

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO SUPERIOR DE BACHARELELADO EM ENGENHARIA DE PESCA

**RAFAEL RIGONI CARDOSO**

PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO A PARTIR DE COPRODUTOS DE  
ATUM (*Thunnus alalunga*) COM USO DA ALCALASE

PIÚMA  
2017

**RAFAEL RIGONI CARDOSO**

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO A PARTIR DE COPRODUTOS DE  
ATUM (*Thunnus alalunga*) COM USO DA ALCALASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria de Engenharia de Pesca do  
Instituto Federal do Espírito Santo, como requisito  
parcial para aprovação na Disciplina de Projeto de  
Conclusão de Curso.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Dayse Aline Silva Bartolomeu  
de Oliveira

PIÚMA

2017

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)  
Bibliotecária responsável Ana Muller CRB6/ES 541

---

C268p Cardoso, Rafael Rigoni, 1985-

Produção de hidrolisado proteico a partir de coprodutos de atum  
(*Thunnus alalunga*) com uso da alcalase / Rafael Rigoni Cardoso. -- 2017.  
43 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora : Dayse Aline Silva Bartolomeu de Oliveira

Monografia (graduação) - Instituto Federal do Espírito Santo, Campus  
Piúma, Coordenadoria de Curso Superior de Engenharia de Pesca, 2017.

1. Indústria pesqueira. 2. Atum (Peixe) – Coproduto. 3. Hidrólise enzimática.  
I. Oliveira, Dayse Aline Silva Bartolomeu de. II. Instituto Federal do Espírito Santo,  
Campus Piúma. III. Título.

CDD: 664.94

---

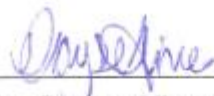
**RAFAEL RIGONI CARDOSO**

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO A PARTIR DE COPRODUTOS DE  
ATUM (*Thunnus alalunga*) COM USO DA ALCALASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria de Engenharia de Pesca do  
Instituto Federal do Espírito Santo, como requisito  
parcial título Bacharel em Engenharia de Pesca.

Aprovado em 12 de dezembro de 2017

**COMISSÃO EXAMINADORA**

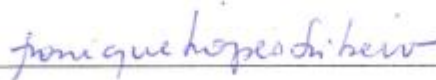


---

Prof. DSc. Dayse Aline Silva Bartolomeu de Oliveira

Instituto Federal do Espírito Santo

Orientadora



---

Prof<sup>a</sup>. MSc Monique Lopes Ribeiro

Instituto Federal do Espírito Santo

Membro interno



---

Prof. DSc. Gabriel Domingos Carvalho

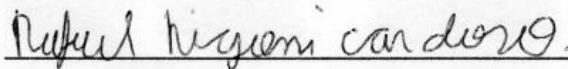
Instituto Federal do Espírito Santo

Membro interno

## DECLARAÇÃO DO AUTOR

Declaro, para fins de pesquisa acadêmica, didática e técnico-científica, que este Trabalho de Conclusão de Curso pode ser parcialmente utilizado, desde que se faça referência à fonte e ao autor.

Piúma, 12 de dezembro de 2017.



Rafael Rigoni Cardoso.

Rafael Rigoni Cardoso

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos a Deus e a todas as pessoas que me apoiaram no decorrer dessa caminhada pelo conhecimento.

A minha família: irmãs, Rosimara Cardoso e Rosana Rigoni Cardoso; irmão, Rondinei Cardoso e minha cunhada Fabiana R Cardoso por acreditarem que seria capaz de concluir essa mais essa etapa em minha vida.

A Professora Dra. Dayse Aline Silva Bartolomeu de Oliveira, grande amiga e orientadora pelo apoio inestimável na realização deste trabalho.

O Professor Dr. Marcelo Giordani Minozzo, também amigo, pela ajuda e conselhos que foram fundamentais nessa trajetória.

Aos amigos Raoní Gonçalves de Souza e João Lucas Santos Menezes, pela amizade, sugestões, considerações e apoio durante toda a elaboração deste trabalho.

A amigas Leticia Benevides Silva, pela amizade, sugestões, considerações e apoio durante toda a elaboração deste trabalho.

A CLB (Coordenação de laboratórios), em especial à Daniela Alves Sant´ana e Suzana Bianchini Menegardo, pela ajuda durante a realização dos trabalhos nos laboratórios do Campus.

A todos amigos e professores do GePP (Grupo de Estudos em Processamento de Pescado) do Curso de Engenharia de pesca, em especial Professora Prof<sup>a</sup>. MSc Monique Lopes Ribeiro e Professora Dra. Flavia Spago.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo Campus Piúma pela oportunidade que me foi ofertada, é sempre bom aplicar um pouco dos conhecimentos adquiridos na construção de um mundo melhor, que estime os reais valores.

A todos os amigos, familiares que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Atualmente a pesquisa mundial sobre a produção de hidrolisados de proteína de pescado concentra-se na diminuição dos coprodutos gerados e na maximização do lucro da indústria. Resíduos do atum são usados para produzir silagem e farinha de pescado. No entanto, também podem ser utilizados para a elaboração de produtos de maior valor agregado, como hidrolisados e compostos bioativos, adquiridos através do processo de hidrólise enzimática utilizando a enzima alcalase. O objetivo do presente estudo foi a produção de hidrolisado proteico a partir de coprodutos do processamento do atum (*Thunnus alalunga*) através da ação da enzima alcalase. As análises foram efetuadas utilizando um planejamento fatorial  $2^2$  compostos central com duas variáveis independentes: tempo entre 70 e 410 (minutos) e concentração de enzima entre (0,2 e 1%) para o desenvolvimento do hidrolisado. Foram calculados a composição físico-química da matéria-prima e dos hidrolisados, o rendimento e o grau de hidrólise dos hidrolisados produzidos. Os resultados obtidos para o coproduto de atum foi: 72,83 % de umidade; 4,18 % de cinza; 14,64 % de proteína e 4,17 % de lipídeos. Os hidrolisados apresentaram uma média de: 80,26% de umidade, 14,82% de proteínas, 2,84% de lipídeos, 4,18% de cinzas. O rendimento máximo do hidrolisado foi de 76,64%. O maior grau de hidrólise foi do tratamento um, 46,63%. Foi possível desenvolver tratamentos de hidrolisado proteico a partir de coproduto de (*Thunnus alalunga*) com resultados aceitáveis de composição físico-química e grau de hidrólise, demonstrando que essa técnica, provavelmente, pode ser utilizada como uma forma de melhor aproveitamento dos coprodutos gerados pela indústria pesqueira. No entanto, o coeficiente de regressão do grau de hidrólise neste estudo ( $r^2 = 0,57218$ ) foi insatisfatório, necessitando de outro modelo matemático para representar o comportamento do grau de hidrólise frente às variáveis testadas no processo.

Palavras-chave: Concentração de enzima. Grau de hidrólise. Hidrólise enzimática.

## ABSTRAT

Current research on the production of fish protein hydrolysates focus in reduce the by-products, maximizing the profit of the industry. Tuna wastes are used to produce silage and fish meal. However, it can be used for the elaboration of products with higher added value, such as hydrolysates and bioactive compounds, acquired through the enzymatic hydrolysis process using the alcalase enzyme. The aim of this work was to produce protein hydrolysate from co-products of the processing of tuna (*Thunnus alalunga*) through the action of alcalase. The analyzes were carried out using a factorial design  $2^2$  central compounds with two independent variables: time between 70 and 410 (minutes) and enzyme concentration between 0,2 and 1 %, for hydrolysate development. The physico-chemical composition of the raw material and the hydrolysates, the yield and degree of hydrolysis of the hydrolysates were calculated. The results obtained for the tuna co-product were:  $72.83 \pm 0.98$  of humidity;  $4.18 \pm 0.02$  of ashes;  $14.64 \pm 0.21$  of protein and  $4.17 \pm 0.38$  of lipids. The hydrolysates analysis presented an average of: 80.26% of humidity, 14.82% of proteins, 2.84% of lipids, 4.18% of ashes. The maximum hydrolysate yield was 76.64%. The highest degree of hydrolysis was treatment one 46.63%. Protein hydrolysate formulations from co-product of *Thunnus alalunga* with acceptable results of physico-chemical composition and degree of hydrolysis of the hydrolysate, demonstrating that this technique can probably be used as a way to make better the use of co-products generated by the fishing industry. The regression coefficient of the degree of hydrolysis in this study ( $r^2 = 0.57218$ ) was unsatisfactory, requiring another mathematical model to represent hydrolysis degree versus process variables.

Keywords: Enzyme concentration. Enzymatic hydrolysis. Degree of hydrolysis.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ocorrência de espécies de atum em diferentes oceanos.....	16
Tabela 2:- Algumas organizações produtoras de hidrolisados de pescado .....	21
Tabela 3 - Delineamento experimental do processo de hidrolise com tempo e concentração de enzima. ....	23
Tabela 4 - Análises físico-químicas da matéria prima coprodutos ( <i>Thunnus alalunga</i> ) .....	27
Tabela 5 - Coproduto de atum ( <i>Thunnus alalunga</i> ) e das onze tratamentos de hidrolisado. ....	28
Tabela 6 - Percentual de rendimento do hidrolisado de atum ( <i>Thunnus alalunga</i> ), em função do tempo (minutos) e variações de concentração de enzimas. ....	29
Tabela 7- Resultado do Grau de Hidrólise, dos 11 tratamentos de hidrolisado Protéico de Pescado .....	30
Tabela 8 - ANOVA; Var. Grau de Hidrólise (GH $R^2 =$ , 57218; Adj:, 03741 (Folha de cálculo1) 2 fatores, 1 bloco, 10 corridas; MS Pure Error = 3,101741 DV: Grau de Hidrólise (GH).....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Esquema geral de preparação do Hidrolisado Protéico de Pescado. ....	20
Figura 2 - Gráfico de Pareto em função dos valores estatístico de teste T. ....	33
Figura 3 - Relação entre os valores observados e previstos do grau de hidrólise. .	33
Figura 4 - Gráficos de superfície de resposta grau de Hidrólise em três eixos. ....	34

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1	O ATUM.....	15
3.2	COPRODUTOS (RESÍDUOS DE PESCADO).....	17
3.3	EMZIMA.....	18
3.4	HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA.....	22
4.2	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA.....	22
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
4.3.1	<b>Produção do hidrolisado proteico de pescado</b> .....	24
4.3.2	<b>Rendimento dos hidrolisados protéicos desenvolvidos</b> .....	24
4.4	COMPROSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROLISADO PROTÉICO DE COPRODUTO DE ATUM.....	25
4.5	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE COPRODUTO DE ATUM ( <i>Thunnus alalunga</i> ).....	25
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DA MATÉRIA PRIMA UTILIZADA.....	27
5.2	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DO HIDROLISADO.....	28
5.3	RENDIMENTO DO HIDROLISADO DE ATUM ( <i>Thunnus alalunga</i> ).....	29
5.4	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE.....	30
5.5	ANALISE DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	31
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo *Food and Agriculture Organization* (FAO), (2016), as capturas de espécies de atum totalizaram cerca de 7,7 milhões de toneladas em 2014. Com elevado índice proteico e ampla utilização na culinária mundial, o atum (gênero *Thunnus*) é um dos grupos de peixe mais importantes do ponto de vista pesqueiro (HAZIN; TRAVASSOS, 2007).

Porém, nem todo o atum é comercializado, pois no seu processo de beneficiamento, segundo Stone (2007), os ossos e as carnes escuras são considerados como resíduos, constituem 17,9% de um atum sem cabeça e a pele e as vísceras constituem 13%, região ventral de 6,2% e a carcaça 7,9% (HERPANDI; ROSMA; NADIAH, 2011).

Segundo a Política Nacional de Resíduos Sólidos, lei nº 12.305/2010, é preciso dar a correta destinação dos resíduos sólidos, sendo responsabilidade compartilhada dos geradores dos resíduos, dos fabricantes, importadores, distribuidores, comerciantes, do cidadão, incluído a destinação final ambientalmente adequada com a segurança necessária a minimizar os impactos ambientais adversos (BRASIL, 2010).

Resíduos do beneficiamento do atum, atualmente chamado de coprodutos apresentam grandes quantidades de água (58-77%) e quantidade mediana de proteína (15-17%), apresentando diferenças principalmente em seu conteúdo de lipídios e cinzas e por tanto, são usados para produzir principalmente silagem e farinha de pescado. No entanto, também podem ser utilizados para a elaboração de produtos de maior valor agregado, como compostos bioativos que podem ser adquiridos através do processo de hidrólise enzimática, como péptidos bioativos, colágeno e gelatina (NGUYEN et al., 2010; HALIM; YUSOF; SARBON, 2016). Essa técnica pode ser utilizada para desenvolver hidrolisados proteicos de pescado, o processo hidrólise quebra as proteínas em cadeias peptídicas menores contendo 2-20 aminoácidos chamados hidrolisados. (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016)

Segundo Halim, Yusof e Sarbon (2016) o processo também recupera e disponibiliza nutrientes essenciais para populações humanas e animais, utilizados como ingredientes alimentares e aditivos que proporcionam características desejáveis aos produtos alimentares processados, aplicados para aumento potencial de

participação de mercado para aditivos farmacológicos e de alimentos para uso humano, alimentação animal e / ou suplementação de alimento.

De acordo com Martins, Costa e Prentice-hernández (2009), a hidrólise é um processo eficiente para a solubilização das proteínas do pescado. Proteases como Alcalase e Flavourzyme, têm sido relatadas como eficientes para hidrolisar proteínas de pescado (KRISTINSSON; RASCO, 2000; NORMAH et al., 2005; DUMAY *et. al.*, 2009).

A metodologia de superfícies de resposta ajuda os pesquisadores a investigar processos complexos, e é aplicada com sucesso para otimizar as operações de processamento, gerando um modelo matemático que descreve com precisão e ajudão a definir as condições de hidrólise otimizadas para a produção de hidrolisado. A metodologia de superfície de resposta é utilizado também para avaliar o grau da hidrólise, pois, segundo o autor Ovissipour et al. (2010) (tempo, temperatura e atividade enzimática da alcalase) mostrou um resultado significativamente influenciado pela enzima alcalase no grau de hidrose em vísceras de atum.

Mundialmente a produção de hidrolisado é feita por diversas indústrias que reutilizam de forma benéfica os o resíduos do beneficiamento de pescado , enquanto no Brasil faltam empresas especializadas para este tipo de processamento de pescado, isto é, o aproveitamento integral do pescado. Por tanto, diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi a produção de hidrolisado proteico. A partir de coprodutos do processamento do atum através da ação da enzima alcalase, avaliando a viabilidade da técnica de hidrólise enzimática como uma forma de melhor aproveitamento de coprodutos do processamento do atum.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de hidrolisado proteico a partir de coprodutos do processamento do atum (*Thunnus alalunga*) através da ação da enzima alcalase 2.4L®.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a composição físico-química da matéria prima composta , de vísceras, nadadeiras e cabeça, (*Thunnus alalunga*);
2. Desenvolver hidrolisado proteico a partir de coprodutos de atum (*Thunnus alalunga*);
3. Calcular o rendimento dos hidrolisados proteicos desenvolvidos;
4. Avaliar o grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos desenvolvidos;
5. Analisar a composição físico-química dos hidrolisados proteicos desenvolvidos;
6. Avaliar a probabilidade de otimizar o processo via técnica de superfície de resposta.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O ATUM

As espécies de atum e afins são muito importantes economicamente e são considerado uma fonte significativa de alimentos (FAO, 2017). Os principais atuns do mercado são distribuídos no Oceano Atlântico (Norte, Sul, Oeste, Oriente e Mar Mediterrâneo), Oceano Índico, Oceano Pacífico (Norte, Sul, Leste, Oeste e Central) e Oceano do Sul (FAO, 2010). Cada oceano tem suas próprias espécies específicas, como o atum rabilho (*Thunnus thynnus*) do atlântico, que geralmente é encontrado no Oceano Atlântico e o atum rabilho do sul (*Thunnus maccoyii*) em partes do sul do Atlântico, Índico e Oceano Pacífico (FAO, 2010). No entanto, atum patudo (*Thunnus obesus*), atum albacora (*Thunnus alalunga*) podem ser capturados nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (FAO, 2010). A Tabela 1 mostra a ocorrência de espécies de atum em diferentes oceanos.

A pesca oceânica, voltada para a captura de atum voador (*Thunnus alalunga*), laje (*Thunnus albacare*) e o bandolim (*Thunnus obesus*), são as espécies mais capturadas, apresentam um alto valor comercial para exportação, constituindo uma importante fonte de recursos financeiros para o Brasil (FIEDLER et al., 2015).

O estado do Espírito Santo representou em 2002 (58%) do desembarque de pescado, 24% das embarcações e 41% dos pescadores (MARTINS & DOXSEY, 2004). No Município de Itapemirim, distrito de Itaipava, Espírito Santo, está instalado uma das principais empresas exportadoras de produtos pesqueiros do estado, essa empresa processou aproximadamente 250 toneladas/mês de pescado. (VILA DOS PESCADORES, O SUSTENTO QUE VEM DO MAR, 2013)

O aproveitamento de resíduos de peixes marinhos vem tornando-se cada vez mais promissor, por ser considerada uma biomassa com propriedades nutricionais elevadas. Os resíduos de atum constituem uma matéria-prima de interesse devido a sua importância econômica mundial (GUERARD et al., 2002). Os resíduos sólidos ou coprodutos gerados pela indústria de conservas de atum podem chegar até 65 % da matéria-prima original, e isso inclui cabeças, ossos, vísceras, brânquias, músculo escuro e pele (FAO, 2014).

Tabela 1 - Ocorrência de espécies de atum em diferentes oceanos.

<b>NOMES COMUNS</b>	<b>NOME CIENTÍFICO</b>	<b>ÁREAS DE OCORRÊNCIA</b>
<b>TUNAS E BONITOS</b>		
<b>SKIPJACK</b>	<i>Katsuwonus pelamis</i>	No mundo todo
<b>ATUM ALBACORA</b>	<i>Thunnus albacares</i>	No mundo todo
<b>ATUM PATUDO</b>	<i>Thunnus obesus</i>	No mundo todo
<b>ATUM ALBACORA</b>	<i>Thunnus alalunga</i>	No mundo todo
<b>ATLÂNTICO ATUM RABILHO</b>	<i>Thunnus thynnus</i>	Oceano Atlântico
<b>ATUM RABILHO DO PACÍFICO</b>	<i>Thunnus orientalis</i>	Oceano Pacífico
<b>ATUM RABILHO DO SUL</b>	<i>Thunnus maccoyii</i>	Partes do sul do Atlântico, Índico e Oceano Pacífico
<b>ATUM LONGTAIL</b>	<i>Thunnus tonggol</i>	Oceano Índico, Oceano Pacífico Ocidental
<b>ATUM PRETO</b>	<i>Thunnus atlanticus</i>	Oceano Atlântico Ocidental
<b>KAWAKAWA</b>	<i>Euthynnus affinis</i>	Oceanos indianos, ocidentais e do Pacífico central
<b>SALTEADOR PRETO</b>	<i>Euthynnus lineatus</i>	Oceano Pacífico Oriental
<b>BONITO-PINTADO</b>	<i>Euthynnus alleteratus</i>	Oceano Atlântico
<b>ATUM BALA</b>	<i>Auxis rochei</i>	No mundo todo
<b>FRIGATA DE ATUM</b>	<i>Auxis thazard</i>	Oceanos Índico e Pacífico
<b>ATUM MAGRO</b>	<i>Allothunnus fallai</i>	Oceano do Sul

Fonte: FAO (2010)



### 3.2 COPRODUTOS (RESÍDUOS DE PESCADO)

O uso do termo resíduo se refere a todos os coprodutos e sobras do processamento de alimentos que são de baixo valor comercial. No caso do pescado, o material residual pode ser constituído de aparas do *toilete* ou limpeza antes do enlatamento, carne escura, peixes fora do tamanho ideal para industrialização, cabeças e carcaças (OETTERER, 1994).

Os coprodutos obtidos no processamento do pescado em seu descarte têm a seguinte composição de compostos de músculo, cortes (15-20%), pele (1-3%), e ossos (9-15%), cabeças (9-12%), vísceras (12-18%) e escamas (5%) (MARTÍNEZ-ALVAREZ, CHAMORRO & BRENES, 2015).

Segundo Arason (2003), um atum eviscerado com cabeça contém 62% de carne comestível. As cabeças de peixe contêm relativamente pouca carne e geralmente são descartadas ou utilizadas como alimento para animais. Stone (2007) relatou que os fié e lombos de atum geralmente constituem 37,1% e 17,9% de um atum sem cabeça, simultaneamente, as duas são partes principais aproveitadas na indústria do atum.

Conforme Stone (2007) os ossos e as carnes escuras, que são consideradas como resíduos, constituem 17,9% de um atum sem cabeça e a pele e as (vísceras) constituem 13%, região ventral 6,2% e a carcaça 7,9% (HERPANDI; ROSMA; NADIAH, 2011). As vísceras, incluindo o fígado e as ovas, podem constituir 10% a 25% do peso líquido de um atum inteiro, dependendo da maturidade e da estação (HERPANDI; ROSMA & NADIAH, 2011).

Os coprodutos produzidos do processamento do pescado são uma fonte expressiva rica em proteínas e outros elementos, como ácidos graxos poliinsaturados, fosfolípidos, vitaminas solúveis e compostos bioativos (SHIRAHIGE et al., 2016). A pele de peixe, osso e barbatanas podem ser usadas em fontes de colágeno e gelatina. Pele abdominal de atum albacora (*Thunnus albacares*) já foi utilizada para desenvolver colágeno e gelatina (HAN et al., 2015). Embora sejam despejadas como resíduos, seu rendimento de colágeno é muito alto (cerca de 36% a 54%) (NAGAI & SUZUKI, 2000).

Entre outras formas de aproveitamento dos coprodutos produzidos estão os isolados para cosméticos (colágeno) (NAGAI & SUZUKI, 2000), biogás / biodiesel (óleo) (KATO et al.,2004), fertilizantes, aplicações como dietéticos e para embalagens alimentícias (gelatina, quitosana) (KUMAR, 2000); (ARVANITOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1998), isolamento da enzima (protease) (TAVARES; BAPTISTA; MARCONE, 1997); (ZHANG; YAMASHITA; NOZAKI, 2002) e pigmentos naturais (carotenóides) (SHAHIDI; METUSALACH; BROWN, 1998); (SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006).

Outra forma de aproveitamento de coprodutos é o uso músculo escuro do atum utilizado em geral nos produtos alimentares para animais de estimação, onde representam cerca de 5% dos alimentos enlatados disponíveis nesse seguimento de mercado (HERPANDI; ROSMA; NADIAH, 2011). Contudo, além dessas utilizações, a produção de farinha e óleo de peixe ainda é a mais utilizada em todo o mundo.

### 3.3 ENZIMA

O uso de enzima para a fabricação do hidrolisado de pescado, inicia-se na segunda Guerra Mundial, que, primeiramente, era empregado como fonte de nitrogênio amínico para a cultura de microrganismos, atualidade, e aproveitado para modificar propriedades adicionados a alimentos, como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos. (BOSCOLO; FEIDEN, 2007). A hidrólise enzimática das proteínas pode ser realizada com enzimas endógenas, proteases existentes no pescado, ou com enzimas exógenas, adicionadas para promover o processo hidrolítico (GONÇALVES, 2011).

Entre estes métodos, a hidrólise enzimática é a mais comum é utilizada para produzir hidrolisados através da adição de inúmeras enzimas tais como alcalase, papaína, pepsina, tripsina, alfa-quimotripsina, pancreatina, saborizante, pronase, neutrase, protamex, bromelina, Cryotin F, protease N, protease A, orientase, termolisina (CHALAMAIAH et al., 2012).

Segundo Schmidt e Salas-mellado (2009) alcalase é uma enzima produzida por fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis* e foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes. Os autores que utilizaram alcalase para desenvolver hidrtolisado proteico de pescado: Guérard et al. (2001), Ovissipour et al. (2010), Han et al. (2015),Oliveira et al. (2017).

Tem-se provado repetidamente, por pesquisadores, que é a melhor enzima usada na preparação de diversos hidrolisados protéicos (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

### 3.4 HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO

*Fish Protein Hydrolysated* (FPH), conforme designado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), pode chegar a uma concentração de proteína de 90%, além de proporcionar propriedades funcionais benéficas para a indústria alimentícia (OETTERER, 2001).

Os hidrolisados proteicos podem ser utilizados para aumentar ou modificar as propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas, como a solubilidade, absorção de óleo, características emulsificantes e, ainda, melhorar as propriedades sensoriais, sem perder o seu valor nutricional (HE; FRANCO; ZHANG, 2013).

As propriedades funcionais do FPH, incluem solubilidade, propriedades emulsionantes, propriedades de formação de espuma, capacidade de retenção de água e capacidade de ligação de gordura (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016).

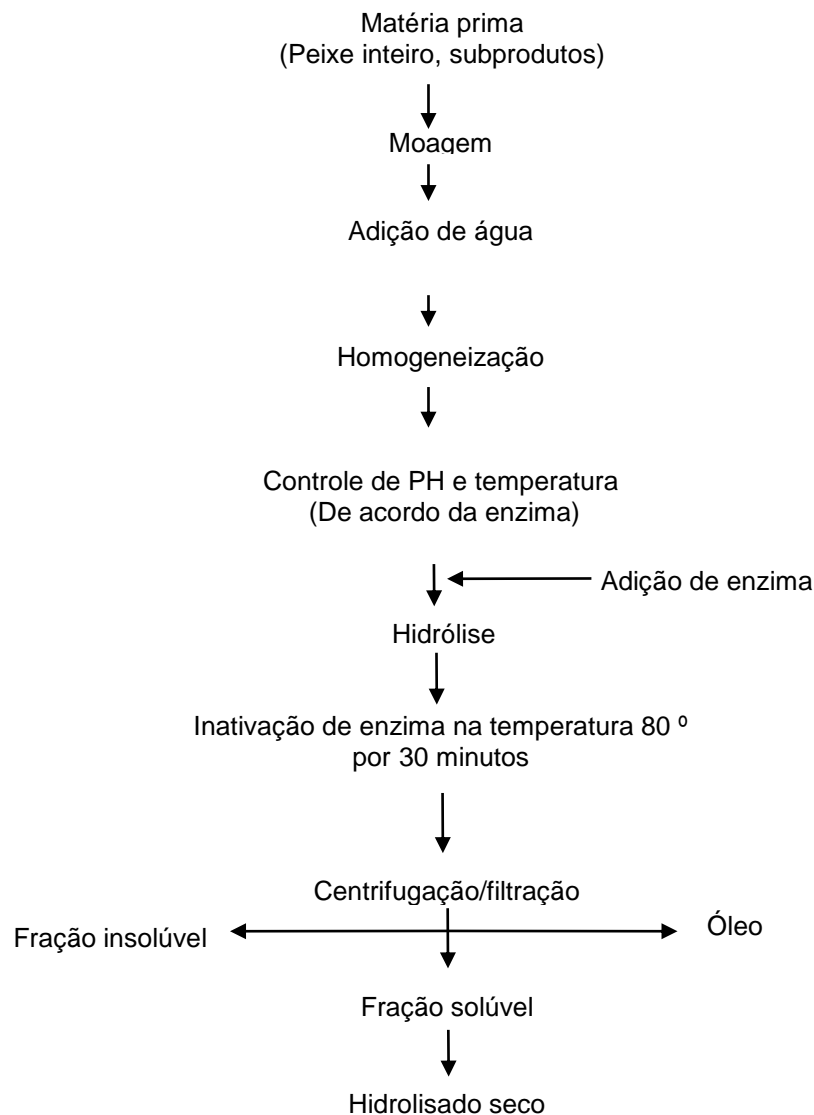
Vários processos e técnicas de hidrólise proteica têm sido propostos, aproveitando peixes inteiros, músculos e resíduos de processamento. O princípio básico para a obtenção do FPH envolve a quebra hidrolítica das longas cadeias de moléculas proteicas pela adição de enzimas vegetais ou por proteases microbianas (VIEGAS, 2000).

Para Wheaton & Lawson (1985) o processo de obtenção do FPH é relativamente simples e rápido. Aplicado na recuperação da proteína dos desperdícios da filetagem do pescado, esses coprodutos são finamente cortados ou moídos e colocados em um recipiente com água, seguido da adição das enzimas, onde a quantidade a ser acrescida depende da sua atividade proteolítica e da porcentagem de proteína da matéria-prima a ser digerida.

O processo de preparação de FPH (Figura 1) envolve uma moagem do material, seguindo-se a adição e homogeneização com volume de água até obtenção de uma massa viscosa (GONÇALVES, 2011). A seguir é checado o grau de hidrólise pretendido, a reação enzimática tem que ser cessada para que a enzima não continue a hidrolisar as proteínas e os peptídeos. Essa desativação é obtida por meios térmicos ou químicos. Na desativação térmica, a mistura racional é aquecida

a temperaturas entre 75 e 100°C durante 5 a 30 minutos, variando da enzima enquanto que na inativação química, é conseguida também por meio do aumento ou da diminuição do pH do meio reacional para valores nos quais a enzima é inativada (GONÇALVES, 2011).

O grau de hidrólise (GH) é uma estimativa de grau da clivagem das proteínas durante a hidrólise, constituindo o tamanho dos peptídeos tão menor quanto maior for o GH (NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001). O grau de hidrólise é avaliado como principal indicador da hidrólise enzimática (HE; FRANCO; ZHANG, 2013), em relação com a funcionalidade dos hidrolisados proteicos, sendo que o seu aumento pode levar ao prolongamento da capacidade emulsificante e de absorção de óleo.



Fonte: GONÇALVES (2011).

Figure 1 - Esquema geral de preparação do Hidrolisado Protéico de Pescado.

Algumas organizações produtoras de hidrolisados de pescado mostrado na 2:

A Tabela 2 desmostra que no mundo existem empresas que visam agregar valor para coprodutos de pescado, especializadas na produção de hidrolisado proteico dessa matéria prima.

Tabela 2:- Algumas organizações produtoras de hidrolisados de pescado

<b>Empresa</b>	<b>Mercado alvo</b>	<b>Especificações / Preço</b>
<b>Sopropêche (France)</b>	Indústria rações e fertilizantes	Hidrolisados proteicos de pescado
<b>COPALIS Sea Solutions (France)</b>	Alimentação humana, suplementos dietéticos, cosmética, rações, extractos aromáticos	-
<b>Shrividya Enterprises (India)</b>	Fertilizantes; animais de estimação	Hidrolisados proteicos de pescado (pó e líquido)
<b>Sterling Gelatin, a Division of Sterling Biotech Ltd (India)</b>	Fármacos, nutracêuticos e aplicações alimentares	Gelatina e hidrolisados proteicos
<b>PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO LTD (Japão)</b>	Nutracêuticos	Gelatina e colagénio
<b>Dutch Protein &amp; Services BV (Holanda)</b>	Indústria alimentar: coberturas, estabilizantes e emulsionantes	-
<b>Vet Superior Consultant Co., Ltd. (Tailândia)</b>	Rações e ingredientes para rações	-
<b>Tasmanian Marine Concentrates (Austrália)</b>	Hidrolisado proteico de salmão 2,1-2,8 \$/kg	
<b>Primex (Islândia)</b>	Produtos alimentares, cosmética, aplicações biomédicas	
<b>Marine Bio Product (Noruega)</b>	Rações, produtos com aplicações médicas	
<b>Scanbio Ltd (Escócia)</b>	Rações e ingredientes para rações	
<b>Tech-Terra Organics.LLC (Estados Unidos)</b>	Fertilizantes	

Fonte: BATISTA; PIRES (2014)

Observando a Tabela 2, enquanto o hidrolisado proteico de pescado já é produzido e comercializado em outros países, no Brasil ainda não existe empresas especializadas nessa área produção, demonstrando a relevância do presente estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

Os coprodutos de atum (*Thunnus alalunga*), vísceras, nadadeiras e cabeça, foram doados pela empresa Estrela do Mar LTDA, situada no município de Piúma/ES. O pescado foi identificado como sendo proveniente do município Prado de latitude 17°20'28" sul e a uma longitude 39°13'15" oeste no estado da Bahia (BA).

As amostras sem separação os coprodutos foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo até o Laboratório de Alimentos do Instituto Federal do Espírito Santo Campus Piúma onde foram trituradas por um multiprocessador Becker GO (modelo Prab 200) com uma granulometria de cinco milímetros, apresentando aparência de carne moída. Após o processo de moagem, a matéria-prima foi acondicionada em sacos assépticos com 500g de amostra sendo devidamente identificadas e armazenadas em freezer da marca (Frilux) à -20°C até o início dos testes.

A Alcalase 2.4L® foi obtida da Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil). Os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

### 4.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

As análise físico-químicos foram realizados para a matéria-prima de coproduto de atum (*Thunnus alalunga*). Tais testes consistiram, em análises de umidade (950.46), cinzas (920.153), de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2010). A metodologia utilizada para investigação de lipídeos foi de acordo com método mais usado, Bligh e Dyer (1959). As análises foram realizadas em triplicata, sendo a média dos resultados expressas em g/100g de matéria úmida. Investigação de proteína foi de acordo com método, Galvani e Gaertner (2006) onde metodologia onde foi adequada da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta.

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

De acordo Pearce Kinsella (2017) o tempo de reação e concentração de enzima são fundamentais no desenvolvimento de hidrolisados protéicos, uma vez que estes fatores (tempo x concentração de enzima) estão diretamente relacionados às características do hidrolisado protéico de pescado.

Este estudo gerou um variável dependente que é o grau de hidrólise. O processo de hidrólise enzimática de coprodutos a atum (*Thunnus alalunga*) foi conduzido seguindo um planejamento fatorial com duas variáveis independentes – Tempo de processo  $X_1$  (em minutos) e concentração de enzima  $X_2$  (% p/v), compostos por três partes, obtidos a auxilio do *software Statistic®*.

O delineamento foi composto por 3 partes: ensaio fatorial, contendo 4 pontos ( $2^2$ ); pontos axiais, e análise do ponto central. Os valores em pseudocomponentes, os pontos e formulações do processo estão definidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Delineamento experimental do processo de hidrolise com tempo e concentração de enzima.

Variáveis codificadas		Tempo (min)	Concentração de enzima (%)	Tratamento
X1	X2			
1,00000	1,00000	360	1,00	T-1
-1,00000	-1,00000	120	0,20	T-2
-1,00000	1,00000	120	1,00	T-3
-1,41421	0,00000	70	0,60	T-4
0,00000 (c)	0,00000 (c)	240	0,60	T-5
0,00000	1,41421	240	1,17	T-6
1,00000	-1,00000	360	0,20	T-7
1,41421	0,00000	410	0,60	T-8
0,00000 (c)	0,00000 (c)	240	0,60	T-9
0,00000 (c)	0,00000 (c)	240	0,60	T-10
0,00000	-1,41421	240	0,03	T-11

Fonte (auto)

NOTA: X1 = Tempo, X2 = Concentração de Enzima correspondentes a pseudocomponentes, C = central.

#### 4.3.1 Produção do hidrolisado proteico de pescado

O hidrolisado proteico de coproduto de atum (*Thunnus alalunga*) (HPA) foi obtido conforme a metodologia descrita por Dieterich et al. (2014).

Os coprodutos de atum (*Thunnus alalunga*), foram descongelados, em temperatura de refrigeração, homogeneizados e inserido no o reator de vidro (MODELO MSM 502 / 5000 / ESP) com capacidade de 5 kg, encamisado e aquecido em banho-maria com regulagem por termostato (banho ultratermostático sl152 da marca Solab). A produção de hidrolisado proteico de pescado variou em uma temperatura média de 63 °C e um variação de pH de entre 6,0 a 6,5.

Para o desenvolvimento dos onze tratamentos de hidrolisado protéico de pescado, diluiu-se o coproduto de atum (*Thunnus alalunga*) triturado, em água destilada numa proporção de 30% (p/v), enquanto a enzima alcalase® foi adicionada conforme as proporções descrita na Tabela 3 e mantida a agitação constante. O tempo de reação variou entre 70 e 410 minutos (Tabela 3). O término do processo foi feito por inativação da enzima através de desnaturação térmica à 85 °C /30 minutos.

#### 4.3.2 Rendimento dos hidrolisados protéicos desenvolvidos

Após o processo de hidrolise, o produto foi submetido ao processo de filtragem por peneira de inox (1.0 mm) para a retirada de osso e posterior cálculo de rendimento conforme Equação 1. Findadas as etapas, acima descritas, o produto obtido foi submetido ao congelamento a -20° C, até o momento das etapas subsequentes. O calculo foi feito segundo Oliveira et al. (2015).

Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Hidrolisado filtrado sem osso}}{\text{Hidrolisado com osso}} * 100$$



#### 4.4 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROLISADO PROTÉICO DE COPRODUTO DE ATUM

Tais testes consistiram, em análises de umidade (950.46), , cinzas (920.153), de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2010). Foram realizadas essas análises citadas para os onze tratamentos estabelecidos de acordo com a Tabela 2, a metodologia utilizada para investigação de lipídeos foi de acordo com método, Bligh e Dyer (1959). As análises foram realizadas em triplicata, sendo a média dos resultados expressas em g/100 g de matéria úmida. Investigação de proteína foi de acordo com método, Galvani e Gaertner (2006), sendo a metodologia uma adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS DE COPRODUTO DE ATUM (*Thunnus alalunga*)

Foi avaliado o Grau de Hidrólise (GH) dos onze tratamentos de hidrolisado protéico de pescado desenvolvidos. Para tanto, utilizou-se o método sugerido por Church et al. (1983) e modificado por Nielsen et al. (2001). Este procedimento baseia-se na reação de grupos amino primários com OPA, sendo esta monitorada a 340 nm, utilizando-se a serina como padrão.

O reagente OPA teve a preparação utilizando-se 3,81g de tetraborato de sódio, 100 mg de SDS (dodecil sulfato de sódio) diluídos em 80 mL de água, sendo posteriormente acrescentados 88 mg de DTT (ditiotreitól).

A seguir, 80 mg de OPA foi adicionados a 2 mL de etanol, sendo esta mistura acrescentada à solução anterior e o volume de 100 mL foi completado com água destilada.

O padrão de serina foi preparado dissolvendo-se 20 mL do aminoácido em 200 mL de água destilada .

A preparado a solução branco , utilizou-se de 0,075g amostra e 7,5ml de água destilada.

Para realização da leitura foi adicionados 3 mL de OPA, a 400 µL de amostra, após 2 min de reação foi lida a absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis), utilizando serina como padrão.

O grau de hidrólise foi então calculado seguindo a três etapas abaixo :

I. Identificação do valor de serina-NH<sub>2</sub>:

$$\text{Serina-NH}_2 = \frac{(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco})}{(\text{Abs. padrão} - \text{Abs. branco})} \times 0,9516 \times V \times \frac{100}{(X \times P)}$$

Onde:

X= massa da amostra em g

P= % proteína total da amostra

V= volume da solução em L

II. 2 – Identificação do valor de h:

$$h = \frac{(\text{Serina} - \text{NH}_2 - \beta)}{\alpha}$$

Onde:

β para proteína de peixe = 0,4

α para proteína de peixe = 1

III. 3 – Determinação do GH:

$$\text{GH (\%)} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

Onde:

h = determinado anteriormente

h<sub>tot</sub> = proteína de peixe = 8,6

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram apresentados, em média, o desvio padrão. A análise de variância ANOVA, teste de Tukey ao nível de 5 % e análise de superfície de resposta foram realizados com o software STATISTIC 10 (Statsoft, Tulsa, USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DA MATÉRIA PRIMA UTILIZADA

Os resultados das análises físico-químicas, de matéria prima utilizada (*thunnus alalunga*) de pescado estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Análises físico-químicas da matéria prima coprodutos (*Thunnus alalunga*)

Análises	RESULTADOS (%) <sup>1</sup>
Umidade	72,83 ± 0,98
Cinzas	4,18 ± 0,02
Lipídeos	4,17 ± 0,21
Proteínas	14,64 ± 0,38

Fonte: Autor

<sup>1</sup> Os resultados são valores médios de três determinações ± desvio padrão.

Ovissipour et al. (2010), trabalhou com a otimização da reação em condições variáveis de (atividade enzimática, temperatura e tempo) para obter ótimo grau de hidrólise de resíduos viscerais de *T.albacares* usando Alcalase® 2.4 L, a composição físico-química da matéria apresentou 69,66 % de umidade; 4,46 % de cinzas; 21,5 % de proteína e 5,08 % de lipídeos. Esses resultados são semelhantes ao observado no presente trabalho, exceto para o teor de proteína onde foi observado um valor inferior ( 14,64%) comparado ao obtido pelos autores citados.

De acordo com Nguyen et al. (2010) coprodutos de atum apresentam na sua composição físico-química a variação de umidade (58-77%) e quantidade média de proteína (15-17%) diferindo principalmente em seu conteúdo de lipídios e cinzas. Ogawa e Maia (1999) citam que o músculo do pescado pode conter de 60 a 85 % de umidade, aproximadamente 20 % de proteína, de 1 a 2 % de cinzas, de 0,6 a 36 % de lipídios. Segundo esses autores, os percentuais da composição físico-química, variam de acordo com a espécie, época do ano, idade, sexo e estado nutricional do peixe, no qual se observa grande variação também nos resíduos incluindo nas vísceras.

## 5.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DO HIDROLISADO

Os resultados das análises físico-químicas de coprodutos de atum (*Thunnus alalunga*), e das onze tratamentos desenvolvidas de hidrolisado protéico de pescado estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Coproduto de atum (*Thunnus alalunga*) e das onze tratamentos de hidrolisado.

Amostras	Análises <sup>1</sup>			
	Umidade (%)	Proteína (%)	Lipídeo (%)	Cinza (%)
T-1	78,10 <sup>d</sup> ± 0,13	14,80 <sup>bcde</sup> ± 0,72	4,25 <sup>b</sup> ± 0,12	1,17 <sup>b</sup> ± 0,02
T-2	78,55 <sup>d</sup> ± 0,45	15,88 <sup>abc</sup> ± 0,74	3,73 <sup>b</sup> ± 0,13	1,23 <sup>b</sup> ± 0,07
T-3	78,48 <sup>d</sup> ± 0,22	14,96 <sup>bcde</sup> ± 0,54	4,12 <sup>b</sup> ± 0,29	1,23 <sup>b</sup> ± 0,12
T-4	78,49 <sup>d</sup> ± 0,45	14,79 <sup>bcde</sup> ± 0,61	4,15 <sup>b</sup> ± 0,10	1,27 <sup>b</sup> ± 0,08
T-5	76,95 <sup>e</sup> ± 0,11	16,50 <sup>ab</sup> ± 0,80	4,28 <sup>b</sup> ± 0,19	1,18 <sup>b</sup> ± 0,08
T-6	80,49 <sup>c</sup> ± 0,84	15,37 <sup>abcd</sup> ± 0,76	0,22 <sup>c</sup> ± 0,08	0,70 <sup>bc</sup> ± 0,17
T-7	82,65 <sup>b</sup> ± 0,07	14,14 <sup>cde</sup> ± 0,44	0,26 <sup>c</sup> ± 0,12	0,97 <sup>bc</sup> ± 0,04
T-8	81,09 <sup>c</sup> ± 0,29	16,89 <sup>a</sup> ± 0,87	0,28 <sup>c</sup> ± 0,01	1,14 <sup>b</sup> ± 0,02
T-9	84,39 <sup>a</sup> ± 0,04	13,48 <sup>ef</sup> ± 0,39	3,81 <sup>b</sup> ± 0,03	0,29 <sup>c</sup> ± 0,56
T-10	84,36 <sup>a</sup> ± 0,02	12,84 <sup>f</sup> ± 0,55	0,59 <sup>c</sup> ± 0,10	0,84 <sup>bc</sup> ± 0,01
T-11	78,89 <sup>d</sup> ± 0,14	13,71 <sup>def</sup> ± 0,21	5,60 <sup>a</sup> ± 0,60	1,40 <sup>b</sup> ± 0,05

Fonte: Autor

<sup>1</sup> Os resultados são valores médios de três determinações ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Oliveira et al. (2017) em seus estudos com extração de óleo via hidrólise enzimática de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) com o uso de alcalase, apresentou os seguintes resultados das análises físico-químicas do hidrolisado de atum: 71,57 % de umidade, 10,39 % de proteínas, 2,55 % de lipídeos e 7,93 % de cinzas, estes resultados são aproximados aos valores encontrados no presente estudo.

Avaliando os valores obtidos das análises físico-químicas, foi possível perceber que houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, com relação à proteína. Os tratamentos T5 e T8 apresentaram maior teor de proteína (tabela 4). Oetterer, Spoto e Darce (2006) observaram, em seus estudos, um alto teor de proteína de pescado (15 a 25 %), segundo os autores, essa quantidade de proteína torna o produto mais nutritivo.

Em relação aos valores de lipídeos, foram estaticamente semelhantes entre si as formulações: T6, T7, T8, T10 com menores valores (0,22 % - 0,59 %) (Tabela 4). Possivelmente pode ter ocorrido absorção de gordura resultando principalmente no aprisionamento físico do óleo, assim, uma maior densidade de proteína em massa equivale a uma maior absorção de gordura (TANUJA et al., 2012).

A T11 apresentou maior valor de lipídeos, indicando que possivelmente seria a tratamento adequado para extração de óleo. Oliveira et al. (2017) avaliando extração de óleo via hidrólise protéica de cabeça de atum (*Thunnus albacares*), demonstraram alto índice de ácido graxos nutricionalmente importantes como o eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA). A presença desses ácidos graxos no óleo de peixe, têm atraído a atenção da comunidade científica e industrial por seus benefícios comerciais (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

### 5.3 RENDIMENTO DO HIDROLISADO DE ATUM (*Thunnus alalunga*)

O rendimento dos onze tratamentos desenvolvidas encontra-se na Tabela 6 .

Tabela 6 - Percentual de rendimento do hidrolisado de atum (*Thunnus alalunga*), em função do tempo (minutos) e variações de concentração de enzimas.

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA	TEMPO (MIN)	RENDIMENTO (%)
1	1,00	360	71,96
2	0,20	120	74,55
3	1,00	120	72,45
4	0,60	70	68,37
5	0,60	240	71,73
6	1,17	240	69,42
7	0,20	360	76,64
8	0,60	410	52,47
9	0,60	240	68,93
10	0,60	240	69,42
11	0,03	240	70,16

Fonte: Autor

Após os experimentos foi caculado o rendimento entre as tratamento de concentrado protéico de coprodutos de atum (cabeças e vísceras) (*Thunnus alalunga*) de acordo

com a Equação 1, já descrita no item 4.3.1. Obteve-se o valor máximo de 76,64 % (Tratamento 7) e mínimo de 52,47 % (Tratamentos 5) (Tabela 5).

Após o hidrolisado de atum ser filtrado, são gerados resíduos, como ossos, que estavam presentes na matéria prima, antes do processo de hidrólise enzimática. A retirada desses ossos, na etapa de filtração do hidrolisado é necessária para facilitar a utilização do produto. Esses resíduos podem ser empregados na extração de colágeno com um alto rendimento (cerca de 36 % a 54 % de colágeno) (NAGAI; SUZUKI, 2000). Que pode ser usado como suplemento alimentar, aplicado para o equilíbrio de cálcio e fósforo.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

Os valores dos graus de hidrólise estão expressos na Tabela 7, apresentando suas variações entre as os tratamentos.

Tabela 7- Resultado do Grau de Hidrólise, dos 11 tratamentos de hidrolisado Protéico de Pescado

Tratamendo	Tempo (min)	Concentração. da enzima (%)	Grau de hidrolisado (%)
1	360	1	46,63
2	120	0,2	40,77
3	120	1	42,95
4	70	0,6	33,95
5	240	0,6	40,21
6	240	1,17	41,64
7	360	0,2	44,93
8	410	0,6	37,99
9	240	0,6	42,90
10	240	0,6	43,53
11	240	0,03	39,57

Fonte : Autor.

Após os experimentos verificou-se que o grau de hidrólise (GH) dos tratamentos desenvolvidos, apresentou o valor máximo de 46,63 % (T1) com uma concentração de enzima (1 %) e um período de 360 minutos (Tabela 6) e a mínima de 33,95 % (T4) com uma concentração de enzima (0,6 %) e tempo de 70 minutos.

Guérard et al. (2001), em seu estudo, trabalhou com o pescado (*Thunnus albacares*) e obteve um grau de hidrólise de 21 % com uma concentração 0,2 a 3 % de enzima Alcalase em um período de 6 horas, (com pH 8), valores inferiores ao observados no presente estudo, possivelmente pela diferença no valor de pH utilizado no presente estudo (pH 6). O grau de hidrólise (GH %), está associado com o número de ligações peptídicas clivadas, valores diferentes de grau de hidrólise podem ser observados, como resultado do pH, tempo de reação e proporção do substrato/enzima utilizado durante a hidrólise e a composição de aminoácidos da proteína, que pode fornecer diferentes quantidades de sítios de ação de clivagem da enzima (BATISTA, 2011).

Já Ovissipour et al. (2010) que também trabalhou com resíduos viscerais de *Thunnus albacares*, testando concentração de enzima Alcalase com variação de 10 a 100 % em um tempo de 1 hora com um pH de 8,5, identificou uma faixa de GH de 31 a 53,75 %, valores estes semelhantes ao encontrados no presente trabalho.

O Shimidt & Salas-Mellado (2009), mostra que o pescado com alto teor de lipídeos, quando submetidos à processos de hidrólise, apresentam baixos níveis de grau de hidrólise quando comparados com pescados caracterizados como magros. Enquanto Batista et al. (2010) definiu que um incremento na concentração de enzima, embora cause um aumento no GH, também resulta em uma de hidrólise reduzida.

## 5.5 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A influência de  $X_1$ , tempo de processo (em minutos),  $X_2$ , concentração de enzima alcalase, no processo de hidrólise para determinar  $Y$  (GH) utilizando o desenho fatorial foi avaliado através da metodologia de superfície de resposta no software STATISTIC. Este resultado gerou uma melhor equação do modelo explicativo para o valor  $Y$  (GH) e buscou um ajuste ao modelo matemático quadrático e linear, obtido a partir de dados codificados de hidrólise de Alcalase, esse modelo é descrito na Equação 3 abaixo.

$$\text{Equação 3: } Y = 34,51 + 0,088 * x - 0,00015 * x^2 - 14,083 * y + 11,452 * y^2 - 0,00259 * x * y + 0$$

Onde  $Y$  é o grau de hidrolisado (%), ou seja, a resposta prevista em valor real,  $x_1$  é o valor codificado da variável Tempo (min) e  $x_2$  o valor codificado da variável concentração da enzima (%). A Tabela 6 mostra o resultado do teste da ANOVA para a resposta de grau de hidrólise (%) em relação a variável  $x_1$  e  $x_2$ .

Tabela 8 - ANOVA; Var. Grau de Hidrólise (GH  $R^2 =$ , 57218; Adj., 03741 (Folha de cálculo1) 2 fatores, 1 bloco, 10 corridas; MS Pure Error = 3,101741 DV: Grau de Hidrólise (GH)

Fator	SS	df	MS	F	p
<b>(1) Tempo (min) (L)</b>	20,3993	1	20,39934	6,576738	<b>0,124322</b>
Tempo (min) (Q)	25,2111	1	25,21110	8,128049	<b>0,104160</b>
<b>(2) Concentração. de enzima (%) (L)</b>	0,8997	1	0,89967	0,290052	<b>0,644110</b>
Concentração de enzima (%) (Q)	12,5627	1	12,56270	4,050209	<b>0,181811</b>
<b>1L by 2L</b>	0,0572	1	0,05717	0,018431	<b>0,904443</b>
<b>Falta de ajuste</b>	44,1401	2	22,07006	7,115379	<b>0,123223</b>
<b>Erro puro</b>	6,2035	2	3,10174		
<b>Total SS</b>	117,6756	9			

Fonte: Autor.

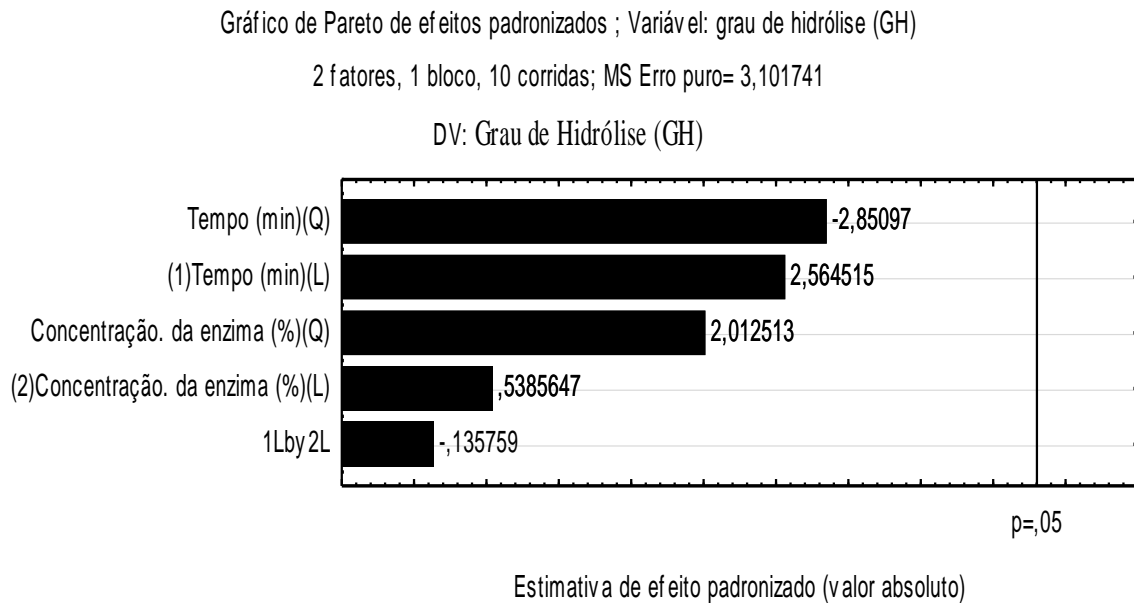
Foi possível notar que para a região abrangida pelo estudo de acordo com os níveis de observação, os fatores não foram relevantes e não tiveram influência significativa, visto que o valor de falta de ajuste  $p$  foi acima de 5%, conforme Tabela 6.

Quanto mais próximo a 1 for o valor de  $r^2$  para unidade, melhor os modelos empíricos se encaixam nos dados reais. De acordo com a ANOVA relacionada na Tabela 6, o coeficiente de regressão da GH neste estudo ( $r^2 = 0,57218$ ) foi insatisfatório, uma vez que para ser um resultado satisfatório o  $p$  tende a ser abaixo de 5% e o valor de  $r^2$  mais próximo de 1. Por outro lado, quanto menor o valor de  $r^2$ , menor será a relevância que as variáveis dependentes do modelo têm para explicar o comportamento das variações (LITTLE & HILLS, 1978).

O diagrama de Pareto (Figura 2) pode ser uma forma rápida e clara de apresentar o efeitos estatísticos importantes. O efeito cuja Figura do retângulo estiver a direita da linha divisória ( $p=0,5$ ) devem ser considerados no modelo matemático. Portanto, aquela equação não pode ser utilizada como modelo, por que não foi significativo.



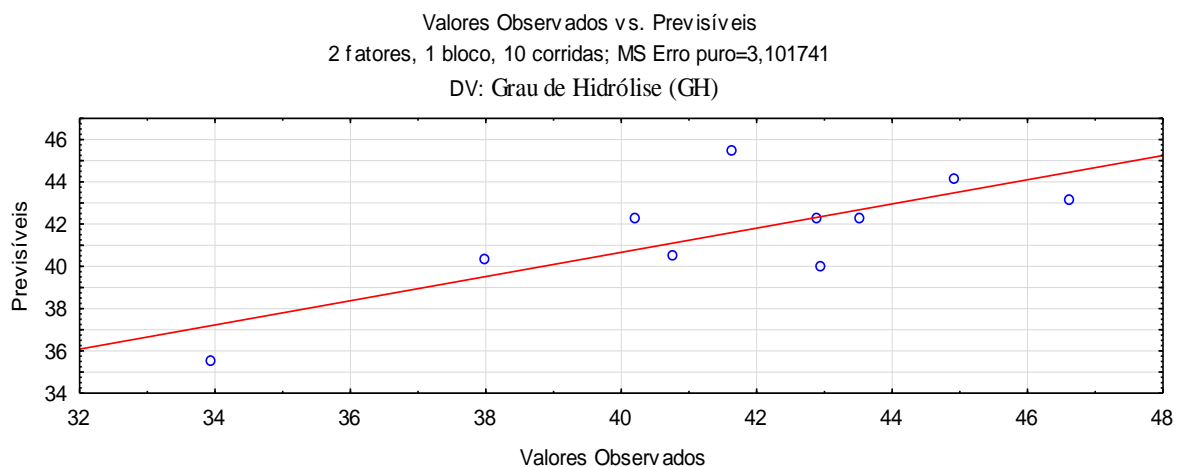
Então o diagrama de Pareto mostra que as variáveis tempo e concentração de enzima, não foram significativas para o modelo matemático.



Fonte: Autor

Figura 2 - Gráfico de Pareto em função dos valores estatístico de teste T.

A Figura 3 mostra a comparação entre os valores observados para o grau de hidrólise ( $Y_0$ ) com os valores previstos ( $Y$ ). Além disso, o coeficiente ( $r^2 = 0,57218$ ) revela uma descrição matemática insatisfatória do processo para o modelo de grau de hidrólise.

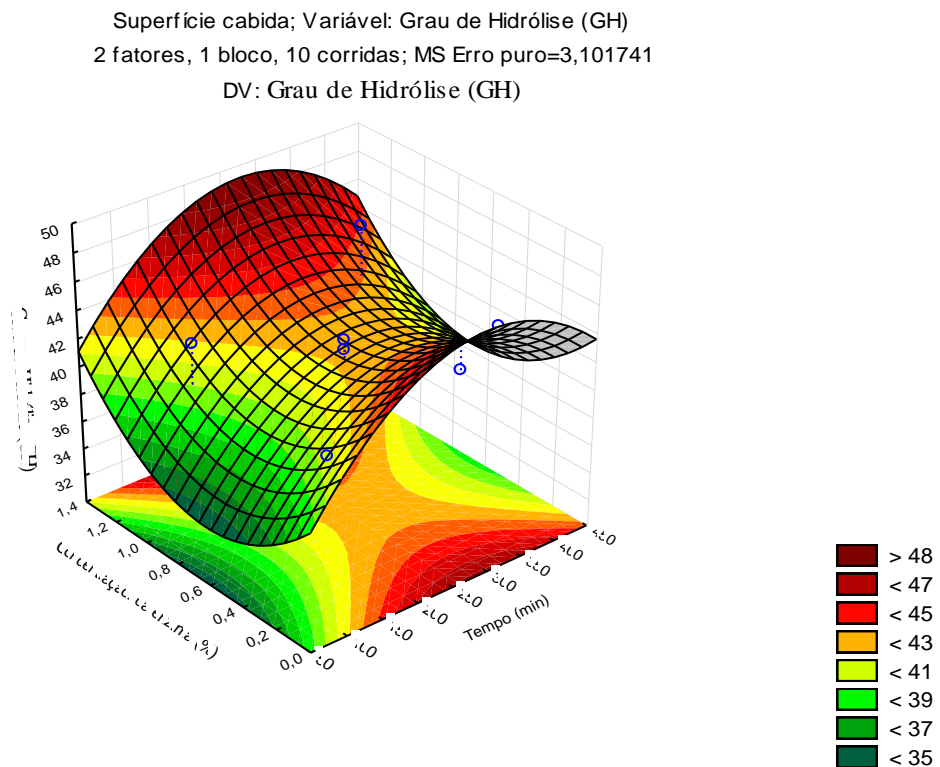


Fonte: Autor.

Figura 3 - Relação entre os valores observados e previstos do grau de hidrólise.

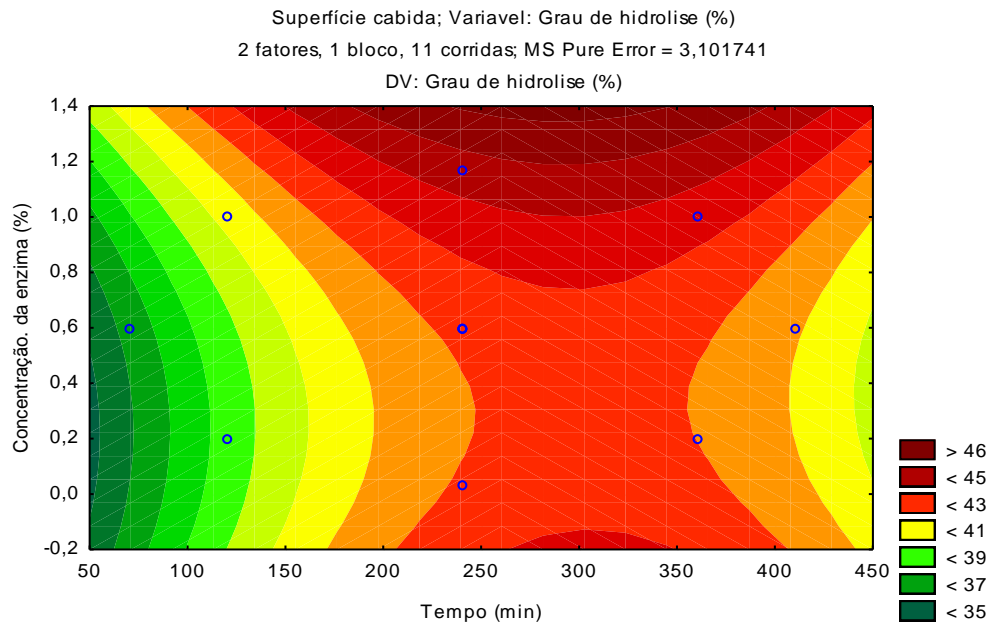
O gráfico de superfície de resposta (Figura 4 e 5) foi gerado pelo modelo preditivo para prever os pontos críticos e a influência de cada fator. Os efeitos combinados de cada par de variáveis indicam que, na hidrólise da proteína do atum (*Thunnus alalunga*), um aumento do GH é alcançado por concentração da enzima (%) e tempo de reação, onde a cor vermelha no gráfico de superfície de resposta (Figura 4 e 5) apresenta a região em que se alcança o maior grau de hidrólise.

Por tanto, avaliando o gráfico 4 e 5, verifica-se que é possível obter o mesmo percentual de GH com menores valores de tempo e concentração de enzima, tornando o processo mais econômico, o que pode sugerir que em novos estudos sejam avaliados outros parâmetros, como o perfil de aminoácidos, a fim de buscar a otimização em fim este processo este modelo não e possível de otimizar.



Fonte: Autor.

Figura 4 - Gráficos de superfície de resposta grau de Hidrólise em três eixos.



Fonte: Autor

Figura 5 - Gráficos de superfície de resposta grau de Hidrólise em dois eixos.

Foi observada, nos estudos de Bhaskar et al. (2008) e Nilsang et al. (2005), dependência semelhante, entre a atividade enzimática, a temperatura e o tempo de reação, para as reações hidrolíticas de proteínas alimentares utilizando enzimas de origem microbiana.

## 6 CONCLUSÃO

O coproduto de atum (*Thunnus alalunga*), de acordo com os dados observados na sua composição físico-química, apresenta-se como uma matéria prima viável para o desenvolvimento de hidrolisado proteico.

Foi possível utilizar a alcalase para a produção de tratamento de hidrolisado protéico a partir de coproduto de (*Thunnus alalunga*) de acordo com a composição físico-química, que apresentou tratamentos com alto teor proteico ( T-5 e T-8) e tratamentos com teor considerável de lipídeos (T -11). Quanto ao grau de hidrólise dos tratamentos desenvolvidos, esses apresentaram altos valores de GH (Colocar aqui a variação de GH ). Demonstrando que essa técnica, provavelmente, pode ser utilizada como uma forma de melhor aproveitamento dos coprodutos gerados pela indústria pesqueira.

Contudo, o modelo matemático proposto, apresentou-se inviável devido ao coeficiente de determinação ser muito baixo. A sugestão para trabalhos futuros é que seja desenvolvido outra posposta, com outro modelo, testando novas variáveis ou alterando os valores máximos e mínimos determinados, uma vez que no presente trabalho houve uma grande dispersão entre os valores obtidos. E também avaliar novos parâmetros de resposta de qualidade do hidrolisado, como o perfil de aminoácidos, a fim de buscar a otimização do processo.

## 7 REFERÊNCIAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of aoac international. 18. Ed. Revision 3. Gaithersburg, 2010.

ARASON, Sigurjon. Advances in Seafood Byproducts: 2002 Conference Proceedings. **Alaska Sea Grant College Program**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.46-66, 2003. Alaska Sea Grant, University of Alaska Fairbanks.

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

BATISTA, I. et al. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.18-24, jan. 2010. E. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1359511309002451>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

BATISTA, I. IN GONÇALVES, A. A. 2011. Hidrolisado proteico de pescado. Tecnologia do pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação. São Paulo.

BATISTA, Irineu; PIRES, Carla. **Estudo de viabilidade da produção de hidrolisados proteicos de pescado**. Lisboa: Instituto Português do Mar e da Atmosfera, 2014. Color. Disponível em:

<[https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/relatorios/pescas.mar/Estudo\\_viabilidade\\_producao\\_hidrolizados\\_proteicos\\_pescado\\_Projeto\\_SECUREFISH\\_Irienu\\_Batista.pdf](https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/relatorios/pescas.mar/Estudo_viabilidade_producao_hidrolizados_proteicos_pescado_Projeto_SECUREFISH_Irienu_Batista.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2017.

BHASKAR, N. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.335-343, jan. 2008. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0960852407000053>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.911-917, jan. 1959. Disponível em:

<<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/y59-099#.Wk4sL2inG70>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

BOSCOLO, W. R, FEIDEN, A. **Industrialização de Tilápias**. Toledo: GFM, 2007. p.270  
BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2012.

BRASIL. **Política Nacional de Resíduos Sólidos; Altera A Lei no 9.605, de 12 de Fevereiro de 1998; e Dá Outras Providências**. Brasília, DF: O Diário Oficial da União.

CHALAMAIAH, M. et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 135, n. 4, p.3020-3038, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814612010990>>. Acesso em: 5 jun. 2017

CHURCH, Frank C. et al. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 66, n. 6, p.1219-1227, jun. 1983. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(83\)81926-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(83)81926-2). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0022030283819262>>. Acesso em: 05 jul. 2017.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W. R.; PACHECO, M. T. B.; SILVA, V. S. N. D.; GONÇALVES, G. S.; VIDOTTI, R. M. Development and Characterization of Protein Hydrolysates Originated from Animal Agro Industrial Byproducts. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v.1, n.2, p.1-7, 2014.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2327–2332, 2006.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014: Opportunities and Challenges**, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, 2014.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Opportunities and Challenges**, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, 2016.

FAO. **Departamento de Pesca e Aquicultura da FAO: Recursos. Características biológicas do atum.** 2010. Michel Goujon e Jacek Majkowski. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

FAO. **Oleções estatísticas de pesca Global Tuna Catches by Stock.** 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/tuna-catches/en>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

FAO. **Species Fact Sheets Thunnus obesus (Lowe, 1839).** 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/2498/en>>. Acesso em: 03 maio 2017

FIEDLER, Fernando N. et al. Spatio-temporal distribution and target species of longline fisheries off Southeastern/Southern Brazil between 2000 and 2011. **Brazilian Journal Of Oceanography**, [s.l.], v. 63, n. 4, p.407-422, dez. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-87592015000400407&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-87592015000400407&script=sci_arttext)>. Acesso em: 10 out. 2017

GALVANI, Fábio; GAERTNER, Eliney. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. **Circular Técnica**, 63, Corumbá, v. 1, n. 1, p.1-9, maio 2006.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação.** São Paulo : Atheneu, 2011

GUERARD F, GUIMAS L, BINET A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 19, n.20, P.489-98, 2002.

GUÉRARD, F et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 11, n. 4-6, p.1051-1059, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S138111770000031X>>. Acesso em: 04 ago. 2017.

HALIM, N.r.a.; YUSOF, H.m.; SARBON, N.m.. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 51, p.24-33, maio 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0924224415300029>>. Acesso em: 24 ago. 2017.

HAN, Yuna et al. Bioactive properties of enzymatic hydrolysates from abdominal skin gelatin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **International Journal Of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 50, n. 9, p.1996-2003, 20 jul. 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/ijfs.12890/full>>. Acesso em: 9 out. 2017.

HAZIN, F. H. V.; TRAVASSOS, P. E. A pesca oceânica no Brasil no século 21. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, n. 1, p. 60-75, 2007.

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

HERPANDI, N. Huda; ROSMA, A.; NADIAH, W.a. Wan. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.195-207, 14 jun. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1541-4337.2011.00155.x/full>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

KATO, S.; KUNISAWA, N.; KOJIMA, T.; MURAKAMI, S. Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 37, p. 863–870, 2004.

KUMAR, Majeti N.v Ravi. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive And Functional Polymers**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.1-27, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1381514800000389>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

KRISTINSSON, Hordur G.; RASCO, Barbara A.. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.657-666, mar. 2000. Disponível em: <<http://pubs-acsc-org.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/jf990447v>>. Acesso em: 04 out. 2017.

MARTINS, Vilásia Guimarães; COSTA, Jorge Alberto Vieira; PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e

enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.61-66, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 8 out. 2017.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, Oscar; CHAMORRO, Susana; BRENES, Agustín. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, [s.l.], v. 73, p.204-212, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0963996915001568>>. Acesso em: 12 set. 2017.

MARTINS, A. S.; DOXSEY, J. R. 2004. Diagnóstico da Pesca no Estado do Espírito Santo. Vitória: Institutos do Milênio – RECOS. 41 p. <<http://www.safraes.com.br/site/conteudo.asp?codigo=80>>. Acesso em: 13 set. 2017.

NAGAI, T. Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 3, p.277-281, 15 fev. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814699001880>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

NAGAI, Takeshi; IZUMI, Masami; ISHII, Masahide. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **International Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.239-244, mar. 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1365-2621.2004.00777.x/full>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

NAGAI, Takeshi; SUZUKI, Nobutaka. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SEVERAL FISH BONE COLLAGENS. **Journal Of Food Biochemistry**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.427-436, out. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1745-4514.2000.tb00711.x/full>>. Acesso em: 10 set. 2017.

NAZIR, Novizar; DIANA, Ayu; SAYUTI, Kesuma. Physicochemical and Fatty Acid Profile of Fish Oil from Head of Tuna (*Thunnus albacares*) Extracted from Various Extraction Method. **International Journal On Advanced Science, Engineering And Information Technology**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.709-715, 21 abr. 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/316359761\\_Physicochemical\\_and\\_Fatty\\_Acid\\_Profile\\_of\\_Fish\\_Oil\\_from\\_Head\\_of\\_Tuna\\_Thunnus\\_albacares\\_Extracted\\_from\\_Various\\_Extraction\\_Method](https://www.researchgate.net/publication/316359761_Physicochemical_and_Fatty_Acid_Profile_of_Fish_Oil_from_Head_of_Tuna_Thunnus_albacares_Extracted_from_Various_Extraction_Method)>. Acesso em: 22 jun. 2017.

NGUYEN, Huong Thi My et al. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. **Food Technol. Biotechnol.** Castanet-tolosan, p. 48-55. jul. 2010. Disponível em: <[http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=98070](http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=98070)>. Acesso em: 10 set. 2017.

NIELSEN, P.m.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C.. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Journal Of Food Science**, [s.l.], v. 66, n. 5,



p.642-646, jun. 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x/full>>. Acesso em: 4 jun. 2017.

NILSANG, Suthasinee et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal Of Food Engineering**, [s.l.], v. 70, n. 4, p.571-578, out. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0260877404005072>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

NORMAH, I. et al. OPTIMIZATION OF HYDROLYSIS CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF THREADFIN BREEM (NEMIPTERUS JAPONICUS) HYDROLYSATE BY ALCALASE. **Journal Of Muscle Foods**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.87-102, abr. 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1745-4573.2005.07404.x/full>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 119-134, 1994.

OETTERER, M. **Produtos Obtidos por Interferência na Fração Proteica do Pescado**. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OETTERER, Marília; SPOTO, Marta Helena Fillet; D'ARCE, Marisa Aparecida Bismara Regitano. **Fundamentos de Ciencia E Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole Ltda, 2006.

OGAWA MASAYOSHI, EVERARDO LIMA MAIA. **Manual de pesca**. São Paulo (SP): Livraria Varela. 1999.

OLIVEIRA, Mari Silvia Rodrigues de et al. Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.199-210, set. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.4414>. Disponível em: <<https://search-proquest.ez120.periodicos.capes.gov.br/docview/1754110051?pq-origsite=gscholar>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

OLIVEIRA, Dayse A. S. B. de et al. Enzymatic extraction of oil from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products: a comparison with other extraction methods. **International Journal Of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.699-705, 7 jan. 2017. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/ijfs.13324/full>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

OVISSIPOUR, Mahmoudreza et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). **Food And Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.696-705, 20 maio 2010. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez120.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11947-010-0357-x>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

PEARCE, KEVIN N. ; KINSELLA, JOHN E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 05/2017, Vol.26(3), pp.716-723 Disponível em: < <http://pubs-acsc-org.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1021/jf60217a041>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

SACHINDRA, N.m.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.s.. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.1092-1098, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956053X05001741>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

SCHMIDT, Cristiano Gautério; SALAS-MELLADO, Myriam. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.1144-1150, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000500012](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000500012)>. Acesso em: 4 jul. 2017.

SHAHIDI, F.; METUSALACH, G.; BROWN, J. A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, p. 1–67, 1998.

SHIRAHIGUE, Ligianne Din et al. The Feasibility of Increasing Lipid Extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)Waste by Proteolysis. **Journal Of Aquatic Food Product Technology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.265-271, 5 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2013.845276>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

STONE, Robert. **A BUSINESS MANUAL ON VALUE ADDED PRODUCTS FROM TUNA AND TUNA BY-CATCH**: Development of Tuna Fisheries in the Pacific ACP Countries (DEVFISH) Project. Bruxelas: Processing Of Fishery Products, 2007.

TAVARES, J. F. P.; BAPTISTA, J. A. B.; MARCONE, M. F. Milkcoagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. **International Journal of Food Science and Nutrition**,v. 48, p. 169–176, 1997.

T.M. LITTLE, F.J. HILLS. **Agricultural experimentation design and analysis** John Wiley, New York (1978) p. 170.

TANUJA, S et al. Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Egyptian Journal Of Biology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.27-35, 9 jul. 2012. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ejb/article/view/78593>>. Acesso em: 19 set. 2017.

VIEGAS, E. M. M. **Elaboração e caracterização de hidrolisados protéicos de peixe e sua utilização na nutrição de organismos aquáticos**.Jaboticabal: UNESP, 2000. Disponível em: < <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/14681/elaboracao-e-caracterizacao-de-hidrolisados-proteicos-de-peixe-e-sua-utilizacao-na-nutricao-de-organ/>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

**VILA DOS PESCADORES, O SUSTENTO QUE VEM DO MAR.** Guaçu: Safra, 2013. Disponível em: <<http://www.safraes.com.br/site/conteudo.asp?codigo=80>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

VILLAMIL, Oscar; VÁQUIRO, Henry; SOLANILLA, José F.. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 224, p.160-171, jun. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814616320830>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

WHEATON, F. W.; LAWSON, T. B. 1985. In: Processing Aquatic Food Products. Nova York: A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons.

YOON, Gun Ae et al. Effects of tuna bone and herbal extract on bone metabolism in ovariectomized rats. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.1013-1019, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0271531705001508>>. Acesso em: 26 out. 2017.

ZHANG, Nong; YAMASHITA, Yasumitsu; NOZAKI, Yukinori. Effect of protein hydrolysate from Antarctic krill meat on the state of water and denaturation by dehydration of lizard fish myofibrils. **Fisheries Science**, [s.l.], v. 68, n. 3, p.672-679, jun. 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez120.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1046/j.1444-2906.2002.00476.x/full>>. Acesso em: 27 nov. 2017.