 2022).

As proteínas são polímeros constituídos por uma ou mais cadeias de aminoácidos. A carne de peixe constitui uma fonte de proteínas de alto valor biológico, abundante e de boa qualidade, sendo uma das proteínas de origem animal mais consumidas (Silva *et al.*, 2021, Soares; Gonçalves, 2012). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 1995), as proteínas no tecido muscular dos peixes podem ser divididas em três categorias:

- As proteínas estruturais (actina, miosina, tropomiosina e actomiosina), que constituem 70-80% do conteúdo proteico total (em comparação com 40% em mamíferos), sendo solúveis em soluções de sal neutro de força iônica razoavelmente alta.
- Proteínas sarcoplasmáticas (mioalbumina, globulina e enzimas) que são solúveis em soluções salinas neutras de baixa força iônica, constituindo entre 25-30% da proteína.
- Proteínas do tecido conjuntivo (colágeno), representando quase 3% da proteína em teleósteos e cerca de 10% em elasmobrânquios (em comparação com 17% em mamíferos).

A proteína é a principal fonte de aminoácidos e uma importante fonte de energia dentro da dieta. Além desta nutrição básica, as proteínas contêm motivos que podem possuir bioatividade. Um grande foco da pesquisa recente em alimentos tem sido a identificação de várias bioatividades em fontes de proteína de baixo valor para aplicação potencial como ingrediente alimentar funcional. Assim, tem ocorrido uma quantidade significativa de pesquisa realizada para extrair peptídeos bioativos de hidrolisados de várias fontes de proteína. Estas fontes de proteína incluem soro de leite e caseína, pescados, ovo, trigo, e soja, entre outros (Sharkey *et al.*, 2020).

A carne é a porção comestível que têm importância pelo seu papel nutricional e socioeconômico, por apresentar alto valor nutritivo, sendo constituída principalmente de tecido muscular, tecido conjuntivo e gordura. A fração proteica apresenta alto valor biológico, qualidade e digestibilidade, além de um teor apreciável de aminoácidos essenciais. A digestibilidade da fração proteica de carnes é alta, acima de 90%, conforme a espécie, é superior a do leite, devido à mínima quantidade de tecido conjuntivo. As proteínas contráteis actina e miosina são as encontradas em maior concentração na fibra muscular dos peixes (Contreras-Guzmán, 1994; Freiria, 2017; Lahnke, 2022).

O concentrado proteico obtido por meio da CMS, é uma das alternativas tecnológicas de melhor aproveitamento da parte comestível do pescado, gerando um produto composto basicamente de proteínas miofibrilares, tornando-se assim uma fonte promissora para alimentos funcionais e formulados. Além disso, pode potencializar propriedades funcionais da proteína como solubilidade, capacidade de formação de espuma dentre outras (Pacheco, 2022).

3.5 Hidrolisados proteicos (HP)

Os subprodutos gerados no processamento de pescado são ricos em proteínas (8 a 35 %) (Sila *et al.*, 2016) e lipídeos, muitas vezes eliminados sem aproveitamento, provocando um grande impacto ambiental. Estes subprodutos podem ser utilizados na produção de concentrados (CP) e hidrolisados proteicos (HP), farinha e óleo de peixe (Sucasas, 2011), biodiesel e biogás (Cheerawit *et al.*, 2012), podendo também ser usados na indústria farmacêutica, médica e cosmética.

As propriedades técnicas funcionais dos hidrolisados dependem de suas características estruturais, incluindo equilíbrio hidrofílico/lipofílico, comprimento da cadeia, conformação, flexibilidade e ponto isoelétrico. Hidrolisados de menor massa molar exibem melhor capacidade de retenção de água do que peptídeos de tamanho maior, uma vez que peptídeos menores são frequentemente mais hidrofílicos (Felix *et al.*, 2019).

Os hidrolisados proteicos de peixes (FHP - *fish protein hydrolysates*) mesmo quando produzidos com subprodutos de baixo valor comercial, são produtos com elevado valor nutricional que contém predominantemente di e tripeptídeos (Dinel *et al.*, 2021; Mangano *et al.*, 2021), que são produtos da decomposição de proteínas de

peixe em peptídeos menores, que normalmente contêm de 2 a 20 aminoácidos (Chalamaiah *et al.*, 2012). Obtidos por via química ou enzimática, sendo facilmente absorvidos que os aminoácidos livres e as proteínas intactas.

Por conseguinte, a hidrólise enzimática é considerada a forma mais eficaz para obter proteínas com propriedades bioativas. Qualquer processo de hidrólise envolve pelo menos cinco variáveis independentes, sendo elas a concentração do substrato proteico, relação enzima-substrato (E/S), pH, temperatura e tempo. Geralmente, existe uma combinação ideal de pH e temperatura, onde a enzima mostra atividade mais alta (Zamora-Sillero *et al.*, 2018).

Para promover a atividade biológica de peptídeos, que são inativos na estrutura nativa da proteína, elas devem ser liberadas por proteólise (digestão *in vivo*) ou hidrólise (*in vitro* por enzimas). O efeito da variação da concentração e do tempo de hidrólise no hidrolisado proteico, estavam contidos com alta quantidade de aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular, sendo fonte de antioxidante e inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA) (Chuesiang; Sanguandeeikul, 2015).

Os peptídeos gerados durante a hidrólise dependem em grande parte da especificidade da(s) enzima(s) proteolítica(s) utilizada(s), temperatura de hidrólise, pH e relação enzima/substrato. Dada a grande variedade de opções de enzimas a serem consideradas, dependendo do resultado primário desejado (pequenos peptídeos, peptídeos de comprimento médio, etc.) existem muitas permutações possíveis de peptídeos que podem ser produzidos como resultado do processo de hidrólise e isso se reflete na variabilidade dos dados aqui apresentados e nas diferenças nas dosagens utilizadas (Sharkey, 2020).

3.6 Hidrólise enzimática

As proteínas hidrolisadas passam por um processo que resulta na quebra da molécula proteica em cadeias peptídicas menores e aminoácidos livres. Dada a grande variedade de opções de enzimas a serem consideradas dependendo do resultado primário desejado (pequenos peptídeos, peptídeos de comprimento médio, etc.) dependem da especificidade das enzimas proteolíticas utilizadas, da temperatura do processo de hidrólise, do pH e da proporção enzima/Substrato. E isto se reflete nos efeitos desejáveis em uma hidrólise de uma estrutura proteica e diferenças das dosagens usadas (Sharkey, 2020).

Figura 2 - Exemplo de hidrólise enzimática

Fonte: Autoria própria (2023).

Na hidrólise com enzima(s) adicionada(s) não ocorrem alterações negativas nos aminoácidos, nem a formação de substâncias tóxicas, sendo o processo de hidrólise realizado em condições suaves e muito controladas, permitindo assim um melhor controle do processo de hidrólise e do produto resultante. A utilização de enzimas proteolíticas é comum nas indústrias alimentícias, por não necessitarem de altas temperaturas e geralmente clivarem ligações peptídicas específicas, o que torna possível a previsão do perfil peptídico, permitindo assim a repetibilidade do processo e padronização (Lindberg *et al.*, 2021; Guadix *et al.*, 2000).

De acordo com Szczodrak e Fiedurek (1996) e Zhu (2005), o rendimento da hidrólise enzimática é governado por muitos fatores, que incluem tipo e concentração de substrato, pré-tratamento, inibição das enzimas pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, tempo de reação, pH e agitação. O processo de hidrólise enzimática é caracterizado no início por uma fase logarítmica, devido à liberação rápida de açúcares solúveis na reação. Após esta fase, há uma taxa de declínio na produção de açúcares (Gregg; Sanddler, 1996). Esta queda da produtividade pode estar relacionada com inibição pelo produto, perda da enzima por adsorção à lignina ou inativação da enzima por diversos fatores, tais como desativação térmica e/ou mecânica (Gregg; Sanddler, 1996; Dasari; Berson, 2007).

Os HP obtidos apresentam um valor nutricional semelhante ao das proteínas originais, mas exibem diversas atividades biológicas que não se manifestam nas proteínas intactas. Este processo permite obter produtos com grande reprodutividade em virtude das especificidades das enzimas utilizadas e do controle das condições de hidrólise. Assim, as características pretendidas para o produto podem ser controladas

com base na seleção da enzima e das condições deste processo (Kurozawa *et al.*, 2009).

Entretanto, num processo industrial, na seleção da enzima devem se levar em consideração vários fatores que incluem, por exemplo, o preço, a disponibilidade no mercado e a garantia da repetibilidade da atividade enzimática.

Ao produzir hidrolisados proteicos de peixe (FPH) usando enzimas sob condições controladas, a possibilidade de variável é reduzida. No entanto, isso não elimina completamente a variação, pois ainda pode haver alguma variação entre os lotes de hidrolisado. A vantagem da hidrólise enzimática sobre a hidrólise ácida ou microbiana, é o tempo relativamente curto necessário para produzir um alto grau de hidrólise. Acredita-se que os peptídeos curtos resultantes sejam mais resistentes à digestão gastrointestinal do que as proteínas intactas. Isto os torna muito mais interessantes para aplicação em alimentos funcionais (Zhang, 2016; Sharkey, 2020).

Os parâmetros mais importantes da reação da hidrólise enzimática são as concentrações de substrato (proteína), relação enzima/substrato, pH e temperatura. Além da especificidade e propriedades da enzima, existem outros parâmetros responsáveis pela trajetória da reação de hidrólise da proteína. A hidrólise enzimática da proteína resulta em: diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis, exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína (Roman; Sgarbieri, 2005).

A reação enzimática de hidrólise de proteínas de peixe pode resultar em duas frações proteicas, uma parte solúvel e outra insolúvel. Enzimas como a papaína, alcalase, neutrase e protamex foram utilizadas para obter hidrolisados de proteínas aquáticas. As características dos estruturais dos hidrolisados estão relacionadas aos locais de clivagens da proteína (Noman *et al.*, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR - Campus Campo Mourão), por meio do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA). A estrutura de laboratórios multiusuários da UTFPR também foi utilizada.

4.1 Matéria-prima

A CMS de tilápia do Nilo foi gentilmente cedida por uma empresa processadora de filés da região oeste do estado do Paraná. Após o recebimento das amostras congeladas, estas foram armazenadas em freezer a uma temperatura de -18°C.

As enzimas alcalase protease obtida do *Bacillus licheniformis* e a papaína enzima vegetal ambas da marca Sigma-Aldrich, foram adquiridas com recurso financeiro de editais de fomentos de apoio a pesquisa da UTFPR.

4.2 Obtenção do concentrado proteico (CP)

O concentrado proteico foi obtido de acordo com o método de Eisele e Brekke (1981) e Vidal (2011) com modificações neste trabalho. As amostras de CMS foram descongeladas parcialmente em geladeira a 4 °C por aproximadamente 8 horas antes das análises. Em seguida, pesadas 100 g de CMS, e submetidas a lavagens considerando a proporção de 1:3 (sólido: líquido). A lavagem inicial foi realizada com água destilada refrigerada com a temperatura de aproximadamente 10 °C, em banho maria invertido, sob agitação no agitador mecânico da (Fisaton®), a 1.500 rpm, por 5 minutos. A amostra foi filtrada, para retirar o excesso de água, usando-se um saco de microfibras de poliéster. Após a lavagem fez-se a filtração, descartando esta água de lavagem.

A segunda lavagem foi realizada com ácido fosfórico (H₃PO₄) a 0,05%, agitando-se mecanicamente em um agitador, por 15 minutos, a uma temperatura de 5 °C, visando a desodorização do concentrado proteico e alcance do pH $\pm$ 5,0, considerado o ponto isoelétrico da proteína miofibrilares de carnes segundo Kristinsson (2003) no ponto isoelétrico a proteína apresenta a menor solubilidade, formando precipitados. Após aguardar a decantação dos sólidos da CMS, o processo de filtragem foi realizado.

A terceira lavagem foi novamente realizada com água destilada, seguindo as mesmas condições da primeira lavagem. Deixada em repouso para decantar por aproximadamente 5 minutos, realizou-se novamente a filtração. Descartou-se o líquido da filtração, e a parte sólida precipitada da última lavagem de CMS foi disposta em bandejas forradas com papel alumínio, submetidas à secagem em estufa com circulação de ar da marca CIENLAB®, por 15 horas, a uma temperatura de 50 °C.

O material seco foi submetido a uma lavagem com etanol 70%, para redução do conteúdo lipídico filtrado com uma peneira 75 mm e levado a estufa novamente, por 3 horas a 50 °C. Em seguida, o material seco, denominado de concentrado proteico (CP) foi triturado em liquidificador, embalado em sacos plásticos e mantidos em congelamento a -18 °C para as análises posteriores. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3 Determinação da composição centesimal proximal do CP

A análise de umidade foi realizada pelo método gravimétrico foi utilizado para determinar a umidade a 105 °C até obtenção de peso constante. determinação de proteínas foi feita pelo processo de digestão de micro Kjeldahl, com correção do fator nitrogênio-proteína de 6,25. ambas de acordo com os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação de lipídeos foi realizada de acordo com o proposto por Bligh e Dyer (1959), onde a extração de lipídeos é realizada a frio, utilizando uma mistura de clorofórmio, metanol e água.

4.4 Processo de hidrólise

Para hidrólise do concentrado proteico foram utilizadas 2 (duas) diferentes enzimas, Alcalase 2,4L, e Papaína, ambas provenientes da empresa Sigma Aldrich. Cada enzima foi submetida a condições ideais de temperatura e pH (Alcalase 2,4L pH 8,0/ 54 °C; Papaína pH 5,5/ 50 °C). Com a finalidade de avaliar a influência das concentrações das enzimas e do tempo no processo de hidrólise no CP, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O DCCR foi planejado utilizando para determinar o ponto ótimo da hidrólise do concentrado proteico e obter um modelo quadrático completo que descreva o processo enzimático. O delineamento adotado para o DCCR contém 2 (dois) pontos centrais e 2 (dois) pontos axiais. A Tabela 1 apresenta os valores codificados e decodificados analisados para os

experimentos em relação as duas enzimas. Considerando como variáveis dependentes o grau de hidrólise, a solubilidade e a capacidade de emulsificação. As enzimas foram adicionadas ao CP em concentrações de 0,50, 0,75 e 1,00% peso/peso (p/p) sobre substrato (concentrado proteico/CP) e incubadas por três diferentes tempos, sendo 1,0, 2,5 e 4,0 horas.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática em concentrado proteico de Tilápia com os valores codificados e decodificados para os fatores analisados

Experimentos	Concentração alcalase (%) x_1	Tempo (horas) x_2
1	0,5 (-1)	1 (-1)
2	0,5 (-1)	4 (1)
3	1,0 (1)	1 (-1)
4	1,0 (1)	4 (1)
5	0,3975 (-1,41)	2,5 (0)
6	1,1025 (1,41)	2,5 (0)
7	0,75 (0)	0,385 (-1,41)
8	0,75 (0)	4,615 (1,41)
9 (C)	0,75 (0)	2,5 (0)
10 (C)	0,75 (0)	2,5 (0)

Experimentos	Concentração papaina (%) x_1	Tempo (horas) x_2
1	0,5 (-1)	1 (-1)
2	0,5 (-1)	4 (1)
3	1,0 (1)	1 (-1)
4	1,0 (1)	4 (1)
5	0,3975 (-1,41)	2,5 (0)
6	1,1025 (1,41)	2,5 (0)
7	0,75 (0)	0,385 (-1,41)
8	0,75 (0)	4,615 (1,41)
9 (C)	0,75 (0)	2,5 (0)
10 (C)	0,75 (0)	2,5 (0)

Fonte: Autoria própria (2022).

Para cada experimento pesou-se 10 g de substrato (concentrado proteico), adicionou 50 mL de água destilada, o pH foi ajustado com soluções de NaOH 0,05M e/ou HCl 0,1M até chegar no pH ideal para cada enzima. Então as concentrações de enzimas foram adicionadas aos tratamentos (0,5, 0,75 e 1% peso/peso). As soluções foram mantidas sob agitação mecânica em um banho termostático, a uma velocidade de 120 rpm.

Transcorrido o tempo de hidrólise, as enzimas foram inativadas por 2 métodos:

- Com ácido tricloroacético (TCA) 6,25%, deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos e posteriormente centrifugados por 20 minutos

a 6000 rpm a 4 °C. Após a centrifugação foi realizado a filtração em papel Whatmman n° 40 para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. O líquido filtrado foi a amostra foi utilizada para fazer análises de determinação de grau de hidrólise (GH).

- O restante da solução foi inativado por temperatura a 90°C por 15 minutos. Esta amostra foi então liofilizada para as demais análises de solubilidade, capacidade emulsificante e espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

4.5 Determinação do grau de hidrólise (GH)

O GH (Equação (1)) das enzimas proteolíticas foi realizado mediante a relação da quantidade de proteínas totais, pelo método de microKjeldahl e a quantidade de proteínas solúveis determinada pelo método de Biureto e expresso como porcentagem, segundo o método descrito por Hoyle e Marrit (1994) por Baek e Cadwallader (1995). Para o cálculo das proteínas solúveis foi necessário a elaboração de curvas que relacionassem a absorbância com a concentração utilizando a albumina com substância padrão. As leituras foram realizadas em 550 nm.

$$GH(\%) = \frac{\text{Proteínas solúveis em TCA}}{\text{Proteína total da amostra}} \times 100. \quad (1)$$

4.6 Determinação de solubilidade dos Hidrolisados proteicos de peixe (FPH)

A solubilidade proteica dos hidrolisados foi determinada conforme descrita por Chalamaiah *et al.* (2010) com algumas adaptações. Para isto, 300 mg de amostra de HP foram diluídas em 30 mL de água destilada, e a solubilidade foi determinada em três valores de pH diferentes a 5,0, 7,0 e 9,0. Os ajustes dos valores do pH foram realizados com a adição de ácido clorídrico 0,5 N (HCl) e/ou hidróxido de sódio 0,5 N (NaOH). A solução foi agitada à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 30 min e centrifugada a 6000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O conteúdo de proteína no sobrenadante foi determinado usando o método de Biureto e a proteína total foi determinada pelo método de microKjeldahl (IAL, 2008). A solubilidade da proteína foi calculada da seguinte forma.

$$Solubilidade(\%) = \frac{Proteína\ no\ sobrenadante}{Proteína\ total\ da\ amostra} \times 100. \quad (2)$$

4.7 Capacidade emulsificante dos Hidrolisados proteicos de peixe (FPH)

As capacidades emulsificantes foram determinadas de acordo com o método descrito por Pearce e Kinsella (1978) com algumas modificações. A capacidade emulsificante foi determinada também em três valores de pH igual a 5,0; 7,0 e 9,0. Preparou-se inicialmente uma amostra de CP hidrolisado contendo a seguinte concentração 1 mg/mL e pegou-se uma alíquota de 90 mL e na sequência fez-se o ajuste dos valores de pH para 5,0, 7,0 e 9,0. Após o ajuste do pH adicionou-se 30 mL de óleo de soja, respectivamente. Cada mistura foi homogeneizada (Ultra-Turrax T18, IKA) a uma velocidade de 20.000 rpm por 1 minuto e, em seguida, 100 µL da emulsão foram pipetados do fundo da mistura e diluído em 10 mL com solução de SDS a 0,1% aos 0 e 10 minutos após a homogeneização. Na sequência fez-se a leitura dos valores de absorbância medidos a 500 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Os valores de absorbância nos tempos A₀ e A₁₀ foram usados para calcular o EAI (4) e o ESI (5), como mostrado nas Equações (3) e (4).

$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times DF \times A}{C \times 2,5 \times 1000} \quad (3)$$

onde DF é um fator de diluição (100), C a concentração inicial de hidrolisados (g/mL), 0,25 é a fração do óleo utilizado para formar a emulsão, A₀ e A₁₀ são as absorbâncias da emulsão diluída em 0 e 10 minutos. Cada amostra foi medida em triplicata.

$$ESI(min) = \frac{A_0}{A_{10}-A_{10}} \times 10. \quad (4)$$

4.8 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). As variáveis solubilidade e grau de hidrólise foram correlacionados utilizando Análise de Componentes Principais (ACP). Estes componentes principais são combinações

lineares das variáveis originais e são classificados em ordem decrescente de acordo com a quantidade de variação dos dados que eles explicam.

Foi utilizado o DCCR para determinar o ponto ótimo da hidrólise do concentrado proteico em relação a capacidade emulsificante obtido pela ação das enzimas alcalase e papaína através da elaboração dos gráficos de contorno. Sendo possível a determinação de um modelo quadrático completo, ou seja, o grau de desejabilidade que descreveu o processo enzimático de cada enzima avaliada. Para a análise dos resultados foi utilizado o *software* OriginPro 2020.

4.9 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu, modelo IRAffinity-1) foi realizada na Central Analítica Multiusuário da UTFPR Campo Mourão (CAMulti-CM). O objetivo foi vincular os picos principais com as ligações químicas majoritárias constituintes de cada molécula, permitindo a identificação das principais bandas do hidrolisado proteico, segundo o modelo matemático significativo, (hidrolisado da enzima alcalase na concentração de 1,1025 % e no tempo de 4,615 horas). Foram utilizadas aproximadamente 3 mg de hidrolisado proteico liofilizado e 100 mg de brometo de potássio. Os espectros FTIR foram determinados no intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} com 32 varreduras para cada amostra analisada.

A correção da linha base foi realizada no próprio *software* do equipamento e a normalização dos espectros foi realizada em *software* OriginPro 2024.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do CP

O teor de umidade do concentrado proteico (CP) obtido de tilápia do Nilo seco em estufa com circulação de ar a 50 °C por 18. h foi de 13,52 g/100 g, valor este maior do que observado por Silva *et al.* (2003) em sopa de peixe elaborada a partir de CMS de piranha-preta (10,53 g/100 g) seca em condições parecidas em estufa com circulação de ar a 60 °C por 18 h. No estudo de Vidal *et al.* (2011), o CP de resíduos obtido a partir de CMS de resíduos da filetagem de tilápia-do-Nilo, apresentou teores de umidades variando entre 0,37% e 2,11%, seca em estufa a 65 °C por 18 horas.

Para o teor de lipídios, o CP apresentou uma porcentagem de 7,34 g/100g, semelhante ao encontrado por Souza *et al.* (2022) que foi de 6,08 g/100 g no seu estudo para elaborar mortadela de tilápia do Nilo com diferentes quantidades de CMS congelada.

Figura 3 - Amostra de CMS



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 4 - Concentrado proteico obtido da CMS da tilápia



Fonte: Autoria própria (2023).

O teor de proteína do CP (65,94 g/100 g) foram próximos aos encontrados por Vidal Campello *et al.* (2021) (62,39 g/100 g) em testes para se obter concentrados proteicos a partir de resíduos da filetagem de tilápia em escala industrial. E similares também ao encontrado no estudo de Romadhonia *et al.* (2016), que obteve teores de proteínas dos CP de *Ophicephalus striatus* com valores médios de 63,78%. Segundo Balaswamy *et al.* (2007) o conteúdo de proteínas que variam em concentrados proteicos é influenciado por diversos fatores, incluindo o tipo de peixe, métodos da extração e tipos de solventes e secagem aplicados, bem como a composição da matéria-prima. Acrescenta-se também que o teor de proteína do peixe é afetado pela umidade, onde existe uma relação inversa entre o teor de proteína e água (Ogawa, 1999). Observa-se, portanto, que a efetiva remoção de água resultou na obtenção de um CP com elevado teor de proteína.

Os resultados da análise dos componentes principais (ACP) e do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que foi o planejamento utilizado para determinar o ponto ótimo de obtenção do hidrolisado proteico e obtenção de um modelo quadrático completo que descrevesse o processo enzimático, estão apresentados no decorrer do texto abaixo. Inicialmente se determinou o grau de hidrólise para se verificar a quebra dos peptídeos e sua influência tanto na solubilidade, quanto na capacidade de emulsão. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$ e os valores do grau de hidrólise (GH) encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2 - Médias e desvios para o grau de hidrólise enzimática em concentrado proteico de Tilápia em função da concentração e tempo das enzimas alcalase e papaína

Experimentos	Grau de hidrólise (g/100g)			
	Concentração enzimas (%)	Tempo (horas)	Alcalase	Papaína
CP1	0,5	1	23,41 ^e ±0,39	88,41 ^e ±1,37
CP2	0,5	4	7,80 ^h ±1,18	107,41 ^d ±0,38
CP3	1,0	1	12,74 ^f ±0,97	105,88 ^d ±2,42
CP4	1,0	4	4,59 ⁱ ±0,15	131,47 ^a ±1,93
CP5	0,3975	2,5	56,59 ^a ±0,54	114,00 ^c ±0,66
CP6	1,1025	2,5	32,44 ^c ±0,26	121,36 ^b ±1,66
CP7	0,75	0,385	40,89 ^b ±1,18	83,36 ^e ±1,25
CP8	0,75	4,615	9,54 ^g ±0,13	121,58 ^b ±1,01
CP9	0,75	2,5	12,59 ^f ±0,15	113,46 ^c ±1,77
CP10	0,75	2,5	28,59 ^d ±0,90	107,41 ^{cd} ±5,00

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Fonte: Autoria própria (2024).

Com base nos resultados observa-se maior grau de hidrólise para a amostra CP5 alcalase (concentração 0,3975%, tempo de hidrólise 2,5 h) e CP4 papaína (concentração 1,0 % e tempo de hidrólise 2,5 h). Os experimentos CP4, CP5, CP1 e CP7 empregaram a concentração de ambas enzimas (alcalase e papaína) de 1,0 %, 0,3985%, 0,5% e 0,75% respectivamente, enquanto que o tempo de hidrólise foi de 4,0 h, 2,5 h, 1,0 h e 0,3985 h, respectivamente. Com isso, nas condições estudadas, pode-se inferir que a menor concentração (0,3985%) de alcalase resultou no seu maior grau de hidrólise (56,59 g/100 g), assim como a maior concentração (1,0%) de papaína resultou no seu maior grau de hidrólise (131,47 g/100g).

Já com a exposição a enzima papaína o experimento com menor grau de hidrólise (CP4) foi com maior concentração (1,0 %) e tempo de hidrólise (4 horas). Pode-se observar também que a enzima papaína apresentou maior grau de hidrólise para todos os experimentos (Tabela 3).

O GH encontrado no CP5 (56,96 g/100 g) com a concentração da enzima alcalase de 0,3975 %, no tempo de 2,5 h, em pH 8,0, é próximo ao obtido por Finkler

et al. (2022), que no seu estudo avaliaram a produção de hidrolisados a partir de aparas de filé de tilápia e encontraram GH de 60,05 g/100g usando alcalase 2.4L™ com um tempo de hidrólise de 3 h, com concentração enzimática de 0,677%, pH 7,5 e temperatura de 39,93 °C.

Dong *et al.* (2008) utilizaram a enzima alcalase em concentração de 0,5% e com condições reacionais de pH 8,0 e temperatura de 60 °C resultando em um GH de aproximadamente 23 g/100 g após 6 horas de tempo de hidrólise. No mesmo estudo utilizou também, a enzima Flavourzyme (protease obtida do *Aspergillus oryzae*) em nível de 0,5% e com pH 7,0 e 50 °C, resultando em um GH de aproximadamente 9 g/100g após 6 horas de tempo de hidrólise. Vázquez *et al.*, (2017), estudando propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas de hidrolisados proteicos de descartes do peixe da espécie *Scylliorhinus canícula*, obtiveram 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 g/100 g) a um pH 6,0 e 55 °C e o maior GH (29,26 g/100 g) a um pH 11,1 e 72,7 °C.

Observou-se ainda, que no caso da enzima alcalase nos experimentos CP1 e CP2 onde a concentração da enzima foi a mesma (0,5%), porém com diferentes tempos de hidrólise de 1 h e 4 h, respectivamente, o GH diminuiu. Segundo Nelson e Cox (2014) a concentração da enzima e o tempo de hidrólise pode afetar a eficiência da reação enzimática com o substrato de diferentes maneiras.

Em geral, a velocidade da reação enzimática aumenta com o aumento da concentração da enzima. Porém, com a progressão da reação, a atividade enzimática começa a ser inibida devido à formação de compostos que competem por ligações em sítios ativos ou sítios alostéricos da enzima e do substrato (Nelson; Cox, 2014), acreditando-se que seja este o motivo pelo qual em alguns experimentos tiveram maior tempo de exposição e menor GH, ou seja, de atividade enzimática pela alcalase possa ter diminuído o seu grau de hidrólise (GH) pela redução dos substratos disponíveis para reação.

Já para a enzima papaína a ação foi diferente, ou seja, o aumento de exposição com a mesma concentração da enzima aumentou o grau de hidrólise, conforme pode ser visto nos experimentos CP1 e CP2 que apresentam mesma concentração, mas tempos de exposição diferentes, o mesmo pode ser observado nos experimentos CP3 e CP4, e nos experimentos CP8, CP9 e CP10. A papaína tem especificidade bastante

ampla, tem atividades de endopeptidase, amidase, esterase, exibe preferências específicas de substrato, principalmente para resíduos hidrofóbicos ou aromáticos volumosos (Tavano, 2013). Normalmente a papaína apresenta atividade proteolítica na faixa de pH 5,0 a 7,0, sendo seu pH ótimo 6,5, e é estável em altas temperaturas (Schechter; Berger, 1968). Apresenta alta especificidade, clivando preferencialmente ligações envolvendo aminoácidos com grande cadeia lateral hidrofóbica na posição. Porém, o aparecimento de características sensoriais desagradáveis no hidrolisado, como o amargor, pode ocorrer e outras proteases podem ser necessárias para melhorar esta característica (Fox *et al.*, 1968).

Assim, a extensão das ligações peptídicas que são hidrolisadas pelas enzimas proteolíticas, está significativamente relacionada ao rendimento de recuperação proteico, às atividades biológicas e às propriedades funcionais do mesmo (Yarnpakdee *et al.*, 2012). Importante destacar que, embora tenham ocorrido estas considerações, o grau de hidrólise foi cerca de 57% maior na papaína do que na alcalase para o maior valor obtido, e cerca de 95% maior na papaína do que na alcalase para o menor valor obtido.

Os resultados de ambas enzimas utilizadas (alcalase e papaína) para verificar o efeito da concentração da enzima e o tempo de exposição sugerem, que a hidrólise produziu peptídeos mais curtos, avaliando o GH. No entanto, as amostras hidrolisadas com a enzima papaína, apresentaram uma hidrólise extensiva, resultando num elevado rendimento de aminoácidos livre e conseqüentemente propriedades funcionais indesejáveis (Chalamaiah *et al.*, 2010).

Figura 5 - Hidrolisado proteico obtido da CMS da tilápia liofilizado



Fonte: Autoria própria (2023).

5.2 Solubilidade proteica

Observa-se que na Tabela 4 que a solubilidade de um modo geral foi menor nos experimentos que tiveram a atividade de hidrólise da enzima papaína, do que da enzima alcalase. E observamos neste estudo que o grau de hidrólise (Tabela 3) foi maior em muitos experimentos que tiveram a utilização da papaína.

A determinação do grau de solubilidade de cada hidrolisado proteico foi avaliada em três valores de pH diferentes, pH 5,0, pH 7,0 e pH 9,0. Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios da solubilidade em cada experimento para as enzimas estudadas, alcalase e papaína.

Tabela 3 - Médias e desvios da solubilidade (g de proteína em solução/100g de proteína total) dos hidrolisados proteicos de peixe em função do pH

Experimentos	Solubilidade (g de proteína em solução/100 g de proteína total)		
	Alcalase		
	pH 5	pH 7	pH 9
CP1	79,37 ^{cC} ±2,67	151,15 ^{aB} ±3,54	319,37 ^{aA} ±7,58
CP2	118,29 ^{aB} ±3,59	115,26 ^{cB} ±2,32	226,47 ^{bA} ±2,67
CP3	71,28 ^{dC} ±1,75	106,66 ^{dB} ±2,20	144,58 ^{dA} ±5,13
CP4	82,90 ^{cC} ±2,67	126,38 ^{bB} ±3,65	170,86 ^{cA} ±7,85
CP5	103,12 ^{bC} ±1,75	110,71 ^{cB} ±1,75	140,53 ^{dA} ±4,32
CP6	115,26 ^{aB} ±3,16	160,75 ^{aA} ±4,55	169,85 ^{cA} ±3,50
CP7	98,07 ^{bB} ±2,67	98,07 ^{eB} ±2,67	168,84 ^{cA} ±2,53
CP8	103,12 ^{bC} ±2,63	120,31 ^{bB} ±1,82	150,14 ^{dA} ±4,01
CP9	80,88 ^{cB} ±2,20	115,76 ^{cA} ±1,34	117,28 ^{eA} ±1,01
CP10	77,34 ^{cB} ±1,52	115,28 ^{cA} ±1,12	116,27 ^{eA} ±1,34

Experimentos	Papaína		
	pH 5	pH 7	pH 9
CP1	43,85 ^{dB} ±1,72	54,34 ^{cA} ±0,75	46,84 ^{dB} ±0,38
CP2	50,59 ^{cB} ±0,65	57,33 ^{bA} ±0,65	47,78 ^{dB} ±0,32
CP3	51,71 ^{cB} ±0,65	43,28 ^{dC} ±0,32	55,65 ^{bA} ±0,32
CP4	49,46 ^{cB} ±1,30	57,33 ^{bA} ±1,30	41,03 ^{eC} ±0,33
CP5	86,00 ^{aA} ±0,97	63,33 ^{aC} ±0,75	68,07 ^{aB} ±0,36
CP6	42,72 ^{dA} ±1,30	42,72 ^{dA} ±0,65	42,65 ^{eA} ±0,71
CP7	50,59 ^{cB} ±0,65	51,71 ^{cB} ±0,65	56,25 ^{bA} ±1,91
CP8	45,72 ^{dC} ±2,62	59,58 ^{aB} ±0,65	68,01 ^{aA} ±0,97
CP9	60,70 ^{bA} ±0,65	54,71 ^{cB} ±0,38	49,84 ^{cC} ±0,75
CP10	59,21 ^{bA} ±0,75	49,09 ^{cB} ±1,35	50,21 ^{cB} ±0,99

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% e para a solubilidade em cada pH comparando-se todas as amostras entre si.

Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% para a variação da solubilidade em distintos valores de pH para a solubilidade de cada amostra.

Fonte: Autoria própria (2023).

Assim, as características de solubilidade de um ingrediente proteico dependem dos parâmetros de processamento usados para obtê-lo, como tipo de solvente, pH, força iônica, forças mecânicas e temperatura (Grossmann, 2023).

O pH afeta a densidade e a distribuição das cargas na molécula da proteína de tal forma que no pH do ponto isoelétrico (pI), da proteína apresenta um mínimo de solubilidade, devido ao número de cargas positivas e negativas ser igual. Portanto, elas se neutralizam intramolecularmente. Normalmente quanto maior o número de grupos apolares expostos, mais forte será a atração hidrofóbica entre as moléculas de proteína e maior será a sua tendência de formar aglomerados (Desantis *et al.*, 2022). Diferentes resíduos de aminoácidos graus diferentes de hidrofobicidade e influenciam diretamente a hidrofiliabilidade da superfície geral das proteínas (Dyson *et al.*, 2006)

A melhor solubilidade de um hidrolisado é devido ao tamanho menor de suas moléculas, comparada com a proteína intacta, e aos grupos amino e carboxila ionizáveis dos aminoácidos recém expostos, que aumentam a hidrofiliabilidade do

hidrolisado. Embora o aumento da solubilidade tenha uma relação positiva com a extensão da hidrólise, precisa-se cuidar para que o hidrolisado não seja extensivamente hidrolisado (Mullally *et al.*, 1995). Como a papaína promoveu maior grau de hidrólise, por consequência, a quantidade de peptídeos foi maior e o tamanho deles menor, porém a solubilidade foi menor em praticamente todos os experimentos e pH testados quando comparados com a alcalase.

Chen *et al.* (2015) investigaram a solubilização das proteínas miofibrilares, observaram que as proteínas miofibrilares tem baixa solubilidade em forças iônicas com cerca de 0,001-0,2M, mas aumenta a solubilidade com a força iônicas cerca de 1M. Muitas propriedades funcionais das proteínas alimentares musculares estão relacionadas à solubilização das proteínas, e a extração de proteínas musculares. Entretanto, as proteínas musculares solubilizadas em soluções de baixa força iônica em pH neutro produzidas por este método pode ser útil para o isolamento de proteínas para fins de pesquisa ou para uso comercial. O impacto das condições durante o processamento e a funcionalidade do produto final ainda precisa ser elucidada.

5.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para as hidrolises com a enzima papaína, a maior solubilidade foi determinada no pH 5,0 para amostra FPH5, e o menor para a amostra FPH6, tanto no pH 5,0 quanto 7,0 e 9,0, com mesma média significativa para a amostra FPH4 no pH 9,0. Nas amostras hidrolisadas com a enzima alcalase os valores da solubilidade são tão maiores quanto menores os valores do grau de hidrólise, assim como nas amostras hidrolisadas com a papaína, os valores da solubilidade são tão menores quanto maiores os valores do grau de hidrólise, o que pode ser verificado no gráfico biplot de PCA (Figura 6).

enzimas, que em 120 min (2,0 horas) de hidrólise, os valores de GH para hidrólise da proteína miofibrilar da papaína GH foram significativamente maiores do que o tratamento com alcalase ($P < 0,05$).

Como cada protease possuem diferentes locais de clivagem, diferentes grupos de hidrolisados são expostos (Shu *et al.*, 2018). Alcalase é uma endoprotease profunda que cliva ligações peptídicas com locais de restrição principalmente na ligação peptídica C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos (Zhang *et al.*, 2022) As características estruturais dos hidrolisados, como sequência de aminoácidos, hidrofobicidade de superfície e espectroscopia de absorção, estão relacionadas à sua atividade (Liu *et al.*, 2017).

5.4 Capacidade emulsificante (EAI e ESI)

O FPH é um material tensoativo que contém grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, que promovem a formação de uma emulsão óleo em água. A capacidade proteica pode ser medida através da formação e estabilização da emulsão, fornecendo unidade de área de interface que é estabilizada por unidade de peso de proteína (m^2/g) e sua continuidade ao longo do tempo através de índice de atividade emulsificante (EAI) e por índice de estabilidade de emulsão (ESI) (Noman *et al.*, 2018).

Com relação a variável capacidade de formação da emulsão determinada no presente estudo para os hidrolisados obtidos pela ação das enzimas alcalase e papaína nos pH 5,0, 7,0 e 9,0, os valores médios EAI e EIS estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias e desvios para as amostras dos hidrolisados proteicos de peixe estudados considerando capacidade emulsificante de ambas as enzimas

Amostras	EAI - atividade da emulsão (m ² /g)			EIS - estabilidade da emulsão (min)		
	alcalase			alcalase		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
FPH 1	1,12E-02 ^{bB} ±2,68E-04	1,09E-02 ^{bA} ±1,41E-03	1,05E-02 ^{bB} ±4,32E-04	13,29 ^{cC} ±0,11	20,67 ^{eB} ±1,25	28,54 ^{cA} ±0,73
FPH 2	1,20E-02 ^{bC} ±1,57E-04	1,18E-02 ^{bA} ±1,01E-03	8,30E-03 ^{cB} ±7,51E-04	14,67 ^{bC} ±0,04	30,02 ^{cB} ±0,84	49,79 ^{aA} ±3,93
FPH 3	2,06E-02 ^{bA} ±8,99E-04	2,75E-02 ^{bA} ±3,49E-04	4,10E-02 ^{bA} ±4,83E-04	14,54 ^{bB} ±0,13	90,34 ^{aA} ±2,98	15,31 ^{eB} ±0,24
FPH 4	1,43E-02 ^{bB} ±2,51E-04	2,58E-02 ^{bA} ±2,28E-03	1,38E-02 ^{bA} ±1,61E-03	15,19 ^{bC} ±0,46	19,52 ^{eB} ±1,31	33,29 ^{bA} ±3,10
FPH 5	1,14E-02 ^{bB} ±1,21E-04	1,79E-02 ^{bB} ±1,26E-04	8,20E-03 ^{cA} ±5,93E-04	12,09 ^{dC} ±0,11	20,08 ^{eB} ±0,24	35,53 ^{bA} ±2,81
FPH 6	3,57E+00 ^{aA} ±1,67E-01	2,53E+00 ^{aB} ±2,03E-01	3,20E+00 ^{aA} ±9,98E-02	11,84 ^{dB} ±0,02	22,63 ^{dA} ±0,54	22,66 ^{dA} ±0,85
FPH 7	2,61E-02 ^{bB} ±1,03E-04	2,73E-02 ^{bA} ±3,42E-03	3,23E-02 ^{bA} ±1,09E-03	14,07 ^{bC} ±0,17	16,07 ^{fB} ±1,19	28,09 ^{cA} ±1,02
FPH 8	2,68E-03 ^{cB} ±1,95E-04	7,08E-03 ^{cA} ±1,91E-03	3,29E-02 ^{bA} ±2,88E-03	19,04 ^{aB} ±1,31	47,41 ^{bA} ±1,12	15,33 ^{eC} ±0,29
FPH 9	1,61E-02 ^{bA} ±1,71E-04	3,12E-02 ^{bB} ±7,67E-05	3,69E-02 ^{bA} ±6,66E-04	12,23 ^{dB} ±0,32	25,61 ^{dA} ±0,20	27,32 ^{cA} ±3,16
FPH 10	1,68E-02 ^{bA} ±7,98E-04	2,00E-02 ^{bA} ±6,34E-04	1,65E-02 ^{bA} ±8,61E-04	11,93 ^{dC} ±0,18	17,40 ^{fB} ±0,67	22,71 ^{dA} ±0,80

Amostras	EAI - atividade da emulsão (m ² /g)			EIS - estabilidade da emulsão (min)		
	papaína			papaína		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
FPH 1	1,33E-03 ^{aA} ±1,51E-04	1,52E-03 ^{cA} ±1,54E-04	5,61E-03 ^{bA} ±1,73E-04	51,89 ^{eC} ±4,50	138,89 ^{dA} ±10,37	109,47 ^{eB} ±3,41
FPH 2	1,26E-03 ^{aC} ±3,25E-05	2,37E-03 ^{bB} ±1,63E-04	1,38E-02 ^{aA} ±1,69E-03	57,31 ^{eB} ±4,27	151,73 ^{cA} ±5,16	45,18 ^{gC} ±3,05
FPH 3	1,77E-03 ^{aB} ±1,53E-04	4,56E-03 ^{aB} ±1,27E-04	1,65E-02 ^{aA} ±3,32E-03	37,79 ^{fB} ±1,21	50,16 ^{eA} ±3,81	28,77 ^{hC} ±3,98
FPH 4	8,23E-04 ^{bC} ±1,62E-05	1,26E-03 ^{cB} ±9,65E-05	8,24E-03 ^{bA} ±2,54E-04	65,28 ^{dB} ±5,93	150,43 ^{cA} ±5,64	60,74 ^{fB} ±0,78
FPH 5	5,22E-04 ^{bB} ±1,62E-05	1,30E-03 ^{cA} ±6,05E-05	3,83E-03 ^{cA} ±1,97E-04	85,00 ^{cB} ±2,90	118,26 ^{dA} ±5,64	129,32 ^{dA} ±6,71
FPH 6	9,52E-04 ^{bA} ±3,74E-05	1,72E-04 ^{dB} ±6,14E-06	7,98E-04 ^{dA} ±3,42E-05	54,69 ^{eC} ±0,98	914,15 ^{aA} ±42,38	503,28 ^{bB} ±46,35
FPH 7	1,60E-04 ^{cB} ±1,23E-05	5,10E-04 ^{dB} ±1,62E-05	2,40E-03 ^{cA} ±2,22E-04	399,33 ^{aA} ±30,68	307,49 ^{bB} ±7,92	187,69 ^{cC} ±15,88
FPH 8	4,48E-04 ^{bA} ±1,23E-05	1,54E-04 ^{dB} ±6,14E-06	4,79E-04 ^{dA} ±4,64E-05	101,02 ^{bC} ±3,84	909,95 ^{aA} ±34,42	774,11 ^{aB} ±74,87
FPH 9	1,14E-03 ^{aB} ±7,08E-05	1,34E-03 ^{cB} ±7,67E-05	1,36E-02 ^{aA} ±9,73E-04	41,40 ^{fB} ±3,00	128,04 ^{dA} ±8,12	27,24 ^{hC} ±1,97
FPH 10	6,51E-04 ^{bB} ±1,62E-05	2,21E-03 ^{bA} ±8,49E-04	2,75E-03 ^{cB} ±5,53E-05	9,15 ^{gA} ±0,21	13,80 ^{fA} ±4,59	14,12 ^{iA} ±0,37

FPH hidrolisados proteicos de peixe. Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% para o grau de hidrólise e para a solubilidade em cada pH comparando-se todas as amostras entre si.

Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% para a variação da solubilidade em distintos valores de pH para a solubilidade de cada amostra.

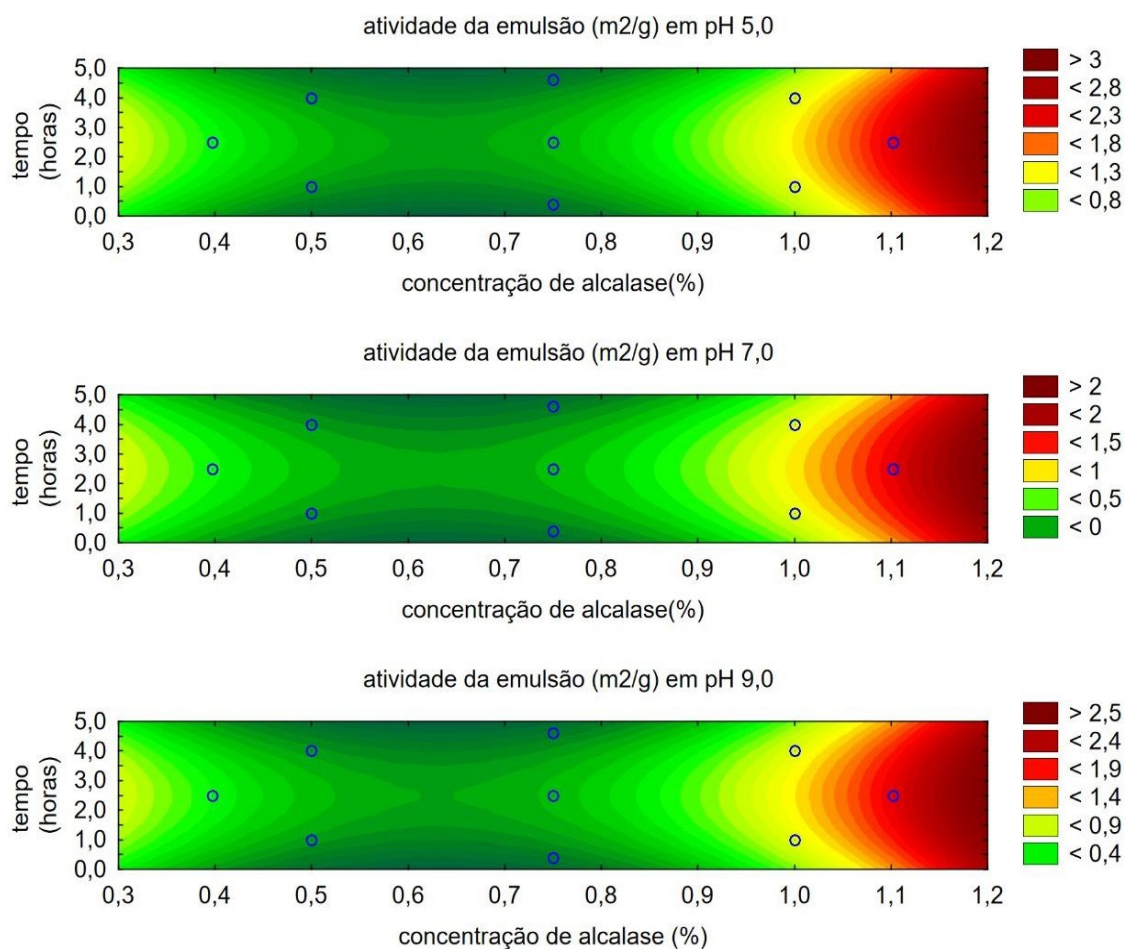
Fonte: Autoria propria (2023).

A turbidez da emulsão foi avaliada a um comprimento de onda de 500 nm. Observou-se que para a atividade de emulsão (EAI), determinada em m^2/g , o maior valor foi verificado na amostra FPH6 de alcalase, com 1,1025% de concentração da enzima, com valores com a mesma média significativa para hidrolises em pH 5,0 ($3,57\text{E}+00 \pm 1,67\text{E}-01 \text{ m}^2/\text{g}$) e 9,0 ($3,20\text{E}+00 \pm 2,03\text{E}-01 \text{ m}^2/\text{g}$). Para a papaína, os valores de atividades de emulsão foram menores do que os observados para a alcalase, e os maiores valores da atividade de emulsão (EAI) estão concentrados no pH 9,0 para as amostras FPH2, FPH3 e FPH9. Observa-se que a atividade de emulsão foi afetada pelo pH, onde as diferenças significativas foram observadas em vários níveis de pH.

Com relação à estabilidade de emulsão (ESI), dada em minutos, o maior valor se deu para a amostra FPH3 ($90,34 \pm 2,98 \text{ min}$) na alcalase no pH 7,0 e nas amostras FPH6 ($914,15 \pm 42,38 \text{ min}$) e FPH8 ($909,95 \pm 34,42 \text{ min}$) para a papaína com pH também 7,0. Menores valores da estabilidade de emulsão (ESI) nas amostras FPH5 ($12,09 \pm 0,11 \text{ min}$), FPH6 ($11,84 \pm 0,02 \text{ min}$), FPH9 ($12,23 \pm 0,32 \text{ min}$) e FPH10 ($11,93 \pm 0,18 \text{ min}$) no pH 5,0 com mesma média significativa para a enzima alcalase e menor para a amostra FPH10 ($9,15 \pm 0,21 \text{ min}$) com pH 5,0 para a enzima papaína, com mesma média significativa nos pH 7,0 e 9,0.

Segundo Kumari *et al.* (2023) os polipeptídios se desdobram em um pH alcalino por causa de suas cargas negativas, o que melhora a orientação da interface e expõe efetivamente hidrofílicos e resíduos hidrofóbicos que estimulam contatos significativos na fronteira óleo-água, aumentando o EAI da proteína hidrolisado. Por outro lado, a estabilidade da camada absorvida que cobre o glóbulo de gordura e a interação entre a camada e o componente hidrofóbico são fatores-chave no ESI (Vo *et al.*, 2020)

Analisando-se de forma individual a capacidade emulsificante da alcalase em relação à concentração (%) e tempo de hidrólise (horas) determinados via DCCR (Tabela 1), verifica-se que a atividade de emulsão (EAI), tanto no pH 5,0, quanto em pH 7,0 e 9,0, tem seus maiores valores localizados na região localizada com tempo aproximadamente de 2,5 horas e maior concentração (Figura 7).

Figura 7 - Gráfico de contorno para a atividade de emulsão

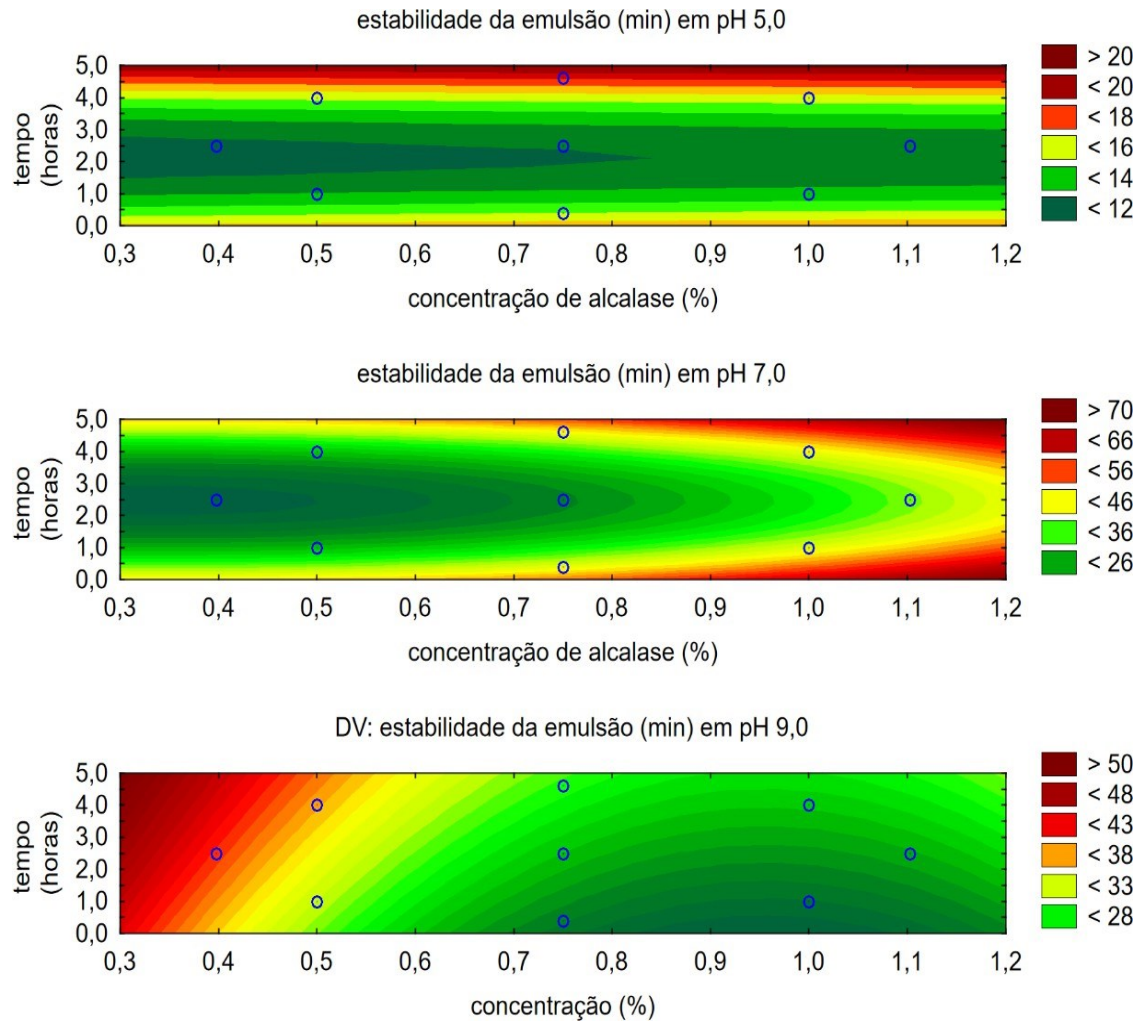
Fonte: Autoria própria (2023).

Para a estabilidade de emulsão (ESI), também observada nos pH 5,0, 7,0 e 9,0, tem-se no gráfico de contorno (Figura 8) regiões um tanto divergentes quanto à concentração da alcalase e o tempo de hidrólise. Embora também se remeta para uma maior concentração e maior tempo, com exceção do pH 9,0, realizou-se emprego da função desejabilidade para determinar um modelo matemático para qual seria a melhor combinação destas duas variáveis que determinaram a capacidade emulsificante, assim como a solubilidade determinada pela alcalase.

Certas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos exercem um papel predominante, pois determinarão as características principais do produto final, definindo seu uso. Logo, a origem da proteína a ser utilizada como matéria-prima para produzir hidrolisados proteicos, assim como o grau de hidrólise obtido devem ser controlados em função das principais propriedades funcionais que se deseja explorar (Centenaro *et al.*, 2009).

De acordo com Panyam e Kilara (1996), a hidrólise extensiva das proteínas resulta em uma drástica perda das propriedades emulsificantes, sendo que estas diminuem linearmente com o grau de hidrólise. Peptídeos maiores promovem maior estabilidade da emulsão, ao passo que a presença de peptídeos menores prejudica a formação e a estabilidade das emulsões. As propriedades emulsificantes das proteínas também dependem da solubilidade inicial.

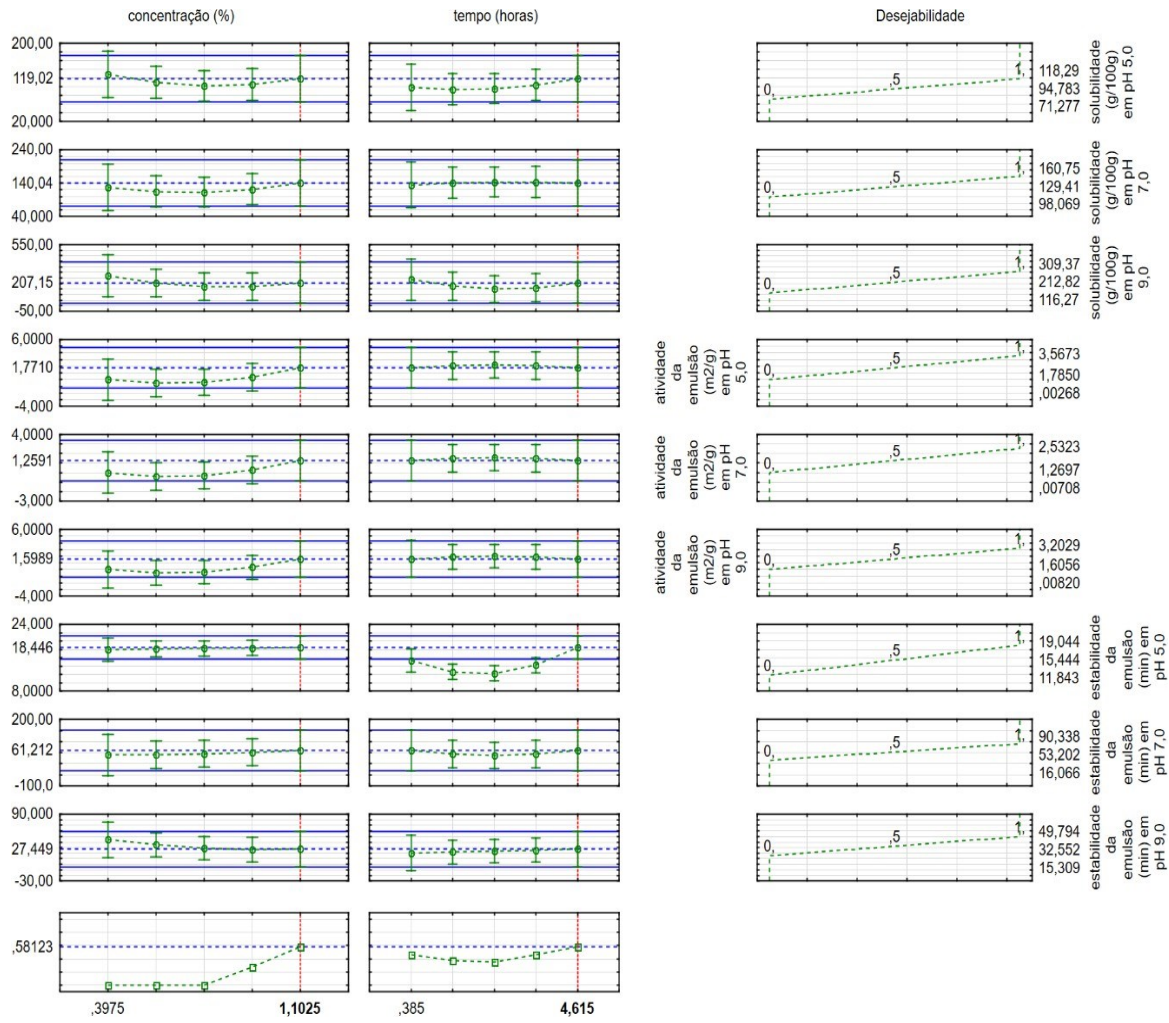
Quanto mais dissolvida a proteína estiver no sistema da emulsão, mais efetiva poderá ser a interface entre a fase óleo e a fase contínua durante a emulsificação. No entanto, a formação de um filme interfacial coesivo e elástico por adsorção de moléculas de proteína na interface poderá ser dificultada pela predominância de pequenos peptídeos. Esta pode ser uma razão da diminuição da capacidade de emulsificação dos hidrolisados à medida que aumenta o grau de hidrólise. Neste estudo o experimento FPH6 da alcalase apresentou resultados significativos melhores para a atividade de emulsão (EAI) em tanto no pH 5,0 mais ácido quanto em pH neutro (7,0) e alcalino (9,0). Já para resultados de estabilidade de emulsão, o experimento HPP3 da alcalase foi o que apresentou maior tempo de atividade (90,34 min) observada em pH neutro (7,0). Ambos apresentaram resultados baixos em grau de hidrólise FPH6 (GH = 32,44 g/100 g) e FPH3 (GH = 12,74g/100g), corroborando com as discussões acima encontradas em literatura.

Figura 8 - Gráfico de contorno para a estabilidade da emulsão

Fonte: Autoria própria (2023).

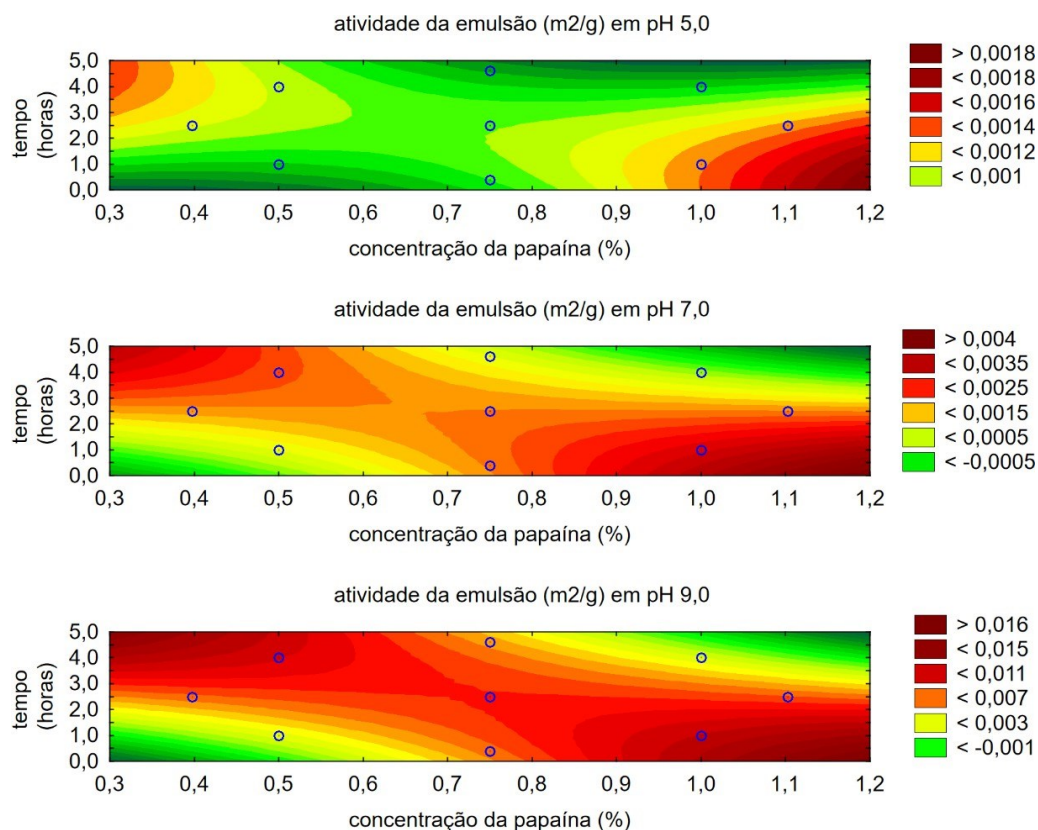
Como resultado gráfico da função desejabilidade, apresenta-se na Figura 9 a resposta otimizada para a combinação da concentração da alcalase e do tempo. Nesta verifica-se que o ideal seria uma concentração de 1,1025% de alcalase, concomitantemente ao tempo de hidrólise de 4,615 horas.

Figura 9 - Representação gráfica da função desejabilidade considerando concentração e tempo para solubilidade e capacidade emulsificante da enzima alcalase



Fonte: Autoria própria (2023).

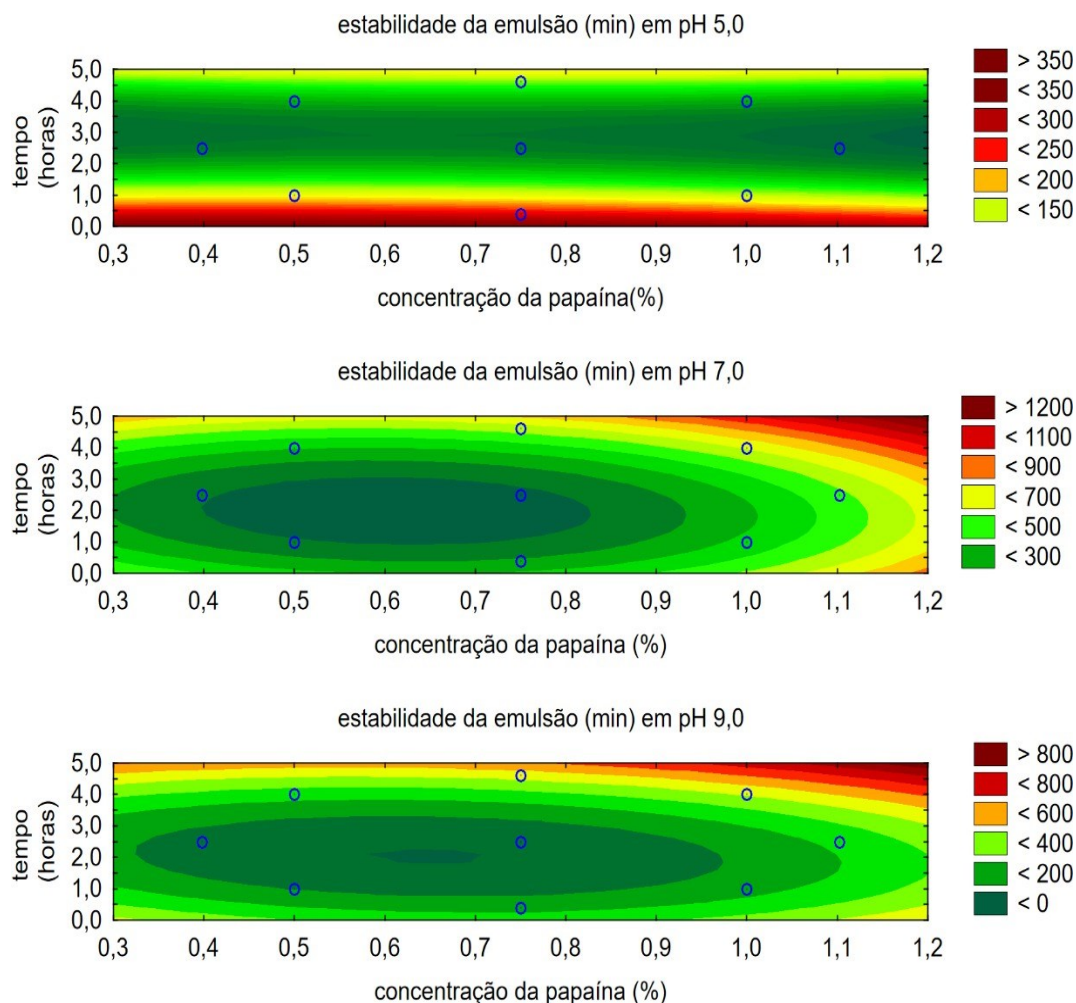
Analisando-se também de forma individual a capacidade emulsificante da alcalase em relação à concentração (%) e tempo (horas) determinados via DCCR (Tabela 1), verifica-se que a atividade de emulsão, tanto no pH 5,0, quanto em pH 7,0 e 9,0, apresentam maiores valores localizados na região localizada com menor tempo e menor concentração (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico de contorno para a atividade de emulsão

Fonte: Autoria própria (2023).

Para a estabilidade de emulsão, também observada nos pH 5,0, 7,0 e 9,0 tem-se no gráfico de contorno (Figura 11) regiões um tanto divergentes quanto à concentração da papaína e o tempo. Mas, foi observado neste estudo valores menores da estabilidade da emulsão da papaína em relação a alcalase (Tabela 4). Embora se remeta para uma maior concentração e maior tempo, com exceção do pH 5,0, realizou-se emprego da função desejabilidade para determinar qual seria a melhor combinação destas duas variáveis que determinaram a capacidade emulsificante, assim como a solubilidade determinada pela papaína.

Segundo Duarte (1998), o efeito do pH na estabilidade das emulsões apresenta uma certa complexidade em valores próximos ao ponto isoelétrico (pI), as proteínas são capazes de formar filmes interfaciais mais coesos e mais viscosos, o que é benéfico para a estabilidade da emulsão. Isso pode explicar o que aconteceu com o hidrolisado (FPH) com papaína no pH 5,0 que é considerado o pI de proteínas animais.

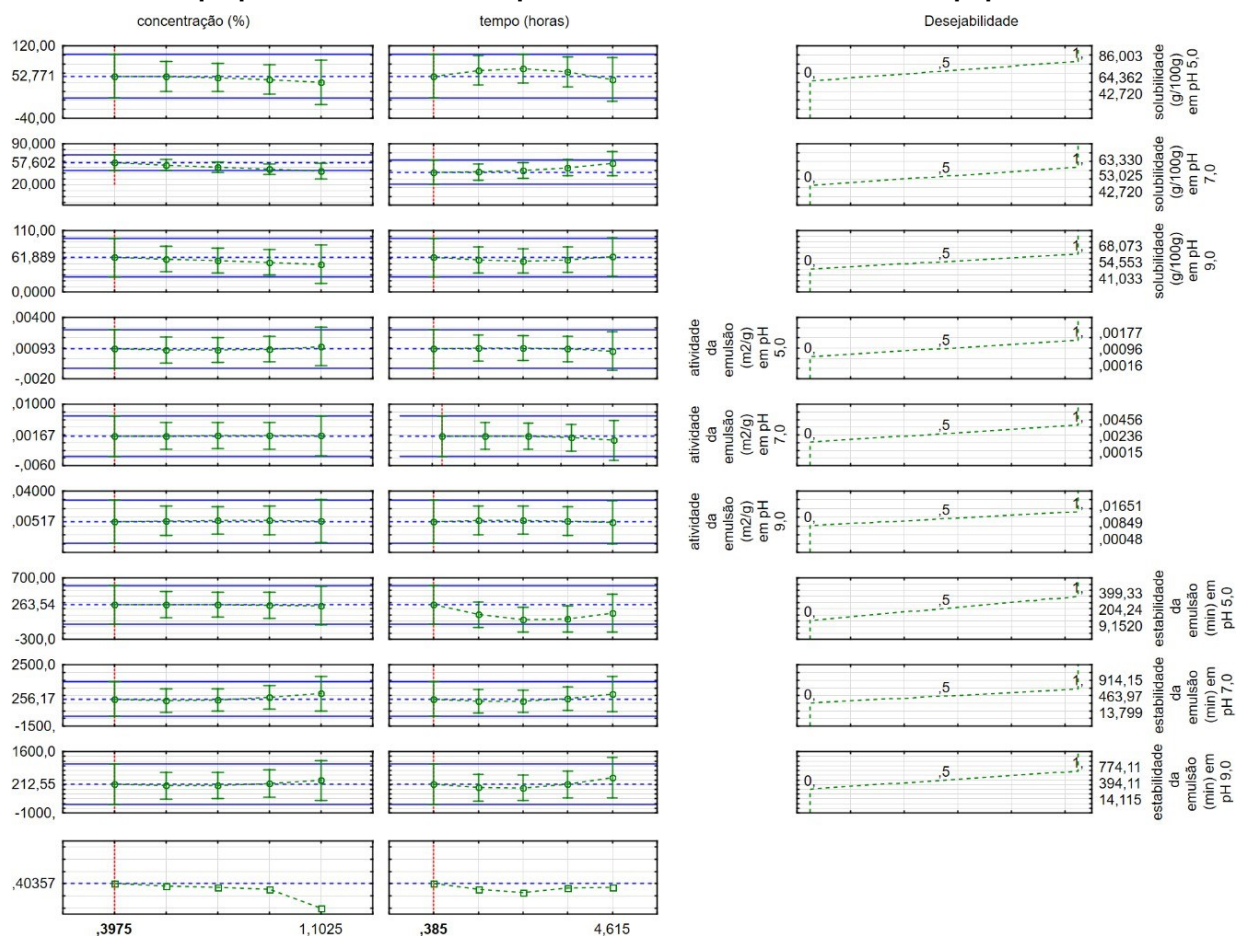
Figura 11 - Gráfico de contorno para a estabilidade da emulsão

Fonte: Autoria própria (2023).

Agora, como resultado da função desejabilidade, apresenta-se na Figura 12 a resposta otimizada para a combinação da concentração da papaína e do tempo. Nesta verifica-se que o ideal seria uma concentração de 0,3975% de papaína, concomitantemente ao tempo de hidrólise de 0,385 horas.

O comportamento das enzimas nos gráficos de superfície de contorno e desejabilidade apresentam uma boa solubilidade, atividade e estabilidade de emulsão. Sendo assim, a escolha da enzima para condições de hidrólise é dependente do perfil do produto desejado.

Figura 12 - Representação gráfica da função desejabilidade considerando concentração e tempo para solubilidade e capacidade emulsificante da enzima papaína



Fonte: Autoria própria (2023).

No estudo Wasswa *et al.* (2007), hidrolisados proteicos de pele de carpa capim foram obtidos por hidrólise enzimática usando Alcalase, a hidrólise foi realizada com o método pH *stat* e os hidrolisados foram analisados quanto às propriedades funcionais. Sendo perceptível que as propriedades funcionais dos hidrolisados de proteínas de peixe podem ser modificados de acordo com o GH. As capacidades emulsionantes dos hidrolisados diminuíram com o aumento da hidrólise de proteínas. Uma relação inversa do GH à capacidade emulsionante, e isto pode ser resultado da presença de peptídeos menores, que são menos eficazes na estabilização de emulsões.

As propriedades funcionais influenciam a utilidade de um ingrediente nos alimentos e governam o comportamento físico durante a preparação, processamento e armazenamento. A solubilidade é uma das propriedades mais importantes das proteínas e hidrolisados de proteínas. Muitas outras propriedades funcionais, como

emulsificação e formação de espuma, são afetadas pela solubilidade. Em um outro estudo realizado por Balti *et al.*, (2011), os concentrados proteicos hidrolisados apresentaram solubilidade mínima em pH 4,0, que pode corresponder ao ponto isoelétrico de hidrolisados proteicos, e alta solubilidade em pH alcalino. Neste estudo o menor valor de pH testado foi o pH 5,0 e o maior foi o pH 9,0. Para a alcalase a solubilidade foi menor no pH 5,0 para a maioria dos experimentos, e apresentou maiores valores nos pH 7,0 e 9,0. Já para a papaína tanto nos pH 5,0, 7,0 e 9,0 estudados os experimentos apresentaram valores similares em relação a solubilidade.

5.5 Otimização das condições de hidrólise enzimática

Fazendo-se agora um comparativo da amostra otimizada da enzima, cuja concentração foi de 1,1025% de alcalase concomitantemente ao tempo de 4,615 horas, com a amostra considerando o ponto central da concentração e do tempo, tem-se os seguintes resultados apresentados na Tabela 5 para o GH.

Tabela 5 - Médias e desvios para o grau de hidrólise em função da concentração e tempo da enzima alcalase

Amostras	Grau de hidrólise (g/100g)
FPHO	13,80 ^b ±0,17
FPHC	20,59 ^a ±3,60

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% para o grau de hidrólise e para a solubilidade em cada pH comparando-se todas as amostras entre si.

Amostras FPHO: hidrolisado proteico de peixe otimizada; FPHC: hidrolisado proteico de peixe do ponto central.

Fonte: Autoria própria (2023).

Com diferença significativa ($p > 0,05$), o grau de hidrólise foi menor ($13,80 \pm 0,17$ g/100g) para a amostra otimizada em comparação com a amostra do ponto central ($20,59 \pm 3,60$ g/100 g). Conforme já discutido anteriormente o grau de hidrólise influenciam muito nas diversas propriedades funcionais, e muitas vezes se elevado pode influenciar negativamente em propriedades como solubilidade, atividades emulsificantes entre outras. Pires *et al.* (2015) ressaltam que é difícil comparar os resultados entre os estudos, pois as condições de hidrólise não são padronizadas. Além disso, a determinação de GH por diferentes métodos, geralmente não permite resultados diretamente comparáveis.

Segundo Fogaça *et al.* (2018), no início da reação, uma quantidade considerável de ligações peptídicas é hidrolisada e, após determinado tempo, esta quantidade é reduzida até apresentar comportamento constante.

Para a solubilidade, os valores da amostra otimizada aumentaram em relação à amostra do ponto central, com diferenças significativas para a solubilidade nos pHs 5,0 e 7,0 (Tabela 6). Para o pH 9,0, as amostras não apresentaram diferenças significativas. Importante destacar que a maior solubilidade foi observada no pH 7,0 para a amostra otimizada e melhor verificado na Figura 10.

Tabela 6 - Médias e desvios para as amostras considerando a solubilidade da enzima alcalase

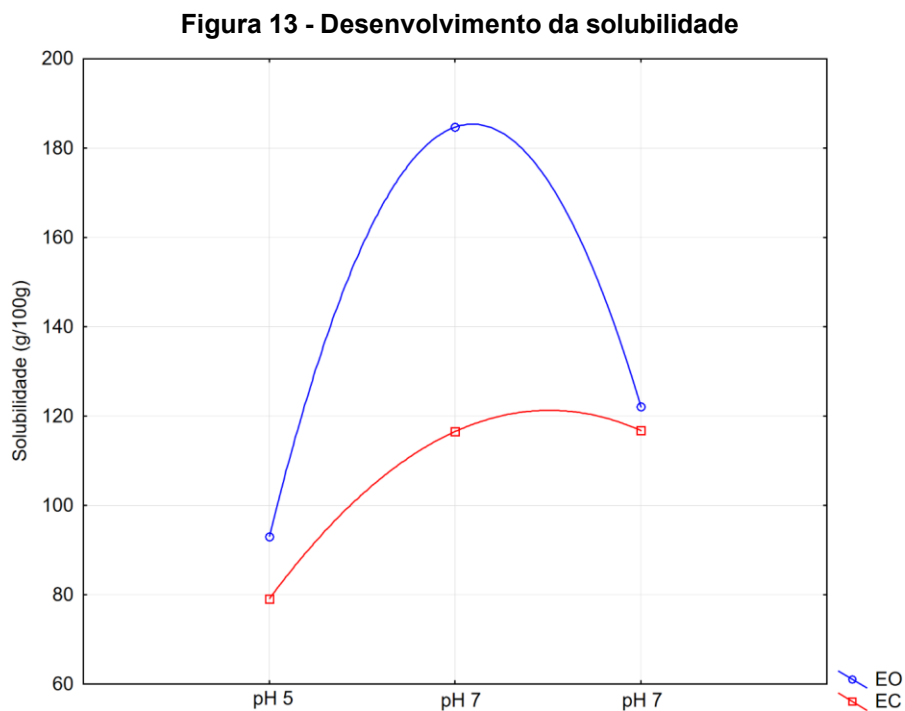
Amostras -	Solubilidade (g de proteína em solução/100 g de proteína total)		
	pH 5	pH 7	pH 9
FPHO	93,01 ^a ±6,58	184,68 ^a ±22,67	122,16 ^a ±12,70
FPHC	79,11 ^b ±1,43	116,52 ^b ±1,07	116,77 ^a ±0,78

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% para o grau de hidrólise e para a solubilidade em cada pH comparando-se todas as amostras entre si.

Amostras FPHO: hidrolisado proteico de peixe otimizada; FPHC: hidrolisado proteico de peixe do ponto central.

Fonte: Autoria própria (2023).

Em relação às propriedades dos hidrolisados de proteínas, a solubilidade é uma das mais importantes (Figura 13), visto que, uma baixa solubilidade pode ocasionar uma aparência pouco atrativa no produto final (Liu *et al.*, 2015). Freitas *et al.* (2021) mostraram que a solubilidade para o hidrolisado do subproduto de palometa, apresentou o maior valor no pH 5,0 alcançando $90,09 \pm 0,97\%$ valores próximos ao encontrados neste estudo no pH 5,0 para amostra otimizada.



Fonte: Autoria própria (2024).

Novamente deve-se notar que este procedimento de lavagem com água é uma espécie dependente. Ao utilizar o procedimento de lavagem e diluição com água, a maioria dos MPs de espécies de peixes como o bacalhau podem ser solubilizados em água. São necessários grandes volumes de água para dispersar as proteínas em pH neutro. Deve-se também prestar muita atenção à força iônica, seja ela adequadamente baixo o suficiente para alcançar a solubilização. No entanto, embora a extração de MPs com baixo teor iônico a força pode ser útil para a separação dos diferentes MPs e sua aplicação na tecnologia de alimentos pode ser limitada, uma vez que a força iônica de um alimento não pode ser ajustada a um valor tão baixo. Para o até onde sabemos, nenhum estudo foi publicado sobre as propriedades funcionais da água MPs solúveis preparados com este procedimento (Chen *et al.*, 2017).

Esta baixa solubilidade em pH 5,0, é próxima à encontrada por Marasca *et al.* (2020) que obtiveram um isolado proteico de pescada (*Cynoscion guatucupa*) e encontrou menores resultados de solubilidade em pH 5,5. Este valor de pH encontra-se próximo ao ponto isoelétrico (pI) das proteínas (Panyam; Kilara, 1996; Mullally *et al.*, 1995; Kristinsson, 2003), onde as cargas tendem a se neutralizar intramolecularmente, apresentando menor afinidade para o solvente. Outro estudo com concentrados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) obtidos por

solubilização química de proteínas, apresentaram boa solubilidade em pHs acima de 7,0, mostrando-se mais solúveis em pHs alcalinos (Fontana *et al.*, 2009).

Como a solubilidade das proteínas está intimamente relacionada aos seus estados estruturais, ela é frequentemente usada como medida da extensão da desnaturação durante os processos de extração, isolamento e purificação. Em virtude disso, a solubilidade é uma das propriedades funcionais mais significativas dos hidrolisados proteicos (Damodaran, 2007). Os peptídeos liberados pela hidrólise da alcalase neste estudo apresentam maior solubilidade em pH 7,0, neutro, e em seguida houve uma diminuição da solubilidade em pH 9,0, resultado inverso encontrado no estudo Benelhadj *et al.* (2016) para isolado proteico de microalgas (*Spirulina platensis*) maior solubilidade em pH 10,0. Em hidrolisados de enguia do pântano asiático (*Monopterus* sp.) com enzima alcalase Halim e Sarbon (2019) verificaram maior solubilidade em pH 10,0. Contudo, não houve diferenças significativas entre os demais pH 4,0 e 7,0 avaliados. Valores de pH influenciam nas propriedades de solubilidade das proteínas hidrolisadas de peixe, através da capacidade da ligação peptídica ser clivada em amplas faixas de pH, sendo assim, a solubilidade é afetada por variações de pH.

A solubilidade está também relacionada ao tamanho da partícula de proteína, ou seja, uma partícula menor tem maior contato em sua área superficial, o que aumenta a propensão à solubilidade e consequentemente, otimiza atividades como a capacidade de formação de espuma e emulsão. As interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína e resultam na diminuição da solubilidade, enquanto que interações iônicas promovem interações proteína-água e resultam num aumento da solubilidade (Abuine *et al.*, 2019).

A melhor solubilidade de um hidrolisado é devido ao tamanho menor de suas moléculas, comparada com a proteína intacta, e aos grupos amino e carboxila ionizáveis dos aminoácidos recém expostos, que aumentam a hidrofiliabilidade do hidrolisado. Embora o aumento da solubilidade tenha uma relação positiva com a extensão da hidrólise, precisa-se cuidar para que não seja hidrolisado extensivamente (Mullally *et al.*, 1995). O que provavelmente aconteceu com o nosso presente estudo em relação a hidrólise com a enzima papaína, que apresentou resultados de solubilidade menores conforme maior o grau de hidrólise

Em relação à atividade da emulsão e sua estabilidade, os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Médias e desvios para as amostras considerando a atividade e a estabilidade da emulsão da enzima alcalase

Amostras	EAI - atividade da emulsão (m ² /g)		
	pH 5	pH 7	pH 9
FPHO	1,08E-02 ^b ±1,84E-04	1,42E-0,2 ^b ±3,22E-04	7,35E-03 ^b ±3,10E-05
FPHC	1,60E-02 ^a ±3,99E-04	2,56E-02 ^a ±2,31E-04	2,67E-02 ^a ±4,57E-04
Amostras	EIS - estabilidade da emulsão (min)		
	pH 5	pH 7	pH 9
FPHO	17,57 ^a ±0,14	23,45 ^a ±0,35	28,71 ^a ±0,06
FPHC	12,08 ^b ±0,18	21,51 ^b ±0,67	25,01 ^a ±1,79

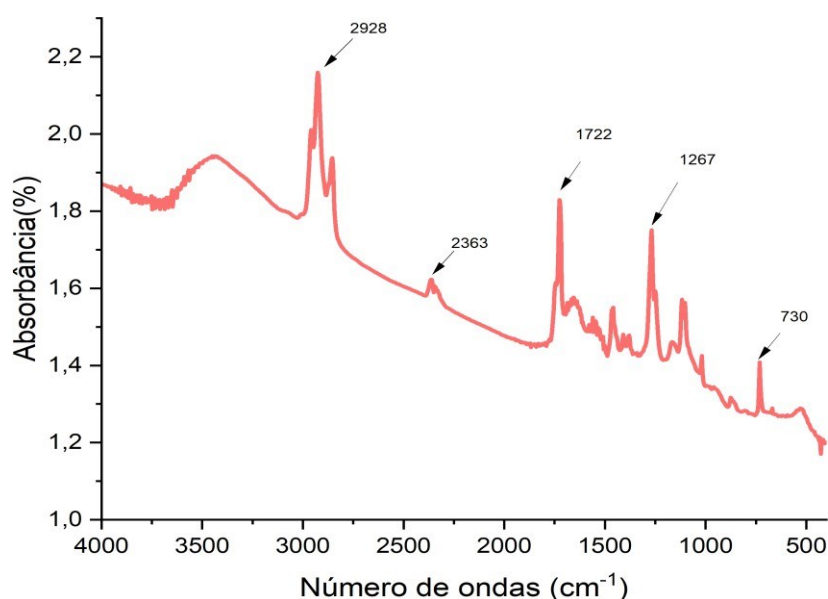
Amostras FPHO:hidrolisado proteico de peixe otimizada; FPHC:hidrolisado proteico de peixe do ponto central.

Fonte: Autoria própria (2024).

Na estabilidade da emulsão (min), maiores valores foram identificados para a amostra otimizada, sem apresentar mesma média significativa ($p>0,5$) nos pHs 5,0 e 7,0. À medida que o pH foi aumentando, o valor da estabilidade da emulsão também aumentou. O contrário aconteceu para a atividade da emulsão. Maiores valores foram identificados para a amostra do ponto central em relação à amostra otimizada e o maior valor encontrado (2,67E-02±4,57E-04), foi no pH 9,0 da amostra FPHC.

Na Figura 14 estão apresentados os espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) para a amostras otimizada da enzima alcalase.

Figura 14 - Espectros de FTIR para a amostras hidrolizada enzimaticamente de forma otimizada pela enzima alcalase



Fonte: Autoria própria (2024).

A estrutura química de uma molécula é o principal fator que determina as frequências vibracionais, devido às forças das ligações e às massas dos átomos. A análise de FTIR caracteriza as reduções da cadeia proteico de forma qualitativa. Uma vez que, as estado de protonação da maioria das cadeias laterais é refletido no espectro (Böcker *et al.*, 2017; Barth, 2007). Diversas características estruturais das proteínas estão ligadas às ligações peptídicas, tais como desempenho funcional, transporte de prótons, síntese de proteínas, troca de informações e outras funções associadas à ligação de amidas peptídicas (Ji *et al.*, 2020).

A análise da amostra otimizada hidrolizada com a enzima alcalase na concentração 1,1025 % e concomitantemente ao tempo de 4,615 h, foi realizada em quadruplicata. Para uma melhor percepção dos dados apenas a média dos espectros das amostras está apresentado na Figura 14. Quando ocorre a hidrolise enzimática, além das mudanças intrínsecas na estrutura primária da proteína, também promove mudanças nas estruturais secundárias, e estes efeitos podem ser observados na absorção do FTIR.

Em relação às principais bandas do espectro do FTIR para a amostra otimizada, podemos verificar 5 bandas nas posições 2928 cm^{-1} ; 2363 cm^{-1} , 1722 cm^{-1} , 1267 cm^{-1} e 730 cm^{-1} .

O pico de 2928 cm^{-1} representa os modos de estiramento do grupo metila e metileno, originando uma vibração de estiramento simétrico em aproximadamente 2872 cm^{-1} e uma de estiramento assimétrica em aproximadamente 2962 cm^{-1} . Estas são atribuídas às cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (Alancay *et al.*, 2023).

A banda amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) é comumente adotada para avaliar a estrutura secundária das proteínas (Ai *et al.*, 2019). A região de 1722 cm^{-1} pode ser atribuída à banda causada pelo estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$). Silva (2013) verificou a presença de bandas de absorção semelhantes para as gelatinas das peles de corvina e de bijupirá, respectivamente na região de 1773 cm^{-1} e 1723 cm^{-1} .

A amida III (1267 cm^{-1}) é resultado da flexão da ligação simples H e do estiramento da ligação -N com vibrações de deformação de C-H e N-H (Glassford *et al.*, 2013).

Um estudo com folhas de ora-pro-nobis (OPN), planta comestível com elevado valor de proteínas, apresentou bandas com valores parecidos com os encontrados neste estudo. 3430 cm^{-1} (alongamento O-H ligado a H, ou alongamento N-H), 2923 cm^{-1} (alongamento de aldeído), 1750 cm^{-1} (aldeído / cetona -C = alongamento de O), $1644,1\text{ cm}^{-1}$ (-C = C- alongamento), $1519,6\text{ cm}^{-1}$ (flexão -NH), $1384,0\text{ cm}^{-1}$ (flexão -CH₃), $1251,9\text{ cm}^{-1}$ (flexão -C - H no plano) e $1156,0\text{ cm}^{-1}$ (amina C -N alongamento) (Maciel *et al.*, 2021).

Colágeno solúvel em ácido (ASC) e colágeno solúvel em pepsina (PSC) obtidos de subprodutos mistos de diferentes espécies de peixes foram extraídas e avaliados. O grupo funcional, amida A estava localizado em 3293 e 3288 cm^{-1} para ASC e PSC, respectivamente, indicando a presença de grupos amino (NH) envolvidos na associação de ligações de hidrogênio e tendo uma forte ligação de hidrogênio no ASC e no PSC. O grupo funcional amida B está associado às vibrações de alongamento assimétrico do Ligações =CH e -NH₃⁺. O funcional amida ASC e PSC grupos B foram detectados em 2.932 cm^{-1} e 2.933 cm^{-1} , respectivamente (García-Sifuentes *et al.*, 2021).

A banda de 730 cm^{-1} pode ser atribuído aos grupos de fosfatos (PO_4^{3-}), encontrado em espinhos de peixe (Nawaz *et al.*, 2020) e às vibrações de balanço dos

grupos de aminoácidos (CH_2), ligações com muita intensidade, não expostos à água solvente, com interações definidas com o ambiente proteico (Barth, 2007).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O concentrado proteico (CP) obtido a partir da CMS de tilápia do Nilo apresentou resultados e similares ao encontrado em literatura em relação aos teores de proteínas (65,94 g/100g), lipídios (7,34 g/100g) e umidade (13,52 g/100g).

Os hidrolisados de peixe (FPH) obtidos a partir das enzimas alcalase e papaína, apresentaram diferentes GH, que influenciaram nas propriedades funcionais determinadas. E observou-se que os melhores valores para as propriedades funcionais em relação a solubilidade e capacidade emulsificante foram para os experimentos que tiveram ação da enzima alcalase.

A hidrólise com enzimas proteolíticas fornece a possibilidade de controlar o grau de clivagem da proteína no substrato. Portanto, a escolha das condições de hidrólise é dependente do perfil do produto alimentício desejado, uma vez que a hidrólise enzimática pode causar mudanças na funcionalidade da proteína.

No presente trabalho, todos os hidrolisados foram mais solúveis em pH alcalino. A menor solubilidade em pH 5 se deve à proximidade do ponto isoelétrico. Que também poderia justificar o alto desvio padrão dos experimentos realizados.

O gráfico de superfície de contorno e desejabilidade nos mostra que para os FPH hidrolisados com as enzimas, e apresentarem boa solubilidade nos, atividade e estabilidade de emulsão de forma otimizada, precisa e geraram os modelos matemáticos para a concentração de papaína de 0,3975% no tempo de hidrólise de 0,385 horas, e concentração de alcalase de 1,1025% no tempo de hidrólise de 4,615 horas.

Desta forma, parâmetros em relação a enzima/substrato foram otimizados para a hidrólise do composto proteico, realizada com a enzima e apresentou melhores resultados em relação as propriedades funcionais. A enzima alcalase foi utilizada nas condições de 1,1025% concentração da enzima no tempo de hidrólise de 4,615 horas, apresentou um GH satisfatório (GH13,80g/100g), melhor solubilidade em pH neutro. Na estabilidade da emulsão (min), maiores valores foram identificados para a amostra otimizada, O contrário aconteceu para a atividade da emulsão. Na análise de FTIR foram observadas espectro de bandas semelhantes de grupamentos proteicos.

REFERÊNCIAS

- ABUINE, R.; RATHNAYAKE, A.U.; BYUN, H. G. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. **Fish Aquatic Science**, v. 22, n. 10, p. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0125-4>. Acesso em: 22 abr. 2024.
- ALI, H. A.; MANSOUR, E. H.; E-LBEDAWAY, A. EI-F. A.; OSHEBA, A. S. Evaluation of tilapia fish burgers as affected by different replacement levels of mashed pumpkin or mashed potato. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 18, n. 2, p. 127-132, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2017.01.003>. Acesso em: 22 abr. 2024.
- AZEREDO, H. M.C.; WALDRON, K W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - a review. **Trends In Food Science & Technology**, v. 52, p. 109-122, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008>. Acesso em: 22 abr. 2024.
- BALASWAMY, K.; JYOTHIRMAYI, T.; GALLA, D. G. Chemical composition and some functional properties of fish egg (Roes) protein concentrate of rohu (*Labeo rohita*). **Journal Food Sciences Technology**, v. 44, p. 293-296, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285683268_Chemical_composition_and_some_functional_properties_of_fish_egg_roes_protein_concentrate_of_rohu_Labeo_rohita. Acesso em: 23 jun. 2022.
- BALTI, R.; BOUGATEF, A.; HADJ ALI, N. E.; KTARI, N.; JELLOULI, K.; NEDJAR-ARROUNE, N.; DHULSTER, P.; NASRI, M. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by alcalase and bacillus licheniformis NH1 proteases. **Journal of Amino Acids**, id 107179, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22312455/>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (Bba) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>. Acesso em: 22 abr. 2024.
- BERNADINO FILHO, R.; ALMEIDA XAVIER, L. C. Obtenção, rendimento e caracterização de CMS produzida com resíduos da filetagem de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 9, n. 2, p. 01-04, 2019. <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/article/view/7534>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- BÖCKER, U.; WUBSHET, S. G.; LINDBERG, D.; AFSETH, N. K. Fourier-transform infrared spectroscopy for characterization of protein chain reductions in enzymatic reactions. **The Analyst**, v. 142, n. 15, p. 2812-2818, 2017. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/an/c7an00488e>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- BORDIGNON, A.C.; SOUZA, B.E.; BOHNENBERGER, C.C.H.; FIEDEN, A.; BOSCOLO, W.R. Elaboração de croquete de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a

partir de CMS e aparas de corte em 'V' do filé e sua avaliação físicoquímica, microbiológica e sensorial. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/43655625_Elaboracao_de_croquete_de_tilapia_do_Nilo_Oreochromis_niloticus_a_partir_de_CMS_e_aparas_do_corte_em_'V'_do_file_e_sua_avaliacao_fisico-quimica_microbiologica_e_sensorial_Preparation_of_Nile_tilapia_O/link/5d714d36a6fdcc9961b1f39d/download?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19. Acesso em: 23 jun. 2022.

BORGOGNO, M.; HUSEIN, Y.; SECCI, G.; MASI, S.; PARISI, G. Technological and nutritional advantages of mechanical separation process applied to three European aquacultured species. **LWT**, v. 84, p. 298-305, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817303833?via%3Dihub#sec4>. Acesso em: 26 jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal** (RIISPOA). Brasília, DF: MAPA/SEAP. 2017, 52 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/diariooficial-publica-decreto-do-novo-regulamento-de-inspecao-industrial-e-sanitaria>. Acesso em: 5 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria especial de Aquicultura e Pesca. **Manual de procedimentos para implantação de estabelecimento industrial de pescado: produtos frescos e congelados**. Brasília, DF: MAPA/SEAP/PR, 2007, 116 p.

CAVALCANTE, C. L. **Avaliação da qualidade de nuggets de CMS e gelatina de tilápia**. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Pombal, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/18506>. Acesso em: 5 mai. 2022.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNANDÉZ, C.; SALAS-MELLADO, M.; NETTO, F. M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/GznX9hJBtvkpjtTrbqVYQpm/#ModalTutors>. Acesso em: 5 mai. 2022.

CHALAMAIAH, M., HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, v. 35, n. 4, 30203038, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814612010990>. Acesso em: 5 mai. 2022.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G. N.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 652-657, 2010. Disponível:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814609012503>. Acesso em: 5 mai. 2022.

CHAMBÓ, A. P. S.; SOUZA, M. L. R. D.; OLIVEIRA, E. R. N. D.; MIKCHA, J. M. G.; MARQUES, D. R.; MAISTROVICZ, F. C.; GOES, E. S. D. R. Roll enriched with Nile tilapia meal: sensory, nutritional, technological and microbiological characteristics. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 726-732, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/dsBPLKWDykDmcdwzfpL8RKx/?lang=en>. Acesso em: 5 mai. 2022.

CHAMPAGNAT, E. S.; CARCOUËT, E.; ROCHET, M. J.; DUMAY, J.; CHOPIN, C.; GENOT, C. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1750-1756, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.2145>. Acesso em 12 mai. 2024.

CHEN, X.; TUME, R. K.; XU, X.; ZHOU, G. (2015). Solubilization of myofibrillar proteins in water or low ionic strength media: classic techniques, basic principles and new functionalities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3260-3280, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26647280/>. Acesso em: 5 mai. 2022.

CHIDICHIMA, A. C. **Industrialização de tilápias**: agregação de valor para uma cadeia emergente da agricultura familiar. 2014. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Marechal Cândido Rondon, 2014. Disponível em: <http://tede.unioeste.br:8080/tede/handle/tede/1488>. Acesso em: 20 jun. 2023.

CHUESIANG, P.; SANGUANDEEKUL, R. Protein hydrolysate from tilapia frame: antioxidant and angiotensin converting enzyme inhibitor properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 6, p. 1436-1444, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12762>. Acesso em: 20 jun. 2023.

COMBET, E.; JARLOT, A.; AIDOO, K. E.; LEAN, M. E. Development of a nutritionally alanced pizza as a functional meal designed to meet published dietary guidelines. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 11, p. 2577-2586, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24160252/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

CORADINI, M. F.; SOUZA, M. L. R.; VERDI, R.; GOES, E. S. D. R.; KIMURA, K. S. COSTA D. P. S. **Desenvolvimento de hambúrguer com carne mecanicamente separada de carcaça e de refil de tilápia: caracterização microbiológica, físico-química e sensorial**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2017. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNSP_1ea78c1323d722a5a965cb79b098172a. Acesso em: 20 jun. 2023.

COSTA, D. P. S. (2017). **Desenvolvimento de hambúrguer com carne mecanicamente separada de carcaça e de refil de tilápia**: caracterização microbiológica, físico-química e sensorial. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia e

Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/150621>. Acesso em: 20 jun. 2023.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. 4th. edition. São Paulo: CRC Press, 2007, 1060 p.

DECKER, A. T.; RODRIGUES, E. A.; ALMEIDA, J. C.; QUADRO, M.S.; LEANDRO, D.; ANDREAZZA, R.; BARCELOS, A.A. Avaliação dos possíveis impactos ambientais dos resíduos de pescado na localidade de Pelotas/RS. **Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade**, v.2, n.1, p.1-10, jul. 2016. disponível em <https://revistas.ufpel.edu.br/index.php/rbes/article/view/353>. Acesso em 22 jul 2023.

DÉLÉRIS, I.; SAINT-EVE, A.; DAKOWSKI, F.; SÉMON, E.; LE QUÉRÉ, J. L.; GUILLEMIN, H.; SOUCHON, I. The dynamics of aroma release during consumption of candies of different structures, and relationship with temporal perception. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p.1615-1624, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814611002858>. Acesso em: 22 jul. 2023.

DOMINGO, J. L. Nutrients and chemical pollutants in fish and shellfish. Balancing health benefits and risks of regular fish consumption. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 6, p. 979-988, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25486051/>. Acesso em: 22 jul. 2023.

DONG, S.; ZENG., M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, H. Y. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1485-1493, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814607010084>. Acesso em: 22 jul. 2023.

DUARTE, Â. J.; CARREIRA R. L; JUNQUEIRA, R. G.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades Emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: efeito do pH e do tempo de hidrólise. **Food Science and Technology**, v.18, n. 3, p. 295-302, 1998 Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000300008>. Acesso em: 20 mai. 2023.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**, 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18986>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ESPERANÇA, V. J. R. **Obtenção e aplicação de hidrolisados proteicos antioxidantes provenientes da hidrólise enzimática de clara de ovo em pó**. 2019. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.repositorio-bc.unirio.br:8080/xmlui/handle/unirio/13124>. Acesso em: 25 jul. 2023

EYMARD, S.; CARCOUËT, E.; ROCHET, M. J.; DUMAY, J.; CHOPIN, C.; GENOT, C. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1750-1756, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2145>. Acesso em: 5 mai. 2022.

FAO. 2020. **The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action**. Rome. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>. Acesso em 01 jul.2023.

FAO. **The state of food security and nutrition in the world 2021**. Rome: FAO, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>. Acesso em: 9 fev. 2023.

FEIDEN, A.; MACEDO, H. R.; VARGAS, J. M.; CHIDICHIMA, A. C.; SILVA, K. C.; PIRES, G. K. G.; SIGNOR, A. Produção e rendimento industrial de entrepostos de pescado de pequeno porte do oeste do Paraná. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e426111133673, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsdv11i11.33673>. Acesso em: 01 jun. 2023.

FELIX M, C. M.; ROMERO, A.; FITZ GERALD, R. J. Characterisation of the bioactive properties and microstructure of chickpea protein-based oil in water emulsions. **Food Research International**, v. 121, p. 577-585, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918309700>. Acesso em: 01 jun. 2023.

FELTES, M.; CORREIA, J. F.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v. 14, n. 6, p 669-677, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/fCnfwcVFbVZFnpTRWtkMM3z/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 01 jun. 2023.

FINKLER, J. K; PIANA, P. A.; FLECK, J. F.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A.; FIORESE, M. L. Produção de hidrolisado de proteína de peixe a partir de aparas de filé de *Oreochromis niloticus*. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 6, p. e37311629172, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/29172>. Acesso em: 27 jul. 2023.

FOGACA, F. H.; OTANI, F. S.; PORTELLA, C. G.; SANTOS-FILHO, L. G. A.; SANTANA, L. S. Caracterização de surimi obtido a partir da carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo e elaboração de fishburger. **Semina Ciências Agrárias**. v. 36, n. 2, p. 765-776, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/129180>. Acesso em: 20 mai. 2023.

FONSECA, C.; FRARE, L. M.; D'AVILA, L.; EDWIGES, T. Influence of different waste compositions from tilapia fish on methane production. **Journal of Cleaner Production**, v. 265, p. 121795, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652620318424>. Acesso em: 20 mai. 2023.

FOX, P. F.; MORRISSEY, P. A.; MULVIHILL, D. M. **Chemical and enzymatic modification of food proteins**. Developments in food proteins, 1982.

FREITAS, J. A.; CUNHA, J. P. S.; RIBAS, V. B.; FURLAN, V. J. M.; CENTENARO, G. Propriedades tecno-funcionais de hidrolisado proteico do subproduto do beneficiamento da palometa (*Serrasalmus spilopleura*). **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 773-782, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18378/rebagro.v12i2.8922>. Acesso em: 10 mai. 2024.

GASPARINO, E. Quality evaluation of onion biscuits with aromatized fishmeal from the carcasses of the Nile tilapia. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, p. 719-728. 2015. Disponível em: <https://institutodepesca.org/index.php/bip/article/view/1098>. Acesso em 25 mai. 2023.

GHALY A. E.; RAMAKRISHNAN, V. V.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. M.; DAVE, D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: a critical review. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**. v, 5, p.107-129, 2013. Disponível em: doi:10.4172/1948-5948.1000110. Acesso: 15 mai. 2023.

GREGG D. J.; SADDLER, J. N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnology Bioengineering**, v. 51, n. 4, p. 375-383, 1996. Disponível em: doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960820)51:4<375::AID-BIT1>3.0.CO;2-F. Acesso em: 20 mai. 2023.

GROSSMANN, L.; MCCLEMENTS, D. J. Current insights into protein solubility: a review of its importance for alternative proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 137, p. 108416, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108416>. Acesso: 01 agos. 2023.

IAHNKE, A. O. S. Principais aspectos de deterioração da qualidade de pescado e relação com a legislação brasileira: uma breve revisão. **Ciência e Tecnologia do Pescado: uma análise pluralista**, v. 4, n. 5, p. 62-77, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.37885/220308322>. Acesso em: 30 jul. 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa mensal de serviços**. Brasília: IBGE, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>. Acesso em: 01 mai. 2023.

JESUS AMORIM, M.; TOSTA, M. D. C. R. A piscicultura como alternativa para diminuir os impactos ambientais da produção de carne bovina. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 4, p. 81-101, 2020. Disponível em: <https://revistabrasileirademeioambiente.com/index.php/RVBMA/article/view/548>. Acesso em: 01 mai. 2024.

JI, Y.; YANG, X.; JI, Z.; ZHU, L.; MA, N.; CHEN, D.; JIA, X.; TANG, J. CAO, Y. DFT-calculated IR spectrum amide I, II and III band contributions of n-methylacetamide fine components. **ACS Omega**, v. 5, n. 15, p. 8572-8578, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7178369/>. Acesso em: 01 mai. 2023.

KHIARI, Z. Sustainable upcycling of fisheries and aquaculture wastes using fish-derived cold-adapted proteases. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 875697, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.875697/full>. Acesso em: 29 jul. 2023.

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, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10408690091189266>. Acesso em: 30 jul. 2023.

KUMARI, A.; KAUSHIK, N.; SLIZYTE, R. Production and microencapsulation of protein hydrolysate of pink perch (*Nemipterus japonicus*) by-products obtained from surimi industry for its sustainable utilization. **Waste Biomass Valor**, v. 14, p. 209-226, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01853-3>. Acesso em: 30 jul. 2023.

KUROZAWA, L. E.; MORASSI, A. G.; VANZO, A. A.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. **Drying Technology**, v. 27, n. 11, p. 1248-1257, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07373930903267187>. Acesso em: 29 jul. 2023.

LIMA, G. L. **Concentrado proteico de tambaqui**: obtenção, estudo e aplicação no desenvolvimento de snack extrusado. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Ariquemes, 2019. Disponível em: <https://www.ri.unir.br/jspui/handle/123456789/2707>. Acesso em: 29 jul. 2023.

MATIUCCI, M. A.; SANTOS, I. C.; OLIVEIRA, G. G.; ARAÚJO, E. S.; CORRÊA, S. S.; RIBEIRO, R. P.; SOUZA, M. L. R.; FEIHRMANN, A. C. Use of tilápia fillet residues in pâté with the addition of oregano essential oil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e59510213059, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13059>. Acesso em: 15 apr. 2024.

MULLALLY, M. M.; O'CALLAGHAN, D. M.; FITZGERALD, R. J.; DONNELLY, W. J.; DALTON, J. P. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2973-2979, 1994. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf00048a062>. Acesso em: 29 jul. 2023.

MURUETA, J. H. C.; TORO, M. A. N.; CARRREÑO, F. G. Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. **Food Chemistry**, v. 100, p. 705-711, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605009313>. Acesso em: 29 jul. 2023.

NAJAFIAN, M. JAFARZADE, M. SAID, AND A. S. BABJI, Biochemical properties and antioxidant activity of myofibrillar protein hydrolysates obtained from patin (*Pangasius sutchi*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 10, p. 2014-2022, 2013. Disponível em:

<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijfs.12162>. Acesso em: 29 jul. 2023.

NAWAZ, A.; LI, E.; IRSHAD, S.; HHM, H.; LIU, J.; SHAHBAZ, H. M.; AHMED, W.; REGENSTEIN, J. M. Improved effect of autoclave processing on size reduction, chemical structure, nutritional, mechanical and in vitro digestibility properties of fish bone powder. **Advanced Powder Technology**, v. 31, n. 6, p. 2513-2520, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appt.2020.04.015>. Acesso em: 29 jul. 2023.

NOMAN, A.; XU, Y.; AL-BUKHAITI, W. Q.; ABED, S. M.; ALI, A. H.; RAMADHAN, A. H.; XIA, W. 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>. Acesso em: 29 jul. 2023.

OGAWA, M. **Química do pescado**: umidade e proteína. São Paulo: Livraria Varela, 1999, p 29-48.

OLIVEIRA, R. G.; MERGEN, M.; SIGNOR, A.; SOUZA, M. L. R. Qualidade nutricional, microbiológica e sensorial da massa de pizza com inclusão de CMS de tilápia do Nilo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e530101018986, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/354110909_Qualidade_nutricional_microbiologica_e_sensorial_da_massa_de_pizza_com_inclusao_de_CMS_de_tilapia_do_Nilo. Acesso em: 20 mai. 2023.

PACHECO, F. C.; PAIVA, P. H. C.; LEITE JUNIOR, B. R. de C. Atividades técnico-funcionais de hidrolisados derivados de proteínas vegetais. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 8, n. 11, p. 15099-01e, 2022. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/jcec/article/view/15099>. Acesso em: 20 jul. 2023.

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. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10012-1](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(96)10012-1). Acesso em: 25 mai. 2023.

PEDROZA FILHO, M. X.; RIBEIRO, V. S.; ROCHA, H. S.; UMMUS, M. E; VALE. T. M. **Caracterização da cadeia produtiva da tilápia nos principais polos de produção do Brasil**. 26. ed. Palmas TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2020. 49 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/216871/1/CNPASA-2020-bpd26-2.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2023.

PESSATTI, M. L. **Aproveitamento dos subprodutos do pescado**. Meta 11. Relatório final de ações prioritárias ao desenvolvimento da pesca e aquicultura no

Sul do Brasil. Convênio Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Universidade do Vale do Itajaí: MA/SARC, 2001

PIRES, D. R.; MORAIS, A. C. N.; COSTA, J. F.; GÓES, L. C. D. S. A. Aproveitamento do resíduo comestível do pescado: aplicação e viabilidade. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5, p. 34-46, 2014. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/2956>. Acesso em: 25 jun. 2023.

PORTINHO, J. L. **Indicadores para avaliação de boas práticas de manejo na produção de tilápia em tanques-rede**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2021.

PRENTICE, C.; FRIEDRICH, A.; RODRIGUEZ, G.; SILVA, M.; LEMPEK, T. Processo de obtenção de um concentrado proteico de resíduos da industrialização do pescado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 17., 2002, Fortaleza. **Anais [...]**. Fortaleza: SbCTA, 2002. p. 11.106.

ROMADHONI, A. R.; AFRIANTO, E.; PRATAMA, R. I.; GRANDIOSA, R. extraction of snakehead fish [*Ophiocephalus striatus* (Bloch, 1793)] into fish protein concentrate as albumin source using various solvent. **Aquatic Procedia**, v. 7, p. 4-11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.001>. Acesso em: 29 jun. de 2023.

ROMADHONI, A. R.; AFRIANTO, E.; PRATAMA, R. I.; GRANDIOSA, R. Extraction of snakehead fish [*Ophiocephalus striatus* (bloch, 1793)] into fish protein concentrate as albumin source using various solvent. **Aquatic Procedia**, v. 7, p. 4-11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.001>. Acesso em 29 jun de 2023

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 468-474, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612005000300013>. Acesso em: 02 jul. 2023.

ROMANZINI, G. B.; COSTA, C. P. Cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede: uma revisão de literatura. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 6, n. 13, p. 783-797, 2023. Disponível em: <https://revistajrg.com/index.php/jrg/article/view/630>. Acesso em: 02 jul. 2023.

SANTOS, D. O. **Propriedades funcionais de proteínas da clara do ovo de codorna**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 32, n. 5, p. 898-902, 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5682314/>. Acesso em: 02 jul. 2023.

SHARKEY S. J., HARNEDY-ROTHWELL, P. A.; ALLSOPP, P. J.; HOLLYWOOD, L. E.; FITZGERALD, R. J.; O'HARTE, F. P. M. A narrative review of the anti-hyperglycemic and satiating effects of fish protein hydrolysates and their bioactive peptides. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64, n. 21, p. e2000403. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32939966/>. Acesso em: 28 jun. 2023.

SILA, A.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, 10-26, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>. Acesso 15 de maio de 2023.

SILVA, G. F.; MACIEL, L. M.; DALMAS, M. V.; GONÇALVES, M. T. **Tilápia-do-Nilo: criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná Curitiba: Universidade Federal do Paraná**, 2015. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2017/12/Livro-pronto.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2023.

SILVA, J. C.; NASCIMENTO, S. L. N.; COSTA, B. A. M.; FIGUEIREDO, A. L. P.; MELO, V. O. **Possibilidades proteicas do processamento agroindustrial de peixes**. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 2., 2021. Recife. **Anais [...]**. Recife: Instituto Internacional Despertando Vocações, 2021. p. 367-384. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.31692/978-65-88970-17-1.367-384>. Acesso em: 03 mai. 2024.

SILVA, M. A. B. **Utilização de piranha-preta *Serrasalmus rhombeus* para elaboração de sopas de peixe**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 13., 2003, Porto Seguro. **Anais [...]**. Porto Seguro: AEP-BA, 2003. p. 1122. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/31906>. Acesso em: 03 mai. 2024.

SIQUEIRA, T. V. **Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea), 2017.

SLYZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) byproducts. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1415-1424, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0032959204002584>. Acesso em: 23 mai. 2024.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p.1-10, 2012. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial71_1_completa/1426.pdf. Acesso em: 28 mai. 2024.

SOUSA, V. F. **Preparação e caracterização de hidrolisados proteicos de tilápia**. 2019. 18 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa-Portugal, Lisboa, 2019. Disponível em:

<https://www.proquest.com/openview/d009dc9c85eb59b6eb86b5d96ea49f28/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y#>. Acesso em: 01 jun. 2023

SOUZA, J. F.; BIITENCOUT, N. N.; GOMES, C. S.; OLIVEIRA, J. K.; SANTOS, R. M.; REIS, I. A. O.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Desenvolvimento e caracterização físico-química e sensorial de nuggets formulados com concentrado proteico de pescado - marine beef. **Scientia Plena**, v. 6, n. 3, p. 1-4, 2010. Disponível em: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/140>. Acesso em: 01 jun. 2023

SOUZA, M. L. R.; OLIVEIRA, G. G.; TESTI, I. A.; CORADINI, M. F.; CESARO, E.; TAKAYAMA, D. M.; FEIHRMANN, A. C.; GOES, E. S. R.; CASETTA, J.; MARENGONI, N. G. Mortadella of mechanically separated meat from filleting Nile tilapia trimmings. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 15925-15945, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n3-028>. Acesso em: 02 agos. 2023.

STIZ, E. P. O.; PEREIRA, G. S.; COSTA, G. O.; BAYLÃO, T. L.; SOUZA, T. D.; CARDOZO, S. P. Vantagens da produção de peixes em tanques-rede. *In*: COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR. 4., 2021, Mineiros. **Anais** [...]. Mineiros: UNIFIMES, 2021. p. 1-6. Disponível em: <file:///C:/Users/matheus/Downloads/elenomarques,+B101.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2023.

SUCASAS, L. F. A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado para o desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-03082011-145355>.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>. Acesso em: 26 jun. 2023.

TENUTA FILHO, A.; JESUS, R. S. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria-prima industrial. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, n. 2, p. 59-159, 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001362349>. Acesso em: 26 jun. 2023.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 92-99, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/sJYd5ySdqh54HwpXdzyxPNp/#ModalTutors>. Acesso em: 26 jun. 2023.

VIDAL-CAMPELLO, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Métodos de obtenção de concentrado proteico a partir de resíduos da filetagem de tilápia. **Ciência e Tecnologia do Pescado**, v. 2, p. 147-159, Disponível

em: <https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/210404113.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

VO, T. D. L.; LAM, H. H.; HUYNH, O. N.; NGUYEN, D. T. M. Investigation of calcium-binding capacity and functional properties of acetes japonicus protein hydrolysate. **Chemical Engineering Transactions**, v. 78, p. 349-354, 2020. Disponível em: <https://www.cetjournal.it/index.php/cet/article/view/CET2078059>. Acesso em: 01 jul. 2023

WASSWA, J.; TANG, J.; GU, X.; YUAN, X. 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.044>. Acesso em: 28 jun. 2023.

WINDSOR M. L. **Fish protein concentrate**. Torrey advisory note nr. 39. FAO fisheries and aquaculture department, Rome. 2001.

YANG, S. ZHANG, Q.; YANG, H.; SHI, H.; DONG, A.; WANG, L.; YU, S. Progress in infrared spectroscopy as an efficient tool for predicting protein secondary structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 206, p. 175-187, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.104>. Acesso em: 29 jun. 2023.

YARNPAKDEE, S. B. S.; KRISTINSSON, H. G. Effect of pretreatments on chemical compositions of mince from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and fishy odor development in protein hydrolysate. **International Aquatic Research**, v. 4, n. 7, p. 1-16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2008-6970-4-7>. Acesso em: 29 jun. 2023.

ZAMORA-SILLERO, J.; GHARSALLAOUI, A.; PRENTICE, C. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: an overview. **Marine Biotechnology**, v. 20, p. 118-130, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9799-3>. Acesso em: 29 jun. 2023.

ZHANG Y, C. R.; CHEN, X.; ZENG, Z.; MA, H.; CHEN, S. Dipeptidyl peptidase iv-inhibitory peptides derived from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* val.) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 831-839, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26758401/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

ZHANG, X.; DAI, Z.; ZHANG, Y.; DONG, Y.; HU, X. Structural characteristics and stability of salmon skin protein hydrolysates obtained with different proteases. **LWT**, v. 153, p. 112460, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112460>. Acesso em: 02 fev. 2024.

ZUFFO, A.; GONZÁLEZ, A. J.; NOGUEIRA, W. **Tópicos em ciências dos alimentos**. Nova Xavantina: Pantanal Editora, 2020, 57 p. Disponível em:

<https://editorapantanal.com.br/ebooks/2020/topicos-em-ciencia-dos-alimentos/ebook.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2024.