

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FÍGADO SUÍNO E
CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS BIOATIVIDADES
FORMADAS**

JOSÉ UEBI MALUF

TOLEDO – PR - BRASIL

Abril de 2020

JOSÉ UEBI MALUF

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FÍGADO SUÍNO E
CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS BIOATIVIDADES
FORMADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em **Processos Químicos e Bioquímicos**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lady Fiorese

TOLEDO – PR - BRASIL

Abril de 2020

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Abib, *in memoriam* e Geni pelo presente do milagre da vida, pelo carinho e apoio sempre, pelos ensinamentos de dedicação pelo que fazemos, superação das dificuldades e por terem sempre nos mostrado a importância de sermos eternos aprendizes e construir o futuro sem esquecer de viver o presente. Além da sempre gratidão e respeito às pessoas.

À minha esposa Márcia, pelo apoio desde o início deste trabalho, quando ainda era uma ideia. Graças a dedicação e contribuição no projeto, tornou-se tudo possível.

Às minhas filhas, Rafaela e Fernanda, pela confiança e apoio. Cada sorriso sempre é um incentivo para seguir em frente.

Aos meus sogros, Célia e José por toda torcida e alegrias compartilhadas durante todo o processo de formação.

Aos meus irmãos, Antônio, Salete, Jorge, Alexandre e Luiz, pelo apoio, confiança e alegria em cada conquista alcançada no decorrer de todo trabalho.

À professora Mônica Lady Fiorese, por todo empenho, ensinamentos, dedicação, orientação, companheirismo, paciência e compreensão.

Ao professor Carlos Eduardo Borba, por acreditar neste trabalho e pela orientação nos caminhos seguidos.

À Fernanda Rengel e Keiti Maestre, uma valorosa e competente equipe no apoio, pela ajuda e contribuição, meu reconhecimento pelo trabalho realizado.

Ao pessoal da BRF, Maria Joana, Silvana, Mariana, Thais, Luísa, pelo incentivo, confiança e por sempre estarem disponíveis para ajudar quando havia alguma demanda - que foram muitas.

Ao prof. Wilson Boscolo, grande conhecedor do tema, pelas contribuições, amizade e apoio, os quais foram valiosos.

Ao prof. Edson Silva, pelos comentários e cooperações que enriqueceram o trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Juliana Veit, Prof. Fabiano Scheufele. Muito obrigado pelas sugestões para o desenvolvimento da redação final do trabalho.

Aos professores do Depto. de Eng. Química da Unioeste de Toledo, que tornaram possível a realização deste curso de alto nível na nossa cidade. É uma conquista de todos adquirida pela competência e dedicação.

Aos professores Aldi Feiden, Fábio Bittencurt e Altevir Signor, pelo apoio e disponibilidade das instalações do GEMAQ para a realizações do processo de hidrólise.

Aos colegas que contribuíram ao longo do curso em diversas atividades, havendo sempre a oportunidade de aprender e aprimorar minhas entregas.

A Camila Marques pelo apoio na revisão, Joana Finkler e Jéssica pela força nas análises laboratoriais.

Ao prof. Ruann da Unicamp, pela inspiração e dicas inestimáveis em diversos temas relacionados ao trabalho.

Ao prof. Marco Aurélio da UEM, pelos comentários e apoio nas análises.

À prof. Graciette Matioli da UEM, pelo incentivo, confiança, respeito e consideração.

A Prof. Cristiane Canan da UTFPR – Medianeira pelo auxilia nas análises de funcionalidade.

A todos aqueles que em algum momento me auxiliaram, meu muito obrigado.

À BRF um agradecimento especial por apoiar a realização deste trabalho, uma vez que seu apoio faz a diferença na construção do conhecimento, além de exercer sua função social e empresarial ao se engajar na construção de parcerias e ao apresentar um diferencial competitivo através da inovação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
NOMENCLATURA	xii
RESUMO	13
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	18
1.2 Objetivos da pesquisa.....	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Mercado mundial da carne suína	21
2.2 Proteínas	23
2.3 Classificação das proteínas.....	24
2.4 Qualidade nutricional das proteínas	25
2.5 Proteínas da carne suína.....	26
2.6 Fígado suíno.....	26
2.6.1. Composição química e sua utilização	26
2.7 Coprodutos agroindustriais	29
2.8 Hidrolisado proteico	31
2.9 Enzimas	33
2.9.1 Enzimas proteolíticas/proteases.....	34
2.9.2 Aplicações de enzimas.....	40
2.10 Processo de Hidrólise enzimática	43
2.11 Aplicações dos hidrolisados proteicos	44
2.11.1 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos	44
2.11.2 Propriedade bioativas dos hidrolisados proteicos	47

2.12 Usos comerciais de alguns produtos obtidos através de hidrólise enzimática	51
2.13 Estado da arte	54
2.14 Justificativa da pesquisa	59
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1 Matéria-prima	61
3.2 Enzimas	61
3.3 Caracterização da matéria-prima e dos hidrolisados proteicos	62
3.3.1 Determinação de teor de proteína total	62
3.3.2 Determinação da umidade	63
3.3.3 Determinação de matéria mineral	63
3.3.4 Determinação de lipídeos	64
3.3.5 Determinação de vitaminas do fígado suíno <i>in natura</i> e dos hidrolisados proteicos.	64
3.3.5.1 Vitamina A (retinol)	64
3.3.5.2 Vitamina B1 (tiamina)	65
3.3.5.3 Vitamina B2 (riboflavina)	65
3.3.5.4 Vitamina B9 (folato)	65
3.3.5.5 Vitamina B12	65
3.3.5.6 Vitamina B5	66
3.3.5.7 Vitamina B8 (biotina)	66
3.3.5.8 Vitamina B3 (niacina)	66
3.3.6 Composição elementar química	67
3.4 Processo de obtenção do hidrolisado proteico de fígado suíno	68
3.4.1 Condições experimentais propostas no planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	68
3.4.2 Ensaio para otimização do processo de hidrólise	70
3.4.3 Fluxograma da hidrólise do fígado suíno	71
3.4.4 Cinética enzimática do hidrolisado de fígado suíno	73
3.4.5 Determinação do grau de hidrólise (GH)	73

3.5 Liofilização	74
3.6 Determinações analíticas para quantificação dos produtos formados durante a cinética enzimática	74
3.6.1 Determinação de aminoácidos por HPLC	74
3.6.2 Metodologia para determinação do aminoácido triptofano por espectrofotometria.....	75
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e mercaptoetanol	76
3.8 Determinação das propriedades funcionais do hidrolisado proteico de fígado suíno	77
3.8.1 Capacidade de absorção de água e óleo	77
3.8.2 Capacidade de formação e estabilidade de emulsão.....	77
3.8.3 Capacidade de formação e estabilidade de espuma	78
3.8.4 Análise do comportamento reológico	79
3.9 Análise estatística dos planejamentos experimentais	79
3.10 Distribuição da massa molecular.....	80
3.11 Determinação de atividades biológicas.....	80
3.11.1 Propriedades antioxidantes	81
3.11.1.1 Capacidade de redução de radicais DPPH	81
3.11.1.2 Capacidade sequestrante do radical ABTS	81
3.11.1.3 Poder redutor do íon ferro (FRAP)	81
3.11.2 Propriedades anti-hipertensivas.....	82
3.11.3 Propriedades antidiabéticas	83
3.11.3 Análise estatística	84
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1 Caracterização química elementar, de vitaminas e aminoácidos do fígado suíno <i>in natura</i>	85
4.2 Desenvolvimento dos hidrolisados proteicos de fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®.....	91

4.2.2 Máxima resposta do Grau de hidrólise (GH) para o fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®.....	98
4.2.3 Cinética da hidrólise enzimática para o fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®.....	100
4.2.4 Caracterização química elementar, de vitaminas e aminoácidos do hidrolisado proteico oriundo de fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®	102
4.3 Desenvolvimento dos hidrolisados proteicos de fígado suíno com enzima NovoPro-D®	105
4.3.1 Grau de hidrólise (GH) para o fígado suíno com enzima NovoPro-D®.....	105
4.3.2 Máxima resposta do Grau de hidrólise (GH) para o fígado suíno com enzima NovoPro-D®	111
4.3.3 Cinética da hidrólise enzimática para o fígado suíno com enzima NovoPro-D®	113
4.3.4 Caracterização química elementar, de vitaminas e aminoácidos do hidrolisado proteico oriundo de fígado suíno com enzima NovoPro-D®.....	115
4.4 Potencial para aplicação dos hidrolisados proteicos	117
4.4.1 Eletroforese	117
4.4.2 Propriedades funcionais dos hidrolisados de fígado suíno	119
4.4.3 Comportamento reológico	122
4.4.5 Distribuição da massa molecular dos peptídeos dos hidrolisados de fígado suíno	125
4.4.6 Determinação de atividades biológicas formadas nos hidrolisados de fígado suíno	128
4.4.6.1 Atividade anti-hipertensiva.....	128
4.4.6.2 Atividade antioxidante	131
4.4.6.3 Atividade antidiabética	133
4.5 Considerações finais e potencial de aplicação do hidrolisado de fígado suíno.....	135
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	138
CAPÍTULO 6 – DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS	140

CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
ANEXOS	169
ANEXO A.....	170

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Consumo de carne suína mundial (ranking 2016).....	22
Figura 2.2 - Produção de carne suína mundial (ranking 2016).....	22
Figura 2.3 - Estrutura geral de um aminoácido.....	24
Figura 2.4 – Aplicação dos coprodutos alimentares.....	30
Figura 2.5 – Classificação de enzimas proteolíticas.....	36
Figura 2.6 – Proteínas para obter hidrolisados proteicos partir do uso de enzimas	37
Figura 2.7 – Peptídeos bioativos obtidos a partir de coprodutos industriais.....	47
Figura 2.8 - Principais vias de obtenção de peptídeos e ensaios de bioatividade...	51
Figura 3.1 - Fluxograma de obtenção e caracterização do hidrolisado proteico de fígado suíno.....	60
Figura 3.2 - Reator utilizado na hidrólise enzimática de fígado suíno.....	73
Figura 4.1 - Fígado suíno <i>in natura</i>	86
Figura 4.2 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima Alcalase 2.4 L® ao nível de significância de 95%	93
Figura 4.3 - Resultado estatístico do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática do fígado suíno para a enzima Alcalase 2.4 L® – (a) resíduos em função dos valores preditos e (b) valores preditos por valores observados.....	95
Figura 4.4 - Superfície de resposta para o grau de hidrólise do fígado suíno para a enzima Alcalase 2.4 L®.....	96
Figura 4.5 - Hidrolisado proteico de fígado suíno a partir da enzima Alcalase 2.4 L®	98
Figura 4.6 - Grau de hidrólise com a enzima Alcalase 2.4 L® fixando proteína:água e variando enzima:proteína em expresso em porcentagem (%).....	99
Figura 4.7 - Grau de hidrólise com a enzima Alcalase 2.4 L® fixando enzima:proteína e variando proteína:água em expresso em porcentagem (%)....	100
Figura 4.8 Grau de hidrólise obtido com a variação da relação proteína:água com a enzima Alcalase 2.4 L®.....	101

Figura 4.9 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima NovoPro-D® ao nível de significância de 95%.....	106
Figura 4.10 - Resultado estatístico do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática do fígado suíno para a enzima NovoPro-D® – (a) resíduos em função dos valores preditos e (b) valores preditos por valores observados.....	109
Figura 4.11 - Superfície de resposta para o grau de hidrólise do fígado suíno para a enzima NovoPro-D®.....	110
Figura 4.12 - Hidrolisado proteico de fígado suíno a partir da enzima NovoPro-D®	111
Figura 4.13 - Grau de hidrólise com a enzima NovoPro-D® fixando proteína:água e variando enzima:proteína em expresso em porcentagem (%).....	112
Figura 4.14 - Grau de hidrólise com a enzima NovoPro-D® fixando enzima:proteína e variando proteína:água em expresso em porcentagem (%).....	113
Figura 4.15 - Grau de hidrólise obtido com a variação da relação proteína:água com a enzima NovoPro-D®.....	114
Figura 4.16 - Distribuição de peso molecular, faixa 1: controle, faixa 2: NovoPro-D® em 1 h, faixa 3: NovoPro-D® em 4 h, faixa 4: Alcalase 2.4 L® em 1 h e faixa 5: Alcalase 2.4 L® em 4 h.....	118
Figura 4.17 – Reograma da viscosidade vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C.....	122
Figura 4.18 – Reograma da viscosidade vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C.....	123
Figura 4.19 – Reograma da tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C.....	124

Figura 4.20 – Reograma da tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C.....124

Figura 4.21 – Distribuição da massa molecular dos peptídeos do hidrolisado proteico de fígado suíno com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h, respectivamente.....127

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação nutricional dos aminoácidos.....	25
Tabela 2.2 - Composição química do fígado suíno por 100 g de amostra.....	27
Tabela 2.3 – Classificação das enzimas.....	34
Tabela 2.4 – Proteases comerciais e suas características de ação.....	37
Tabela 2.5 – Estudos para aplicação de proteases na obtenção de peptídeos com atividade biológica a partir de diferentes fontes de proteína.....	39
Tabela 2.6 - Uso comercial de diversos produtos obtidos através de hidrólise enzimática utilizadas em alimentação humana e animal.....	53
Tabela 2.7 - Estudos sobre hidrolisados proteicos realizados nos últimos dez anos.....	55
Tabela 3.1 - Resumo das características das enzimas utilizadas no desenvolvimento dos hidrolisados de fígado suíno.....	62
Tabela 3.2 - Níveis e valores reais das variáveis admitidas no planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) com 4 pontos axiais para as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®.....	69
Tabela 3.3 - Matriz do planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) com 4 pontos axiais para as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, com valores reais e codificados para suas variáveis.....	69
Tabela 3.4 - Condições experimentais utilizadas para otimização da relação proteína:água e enzima:substrato.....	71
Tabela 4.1 - Composição química percentual para o fígado suíno <i>in natura</i> e valores obtidos em trabalhos reportados na literatura.....	86
Tabela 4.2 - Conteúdo de vitaminas ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$; $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) de fígado suíno <i>in natura</i>	88
Tabela 4.3 - Conteúdo de minerais presentes no fígado suíno <i>in natura</i>	88
Tabela 4.4 - Composição média de aminoácidos (%) identificado no fígado suíno <i>in natura</i>	90
Tabela 4.5 - Recomendação nutricional diária de aminoácidos para adultos mg kg^{-1}	91

Tabela 4.6 - Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais das variáveis analisadas e a resposta para a hidrólise enzimática com enzima Alcalase 2.4 L® em 1 hora.....	92
Tabela 4.7 - Estimativa dos efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima Alcalase 2.4 L®.....	93
Tabela 4.8 - Análise de variância (ANOVA) para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima Alcalase 2.4 L®.....	94
Tabela 4.9 - Grau de hidrólise do fígado suíno utilizando a Alcalase 2.4 L® e dispostos na literatura.....	97
Tabela 4.10 - Composição química percentual para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®.....	102
Tabela 4.11 - Conteúdo de vitaminas (mg 100g ⁻¹) para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®.....	102
Tabela 4.12 - Conteúdo de minerais para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®.....	103
Tabela 4.13 - Composição média de aminoácidos para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®.....	103
Tabela 4.14 - Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais das variáveis analisadas e a resposta para a hidrólise enzimática com enzima NovoPro-D® em 1 hora.....	105
Tabela 4.15 - Estimativa dos efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima NovoPro-D®.....	106
Tabela 4.16 - Análise de variância (ANOVA) para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima NovoPro-D®.....	107
Tabela 4.17 - Grau de hidrólise do fígado suíno utilizando a NovoPro-D® e reportados na literatura.....	110
Tabela 4.18 - Composição química percentual para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®.....	115
Tabela 4.19 - Conteúdo de vitaminas (mg 100g ⁻¹) para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®.....	115

Tabela 4.20 - Conteúdo de minerais para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®.....	116
Tabela 4.21 - Composição média de aminoácidos para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®.....	116
Tabela 4.22 – Propriedades funcionais do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® em 1 h e 4 h.....	120
Tabela 4.23 – Propriedades funcionais do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® em 1 h e 4 h.....	120
Tabela 4.24 – Distribuição da massa molecular dos peptídeos do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® em 1 h e 4 h	126
Tabela 4.25 – Distribuição da massa molecular dos peptídeos do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® em 1 h e 4 h	126
Tabela 4.26 - Propriedades anti-hipertensivas do fígado suíno <i>in natura</i> e dos hidrolisados proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h.....	129
Tabela 4.27 - Propriedades antioxidantes do fígado suíno <i>in natura</i> e dos hidrolisados proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h.....	131
Tabela 4.28 - Propriedades antidiabéticas do fígado suíno <i>in natura</i> e dos hidrolisados proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h	134

NOMENCLATURA

F_c	Fator de correção	-
P_a	Peso da amostra	(g)
U	Umidade	(%)
V	Volume de ácido gasto	(mL)
GH	Grau de hidrólise	(%)
N	Normalidade	-
PB	Proteína Bruta	(%)
AbsCN	Absorbância do controle negativo	
AbsA	Absorbância das amostras	

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FÍGADO SUÍNO E CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS BIOATIVIDADES FORMADAS

AUTOR: JOSÉ UEBI MALUF

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO BORBA

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defesa em 24 de abril de 2020. 176 p.

RESUMO

O elevado volume de resíduos industriais gerados pelas indústrias de produtos cárneos tem impulsionado um novo nicho de mercado, o de hidrolisados proteicos. Sendo que, estes coprodutos apresentam-se como oportunidade para explorar matérias-primas de baixo valor comercial, porém, rico em proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais. Neste contexto, o presente trabalho objetivou, por meio da hidrólise enzimática de fígado suíno, proveniente do abate, a obtenção de hidrolisado proteico, os quais podem formar compostos bioativos com propriedades nutricionais e funcionais para ser incorporado na alimentação humana e animal, agregando valor aos coprodutos do abate suíno, e ainda colaborando para uma tecnologia limpa e sustentável. A fim de estabelecer as propriedades funcionais e composição da matéria-prima, fígado suíno, determinou-se a composição química, vitaminas, minerais e perfil de aminoácidos, no intuito de verificar seu potencial de aplicação. Após esta etapa, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática empregando duas enzimas, Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, seguindo o planejamento experimental do tipo

DCCR com 4 pontos axiais. Ao final, fez-se ensaios para viabilizar o processo, conseguinte, para o melhor ensaio foi realizado a cinética de hidrólise. Em todos os planejamentos, as variáveis independentes avaliadas foram: relação enzima:substrato e relação proteína:água, a variável dependente foi o grau de hidrólise (GH) das proteínas. Os resultados revelaram que o fígado suíno apresenta excelente qualidade nutricional, com elevado teor de proteína (19,73%) e baixo valor de gordura (2,4%), umidade (74,3%) e cinzas (1,4%), presença balanceada de todos os aminoácidos essenciais (50,05% EAA), vitaminas A, complexo B e minerais, todos detectados em quantidades suficientes para suprir as necessidades diárias do organismo. Após análise das condições que apresentaram os melhores resultados, em termos de hidrólise, considerando as restrições para ser aplicada em larga escala, para as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® foi estabelecido como temperatura (64°C), relação enzima:substrato de (1,5% e 3,0%) e proteína:água com (20% e 22%), respectivamente, por um período de 1 hora com pH em torno de (6,0-6,5), para cada enzima. Os hidrolisados advindos das reações Alcalase 2.4 L® e NovoPro- D® resultaram valores de grau de hidrólise de 27,86% e 27,30% respectivamente. Os estudos demonstraram que os hidrolisados são fontes ricas de nutrientes necessários tais como proteínas, aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas. Pela eletroforese confirmou-se que houve hidrólise em todas as amostras, havendo formação de peptídeos com baixa massa molecular, com faixas abaixo de (14kDa), além disso, detectou-se que o hidrolisado proteico dispõe de propriedades funcionais elevando as possibilidades de aplicação, sendo as funcionalidades capacidade de absorção de água e óleo, capacidade e estabilidade emulsificante, e, capacidade e estabilidade de formação de espuma. Diante destes resultados, foi possível evidenciar que o fígado suíno é uma excelente matéria-prima, rico em proteínas de alto valor biológico com potencial passível de transformação em hidrolisado proteico através de processo enzimático. A hidrólise enzimática, nas condições de estudo avaliada, apresentaram aumento na capacidade antioxidante, antidiabéticas e anti-hipertensivas. Devido a formação dessas moléculas bioativas este novo produto é capaz de melhorar as propriedades nutritivas e biológicas, de modo a ser incorporado na alimentação humana e animal.

Palavras-chaves: coprodutos de suíno, hidrólise enzimática, peptídeos bioativos.

PORCINE LIVER ENZYMATIC HYDROLYSIS AND POTENTIAL BIOACTIVITIES CHARACTERIZATION

AUTHOR: JOSÉ UEBI MALUF

SUPERVISOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO BORBA

CO - SUPERVISOR: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

Doctoral Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on April, 24th 2020. 176 p.

ABSTRACT

The high volume of industrial waste generated by the meat products industry has driven a new market niche, that of protein hydrolysates. Since these co-products are an opportunity to explore raw materials of low commercial value, however, rich in proteins of high biological value, vitamins and minerals. In this context, the present work aimed, through enzymatic hydrolysis of swine liver, from slaughter, to obtain protein hydrolyzate, which can form bioactive compounds with nutritional and functional properties to be incorporated into human and animal feed, adding value to animals. by-products of pig slaughter, and still collaborating for a clean and sustainable technology. In order to establish the functional properties and composition of the raw material, pig liver, it was determined the chemical composition, vitamins, minerals and amino acid profile, in order to verify its application potential. After this stage, enzymatic hydrolysis tests were carried out using two enzymes, Alcalase 2.4 L® and NovoPro-D®, following the experimental design of the DCCR type with 4 axial points. At the end, tests were carried out to make the process feasible. Therefore, for the best test, hydrolysis kinetics were performed. In all plans, the independent variables evaluated were: enzyme: substrate ratio and protein: water ratio, the dependent variable was the

degree of hydrolysis (GH) of the proteins. The results revealed that the pig liver has excellent nutritional quality, with high protein content (19.73%) and low fat (2.4%), moisture (74.3%) and ash (1.4%) , balanced presence of all essential amino acids (50.05% EAA), vitamins A, B complex and minerals, all detected in sufficient quantities to supply the body's daily needs. After analyzing the conditions that presented the best results, in terms of hydrolysis, considering the restrictions to be applied on a large scale, for the enzymes Alcalase 2.4 L® and NovoPro-D® it was established as temperature (64 ° C), enzyme ratio: substrate (1.5% and 3.0%) and protein: water with (20% and 22%), respectively, for a period of 1 hour with a pH around (6.0-6.5), for each enzyme. The hydrolysates from the Alcalase 2.4 L® and NovoPro-D® reactions resulted in hydrolysis degree values of 27.86% and 27.30% respectively. Studies have shown that hydrolysates are rich sources of necessary nutrients such as proteins, essential amino acids, minerals and vitamins. Electrophoresis confirmed that there was hydrolysis in all samples, with the formation of peptides with low molecular mass, with bands below (14kDa), in addition, it was detected that the protein hydrolyzate has functional properties, increasing the application possibilities, the functionalities being water and oil absorption capacity, emulsifying capacity and stability, and foaming capacity and stability. In view of these results, it was possible to show that the pig liver is an excellent raw material, rich in proteins of high biological value with potential that can be transformed into protein hydrolyzate through an enzymatic process. Enzymatic hydrolysis, under the conditions of the study evaluated, showed antioxidant, anti-diabetic and anti-hypertensive capacity, increasing with the hydrolysis time. Due to the formation of these bioactive molecules this new product is able to improve the nutritional and biological properties, in order to be incorporated into human and animal food.

Keywords: swine co-products, enzymatic hydrolysis, bioactive peptides.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A agroindústria de produção animal destaca-se como uma potencial fonte de coprodutos de elevada qualidade biológica a ser explorada, principalmente por ser rica em proteínas e conter todos os aminoácidos essenciais (MORA *et al.*, 2014; FAO, 2017), e além disso, apresenta elevado volume de geração de coprodutos, variando de 33 a 49% do peso vivo do animal (MULLEN *et al.*, 2017).

Dentre esses coprodutos encontram-se vísceras, cabeças, peles, escamas, penas, pés, recortes de carne, ossos, entre outros. O conteúdo biológico dessas matérias-primas desperta o interesse industrial devido, à possibilidade de agregação de valor, seja pela fragmentação do conteúdo proteico ou pelo isolamento de moléculas bioativas. Para tanto, faz-se o emprego da biotecnologia, em específico a hidrólise enzimática, processo este amplamente utilizado para a obtenção de coprodutos com valor comercial elevado e nutricionalmente benéfico (MARTÍNEZ-ALVAREZ *et al.*, 2015; MORA *et al.*, 2014; MULLEN *et al.*, 2017).

A utilização de enzimas para promoção da hidrólise enzimática proteica é considerada o método mais vantajoso em relação à hidrólise química, processos fermentativos, por permitir maior controle das condições reacionais em virtude de atuar faixas de temperatura e pH moderadas, e assim, evita a degradação da matéria - prima. Ademais, a escolha da enzima em função da sua atuação na estrutura proteica também proporciona conhecimento sobre a composição do hidrolisado a ser gerado, em que proteases, endo e exopeptidases, clivam as porções internas e externas, respectivamente. Nessa premissa, a enzima Alcalase, uma endopeptidase, é amplamente utilizada na recuperação de matérias-primas proteicas de origem animal e vegetal (DIETERICH *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

Durante o processo de hidrólise, além da fragmentação proteica, são gerados compostos bioativos que exercem funções positivas no organismo, melhorando a saúde dos organismos que o ingerem (c). Esses peptídeos com bioatividade são constituídos por uma sequência de aminoácidos que irão

determinar sua função metabólica ou fisiológica, seja como antioxidante, antimicrobiano, anti-hipertensivo, antitrombótico, imunomodulador ou redutor de lipídeos (SHARMA *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-ALVAREZ *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; MULLEN *et al.*, 2017; VILLAMIL *et al.*, 2017).

As características funcionais das proteínas hidrolisadas também são alteradas e melhoradas, possibilitando a sua aplicação em diversos segmentos industriais, que compreendem a capacidade de absorção de água e óleo, formação de espuma, o poder emulsificante e solubilidade, sendo importante na fabricação de alimentos. A combinação dessas características nutricionais e funcionais podem ser empregadas para a redução de estabilizantes, pois a fonte nutricional contribui no aporte tecnológico do alimento (ROMAN & SGARBIERI, 2005; MUZAIFA *et al.*, 2012).

1.2 Objetivos da pesquisa

1.2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a hidrólise enzimática do fígado suíno pela ação de enzimas proteolíticas, estabelecendo parâmetros otimizados de processo visando obter produtos com características funcionais e bioativas, passíveis de serem utilizadas como um novo produto comercial para aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica.

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição centesimal da matéria-prima, em termos de lipídeos, proteínas, umidade, material mineral e composição elementar;
- Realizar hidrólises enzimáticas com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, aplicando planejamentos DCCR, e avaliar os efeitos da concentração de enzima e quantidade de água na reação de hidrólise;

- Quantificar a composição centesimal dos hidrolisados em suas melhores condições processuais obtidas, em termos de proteínas, lipídeos, umidade, material mineral e composição elementar, e vitaminas;
- Realizar a eletroforese dos melhores hidrolisados para as diferentes enzimas testadas;
- Obter as concentrações dos aminoácidos formados por meio de aminograma dos melhores hidrolisados;
- Determinação das propriedades funcionais para as melhores condições de hidrólise;
- Investigação de bioatividades formadas nos hidrolisados proteicos.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica sobre proteínas; composição físico-química e a utilização de coprodutos de origem animal, especificamente do fígado suíno; também será abordado os temas hidrólise enzimática utilizando diferentes proteases para obtenção de hidrolisados; alimentos funcionais, dentre eles, os peptídeos bioativos, com suas diferentes atividades; aplicação e usos comerciais de coprodutos de origem animais; e pesquisas em hidrolisados proteicos com diferentes matérias-primas realizadas nos últimos dez anos.

2.1 Mercado mundial da carne suína

A carne suína vem ganhando o mercado consumidor e tem contribuído para o aumento da proteína de origem animal, sendo que no ano de 2017, obteve uma elevação de 4% (ABPA, 2017). O Brasil em termos de produção de carne suína ocupa o quarto lugar mundial em produção e em exportação de carne suína (ABPA, 2017). Fatores como sanidade, nutrição, bom manejo de granja e produção integrada, somados à evolução genética durante os últimos 20 anos, contribuíram para uma carne com teores reduzidos de gordura (31%), de colesterol (10%) e de calorias (14%) (BRASIL, 2014), e com isso despertando consolidando o interesse de consumo pela população.

Devido a estes fatores, a produção de suínos no Brasil vem crescendo vigorosamente nas últimas décadas. E cada vez mais o país tem conquistado espaço no cenário internacional de carne suína, com exportações em volumes crescentes. Isto se deve ao fato dos inúmeros investimentos em ampliação e também de um substancial evolução na produtividade das granjas. Obviamente, a carne suína participa das cadeias da proteína animal, concorrendo principalmente com as cadeias da carne de frangos e de bovinos pela preferência dos compradores, sendo que a suína ainda é a mais produzida e

consumida no mundo (ABCS, 2017). O consumo e a produção de carne suína estão representados nas Figuras 2.1 e 2.2, respectivamente.

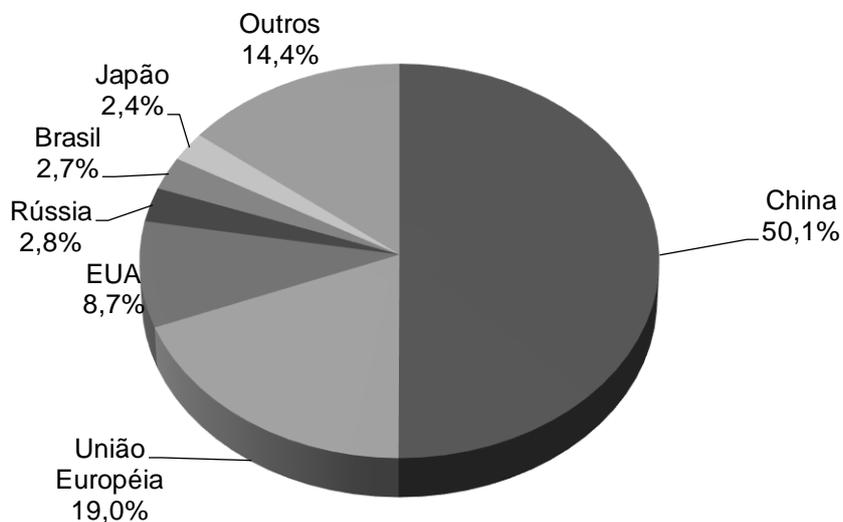


Figura 2.1 - Consumo de carne suína mundial (Ranking 2016)

Fonte: Adaptado de USDA (2016).

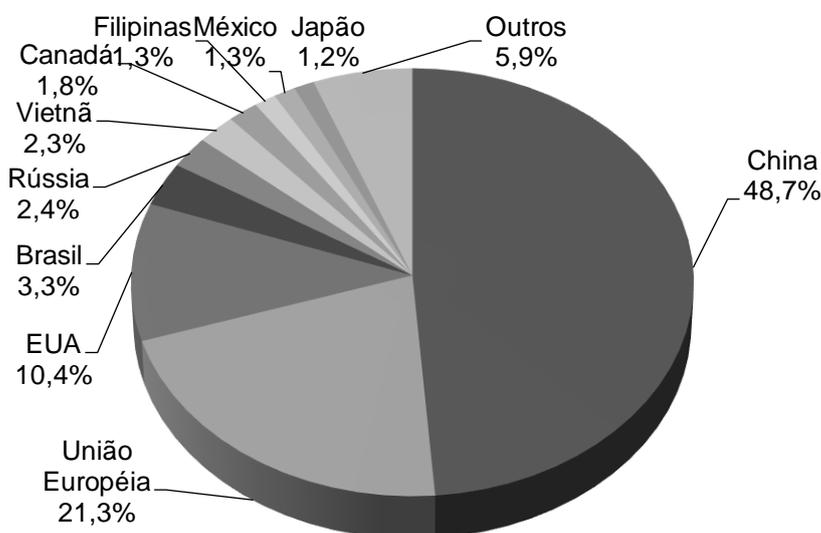


Figura 2.2 - Produção de carne suína mundial (Ranking 2016)

Fonte: Adaptado de USDA (2016).

Dentro do cenário mundial (Figuras 2.1 e 2.2), a China é a maior produtora, respondendo por quase metade da produção, seguida pela União Europeia (UE), Estados Unidos (USA), e o Brasil ocupando a quarta posição, seguido pela Rússia, em quinto lugar (ABPA, 2018).

Segundo a mesma fonte, a China, além de possuir o status de maior produtor e consumidor mundial de carne suína, passou a ser também o maior importador, respondendo, em 2016, por espantosos 2,5 milhões de toneladas ou 29% das importações mundiais. Já o mercado exportador apresentou mudanças importantes.

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) a União Europeia, após um período de estabilidade nas suas exportações, apresentou um expressivo incremento das vendas para outros países em 2016, com previsão de manter os volumes exportados também em 2017. Passou de uma exportação de 2,17 milhões de toneladas de carne suína em 2012 para 3,3 milhões de toneladas em 2016 (ABPA, 2017).

Diante disso, o Brasil, em uma menor escala, também conseguiu ocupar espaço no mercado internacional saindo de 660 mil toneladas em 2012 para cerca de 900 mil toneladas em 2016, apresentando um crescimento de 9% para 10,5% no mesmo período. Nesse sentido, verifica-se que o consumo per capita da carne suína encerrará 2017 com 14,7 quilos, uma elevação de 2% em relação ao consumo do ano passado que chegou aos 14,4 quilos per capita (ABPA, 2017).

2.2 Proteínas

Proteínas são macromoléculas biológicas e as mais abundantes presentes em células vivas. São consideradas um nutriente fundamental para o nosso organismo, uma vez que são essenciais para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção do organismo. São formadas por aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. A partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos é construída desde a mais simples proteína existente em bactérias até as constituintes em seres humanos (NELSON & COX, 2014).

De acordo com os mesmos autores, esses aminoácidos, quando arranjados em diferentes combinações e junções, produzem propriedades e funcionalidades distintas, as quais desempenham funções essenciais e variadas,

como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, proteínas das lentes dos olhos, penas, teias de aranha, chifres de rinocerontes, proteínas do leite, antibióticos, venenos de cogumelos e uma infinidade de outras substâncias com atividades biológicas distintas. Sendo que suas propriedades são determinadas pelo número e espécie dos resíduos de aminoácidos, bem como pela sequência desses compostos na molécula (LEHNINGER *et al.*, 1995; NELSON & COX, 2014). Nesse sentido, a Figura 2.3 apresenta a estrutura de um aminoácido. Nesta figura se observa a estrutura básica do aminoácido, que é um composto orgânico que contém um grupo amina e um grupo carboxila.

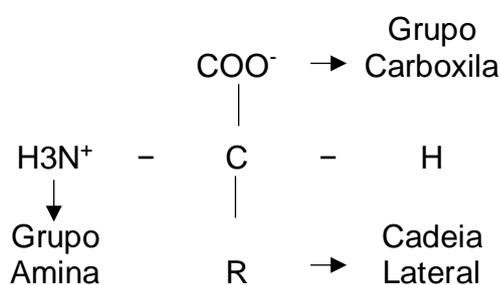


Figura 2.3 - Estrutura geral de um aminoácido

Fonte: Adaptado de Lehninger *et al.* (1995) e Nelson & Cox (2014).

2.3 Classificação das proteínas

As proteínas podem ser classificadas, de acordo com sua função, estrutura e composição (TIRAPÉGUI, 1994; LAJOLO *et al.*, 1998). Em termos de função, esta dependerá das combinações de aminoácidos existentes na composição da proteína, como hormônio (insulina), enzima (tripsina), proteínas contráteis (actina e miosina), proteínas estruturais (colágeno), proteínas de reservas nutritivas (caseína), entre outras.

No que se refere à estrutura, são classificadas conforme sua configuração espacial, as proteínas irão apresentar diferentes níveis de complexidade estrutural, desde as mais simples (primária) até a mais complexa (quaternária). E, quanto à composição, são classificadas a partir do produto de sua hidrólise, se resultar somente de aminoácidos serão simples; quando liberarem outros

componentes orgânicos ou inorgânicos denomina-se de grupos prostéticos (TIRAPEGUI, 1994; LAJOLO *et al.*, 1998).

2.4 Qualidade nutricional das proteínas

Do ponto de vista nutricional existem os aminoácidos essenciais que não podem ser sintetizados pelo organismo animal, portanto, devem ser fornecidas por meio de dieta balanceada com proporções correspondentes às necessidades de cada indivíduo para que possam ser absorvidas e metabolizadas pelo organismo com a máxima eficiência. Os ditos não essenciais são aqueles que o organismo humano consegue sintetizar a partir dos alimentos ingeridos (TIRAPEGUI *et al.*, 2006). Exemplos de proteínas completas seriam aquelas derivadas de alimentos como carne, leite, ovos, peixe e aves que apresentam todos os aminoácidos essenciais ao homem em quantidades adequadas a seu crescimento e manutenção, conforme está apresentado na Tabela 2.1 a classificação nutricional dos aminoácidos.

Tabela 2.1 - Classificação nutricional dos aminoácidos

Essenciais	Condicionalmente essenciais	Não essenciais
Fenilalanina	Glicina	Alanina
Triptofano	Prolina	Ácido Aspártico
Valina	Tirosina	Ácido Glutâmico
Leucina	Serina	Asparagina
Isoleucina	Cisteína e Cistina	--
Metionina	Taurina	--
Treonina	Arginina	--
Lisina	Histidina	--
--	Glutamina	--

Fonte: Tirapegui *et al.* (2006).

Diante disso, a carne oriunda de qualquer espécie, é considerada uma fonte de proteína completa, de excelente qualidade e de alto valor biológico, pois contém alta porcentagem de todos os aminoácidos essenciais ao corpo humano. A disponibilidade dos aminoácidos da carne após a digestão é alta, em média proteínas cárneas são 95 a 100% digeríveis (OLIVO & OLIVO, 2006).

2.5 Proteínas da carne suína

A carne suína, além de saborosa e saudável, é um componente importante em muitas dietas tradicionais. Quase todas as partes do suíno podem ser consumidas e as preferências dos consumidores são variáveis. De acordo com Toldrá *et al.* (2012) e observando o mercado, percebe-se que a parte muscular é a porção do animal mais comumente consumida. No entanto, a utilização de coprodutos tais como vísceras, carcaças e órgãos internos estão relacionados com o país e a cultura estudada, podendo ser considerados iguarias de altos preços ou material residual a ser eliminado.

2.6 Fígado suíno

2.6.1. Composição química e sua utilização

De um modo geral, os coprodutos comestíveis de animais possuem um bom valor nutricional, pois contêm boa fonte de proteínas e baixo teor de gorduras, sendo rico em vitaminas e minerais (KIM, 2011). Particularmente, o fígado é um dos componentes mais nutritivos e constitui uma fonte rica no aporte proteico em vitamina B12 e A (NOLLET & TOLDRÁ, 2011; SEONG *et al.*, 2015). E, desta forma, é utilizado em cardápios que buscam por uma dieta saudável. Alguns estudos, os quais são apresentados a seguir mostram sua composição de nutriente é benéfica ao organismo ingestor.

Pesquisa realizada por Nolle & Toldrá (2011) e Seong *et al.* (2014)^b, demonstraram que a composição química do fígado suíno é semelhante à dos tecidos musculares, rica em fontes de nutrientes necessários, como proteínas, aminoácidos, vitaminas, conteúdo mineral e perfil de aminoácidos, portanto, diante destes resultados, concluíram que o fígado suíno é adequado para o consumo humano.

Honikel (2011) e Nolle & Toldrá (2011) em suas pesquisas analisaram os constituintes do fígado suíno, verificaram variações nos valores de composição,

e atribuíram estas a fatores como: alimentação, clima e tempo de crescimento do animal a ser abatido, influenciam na constituição dos nutrientes presentes no órgão, não havendo um padrão.

Conforme composição química apresentada na Tabela 2.2, observa-se que o fígado suíno *in natura* representa uma fonte de proteínas, minerais e vitaminas, além de alto teor de umidade (74-76%).

Tabela 2.2 - Composição química do fígado suíno por 100 g de amostra

Componente	Nome estrutura	Quantidade (100 g)
Proteína (g)	--	18,9 - 21,6
Gordura (g)	--	2,4 - 6,8
Ca (mg)	Cálcio	6 - 10
P (mg)	Fósforo	356 - 370
Fe (mg)	Ferro	19,2 - 21,0
Na (mg)	Sódio	73 - 87
K (mg)	Potássio	271 - 320
Mg (mg)	Magnésio	18
Zn (mg)	Zinco	5,76
Cu (mg)	Cobre	0,68
Mn (mg)	Manganês	0,34
Ácido fólico (µg)	Folacina	110 - 212
Colesterol (mg)	--	301
Vitamina A (IU)	Retinol	Traços - 10900
Vitamina B1 (mg)	Tiamina	0,28 - 0,31
Vitamina B2 (mg)	Riboflavina	3,00
Vitamina B3 (mg)	Niacina	14,8 - 16,4
Vitamina B6 (mg)	Piridoxina	0,68 - 0,69
Vitamina B5 (mg)	Pantotenato	0,9
Vitamina B6 (mg)	Piridoxina	0,68 - 0,69
Vitamina B8 (µg)	Biotina	27,0
Vitamina B12 (µg)	Cobalamin	25,0 - 26,0
Vitamina C (mg)	Ácido ascórbico	13,0 - 25,3

Fonte: Adaptado de Honikel (2011) e Nollet & Toldrá (2011).

Em seus estudos os autores Srebernich *et al.* (2017) avaliaram a qualidade de uma mistura fortificante (FM), contendo fígado suíno preparado em pó. Os autores concluíram que o FM possui características que o tornam um excelente alimento fortificante, para uso nas refeições escolares principalmente em sopas, cremes, carnes cozidas e especialmente no feijão, uma preparação que faz parte dos hábitos alimentares brasileiros desde a infância.

Os referidos autores Srebernich *et al.* (2015) também avaliaram a qualidade de um bolo de carne desenvolvido com fígado suíno. Concluíram que houve redução nos níveis de gorduras e um aumento dos níveis de proteína e

matéria mineral, especialmente ferro e zinco, com aumentos de 100,0% e 152,73% para o ferro e 70,83% e 97,92%, fornecendo 15 e 20% das necessidades diárias desses minerais para crianças em idade pré-escolar, sendo uma opção viável para reduzir a incidência de anemia ferropriva.

Diante desses estudos é evidente a excelente qualidade nutricional do fígado suíno, pois são fontes ricas em nutrientes necessários para a manutenção das atividades vitais. No entanto, ainda são poucas as pesquisas que enfatizaram a potencialidade do aproveitamento do fígado suíno na obtenção de novos produtos.

A maior parte dos estudos reportados na literatura enfocando o aproveitamento dos coprodutos do abate animal, por meio do processo de hidrólise, se refere principalmente à utilização de pescados, a exemplo do aproveitamento de vísceras de peixe (FELTES *et al.*, 2010; ROSLAN *et al.*, 2014, 2015; SILVA *et al.*, 2014); espinha dorsal de salmão (SLIZYTE *et al.*, 2016); vísceras de camarão (*Katsuwonus pelamis*) (KLOMKLAO & BENJAKUL, 2016), vísceras de sardinha (VENTURIN *et al.*, 2017). Alguns estudos relatam a obtenção de hidrolisado proteico a partir de coproduto do abate caprino (QUEIROZ *et al.*, 2017); bovino (BAH *et al.*, 2016); aves (OLIVEIRA *et al.*, 2015; LASEKAN *et al.*, 2013) e tecidos suínos (DAMGAARD *et al.*, 2014).

Atualmente as indústrias processadoras de produtos cárneos geram um volume de, aproximadamente, 24,5 milhões de toneladas de matérias-primas residuais (MARTÍNEZ-ALVAREZ *et al.*, 2015). Contudo, se os coprodutos do abate bovino e suíno forem usados de forma eficaz, podem proporcionar uma economia de 11,4% a 7,5% ao setor produtivo, respectivamente (TONDRÁ *et al.*, 2011).

Diante do exposto, verifica-se a possibilidade do uso dos coprodutos, como o fígado suíno, em processos biotecnológicos. Uma vez que, esta é uma alternativa tecnológica que possibilita agregar valor aos coprodutos industriais, resultando em alimentos seguros e de alto valor biológico e nutricional.

2.7 Coprodutos agroindustriais

A demanda crescente por alimentos para atender à necessidade nutricional da população mundial é cada vez maior, sendo o setor agrário o principal responsável por este fornecimento (FAO, 2015).

Dentre as atividades agrárias de produção de alimentos, as de produção de proteína animal (avicultura, suinocultura, bovinocultura e aquicultura) se destacam devido ao crescimento exponencial no cenário mundial, além de perfazer as principais fontes nutricionais para a alimentação da população mundial (FAO, 2015; ABPA, 2017). Não obstante, da mesma forma com que esse setor cresce, a geração de coprodutos, subprodutos e resíduos oriundos das etapas de abate e processamento, também acompanham a ascensão de crescimento (MULLEN *et al.*, 2017). Na Figura 2.4 são apresentadas as possíveis aplicações dos coprodutos alimentares.

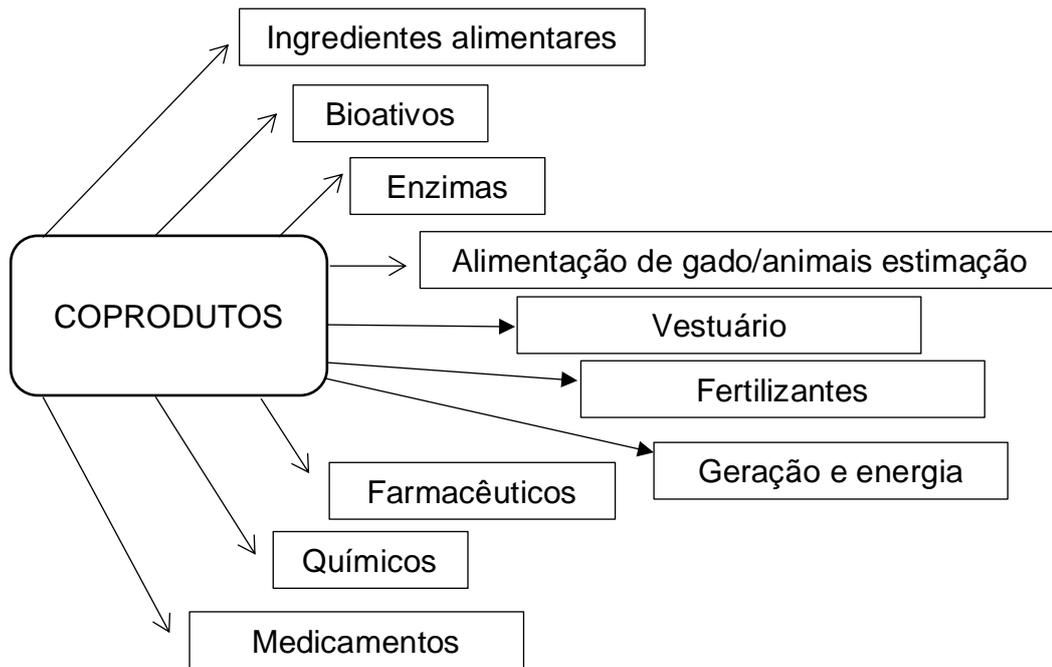


Figura 2.4 – Aplicação dos coprodutos alimentares.

Fonte: Adaptado de Toldrá *et al.* (2016).

Em geral, estes produtos gerados (Figura 2.4) que não são diretamente destinados ao consumo humano são considerados coprodutos do processamento e compreendem sangue, pele, vísceras, ossos, aparas de carne, tecidos gordurosos, escamas, nadadeiras, cartilagens, penas, entre outros. Estima-se que o volume de coprodutos seja de, 18 a 28% na avicultura, 55%, na bovinocultura, 48% na suinocultura e 50 a 70% na piscicultura em relação ao peso do animal vivo (MULLEN *et al.*, 2017; VILLAMIL *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2018).

Estes coprodutos, antes chamados de resíduos do processamento, são, geralmente, subutilizados e destinados à produção de farinhas e óleos para nutrição animal ou à produção de compostos agrícolas, o que proporciona a baixa valorização, considerando sua potencialidade (FERREIRA *et al.*, 2018).

Na busca pela sustentabilidade no setor, as principais preocupações com a geração de resíduos nestas atividades são inerentes às repercussões que estes podem apresentar em relação à saúde humana e ambiental (FERREIRA *et al.*, 2018).

Além disso, Toldrá *et al.* (2016) ressaltam que o tratamento de resíduos agroindustriais para descarte é tão oneroso quanto o emprego de tecnologias

para a transformação em produtos que agregam valor e aumentam a lucratividade na cadeia produtiva. Estes fatores evidenciam que estes produtos coadjuvantes da produção animal vislumbram alternativas industriais com a possibilidade de agregação de valor devido a sua alta qualidade biológica como fonte de proteínas, minerais, vitaminas, ácidos graxos, biomoléculas, entre outros valiosos componentes de interesse comercial/industrial.

O emprego de tecnologias para a otimização, a recuperação ou a transformação destes coprodutos é relativo à sua valorização, em que, quanto mais tecnologias são utilizadas, maior será o valor atribuído a estes produtos (MULLEN *et al.*, 2017).

Aspectos gerais como a elevada oferta, a boa qualidade biológica e o baixo custo destas matérias-primas despertam o interesse industrial, sendo uma tendência do mercado o emprego de tecnologias que melhoram as propriedades químicas e funcionais destes coprodutos, apresentando diversas possibilidades de aplicações (DIETERICH *et al.*, 2014; MULLEN *et al.*, 2017).

Dependendo do tratamento e da integridade do coproduto, as aplicações podem variar desde a elaboração de ingredientes para nutrição animal até a exploração de propriedades bioativas e nutraceuticas (TOLDRÁ *et al.*, 2016).

De acordo com Fiorese *et al.* (2018), um processo promissor para a valorização de coprodutos agroindustriais é o emprego da biotecnologia, por meio da hidrólise enzimática proteica que, além de melhorar a qualidade nutricional e funcional da matéria-prima, apresenta pouco ou nenhum resíduo de processamento, sendo uma forma de aproveitamento integral de produtos pouco explorados ou com baixo valor agregado.

2.8 Hidrolisado proteico

O processo de hidrólise consiste na clivagem da porção proteica em meio aquoso em fragmentos de diversos tamanhos, solubilizando a proteína e resultando em uma porção solúvel que é rica em proteína, peptídeos e aminoácidos livres, e outra porção insolúvel que é constituída pelo material não

hidrolisado (ADLER-NISSEN, 1986; ALBUQUERQUE, 2003; PASUPULETI & BRAUN, 2010).

O fator principal da hidrólise proteica é o aprimoramento nutricional desta reação, em que ocorre uma pré-digestão deste nutriente, tendo como resultado um produto com maior digestibilidade, uma vez que sua absorção é facilitada por conter fragmentos de menor tamanho (SILVA *et al.*, 2017).

Assim, a modificação da estrutura proteica pode ser catalisada sob ação ácida, alcalina ou enzimática. A hidrólise química (ácida ou alcalina) é o método convencional e severo para hidrólise proteica, a qual é realizada através da quebra de ligações peptídicas, utilizando bases e ácidos fortes sob alta pressão e temperatura (ARAÚJO *et al.*, 2009).

No entanto, esse método apresenta algumas limitações, tais como, dificuldade de controle do processo, podendo levar a clivagem de ligações peptídicas não específicas, racemização dos aminoácidos, alterando a estrutura do L-aminoácido para o D-aminoácido, impossibilitando a utilização desses hidrolisados proteicos na alimentação de humanos e animais. Além disso, alguns dos aminoácidos essenciais como triptofano e cisteína, podem ser degradados ou diminuídos durante a reação de hidrólise. Diante disso, torna-se difícil de controlar a qualidade do produto, gerando quase sempre produtos com composição química e propriedades funcionais variáveis (HALL *et al.*, 1992; SGARBIERI, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2009; WHISUTHIPHAET *et al.*, 2015).

Já a hidrólise enzimática tem sido muito utilizada nos processos de hidrólise proteica, a qual envolve a aplicação de enzimas proteolíticas digestivas, vegetais ou de origem microbiana. Este processo de hidrólise é limitado, induzindo a redução de fatores alergênicos, assim como melhoria da digestibilidade e formação de peptídeos com atividade biológica (KORHONEN, 2009).

No entanto, para a garantia da qualidade nutricional e dos grupos funcionais do produto, o processo de hidrólise deve ser realizado em condições brandas e controladas, com a finalidade de proporcionar um perfil peptídico definido, liberação de compostos bioativos e possibilidade de reprodução deste padrão (ADLER-NISSEN, 1986; ZAVAREZE *et al.*, 2009), assim, a hidrólise

enzimática dentre os processos citados é considerada a mais vantajosa (PASUPULETI & BRAUN, 2010).

Toldrá *et al.* (2016), ao listarem processos promissores para o aproveitamento de coprodutos animais, apontam a produção de hidrolisados proteicos como um dos métodos com maior valorização, visto que além da melhoria nutricional em função da fragmentação proteica, este processo contribui para a liberação de componentes com ação funcional, desempenhando melhorias fisiológicas no organismo.

2.9 Enzimas

A hidrólise enzimática da proteína é baseada no uso de enzimas que clivam ligações proteicas para alterar as propriedades químicas e funcionais da matéria-prima sem prejudicar seu valor nutricional (ADLER-NISSEN, 1986; PASUPULETI & BRAUN, 2010).

A maioria das enzimas são importantes proteínas especializadas em realizar biotransformações nos sistemas biológicos, sendo responsáveis por catalisar as reações bioquímicas do crescimento celular, com exceção do grupo de ácido ribonucleico (RNA). Essas moléculas aceleram as reações químicas em até 10^{17} vezes mais que as reações não catalisadas. Elas agem de forma organizada e, em sequência, possuem especificidade e degradam nutrientes de modo a conservar a energia química e ainda podem possuir ação reguladora de outras atividades necessárias para a manutenção da vida (NELSON & COX, 2002).

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam e estão apresentadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Classificação das enzimas

Classe	Tipo de reação catalisada
1. Oxidorredutase	Transferência de elétrons
2. Transferase	Reações de transferência de grupos
3. Hidrolase	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4. Liase	Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos
5. Isomerase	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6. Ligase	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N pelo acoplamento da clivagem da adenosina trifosfato (ATP) com as reações de condensação

Fonte: Adaptado de Nelson & Cox (2002).

As enzimas utilizadas na quebra de proteínas são proteases, peptidases ou proteinases e pertencem ao grupo das hidrolases as quais catalisam e clivagem hidroliticamente as ligações peptídicas da molécula de proteína (NELSON & COX, 2002).

2.9.1 Enzimas proteolíticas/proteases

As proteases pertencem ao grupo das hidrolases, as quais catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo à transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994; ELLAIAH, 2002). Além disso, podem ser produzidas a partir de plantas, animais ou microrganismos, sendo que as de origem microbiana apresentam-se mais promissoras por produzir enzimas específicas e possuírem a maioria das características desejadas para a aplicação em biotecnologia. Estas são responsáveis por 60% das vendas do mercado mundial e em maior quantidade que animais e plantas (BEYOND & BOND, 2001).

São classificadas baseadas em pH, especificidade do substrato, mecanismo de ação e na comparação de sítios ativos, mas convencionalmente elas são divididas em quatro importantes grupos: serina-proteases, aetalo-proteases, cisteína-proteases e aspártico-proteases (ELLAIAH *et al.*, 2002; SOUZA, 2008). Segundo o sistema internacional de nomenclatura as enzimas proteolíticas pertencem a subclasse 4 da classe 3 (EC 3.4 Peptídeo hidrolases), conforme mostra a Figura 2.5. As proteases são subdivididas em sub-classes

baseadas no mecanismo de ação catalítico e estas são caracterizadas por sua especificidade pelo substrato (WARD, 1985).

As proteases podem ser consideradas uma endopeptidases e exopeptidases, dependendo do mecanismo de hidrólise. As endoproteinases hidrolisam as ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica, geralmente em resíduos específicos produzindo peptídeos relativamente grandes. Enquanto as exopeptidases quebram as ligações peptídicas terminais, atuam nas extremidades N- ou C-terminal (YANG *et al.*, 2011; TAVANO, 2013; HSIAO *et al.*, 2014).

De acordo com Ellaiah *et al.* (2002) as endopeptidases são subdivididas em relação à especificidade de atuação do seu sítio ativo em:

- serino endopeptidases, quando apresentam um centro ativo na catálise da serina, geralmente sua atividade ótima está quando o pH se encontra neutro ou alcalino (7-11);
- cisteína endopeptidases com centro ativo para cisteína, sua atividade acontece em pH (5-8);
- aspártico endopeptidases quando apresentam dependência de resíduos de ácido aspártico, sua atividade máxima acontece em pH baixo (3-4);
- metaloendopeptidases que utilizam metais em suas reações catalíticas, essas enzimas tem atividade ótima com pH entre (5-9).

Já as exopeptidases são classificadas em dois grupos quanto ao local de ação na cadeia proteica em: amino-peptidases que atuam na porção N-terminal da proteína e libera aminoácidos livres, di ou tri peptídeos e carboxipeptidase com atuação na extremidade C-terminal e liberando aminoácidos livres e dipeptídeos (ELLAIAH *et al.*, 2002).

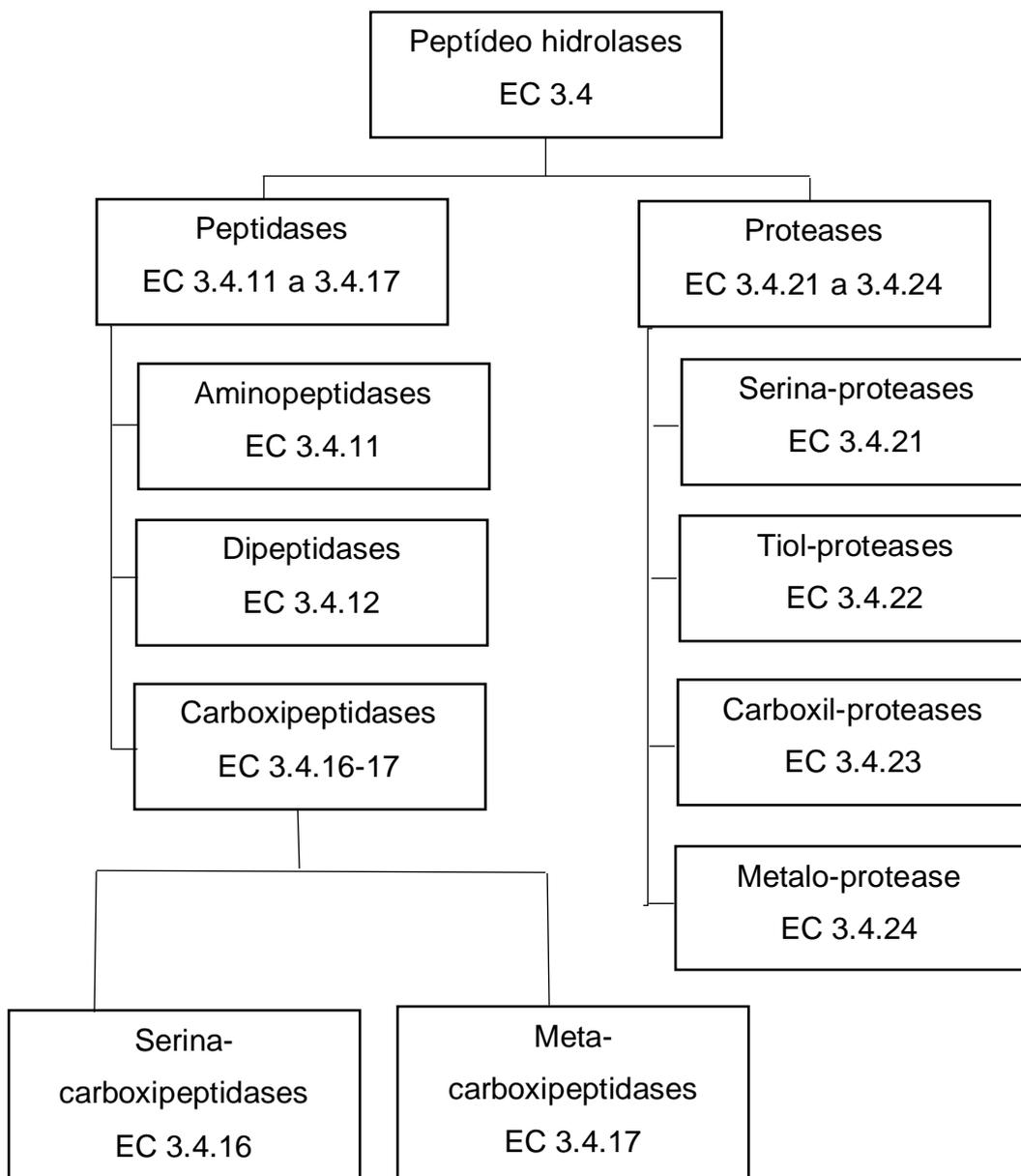


Figura 2.5 – Classificação de enzimas proteolíticas
 Fonte: Adaptado de Ward (1985).

Diante disso, a Figura 2.6 apresenta as principais finalidades das proteínas visando hidrolisados proteicos a partir de enzimas.

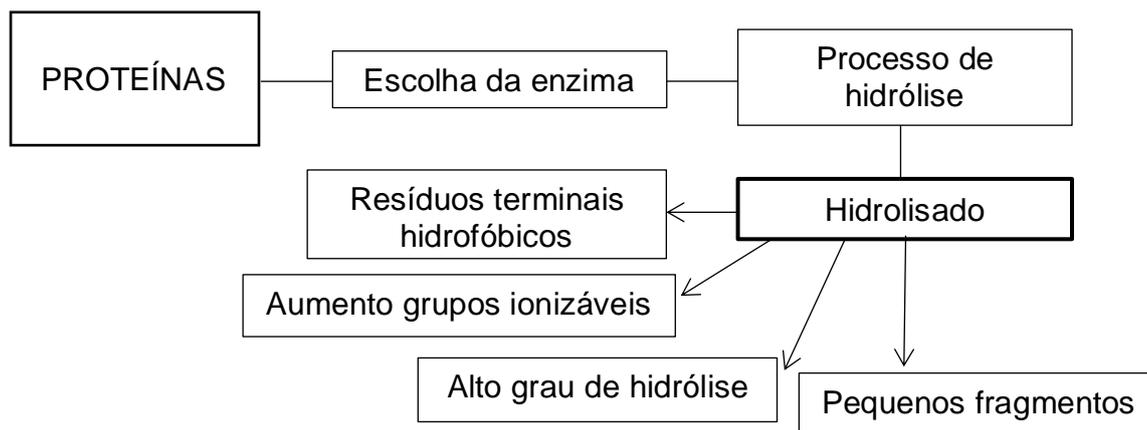


Figura 2.6 – Proteínas para obter hidrolisados proteicos partir do uso de enzimas
 Fonte: Adaptado de Tavano (2013).

Diversas proteases são comercializadas para fins de transformação proteica na indústria alimentícia, cosmética, fármaco e animal (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Proteases comerciais e suas características de ação

Enzima	pH de máxima atividade proteolítica	Temperatura (°C) de máxima atividade proteolítica	Especificidade
Alcalase 2.4 L®	6,5 - 8,5	55 - 70	Endo*
Neutrase 0,5L	5,5 - 7,5	45 - 55	Endo
Protamex	5,5 - 7,5	35 - 60	Endo e Exo**
Corolase 7089	5 - 7,5	<60	Endo
Corolase PN-L	5 - 8	<50	Endo e Exo
Corolase LAP	6 - 9	<70	Exo
Papaina	5 - 7	65 - 80	Endo e Exo
Bromelina	3 - 9	50 - 60	Endo e Exo
Pepsina	1,5 - 2,5	35 - 50	Endo
NovoPro-D®	6 - 9	50 - 60	Endo

* Endo: endopeptidase. ** Exo: exopeptidase.

Fonte: Adaptado de Vermelho *et al.* (2008).

A Tabela 2.4 explana a diversidade de enzimas proteases, assim como suas características de atuação, o que demonstra o quão amplo pode ser o emprego destas enzimas em diferentes processos de produção, quanto aos processos hidrolíticos tornam-se extremamente aplicáveis, pois apresentam uma larga faixa de temperatura 35 a 80°C e pH 1,5 a 9. Para Vermelho *et al.* (2008) pode-se escolhê-las em relação ao produto que se objetiva, por meio de sua

especificidade de atuação na clivagem proteica em diferentes porções desta estrutura.

A Tabela 2.5 apresenta alguns estudos desenvolvidos com proteases e variadas matérias-primas.

Tabela 2.5 – Estudos para aplicação de proteases na obtenção de peptídeos com atividade biológica a partir de diferentes fontes de proteína

Protease	Condições de hidrólise	Fonte proteica	Bioatividade dos Peptídeos	Peptídeos (massa molecular)	Referência
Alcalase 2.4 L®	pH 8,0; 50°C; 3h E*:S** = 1:20 (S) = 5,0%	Soja	Antiadipogênese	754 a 3897 kDa	Mejia <i>et al.</i> (2010)
Flavourzyme®	pH 7,0; 50°C; 2h E:S = 1:100 (S) = 2,5%	Proteína isolada de soja (PIS)	Antiadipogênese	≤1300 Da	Tsou <i>et al.</i> (2010) ^a
Neutrase®	pH 6,0; 45°C; 4h E:S = 1:100 (S) = 2,5%	(PIS)	Antiadipogênese	1300 - 2200 Da	Tsou <i>et al.</i> (2010) ^b
Pepsina	pH 6,0; 45°C; 4h E:S = 1:100	Hemoglobina Bovina	Antimicrobiana e Anti-hipertensiva	688 a 4430 Da	Adje <i>et al.</i> (2011)
Alcalase 2.4 L®	pH 8,0; 50°C; 3h (E) = 0,2 mgmL ⁻¹ (S) = 8,0%	Feijão	Antioxidante e Anti-inflamatória	445 e 2148 Da	Oseguera-Toledo <i>et al.</i> (2011)
Alcalase 2.4 L® Flavourzyme® Protamex® Neutrase® Pepsina Tripsina	pH 7,0; 50°C; 8h pH 7,0; 50°C; 8h pH 7,0; 50°C; 8h pH 7,0; 50°C; 8h pH 2,0; 37°C; 8h pH 8,0; 37°C; 8h	Salmão	Antioxidante e Anti-inflamatória	1000 e 2000 Da	Ahn <i>et al.</i> (2012)

* Enzima.

** Substrato.

2.9.2 Aplicações das enzimas

Dentre as proteases comerciais existentes, atualmente a Alcalase 2.4 L® é a enzima comercial mais utilizada na fabricação de hidrolisados proteicos. Uma vez que, produz características sensoriais desejáveis, ausência de cheiro desagradável e possui alta funcionalidade (SUJITH & HYMAVATHI, 2011).

A enzima Alcalase 2.4 L® é uma endopeptidase bacteriana que foi desenvolvida pela empresa Novozymes e provém da fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis* (NOVOZYMES, 2011; CORÍCI *et al.*, 2011; BERNARDI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2017; ALAVI *et al.*, 2019). É classificada como uma subtilisina, uma serina-protease, conhecida pela sua atuação sob altas temperaturas e moderada alcalinidade (SCHIMIDT, 2008). Seu principal desempenho é na hidrólise das ligações peptídicas contidas de resíduos hidrofóbicos na cadeia lateral carboxílica e no alcance de um alto grau de hidrólise sob condições suaves em menor período (ADLER-NISSEN, 1986; ASPMO *et al.*, 2005).

Estudos reportados na literatura voltados ao reaproveitamento de coprodutos apresentam pesquisas aplicando diversos resíduos utilizando a Alcalase 2.4 L® como referência (padrão) no processo de hidrólise enzimática.

Realizaram hidrólise com fígado suíno utilizando Alcalase 2.4 L® durante 6 h e pH 8,0 e 50°C, e obtiveram graus de hidrólise na faixa de 1,22 a 23,56%. Detectando nos hidrolisados produzidos, atividades antioxidante como 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e ácido 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico (ABTS), e, radicais de poder redutor de íons férricos (FRAP) (VERMA *et al.*, 2017).

Investigaram para a bioconversão de sardinha com enzima Alcalase 2.4 L® no tempo de 4 h e obtiveram graus de hidrólise na faixa de 13,2-14,9 % (pH 8,0 e 50°C), com formação de perfil de pequenos peptídeos abaixo de 1000 Da, além da atividade antioxidante natural (GARCÍA-MORENO *et al.*, 2014)

Roslan *et al.* (2015) avaliaram a otimização de produção de hidrolisado de proteína de peixe a partir do subproduto da Tilápia com enzima Alcalase 2.4 L®.

A condição ótima encontrada foi com pH 7,5, 60°C, concentração de substrato 15% (p/v) e de enzima 2,5% (p/p), fornecendo um grau de hidrólise de 20,20%, hidrolisado este, com propriedades nutricionais e funcionais.

Enquanto que na pesquisa de Roslan *et al.* (2014), empregaram diferentes subprodutos (pele, ossos, cabeças e caudas) oriundo do processamento de file de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em hidrólises proteicas com Alcalase 2.4 L®. Os autores obtiveram excelentes valores para a liberação de aminoácidos como triptofano, tirosina, fenilalanina e prolina.

No estudo realizado por Bernardi *et al.* (2016) os autores concluíram que, a hidrólise enzimática utilizando Alcalase 2.4 L®, possibilitou recuperar as proteínas dos coprodutos do processamento de Tilápia do Nilo, promovendo a formação de péptidos *in vitro* altamente antioxidantes.

Enquanto que Mejia *et al.* (2010) avaliaram o efeito de hidrolisados protéicos da soja produzidos com Alcalase 2.4 L® (pH 8,0; 50°C; 3h) e enriquecidos com b-conglicinina, a performance foi ponderada em termos de atividade da sintase ácida (FAS) sobre a gordura e resposta adipogênica de adipócitos humanos *in vitro*. Os resultados, mostraram que alterações genotípicas nas subunidades de proteínas da soja produziram perfis peptídicos ativos na faixa de 754 a 3897 kDa, com bioatividade antiadipogênica.

A enzima Alcalase 2.4 L® também foi estudada na hidrólise do feijão durante 3 h a 20°C e pH 8,0, os autores concluíram que houve formação das bioatividades antioxidante e anti-inflamatória, com perfis peptídicos ativos de 445 e 2148 Da (OSEGURA-TOLEDO *et al.*, 2011).

Outra enzima aplicada em pesquisas com coprodutos nos últimos anos é a NovoPro-D®, entretanto, há poucos estudos utilizando esta enzima, se comparado com a Alcalase 2.4 L®, mostrando que ainda é necessário aumentar o número de pesquisas com esta enzima, de forma a evidenciar o seu potencial de aplicação.

A enzima NovoPro-D® é resultante de uma preparação enzimática de Serina endoprotease, que hidrolisa ligações pépticas internas, seu componente enzimático principal é uma subtilisina produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis* geneticamente modificado em fermentação submersa,

comercializada pela empresa Novozymes na forma líquida, estabilizada em água, glicerol e ácido fórmico (NOVOZYMES, 2011; MIRANDA, 2012; ROJAS *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2019).

Para Miranda (2012) o destaque da NovoPro-D® para a aplicação industrial se dá na indústria de *pet food*, uma vez que empregam esta enzima em processos que visam o melhoramento do sabor das rações.

Kamnerdpetch *et al.* (2007) avaliaram a hidrólise enzimática da polpa de batata com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® (7%), por 26 h, a 300 rpm, a 50°C com pH inicial 8,5, obtiveram ao final dos processos graus de hidrólise de 8,56 e 3,28%. Ambos os hidrolisados apresentaram formação de aminoácidos de forma significativa, contudo, os hidrolisados da enzima Alcalase 2.4 L® destacaram-se pela variedade de aminoácidos, produzindo histidina, fenilalanina, triptofano, tirosina e metionina, em mg g proteína⁻¹ de 3,75; 2,84; 1,27; 2,03 e 1,06, respectivamente.

Miranda (2012) realizou a hidrólise enzimática de soja empregando as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® para a finalidade de aplicação em dietas de animais. O estudo verificou que o grau de hidrólise (19%) obtido com a enzima NovoPro-D® na concentração de 1%, temperatura de 60°C e pH 9,0 por um período de 3 h foi levemente superior que em comparação com a enzima Alcalase 2.4 L® no mesmo tempo e condições processuais, grau de hidrólise de 18%.

Enquanto Antunes (2014) investigou as enzimas Alcalase 2.4 L® e a NovoPro-D® quanto ao seu potencial catalítico na hidrólise de carne mecanicamente separada (CMS) de Tilápia, após 5 horas de reação, o grau de hidrólise final para Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® foi de 41% e 56%, respectivamente, e o valor de aminoácido aromático livre é de 0,15 e 0,22 mg mL⁻¹. Demonstrando desta forma o potencial de aplicação da enzima NovoPro-D®.

No estudo de Rojas *et al.* (2014) os autores hidrolisaram casca de soja utilizando a enzima NovoPro-D®, com o intuito desta aplicação foi recuperar proteínas na forma de peptídeos com baixo peso molecular e produzir etanol a partir da fração oligocelulósica remascente. Os resultados mostraram que os

hidrolisados geraram proteínas de alto valor biológico e oligopeptídeos de baixo peso molécula.

Rosa *et al.* (2018) hidrolisaram soro de leite com a enzima NovoPro- D®, encontraram um grau de hidrólise de 18,5% em 5 h, a 50°C, com pH 9,0 e enzima:substrato de 7%. Houve a formação de perfis peptídicos diversos, além apresentar atividade de 40% para a propriedade funcional de emulsificação.

2.10 Processo de hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de coprodutos ricos em proteínas altera suas propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais, fatores estes que influenciam nas características e componentes finais do produto hidrolisado. A hidrólise com enzimas demonstra ser um processo mais vantajoso em relação aos demais, pois é realizado em condições controladas e não resulta em produtos demasiadamente degradados como os gerados em hidrólises ácida e alcalina (ADLER-NISSEN, 1986). Além disso, o uso de enzimas para promover a clivagem proteica permite maior precisão dos grupos funcionais liberados na reação, perfazendo outra vantagem ao emprego dessa tecnologia (SHARMA *et al.*, 2011).

Pode-se citar também como benefícios de interesse industrial, a melhoria das propriedades funcionais tecnológicas, apresentando capacidade de absorção de água e óleo, poder emulsificante, solubilidade, capacidade de formação de espuma, apresentando características de interesse da indústria alimentícia (ROMAN & SGARBIERI, 2005). Segundo Santos *et al.* (2009), o uso de enzimas proteolíticas no processo de hidrólise permite o maior controle da clivagem.

A possibilidade de utilizar enzimas endógenas e exógenas, nestas reações também é considerada vantagens deste processo. Uma vez que, pode-se escolhê-las em relação ao produto que se objetiva, por meio de sua especificidade de atuação na clivagem proteica em diferentes porções desta

estrutura (VERMELHO *et al.*, 2008). O uso de enzimas exógenas é considerado uma boa opção para tornar o processo hidrolítico mais controlável e reproduzível.

A intensidade de solubilização da proteína pode ser aferida pela relação entre a quantidade de proteína solúvel antes e ao final do processo, tendo como resposta analítica o grau de hidrólise. Este parâmetro reporta a proporção de proteína que sofreu hidrólise durante determinado tempo de reação, sendo uma importante ferramenta de resposta deste processo biotecnológico (NIELSEN *et al.*, 2001).

Kristinsson & Rasco (2000) ressaltam que os principais fatores que influenciam o hidrolisado elaborado são o substrato utilizado, a especificidade da enzima e o grau de hidrólise, pois estas variáveis estão diretamente relacionadas com o peso molecular do produto gerado.

Embora atuem em ampla variação de condições como pH e temperatura, as enzimas apresentam sua melhor performance em condições ótimas ou intervalos dessas condições, que são determinadas pela máxima atividade enzimática dentro de uma cinética de reação (NELSON & COX, 2002).

2.11 Aplicações dos hidrolisados proteicos

2.11.1 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos

Propriedades funcionais são características físico-químicas que influenciam a performance da proteína em sistemas alimentares durante diferentes estágios desde o processamento até o consumo, estas propriedades são classificadas em hidrodinâmicas, tais como, solubilidade, viscosidade, capacidade de gelificação e absorção de água, e, propriedades ativas de superfície como capacidade de emulsificação, formação de espuma e filme (VILLAMIL *et al.*, 2017).

De acordo com Roman & Sgarbieri (2005), além da valorização nutricional, durante o processo de solubilização da proteína por meio da hidrólise, características funcionais desse nutriente são alteradas e melhoradas,

possibilitando a sua aplicação nos mais diversos tipos de segmentos, com maior interesse na fabricação de alimentos.

Essas propriedades funcionais tecnológicas dos hidrolisados proteicos compreendem a capacidade de absorção de água e óleo, a formação de espuma, o poder emulsificante e solubilidade. Desse modo, são importantes na fabricação de alimentos, tendo em vista que, além de conferir características nutricionais, podem contribuir também em aspectos relacionados à textura de um alimento, por exemplo. A combinação dessas características nutricionais e funcionais pode ser empregada para a redução de estabilizantes, em que a fonte nutricional também contribui no aporte tecnológico do alimento (ROMAN & SGARBIERI, 2005; MUZAIFA *et al.*, 2012).

As interações de decréscimo de peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição dos grupos hidrofóbicos, controlam as propriedades físico-químicas de formulação de alimentos são diretamente responsáveis por sua performance e comportamento em sistema alimentar (HE *et al.*, 2013).

A capacidade emulsificante é definida como a habilidade do material em formar emulsão e estabilidade da emulsão, sendo definida como a capacidade de manter a emulsão formada (WITONO *et al.*, 2016). É uma propriedade funcional primária em proteínas alimentícias, pois estão relacionadas com a capacidade das proteínas em diminuir a tensão superficial entre os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo muito importante para produtos cárneos (CASTRO *et al.*, 2015).

A capacidade de solubilidade e retenção de água dentre as propriedades funcionais dos peptídeos, são destacadas pela capacidade de rompimento das proteínas em peptídeos menores, obtendo um produto com maior solubilidade e depende da hidrofobicidade e da carga dos peptídeos, devido a exposição de grupos ionizáveis (grupos amino e carbóxilos) (LACOU, 2016).

Para tanto, em comparação com a proteína original os peptídeos são capazes de aumentar a formação e a estabilidade de espuma e emulsão, até um grau limitado de hidrólise após este ponto essa capacidade diminui. O benefício do peptídeo em relação à proteína, é a capacidade de difundir mais rapidamente

para a interface através de seu aumento de solubilidade e assim absorver rapidamente na interface ar/água ou líquido/interface água (LACOU, 2016).

A funcionalidade dessas propriedades está relacionada à estrutura das proteínas e podem ser influenciadas pelo grau de hidrólise, pelo peso molecular, pela conformação e carga das moléculas, além de, por consequência, a relação enzima/substrato e especificidade da enzima também influenciarem essas características (NELSON & COX, 2002).

Mufaiza *et al.* (2012) destacam que o uso da enzima Alcalase 2.4 L® em hidrolisado proteico de pescado proporciona, além de maior disponibilidade de proteína, melhores propriedades funcionais tecnológicas como solubilidade, poder de emulsificação e formação de espuma em relação à enzima Flavourzyme.

Zavareze *et al.* (2009), avaliaram a capacidade emulsificante em hidrolisados de cabrinha (*Prionotus punctatus*), utilizando diferentes proteases, observaram maior eficiência com a enzima Alcalase 2.4 L®, obtendo melhores conversões tanto para a capacidade emulsificante quanto para estabilidade.

Barac *et al.* (2012) estudaram as propriedades funcionais de proteína isolada de ervilha (*Pisum sativum, L*) obtido de dois genótipos de ervilha e com duas proteases (papaína e uma protease comercial). A partir do estudo, verificou-se que a partir das condições processuais de pH (3,0; 5,0; 7,0 e 8,0) observaram aumento de solubilidade, propriedade de emulsão e espuma em todos os pH avaliados.

Klost *et al.* (2016) averiguaram o produto hidrolisado ervilha com variação da faixa de pH aplicável em alimentos (pH 4,0 – 7,0) e variação no grau de hidrólise. Verificaram que a solubilidade aumentou em todas as amostras, apresentando à formação de emulsão e tendência para distribuição de tamanho de gotas de óleo maiores próximo ao ponto isoelétrico.

Latorres *et al.* (2017) avaliaram a hidrólise enzimática com camarão (*Litopenaeus vannamei*) utilizando as enzimas Alcalase 2.4 L® e Protamex. Observaram que o maior grau de hidrólise apresentou uma relação positiva com a solubilidade da proteína hidrolisada, além da influência negativa nas propriedades de formação de espuma e emulsão.

2.11.2 Propriedade bioativas dos hidrolisados proteicos

As proteínas animais apresentam grande potencial de aplicação na área de compostos bioativos, por possuírem importantes atividades biológicas. Para Lafarga & Hayes (2014), os peptídeos bioativos são constituídos por uma sequência de 2 a 20 aminoácidos que exercem alguma função fisiológica no organismo. Da mesma forma, aspectos estruturais, como composição e sequência de aminoácidos, determinam sua bioatividade, que são classificadas de acordo com seu modo de ação (SÁNCHEZ & VÁZQUEZ, 2017).

A Figura 2.7 ilustra, alguns dos possíveis peptídeos bioativos que podem ser obtidos por hidrólise enzimática ou processo fermentativo de coprodutos industriais.

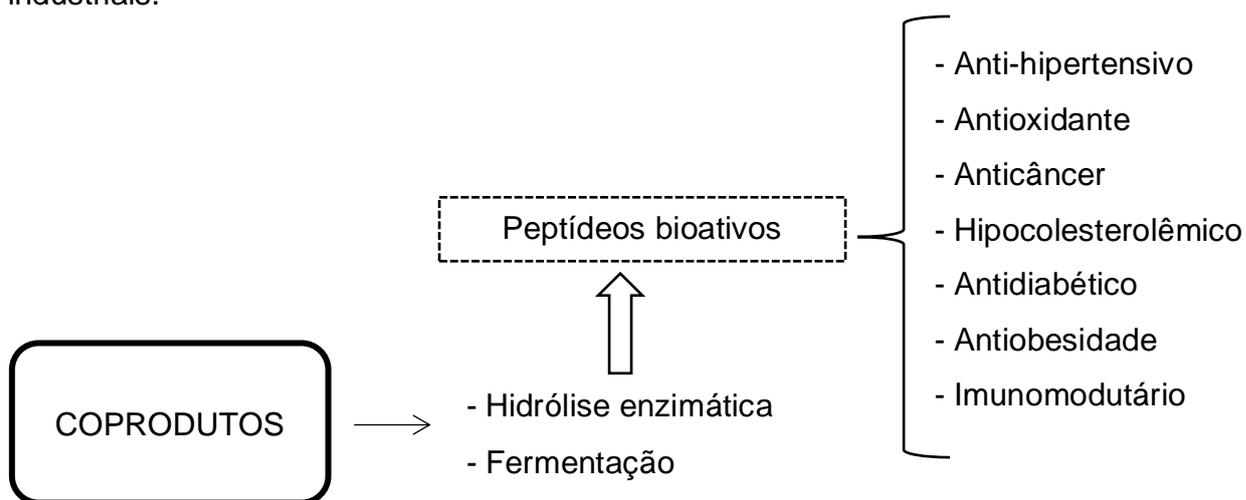


Figura 2.7 – Peptídeos bioativos obtidos a partir de coprodutos industriais
Fonte: Adaptado de Singh *et al.* (2014).

Algumas funções biológicas de peptídeos de coprodutos animal reportadas foram, ações anti-hipertensiva e antioxidante, como as mais estudadas. Outras bioatividades relatadas são antimicrobianas, imunomoduladores, promover redução lipídica, antitrombóticos e os anticancerígenos (AHMED & MUGURAMA, 2010; KIM *et al.*, 2012; MORA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015; MULLEN *et al.*, 2017; SÁNCHEZ & VAZQUEZ, 2017).

Diante desse cenário, fica evidente que os hidrolisados proteicos de coprodutos do processamento animal apresentam potencial para o uso fármaco, suplementação nutricional tanto para humanos quanto para animais (SÁNCHEZ & VAZQUEZ, 2017).

A bioatividade anti-hipertensiva de peptídeos refere-se ao controle da pressão arterial, alguns peptídeos são capazes de inibir a enzima conversora angiotensina I e convertê-la em angiotensina II, funcionando como vasoconstritor, na regulação da pressão sanguínea (AHMED & MUGURAMA, 2010). Os inibidores sintéticos como o captopril por vez, apresentam efeitos colaterais como tosse e erupções cutâneas. Ademais, a inibição da enzima conversora angiotensina pode favorecer a formação de bradicinina, atuando como mediadora do processo inflamatório agudo (SHARMA *et al.*, 2011; ESCUDERO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012), tornando portanto a exploração de peptídeos bioativos a partir de coprodutos um mercado potencial para exploração de moléculas bioativas.

Já a ação antioxidante se refere ao combate de radicais livres no organismo. Durante o processo de hidrólise, ao liberar essas moléculas da estrutura originária, a reação proporciona também a ação antioxidante no organismo, isto porque alguns aminoácidos atuam como doadores de prótons ou hidrogênio com carga positiva para reagir com elétrons sem par dos radicais livres, exercendo, assim, a referida ação (CHALAMAIAH *et al.*, 2012; GARCÍA-MORENO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; NAJAFIAN & BABJI, 2012).

Mendis *et al.* (2004) observaram atividade antioxidante mais elevada em hidrolisado proteico de pescado do que nos antioxidantes sintéticos α -tocoferol e hidroxianisol butilado, pelo método DPPH. Além disso, o interesse em explorar essa funcionalidade a partir de hidrólise em matérias-primas animais é devido ao pouco ou nenhum efeito colateral, enquanto que os antioxidantes sintéticos podem causar graves efeitos secundários.

Outra vantagem da bioatividade antioxidante desses peptídeos está relacionada à estabilidade e à vida de prateleira do produto, visto que esta ação retarda a oxidação lipídica, proporcionando a preservação e o aumento da vida útil (HERPANDI *et al.*, 2011; BERNARDI *et al.*, 2016).

Yu & Tan (2017) reportaram maior atividade antioxidante em hidrolisado de fígado suíno quando aplicado o pré-tratamento com equipamento ultrassônico até 30 segundos, demonstrando que as tecnologias utilizadas podem melhorar essa atividade.

A capacidade antimicrobiana dos peptídeos se deve ao poder inibitório de crescimento de microrganismos patogênicos (DI BERNARDI *et al.*, 2011; LAFARGA & HAYES, 2014). Essa funcionalidade demonstra-se importante para a integridade dos produtos elaborados, pois, ao repelir esses microrganismos, pode garantir a segurança alimentar e prolongar a vida útil (CRUZ *et al.*, 2014).

Przybylski *et al.* (2016) observaram melhoras na preservação de carnes quando utilizaram peptídeos com ação antimicrobiana. Produtos de origem animal, como coprodutos do processamento, frutos do mar e derivados do leite, são apontados como importantes fontes de peptídeos bioativos com função antimicrobiana (FALANGA *et al.*, 2016; MOHANTY *et al.*, 2016; PRZYBYLSKI *et al.*, 2016).

Gómez-Guilén *et al.* (2010) relataram que os peptídeos antimicrobianos podem ser utilizados na biopreservação natural para controlar a deterioração e a patogenicidade provocada por microrganismos.

Najafian & Babji (2012) estudaram que a maioria dos peptídeos antimicrobianos de peixe são antibacterianos ou bacteriostáticos, funcionando contra cepas Gram-negativas e Gram-positivas.

De acordo com Sharma *et al.* (2011), os peptídeos imunomoduladores são capazes de aumentar a resistência a certas bactérias, uma vez que, ao aumentar a atividade fagocítica dos macrófagos, estimula a imunidade inata. Ngo *et al.* (2012) ressaltam que organismos aquáticos marinhos apresentam elevada bioatividade imunomoduladora e são utilizados no tratamento de doenças. A ação imunomoduladora de peptídeos bioativos também foi reportada no tratamento de celíacos (JANAS *et al.*, 2016).

O aumento dos níveis de colesterol é um fator de risco para doenças coronárias e cardiovasculares, sendo apontadas bioatividades em peptídeos animais com capacidade de redução desses níveis (WU *et al.*, 2015).

A atividade antitrombótica de peptídeos apresenta-se por reduzir a incidência de doenças vasculares por meio da supressão de plaquetas formadoras de trombócito (WU *et al.*, 2015).

A aplicação na pecuária, têm como intuito aumentar a eficiência da utilização dos alimentos para a produção de leite, carne e ovos (WU *et al.*, 2015). Diante disso, os peptídeos obtidos por meio de hidrólise enzimática de proteínas vegetais e, principalmente animais, têm sido adicionados na dieta de suínos, aves, peixes e animais de companhia para a melhoria da saúde intestinal, crescimento e produção de desempenho. No entanto, a indústria alimentícia e farmacêutica tem buscado alternativas biotecnológicas para o desenvolvimento de novos produtos com ênfase em produtos bioativos, tanto para a alimentação humana quanto para animal. Na Figura 2.8 são apresentadas as principais vias de obtenção de peptídeos e ensaios de bioatividade.

Em geral, as bioatividades em peptídeos de coprodutos animal vislumbram a possibilidade de incorporação destes compostos em suplementos alimentares ou fármacos, com o intuito de prevenir ou no tratamento de doenças já instaladas, perfazendo uma importante fonte de promoção da saúde.

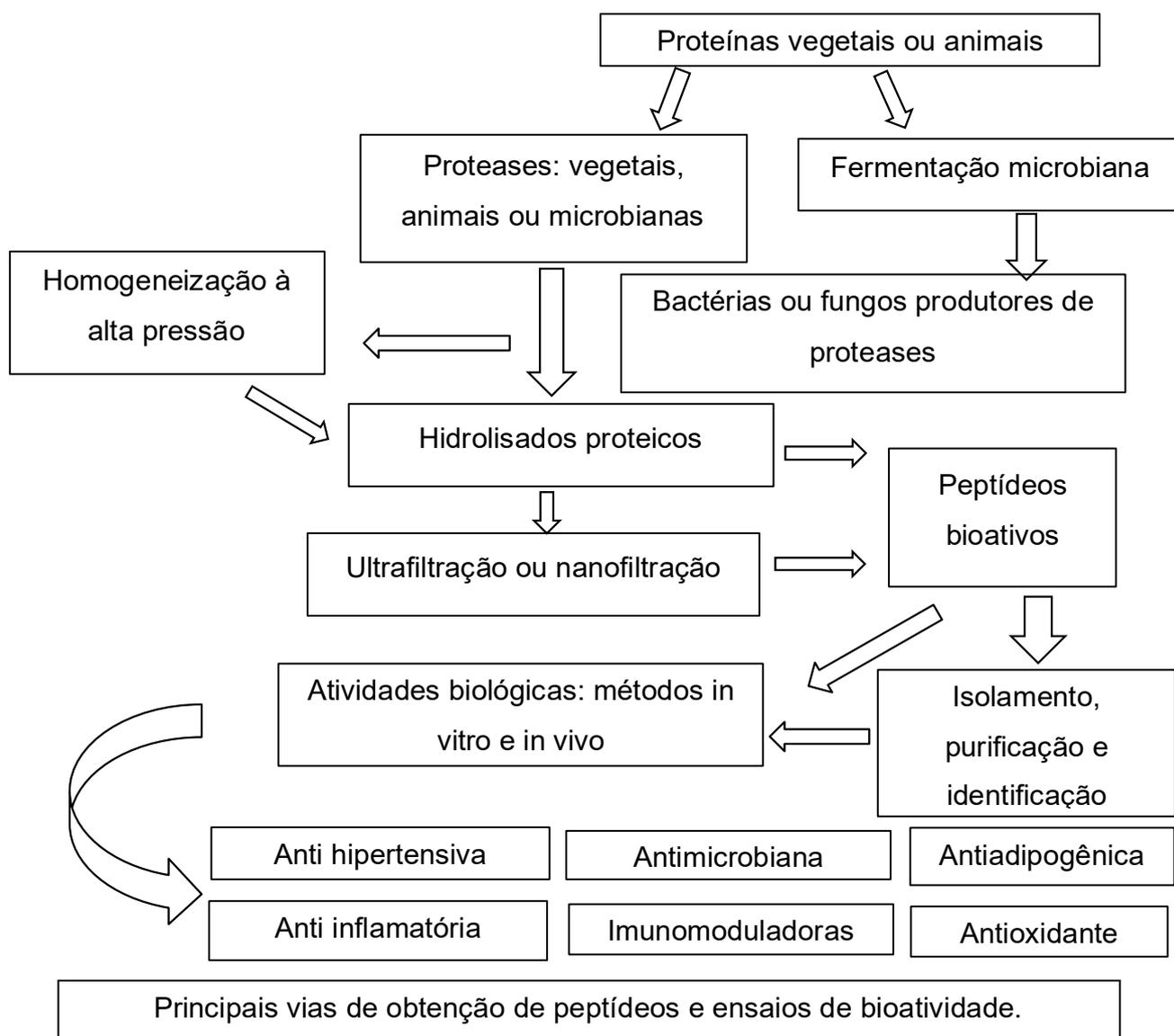


Figura 2.8 - Principais vias de obtenção de peptídeos e ensaios de bioatividade

Fonte: Adaptado de Castro (2015).

2.12 Usos comerciais de alguns produtos obtidos através de hidrólise enzimática

A Tabela 2.6 apresenta produtos de uso comerciais de hidrolisados enzimáticos proteicos a partir de diferentes matérias-primas em diversas áreas da indústria alimentícia e farmacêutica, e busca desta forma, mostrar o potencial de aplicação dos mesmos.

Como visto os hidrolisados proteicos e seus inúmeros benefícios à saúde humana podem ser incluídos como ingredientes em alimentos funcionais e/ou

em produtos farmacêuticos para melhorar a saúde humana e prevenir doenças, além de agregar valor à subprodutos de baixo valor comercial (GONZALESTELLO *et al.*, 1994; ZAREI *et al.*, 2014).

Tabela 2.6 - Uso comercial de diversos produtos obtidos através de hidrólise enzimática utilizadas em alimentação humana e animal

Matéria-prima utilizada	Produto comercial/marca	Biopeptídeos	Atividade	Local de comercialização
Peixe	Molval®	Ômega 3 + peptídeos bioativos	Proteção cardiovascular	França
	Fortiduum®	Ômega 3 a 6	Anti stress oxidativo	França
	Pro-protein®	Hidrolisado de colágeno marinho	Fortalecimento de unhas cabelo e regeneração de cartilagem	Reino Unido
	Calcium fish bones (MCHC) POWDER CAPSULES®	Hidrolisado de colágeno marinho	Fortalecimento dos ossos	Nova Zelândia
	Daonly®	Hidrolisado de colágeno marinho	Fortalecimento das articulações de animais	Espanha
	Vasotensin®	Hidrolisado de bonito seco	Ajuda as células do trato gastrointestinal e regula o intestino	Estados Unidos
Mexilhões	Greenshell mussel powder capsules®	Glicosaminoglicano marinho (GAG)	Fonte de ômega 3, anti-inflamatório, melhora das articulações	Nova Zelândia
	Greenshell mussel tablets for pets®	Glicosaminoglicano marinho (GAG)	Fonte de ômega 3, anti-inflamatório, melhora das articulações dos animais	
Tubarão	Shark Cartilage powder capsule®	Hidrolisado de cartilagem de tubarão	Fortalecimento do sistema imunológico melhora articulações	Nova Zelândia
Suíno	Gelamin®	Hidrolisado de colágeno suíno	Saúde da pele, unha e cabelos	Estados Unidos
Frango	Chicken Stemum Cartilage Collagen Type II®	Hidrolisado de cartilagem de frango	Saúde das cartilagens, tendões e ligamentos	Estados Unidos
	Chicken protein boullion®	Hidrolisado de proteína de frango	Crescimento de músculos, recuperação e regeneração	Inglaterra
Bovino	Muscle Wellness Beef Protein Hydrolysate®	Hidrolisado de proteína de carne	Crescimento de músculos, recuperação e regeneração	-
Levedura	Nutritional yeast seasoning®	Hidrolisado de levedura	Anti-hipertensivo	Estados Unidos
	Organic gourmet savoury spread european nutritional-yeast extract®	Hidrolisado de levedura	Anti-hipertensivo	Alemanha
Leite Azedo	Calpis®	Leite fermentado	Redução de pressão sanguínea	Japão

2.13 Estado da arte

Na Tabela 2.7 constam alguns dos estudos científicos realizados nos últimos oito anos advindos de hidrolisados enzimáticos proteicos relacionados a diversas matérias-primas com propriedades funcionais, bioativas e nutracêuticas. Foram selecionados os artigos na base de dados *Science Direct*, *Google Scholar* e *Scopus*, utilizando as palavras-chave: hydrolyzed, swine liver, porcine liver, os quais apresentaram relevância para a presente pesquisa.

Tabela 2.7 - Estudos sobre hidrolisados proteicos realizados nos últimos dez anos

Artigo	Título	Objetivo	Material	Enzimas	Condições de processo	Grau de Hidrólise e Peso molecular	Resultados	Autor
1	Dorso e escamas de peixe brema marinho como fonte de gelatina e peptídeos inibidores de Angiotensina –I ACE	Obter produtos de valor agregado do dorso e escamas de peixe brema marinho, obtidos como resíduos da indústria de processamento de peixe.	Escamas e dorso de Brema do Mar	Esperase	Tempo: 3h Temperatura: 60°C pH: 8,0	16,1 ±0,3%	Gelatinas com propriedades de gelificação razoáveis podem ser obtidos a partir de resíduos de Brema do Mar (escamas e ossos). A gelatina obtida pode ser uma fonte promissora para o isolamento de peptídeos com alta atividade inibitória de ACE.	Akagündüz <i>et al.</i> (2014)
2	Propriedades funcionais e antioxidantes de hidrolisados de sardinha (<i>S. pilchardus</i>) e cavala mackerel (<i>T. mediterraneus</i>) para a microencapsulação de óleo de peixe por <i>spray drying</i>	Estudar as propriedades funcionais e antioxidantes do hidrolisado proteico de peixe (FPH) para avaliar o potencial do uso para a microencapsulação de óleo de peixe.	Proteína muscular da sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>) e da cavala (<i>Trachurus mediterraneus</i>)	Alcalase 2.4 L® e Tripsina	Temperatura: 50 °C pH: 8,0	5 e 10%	Eficiência de microencapsulação de 98 ± 0,1% e estabilidade oxidativa para o óleo encapsulado por um período superior a doze semanas	Cano-Medina <i>et al.</i> (2015).
3	Isolamento, purificação e caracterização de frações peptídicas	Gerar frações contendo peptídeos bioativos com atividades antioxidantes	Fígado bovino	Termosilina	Tempo: 2 h Temperatura: 37°C		O subproduto da carne, como o fígado, pode ser utilizado como	Di Bernardini <i>et al.</i> (2011)

	antioxidantes de um hidrolisado de termolisina de proteína sarcoplasmática de fígado bovino	<i>in vitro</i> demonstradas de fígado bovino (<i>Bos taurus</i>), que normalmente é considerado como produto residual do processamento de carne			pH ótimo da enzima		matéria-prima para a geração de peptídeos bioativos com atividades antioxidantes demonstradas <i>in vitro</i> usando a enzima termolisina. É significativo, uma vez que apresenta uma oportunidade potencial para os processadores de carne usar seus fluxos de resíduos para a geração de peptídeos bioativos para o uso potencial de alimentos funcionais.	
4	Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente	Desenvolver diferentes hidrolisados liofilizados com alto valor proteico a partir da hidrólise enzimática de carcaças de frango manualmente desossadas (CMD)	Carcaça de frango manualmente desossada (CMD)	Papaína, Flavourzyme, Protamex	(E):(S) 1:250, pH 6,5, 60°C, 120 min, (E):(S) 1:250, pH 7,0, 60°C, 120 min, (E):(S) 1:250, pH 7,0, 60°C, 120 min,	Grau de hidrólise (GH): 43,19%, 20,25%, 51,31%	Os hidrolisados proteicos obtidos da carcaça manualmente desossada (CMD) de frango apresentaram alto conteúdo proteico, caracterizando-se como matéria-prima promissora na formulação de dietas especiais.	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
5	Avaliação da atividade físico-	Avaliar o efeito do sangue hidrolisado	Sangue suíno	Papaína	(E):(S)1:100 pH 6,5		Proteína hidrolisada de	Verma <i>et al.</i> (2017)

	química, antioxidante e antimicrobiana do hidrolisado de proteína de sangue suíno em emulsão suína sob condição de embalagem aeróbica em 4 ±1°C	suíno na estabilidade oxidativa lipídica e crescimento microbiano em emulsão suína.		6 horas 50°C	sangue suíno incorporada como antioxidante e agente antimicrobiano em emulsão de carne suína apresenta resultados encorajadores e promissores. Levando em consideração este estudo conclui que a oxidação lipídica e proliferação microbiana pode ser controlada com sucesso pela incorporação de proteína hidrolisada de sangue suíno em embalagem aeróbica e refrigerada de emulsão de carne suína.	
6	Capacidade antioxidante de tecido hidrolisado suíno	Examinar a capacidade antioxidante de hidrolisados obtidos de 7 diferentes tecidos suínos com alta variação na composição química.	cólon, apêndice, reto, pâncreas, coração, fígado e pulmão	Protamex Alcalase 2.4 L®	Todos os tecidos mostraram capacidade antioxidante com hidrólise de ambas as enzimas. Os diferentes mecanismos antioxidantes mostraram que os	Damgaard <i>et al.</i> (2014)

							vários tecidos também apontam para a vantagem de misturar os hidrolisados, que inibiria uma maior variedade de processos oxidativos.	
7	Propriedades andiabéticas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da Proteína de musculo hidrolisado do Verdinho (<i>Micromesistius poutassou</i>)	O estudo foi planejado para avaliar o potencial antidiabético da proteína de musculo hidrolisado do Verdinho	Verdinho (<i>Micromesistius poutassou</i>)	Alcalase 2.4 L® Flavourzyme 500L	(E):(S): 0,74% pH 7 4 horas 50°C (E):(S): 0,74% pH 7 4 horas 50°C	Grau de hidrólise 29,13 a 32,58%	Os resultados demonstraram que a proteína de músculo hidrolisado do Verdinho tem significativo efeito metabólito controle da glicose in vivo	Harnedy <i>et al.</i> (2018)
8	Um novo peptídeo antioxidativo derivado do hidrolisado de sangue coagulado de galinha	O sangue de frangos é um subproduto principal no processamento da indústria de carne, contém grande quantidade de proteína comestível. Coagulado de sangue constitui em torno de 40% do sangue e contém mais que a metade do total da proteína contida, a qual normalmente é subutilizada.	Sangue de frango	Papaína e Flavourzyme	(E):(S): 1,66 a 3,34% (E):(S): 1% pH 6 3,32-6,68 horas 41,59 – 58,41°C		Coagulado de sangue de frango é uma boa fonte para produzir peptídeos e hidrolisados antioxidativos, o qual pode ser usado como ingredientes promissor para formular alimentos funcionais.	Zheng <i>et al.</i> (2018)

2.14 Justificativa da pesquisa

Diante do exposto, verifica-se que há escassos estudos científicos que avaliam a produção de hidrolisado proteico empregando como matéria-prima fígado suíno e as enzimas proteases Alcalase 2.4 L® e a NovoPro-D®, e por este coproduto ser uma excelente fonte nutricional de proteínas, aminoácidos, assim como vitaminas, se faz necessário o desenvolvimento de processos que possam convertê-lo em novos produtos, explorando assim, o seu grande potencial. Para a indústria, a sua bioconversão por processos enzimáticos têm-se mostrado uma possibilidade viável, pois possibilita a geração de biopeptídeos que podem expressar atividades como a anti-hipertensiva, anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante entre outras, além de melhorar nas características funcionais do produto.

Assim, a presente pesquisa teve como motivação a possibilidade de promover um melhor aproveitamento do fígado suíno, por meio da bioconversão enzimática, haja visto que este processo apresenta enorme potencial de transformação para o aproveitamento tecnológico e nutricional deste coproduto, e também por ser uma alternativa viável e interessante para as agroindústrias.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos que foram utilizados na execução da parte experimental deste trabalho. Essa descrição envolve as etapas de desenvolvimento da pesquisa, técnicas, procedimentos, equipamentos e materiais necessários e conforme o fluxograma com o processo que será realizado.

O processo de obtenção do hidrolisado proteico seguiu as etapas apresentadas no fluxograma da Figura 3.1.

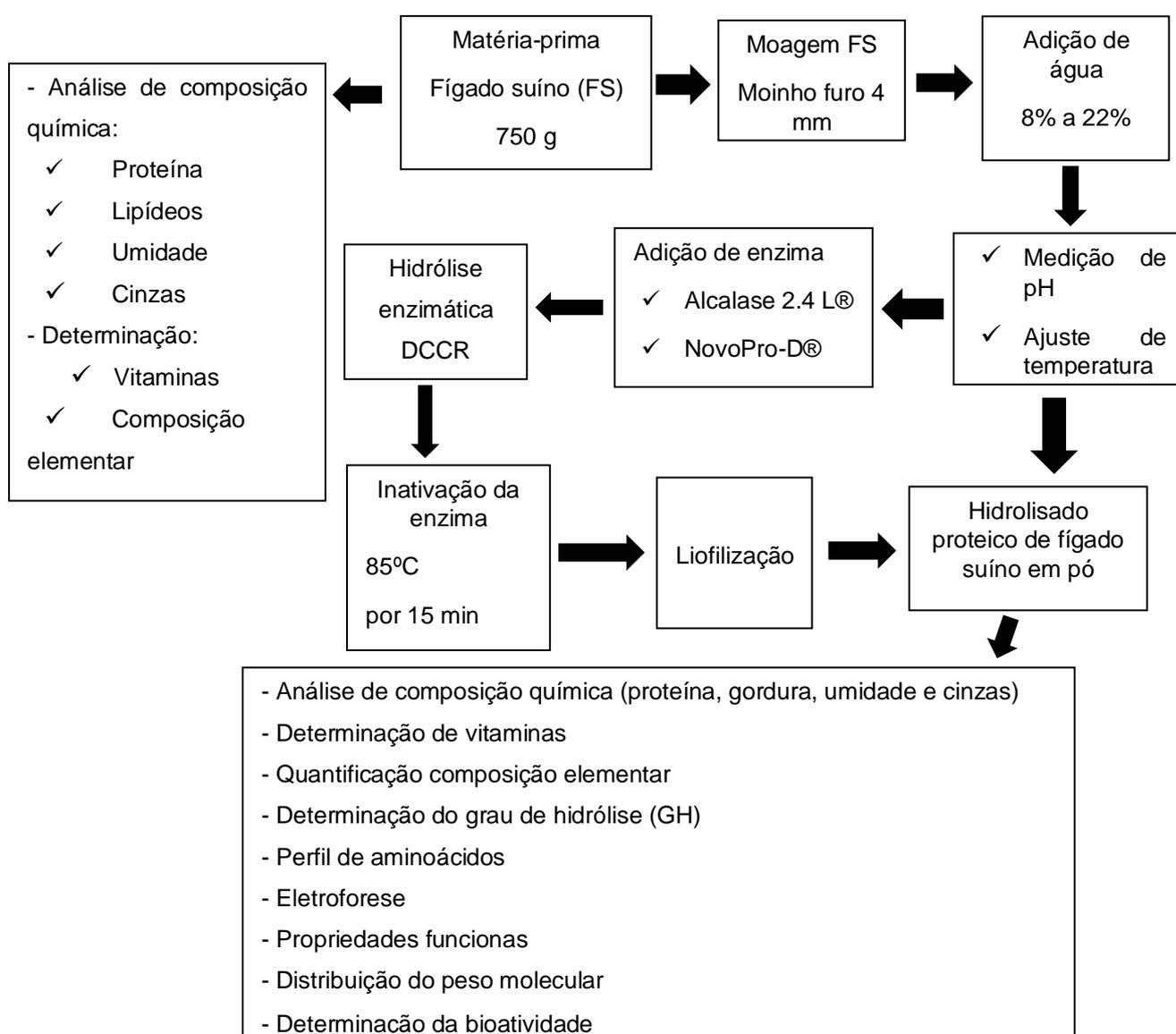


Figura 3.1 - Fluxograma de obtenção e caracterização do hidrolisado proteico de fígado suíno
Fonte: próprio autor.

3.1 Matéria-prima

O fígado suíno, utilizado como matéria-prima desta pesquisa foi cedido, gentilmente, pela empresa Brasil Food (Brf Food) – Unidade Toledo – PR, a coleta das amostras ocorreu após o abate, na fase de evisceração animal. O fígado usado é oriundo de animais da espécie WH (informações genéticas de propriedade da empresa), abatidos após 190 dias por injeção de dióxido de carbono, garantindo os princípios de bem-estar animal.

Sendo acondicionado em sacos de polietileno plásticos com capacidade para 20 kg e armazenado em freezer (-18 ± 1 C) até transportado sob refrigeração (2 ± 1 C) em caixas térmicas para o Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, localizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Campus Toledo - PR), para uso posterior.

Seguidamente, o fígado foi moído em moinho de eixo helicoidal com furo de 4 mm e homogeneizado, na sequência foi fracionado em embalagens plásticas de 750 g e armazenado sob congelamento ($-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) até a realização do processo de hidrólise.

3.2 Enzimas

As enzimas utilizadas nos processos hidrolíticos de fígado suíno foram a Alcalase 2.4 L® e a NovoPro-D® cedidas pela empresa Novozymes Latino Americana Ltd - PR. A Alcalase 2.4 L® é uma endopeptidase produzida a partir *Bacillus licheniformis* com atividade endógena, e a NovoPro-D® é uma protease alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* geneticamente modificado. As características de pH, temperatura e inativação das enzimas, as quais serviram de base para os parâmetros experimentais, estão apresentadas na Tabela 3.1, e foram retiradas das fichas técnicas das enzimas fornecidas pela empresa, sendo que as fichas técnicas se encontram no Anexo A.

Tabela 3.1 - Resumo das características das enzimas utilizadas no desenvolvimento dos hidrolisados de fígado suíno

Condições	Nome comercial	
	Alcalase 2.4 L®	NovoPro-D®
Origem	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
Faixa pH	6,0 – 8,5	6,0 – 9,0
Faixa Temperatura (°C)	50 – 70	50 – 65
Estado físico	Líquido	Líquido
Temperatura inativação (°C)	85	85
Tempo inativação (min)	15	15

Fonte: Adaptado Novozymes (2011).

3.3 Caracterização da matéria-prima e dos hidrolisados proteicos

O fígado suíno e os hidrolisados proteicos foram caracterizados em termos de proteína total (928,08) (MAPA, 1999; AOAC, 2016), umidade (950,46) (AOAC, 2016), matéria mineral (920,153) (AOAC, 2016) e lipídeos (991,36) (MAPA, 1999; AOAC, 2016). As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.1 Determinação de teor de proteína total

O teor de proteína total (% N) presente no fígado suíno foi determinado em tubos-Kjeldahl com solução digestora. Após, esta suspensão foi aquecida em bloco digestor de forma gradativa a partir de 50°C a cada 30 min, até que atingisse 450°C. Em um destilador de nitrogênio, realizou-se a destilação. O líquido coletado após destilado, foi então titulado com ácido sulfúrico 0,02 mol L⁻¹. O teor de nitrogênio presente nas amostras foi determinado a partir da Equação (3.1), e, convertido para porcentagem de nitrogênio conforme Equação (3.2), (MAPA, 1999; AOAC, 2016).

$$\% \text{ de Nitrogênio} = \frac{V N Fc 14 100}{Pa 1000} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

$$\% \text{ de Proteína bruta} = \% \text{ de Nitrogênio } 6,25 \quad \text{Eq. (3.2)}$$

Em que, V corresponde ao volume do titulado (mL), N a normalidade (g mL⁻¹), Fc o fator de correção e Pa é a massa da amostra (g).

3.3.2 Determinação da umidade

O fígado suíno foi seco em estufa de secagem por 72 h à 55°C, após este tempo, foram retiradas e resfriadas em dessecador (Equações 3.3 a 3.5). O valor da umidade foi determinado pela Equação (3.6) (AOAC, 2016).

$$P_s = P_a - P_{sec} \quad \text{Eq. (3.3)}$$

$$(\%) Pr = \frac{P_s \cdot 100}{P_a} \quad \text{Eq. (3.4)}$$

$$(\%) Ms = \frac{Msd \cdot (\%) (Pr)}{100} \quad \text{Eq. (3.5)}$$

$$\% \text{ Umidade} = 100 - (\%) Ms \quad \text{Eq. (3.6)}$$

Em que, Ps é o peso seco (g), Pa é o peso da amostra (g), Psec corresponde ao peso após secagem a 55°C (g), Pr é o peso pré seco (g), Ms é a matéria seca (g), Msd a matéria seca definitiva (g).

3.3.3 Determinação de matéria mineral

A matéria mineral foi determinada com auxílio de cadinhos secos a 105°C por 8h, em que as amostras foram acondicionadas em mufla à 550°C por 4h até queima total da matéria orgânica. Quantificou-se a matéria seca pela Equação (3.7) e a matéria mineral pela Equação (3.9) (AOAC, 2016).

$$\text{Msd} = \frac{(P105 - P_c) 100}{P_a} \quad \text{Eq. (3.7)}$$

$$\% \text{ de C} = \frac{(P550 - P_c) 100}{P105} \quad \text{Eq. (3.8)}$$

$$\% \text{ de CMnat.} = \frac{\% \text{ de C Msd}}{100} \quad \text{Eq. (3.9)}$$

Em que, P105 corresponde ao peso a 105°C em gramas, P550 ao peso a 550°C (g), P_c a massa do cadinho (g), C é as cinzas, CMnat cinzas da matéria *in natura* (%), e, Msd a matéria seca definitiva (g).

3.3.4 Determinação de lipídeos

O teor de lipídeos do fígado suíno e dos hidrolisados foi quantificado pelo sistema de extração de Soxhlet com éter etílico anidro (MAPA, 1999; AOAC, 2016).

3.3.5 Determinação de vitaminas do fígado suíno *in natura* e dos hidrolisados proteicos.

A análise de vitaminas do fígado suíno e dos hidrolisados proteicos foram realizadas no Laboratório EUROFINS localizado em Indaiatuba-SP, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.3.5.1 Vitamina A (retinol)

A vitamina A é liberada da amostra por hidrólise alcalina utilizando solução etanólica de hidróxido de potássio e extraída por três vezes com hexano: acetato de etilo (85:15 v/v) em np-HPLC com detecção UV/DAD (325 nm). Para cada

calibração foi utilizado compostos puros, pureza > 98% e determinou-se por medição espectrofotométrica (325 nm).

3.3.5.2 Vitamina B1 (tiamina)

Por meio de hidrólise ácida foi extraída a vitamina B1 com auxílio de uma autoclave e quantificou-se por rp-HPLC com detecção fluorimétrica (368 nm, 440 nm).

3.3.5.3 Vitamina B2 (riboflavina)

A vitamina B2 é obtido pela hidrólise ácida em autoclave e quantificada por rp-HPLC com detecção fluorométrica (468 nm, 520 nm). Os padrões de calibração utilizados foram compostos puros de Sigma, pureza > 98%.

3.3.5.4 Vitamina B9 (folato)

O folato incluindo o ácido fólico foi extraído com solução tampão, seguida de uma digestão enzimática com plasma humano e processo de digestão trienzimático, que consiste do tratamento seqüencial da matriz alimentícia com protease e α -amilase antes da adição da conjugase, em tratamentos em autoclave. Após a diluição com meio basal contendo todos os nutrientes de crescimento requeridos, exceto o ácido fólico, mediu-se de forma turbidimétrica a resposta ao crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) ao folato.

3.3.5.5 Vitamina B12

Usou-se uma solução tamponada em autoclave para a extração da vitamina B12. Em seguida, diluiu-se com meio basal (contendo todos os nutrientes de crescimento requeridos, exceto cobalamina), a resposta de

crescimento de *Lactobacillus leichmanii* (ATCC 7830) à cobalamina extraída foi medida de forma turbidimétrica.

3.3.5.6 Vitamina B5

Quantificou-se a vitamina B5 por Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC/MS/MS) com extração que emprega adição de acetato de amônio e para a purificação do extrato, ácido tricloroacético (TCA).

3.3.5.7 Vitamina B8 (biotina)

As amostras foram extraídas em água e adicionou-se a amilase para reduzir o teor de amido. Posteriormente, trataram-se as amostras em autoclave para liberar a biotina unida da proteína e desativar a amilase. Ajustou-se o pH para 6-8 e projetou-se o método de detecção como um teste de inibição. Em seguida, foi misturada a amostra com excesso de biotina para detectar molécula de anticorpos anti-biotina.

A molécula de detecção se liga à biotina na amostra e a molécula de detecção livre restante é medida pelo Biacore Q por interação com um chip de sensor de biotina. Biacore Q explora o fenómeno da ressonância plasmática de superfície (SPR) para detectar e medir a biotina. A quantidade de molécula de detecção livre está inversamente relacionada com a quantidade de biotina na amostra.

3.3.5.8 Vitamina B3 (niacina)

Com uma mistura de ácido nicotínico e amida nicotínica, extrai-se a niacina em 100°C. Ajustou-se o pH do extrato para 4,5, utilizando-se acetato de sódio, seguido por uma filtração. A quantificação foi em rp-HPLC com detecção flourométrica (322 nm, em 380 nm) posterior a oxidação pós coluna com íons de

peróxido de hidrogênio e Cu (II) ativados por radiação UV (365 nm). Para isso, utilizou-se como padrões de calibração compostos puros da Fluka (Pureza = USP). Por fim, determinou-se a concentração dos padrões por medição espectrofotométrica (260 nm) para cada calibração. O resultado foi expresso como a soma de ácido nicotínico e nicotina em meio.

3.3.6 Composição elementar química

A concentração dos elementos químicos presentes no fígado suíno e nos hidrolisados proteicos foi determinada a partir da técnica analítica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), utilizando o equipamento Bruker, Modelo: S2 PICOFOX do PEQ/UNIOESTE, a partir de uma fonte de molibdênio incidindo raios X sobre a amostra com energia de 20 keV durante 1000 s, conforme Espinoza-Quiñones *et al.* (2015).

As amostras liofilizadas de fígado suíno e hidrolisadas foram pesadas na quantidade de 30 mg e adicionadas ao tubo Falcon com capacidade de 4 a 5 mL com tampa de rosca externa, possuindo fundo cônico. Posteriormente adicionou-se 2,5 mL de triton 1% e 10 μL de gálio (1000 mg L^{-1}). Em seguida, a mistura foi disposta em um disco refletor de quartzo devidamente preparado. Para a fixação das amostras nos discos de quartzo, foram pipetados 5 μL de solução de silicone em isopropanol no centro do disco e, em seguida, 5 μL da amostra, seguido de secagem a temperatura ambiente por 24 horas. Com posterior leitura no equipamento já descrito.

3.4 Processo de obtenção do hidrolisado proteico de fígado suíno

3.4.1 Delineamento Composto Central Rotacional: Enzima/Proteína e Proteína/água

Após análise detalhada do processo e informações a partir da revisão bibliográfica, foi possível determinar as variáveis independentes a serem estudadas, as faixas de estudos de cada uma delas e as respostas de interesse.

No estudo do processo de hidrólise enzimática para obtenção de hidrolisado proteico de fígado suíno, utilizou-se a ferramenta planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), com quatro pontos fatoriais (níveis ± 1), 3 pontos centrais (nível 0) e quatro pontos axiais (níveis $\pm \sqrt{2}$), totalizando 11 experimentos para cada uma das enzimas utilizadas.

Como variáveis independentes foram avaliadas: Fator 1 (F1): relação proteína:água (p/p) e Fator 2 (F2): relação enzima:proteína (p/p). A variável resposta pretendida em ambos os planejamentos, foi o grau de hidrólise (GH). Os níveis das variáveis utilizadas em cada planejamento, para as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® estão dispostos na Tabela 3.2 e os valores reais e codificados na Tabela 3.3.

Os níveis estudados para as variáveis independentes do planejamento experimental foram baseados em condições já utilizadas por diferentes pesquisadores com matérias-primas cárneas (ROMAN & SGARBIERI, 2005; SCHMIDT, 2008), sendo assim estabelecido as condições a serem utilizadas nas hidrólises do fígado suíno, uma vez que, há um número muito restrito de pesquisas científicas relacionadas ao fígado suíno como matéria-prima.

Tabela 3.2 - Níveis e valores reais das variáveis admitidas no planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) com 4 pontos axiais para as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®

Variável	Unidade	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Fator 1 – Proteína:água	(%)	8	10	15	20	22,1
Fator 2 – Enzima:proteína	(%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7

Tabela 3.3 - Matriz do planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) com 4 pontos axiais para as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, com valores reais e codificados para suas variáveis

Ensaio	Variáveis			
	Fator 1 – Proteína:água (%)		Fator 2 – Enzima:proteína (%)	
	Reais	Codificados	Reais	Codificados
1	10	-1	0,5	-1
2	20	1	0,5	-1
3	10	-1	1,5	1
4	20	1	1,5	1
5	8	-1,41	1	0
6	22	1,41	1	0
7	15	0	0,3	-1,41
8	15	0	1,7	1,41
9	15	0	1	0
10	15	0	1	0
11	15	0	1	0

Para o sistema de dois fatores (F1 e F2), a equação polinomial (Equação 3.10) é representada pelo grau de hidrólise de proteínas (variável dependente) em função dos termos dos efeitos lineares e quadráticos, em que Y é a resposta prevista, b₀ é a interceptação, b₁ e b₂ são os termos lineares e b₁₁ e b₁₂ são os termos quadráticos. Y₁ é o DH para a enzima Alcalase 2.4 L® e Y₂ para NovoPro-D®.

$$Y = b_0 + b_1F_1 + b_2F_2 + b_{11}F_1^2 + b_{12}F_2^2 + b_{12}F_1F_2 \quad \text{Eq. (3.10)}$$

Salienta-se que os valores reais para os níveis de cada variável independente foram representados pelos fatores, definidos a partir de pesquisas na literatura sobre matérias-primas de carne (ROMAN & SGARBIERI, 2005; SCHMIDT, 2008; SCHMIDT & SALAS-MELLADO, 2009). Dessa forma, a quantidade de água adicionada ao meio de reação de hidrólise foi calculada a partir das Equações (3.11) e (3.12).

$$Aa (g) = \frac{Pb (g) MP (\%)}{F1} - \frac{Pb (g) MP (\%)}{100\%} \quad \text{Eq. (3.11)}$$

$$Ta (g) = Aa (g) + \frac{MP (g) U (\%)}{100\%} \quad \text{Eq. (3.12)}$$

Em que, Aa corresponde à adição da água em gramas, Pb proteína bruta (g), MP matéria-prima (g), Ta total de água (g), e, U corresponde a umidade (%).

3.4.2 Ensaios para otimização do processo de hidrólise

Após a obtenção da melhor resposta de grau de hidrólise para cada enzima, e também com a avaliação estatística do planejamento, foram realizados ensaios individuais fixando a proporção enzima:proteína ou a relação proteína:água, de forma a obter uma condição otimizada para posterior desenvolvimento da cinética da hidrólise.

Primeiramente, foram selecionados os valores com maior grau de hidrólise obtidos nos processos hidrolíticos utilizando as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, conforme o planejamento experimental (item 3.4.1). Posteriormente, o experimento foi conduzido em duas etapas: primeiro foi fixado a relação proteína:água e variou-se a concentração de enzima; a partir do melhor resultado desta primeira etapa, fixou-se a concentração de enzima:proteína, e variou-se a proporção de proteína:água. As condições experimentais utilizadas para a reação proteína:água e proporção enzima:substrato, são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Condições experimentais utilizadas para otimização da relação proteína:água e enzima:substrato

Ensaio	Proteína:água (%)	Enzima:proteína (%)
1	20	0,5
2	20	1,0
3	20	1,5
4	20	2,0
5	20	3,0
6	20	6,0
7	22	0,5
8	22	1,0
9	22	1,5
10	22	2,0
11	22	3,0
12	22	6,0
13	24	0,5
14	24	1,0
15	24	1,5
16	24	2,0
17	24	3,0
18	24	6,0
19	26	0,5
20	26	1,0
21	26	1,5
22	26	2,0
23	26	3,0
24	26	6,0

3.4.3. Fluxograma da hidrólise do fígado suíno

A proteína presente no fígado se encontra na forma *in natura*, composta por peptídeos de cadeia longa com elevado peso molecular. Com o intuito de se obter peptídeos de cadeia curta e com propriedades bioativas, foi realizado o processo de hidrólise desta proteína por via enzimática. As condições experimentais, utilizadas nesta etapa, seguiram as condições de processo dentro das faixas adequadas das enzimas indicadas pelo fabricante e obedecendo ao planejamento experimental proposto (item 3.4.1 e 3.4.2), para a obtenção de diferentes graus de hidrólise e peptídeos de vários tamanhos.

A hidrólise foi realizada com 750 g de matéria-prima, em seguida, adicionou-se 20% de água para o processo com Alcalase 2.4 L® e 22% para a

NovoPro-D®, homogeneizou-se a mistura e transferiu-a para um reator de vidro (Figura 3.2) de parede dupla, o qual encontra-se conectado a um banho termostaticado.

O pH e a temperatura empregados nas hidrólises foram selecionados a partir da faixa de melhor atividade das enzimas (Tabela 3.1) (DAMGAARD *et al.*, 2014; CANO-MEDINA *et al.*, 2015; HARNEDY *et al.*, 2018), e considerando a aplicação na indústria, ou seja, não havendo a correção do pH, com o intuito de minimizar o acréscimo de produtos químicos no processo, facilitando a transição para escala industrial e redução do impacto ao meio ambiente. E ainda, uma temperatura branda, para não ocasionar perdas, como desnaturação das proteínas e perda de aminoácidos formados durante a hidrólise.

Desta forma ajustou-se a temperatura, fixando em 64 °C, para as reações com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, respectivamente. E o pH dentro da faixa de 6,2 - 6,4. O processo foi conduzido sob agitação constante de 600 rpm, por meio de um agitador do tipo eixo-hélice. Depois de atingidas as condições estabelecidas acima, adicionou-se a enzima Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, conforme condições descritas na Tabela 3.1. O planejamento foi realizado conforme os itens 3.4.1 e 3.4.2 e monitorou-se a reação no tempo pré-estabelecido, item 3.4.4.

Em seguida, inativou-se a enzima em banho maria a uma temperatura de 85°C por um período de 15 minutos. A proteína hidrolisada foi separada em amostras, onde para realização de proteína solúvel e grau de hidrólise as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante congelado (-18 °C) até a data das realizações das análises e a amostra para o processo de liofilização, foi mantida integral.

Para medição de pH e controle de temperatura foram utilizados um pHmetro de bancada e termômetro digital para alimentos tipo espeto. Para a pesagem dos ingredientes e aditivos foi utilizada uma balança semi-analítica digital.



Figura 3.2 - Reator utilizado na hidrólise enzimática de fígado suíno

Fonte: próprio autor.

3.4.4 Cinética enzimática do hidrolisado de fígado suíno

A partir da obtenção da condição otimizada de enzima: proteína e proteína:água, conforme Tabela 3.4 realizou-se a cinética enzimática com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®. Nos ensaios cinéticos, para ambas as enzimas avaliadas, utilizou-se uma quantidade de 2 kg de fígado suíno, e o processo de hidrólise enzimática procedeu-se conforme já apresentado no fluxograma (Figura 3.1). Sendo o tempo de hidrólise para cada enzima, fixado em 10 horas de reação. Sendo que, ao longo deste tempo foram retiradas amostras na primeira hora nos tempos de: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutos e após 1 hora a cada 60 minutos até completar 8 horas e congeladas para análises posteriores.

3.4.5 Determinação do grau de hidrólise (GH)

O processo de hidrólise foi quantificado por meio da determinação do grau de hidrólise, definido por Adler-Nissen (1986) como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas. Para tanto, foi determinada a proteína solúvel (PS) dos hidrolisados de fígado suíno.

Amostras de fígado suíno hidrolisado foram descongeladas e centrifugadas em uma rotação de 2600 rpm em uma centrífuga (Excelsa Baby). Em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético 20 % (TCA) na proporção de 1:1 (agente precipitante) e mantidas em repouso por 30 min. Posteriormente, as

amostras foram filtradas com o auxílio de uma bomba a vácuo, utilizando papel filtro Whatman nº (40).

O sobrenadante obtido, foi então utilizado para determinar a PS pelo método de Lowry *et al.* (1951), fazendo uso da metodologia descrita por Hoyle & Merrit (1994) e por Baek & Cadwallader (1995) com modificações, sendo a leitura das amostras realizada em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, modelo Spectronic 200E) em absorvância de 750nm, e resultado expresso em miligramas de albumina. O grau de hidrólise (GH) foi determinado conforme Equação (3.13) a qual faz a relação entre a proteína total (Pt) presente inicialmente na matéria- prima, com a proteína solúvel (Ps).

$$\% \text{ GH} = \frac{Ps \text{ (mg)} 100(\%)}{Pt \text{ (mg)}} \quad \text{Eq. (3.13)}$$

3.5 Liofilização

Para a liofilização das amostras de fígado suíno e dos hidrolisados fez-se o congelamento a -18 °C e liofilização em equipamento Labconco, FreeZone 6, EUA em pressão absoluta menor que 0,5 mBar, temperatura de aquecimento de 40 °C por 24 h.

3.6 Determinações analíticas para quantificação dos produtos formados durante a cinética enzimática

3.6.1 Determinação de aminoácidos por HPLC

Para a determinação do aminograma do fígado suíno e dos hidrolisados proteicos utilizou-se a metodologia de derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato PITC, formando os PTC aminoácidos, sendo estes quantificados em 30min por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em

fase reversa, utilizando um detector de ultravioleta em comprimento de onda de 254nm.

Para tanto, calculou-se a massa a ser hidrolisada em função do teor de proteína bruta (%PB) na amostra, pesou-se a massa em um tubo de hidrólise, adicionou-se 9 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 N com 3 % m/v de fenol, fez-se vácuo no tubo, sendo o mesmo lacrado e adicionado em bloco de reação térmica. A hidrólise ocorreu por 24 h a 110°C.

Em seguida, acrescentou-se uma alíquota do padrão interno AAAB e diluiu-se conforme volume tabelado por Walters Martins. Filtrou-se uma alíquota, seguindo a tabela de diluição, a qual foi seca a 70miliTorr em sistema trapp com nitrogênio criogênico. Neutralizou-se com uma solução 4:4:2 de acetato de sódio trihidratado 0,2 N, metanol grau HPLC e trietilamina a 99-100%, secou-se novamente, a 70miliTorr em sistema trapp com nitrogênio criogênico. Nesta etapa, adicionou-se o PITC para derivatizar os aminoácidos liberados pela hidrólise, formando-se o PTC aminoácido.

No tubo contendo os cristais de aminoácidos derivatizados, adicionou-se 500 µL de diluente. A detecção foi a 254 nm por cromatografia em fase reversa, com loop de injeção de 30 uL e pH 6,40, em gradiente linear binário com fluxo de (1mL.min⁻¹ e temperatura da coluna 58°C), sendo o eluente A um tampão de acetato de sódio 0,14 N, acetonitrila (240 mL 2000mL⁻¹ de acetato de sódio 0,14 N) e trietilamina (1 mL 2000mL⁻¹ de acetato de sódio 0,14 N). E o eluente B uma solução 6:4 de acetonitrila (grau HPLC) e água milli-Q. A quantificação foi realizada por inclusão do ácido a-aminobutírico AAAB como padrão interno, este procedimento seguiu a metodologia proposta por White *et al.* (1986) e Hagen *et al.* (1989).

3.6.2 Metodologia para determinação do aminoácido triptofano por espectrofotometria

Para quantificar o aminoácido triptofano do fígado suíno e do hidrolisado foi utilizada a metodologia de espectrofotometria. Primeiramente, foi realizada a

trituração da amostra em moinho refrigerado a (20°C), pesou-se de acordo com o teor esperado, foi transferida a massa pesada para os tubos da centrífuga. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas com solução de pancreatina a 45°C por 24 horas.

Posteriormente, diluiu-as em solução contendo ácido diamino benzaldeído em meio de ácido sulfúrico (H₂SO₄), deixou-se em repouso ao abrigo de luz durante 6 horas. Após, adicionou-se uma solução de nitrito de sódio e foi mantido por mais 30 minutos ao abrigo de luz. Por fim, as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda 590 nm.

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e mercaptoetanol

Este procedimento foi realizado conforme metodologia de Laemmli (1970), para as amostras de hidrolisados de 1 e 4 h. O tampão do sistema Tris-HCl-glycine variou de 4 a 17% Tris-tricine gradiente gel. As amostras (5 µL) foram dissolvidas em (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol L⁻¹ de Tris-HCl a pH 6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e aquecidas por 5 min. A eletroforese foi conduzida utilizando Mini PROTEAN 3 Cell electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 200 V com tampão (3 g L⁻¹ de Tris-base, 14 g L⁻¹ de Glicina e 1 g L⁻¹ de SDS). After eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R- 250 e descorados em uma solução com 50% de metanol e 10% de ácido acético. Utilizou-se o marcador Imw da GE, com faixa de peso molecular entre 14,4 e 97 kDa foi usado como controle.

3.8 Determinação das propriedades funcionais do hidrolisado proteico de fígado suíno

As propriedades funcionais ou funcionalidades foram identificadas em amostras coletadas em 1 e 4 horas de hidrólise.

3.8.1 Capacidade de absorção de água e óleo

As capacidades de absorção de água ($CA_{\text{água}}$ (%)) e óleo ($CA_{\text{óleo}}$ (%)) foram determinadas pela metodologia de Köhn *et al.* (2015), com adaptações. Considerando o conteúdo de água ou óleo absorvido pelo concentrado proteico, conforme as Equações (3.14) e (3.15) em g de água ou óleo absorvidos por 100 g (%) de concentrado proteico (amostras).

$$CA_{\text{água}}(\%) = \frac{Aa \text{ (g)}}{Pia \text{ (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. (3.14)}$$

$$CA_{\text{óleo}}(\%) = \frac{O_{\text{abs}} \text{ (g)}}{Pia \text{ (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. (3.15)}$$

Em que, Aa corresponde a água absorvida (g), Pia é o peso inicial da amostra, O_{abs} refere-se ao óleo absorvido.

3.8.2 Capacidade de formação e estabilidade de emulsão

A capacidade de formação de emulsão ($CF_{\text{Emulsão}}$) e a estabilidade de emulsão ($E_{\text{Emulsão}}$) foram identificadas conforme metodologia descrita por Cano - Medina *et al.* (2011), com adaptações. Em tubo graduado tipo Falcon de 50 mL com 3,0 g de amostra com óleo de milho.

Verifica-se o ponto de formação da emulsão pela fase contínua e homogênea. Para tanto, considera-se o conteúdo de óleo de milho adicionado e

o volume da camada emulsionada, para determinar a porcentagem de $CF_{emulsão}$ seguindo a Equação (3.16).

$$CF_{emulsão}(\%) = \frac{P_{tfe} (g)}{P_{ia} (g)} \times 100 \quad \text{Eq. (3.16)}$$

Sendo, P_{tfe} o peso total após a formação da emulsão (g) e P_{ia} o peso inicial da amostra.

Após a verificação do ponto de emulsificação, averiguou-se a $E_{Emulsão}$, pelo volume da camada emulsionada centrifugada, determinou-se a porcentagem de $E_{Emulsão}$ pela Equação (3.17).

$$E_{emulsão}(\%) = \frac{V_{ce}(mL)}{V_{tac} (mL)} \times 100 \quad \text{Eq. (3.17)}$$

Em que, v_{ce} trata do volume da camada emulsionada (mL) e v_{tac} corresponde ao volume total antes da centrifugação (mL).

3.8.3 Capacidade de formação e estabilidade de espuma

De acordo com a metodologia adaptada de Mohanty *et al.* (1988), identificou-se a capacidade de formação de espuma (CF_{Espuma}). O resultado foi expresso em porcentagem de CF_{Espuma} , conforme Equação (3.18).

$$CF_{espuma}(\%) = \frac{V_{fe} (mL)}{V_{id} (mL)} \times 100 \quad \text{Eq. (3.18)}$$

Visto que, v_{id} refere-se ao volume inicial da dispersão (mL) e v_{fe} é o volume final de espuma (mL).

Para determinação da estabilidade da espuma (E_{espuma}) empregou-se o método proposto por Ahmed & Schmidt (1979) adaptado, determinado pela Equação (3.19) expresso em porcentagem de E_{Espuma} .

$$E_{espuma}(\%) = \frac{V_{60} (mL)}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \times 100 \quad \text{Eq. (3.19)}$$

Em que, **V60** é o volume da espuma (mL) após 60 min e **V_{id}** refere-se ao volume inicial da dispersão (mL).

3.8.4 Análise do comportamento reológico

As amostras de hidrolisado proteico oriundas de fígado suíno para ambas as enzimas em 1 e 4 horas foram avaliadas quanto ao comportamento reológico baseado em Santos *et al.* (2017).

Empregou-se um viscosímetro DV-III Ultra (Brookfield, Middleboro), acoplado com um banho termostático (TC-602, Brookfield) e o programa computacional Rheocalc V33 (Brookfield).

Para as análises empregaram-se as temperaturas 20, 35, 50 e 65 °C numa rampa ascendente e descendente de 9 velocidades (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 rpm).

As amostras hidrolisadas com a enzima Alcalase 2.4 L® foram analisadas com o spindle SC4-34 e as da NovoPro-D® com o spindle SC4-25. Cada velocidade foi mantida por 3 min, sendo que ao final desses 3 min foram coletados os dados da viscosidade aparente, tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento para plotagem dos reogramas.

3.9 Análise estatística dos planejamentos experimentais

A influência dos fatores proteína: água (F1) e a concentração de enzima: proteína (F2), foram avaliadas estatisticamente, submetendo os resultados à análise de efeitos, verificação das suas interações. Superfície de resposta, validação do modelo ao nível de 5% de significância, análise de variância (ANOVA) e teste F (BARROS *et al.*, 2010; RODRIGUES & IEMMA, 2014). Para tanto, utilizou-se o *software* STATISTICA™ (versão 10.0, Statsoft, Inc.).

3.10 Distribuição da massa molecular

A análise para determinação da distribuição da massa molecular dos peptídeos formados nos hidrolisados proteicos de fígado suíno, foram realizadas pelo Laboratório de Química de Carboidratos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal do Paraná, Campus Curitiba-PR.

Para tanto, 10 mg da amostra dos peptídeos foi dissolvida em 0,5 mL de D₂O e centrifugadas à 13000 rpm, o sobrenadante foi utilizado para a análise de Ressonância Magnética variando de ¹H à 600MHz na temperatura de 303K, pulso de 90° e tempo para relaxação de 2s e 8 transientes para se obter um espectro de 2D DOSY.

As massas moleculares foram obtidas por curva padrão de DOSY com substâncias de massa molecular (PM) conhecida (ACETONA), os volumes das correlações de ¹H RMN e Log D foram obtidos dos espectros de DOSY processados no software *mestReNova 6.1.1* (Mestre Lab research S.L) e quantificados no software *Topspin 3.2* (Bruker GmbH). Os resultados foram tabulados na forma de percentual relativo e massa molecular.

3.11 Determinação de atividades biológicas

As atividades biológicas foram identificadas em amostras coletadas em 1 e 4 horas de hidrólise, e, realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)-SP.

3.11.1 Propriedades antioxidantes

3.11.1.1 Capacidade de redução de radicais DPPH

A atividade antioxidante dos diferentes hidrolisados proteicos oriundos de fígado suíno, foram avaliadas pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), de acordo com o descrito por Bougatef *et al.* (2009).

Alíquotas do hidrolisado na concentração de 5 mg mL⁻¹ foram misturadas com 0,5 mL de etanol (99,5%) e 0,125 mL do radical DPPH (0,02%) em etanol (99,5%). A mistura foi mantida durante 60 min a temperatura ambiente e na ausência de luz.

As amostras foram lidas em espectrômetro a 517 nm, para quantificar a redução do radical DPPH, os quais foram expressos em μmol de Trolox equivalente por grama de amostra ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$).

3.11.1.2 Capacidade sequestrante do radical ABTS

A quantificação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos utilizando o radical ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re *et al.* (1999).

Alíquotas de 20 μL das amostras (5 mg mL⁻¹) foram adicionadas a 2 mL da solução do radical ABTS (7 mM). As misturas reacionais foram incubadas (ausência da luz e temperatura ambiente) por 6 min e a absorbância determinada a 734nm. Os valores finais de atividade antioxidante foram expressos em μmol de Trolox equivalente por grama de amostra ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$).

3.11.1.3 Poder redutor do íon ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), foi desenvolvida baseado em Benzie *et al.* (1996).

Para tanto, empregou-se solução tampão acetato (0,3 M e pH 3,6), solução padrão de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) (10 mM) e cloreto férrico (0,02 M).

A análise consistiu na mistura de 0,1 mL de cada amostra e 1 mL da solução FRAP, com posterior incubação em banho termostático na temperatura de 37°C durante 15 min. Em seguida, as absorbâncias foram medidas a 593 nm. Os valores finais de atividade antioxidante foram expressos em μmol de Trolox equivalente por grama de amostra ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$).

3.11.2 Propriedades anti-hipertensivas

A determinação da atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados proteicos foi realizada em função da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) de acordo com o método descrito por Siow & Gan (2013).

Alíquotas de 50 μL das amostras em diferentes concentrações (0,10, 0,25 e 0,50 mg mL^{-1}) foram misturadas com 50 μL de solução de ECA (50 mU mL^{-1}). As misturas reacionais foram incubadas a 37°C por 10 min para aclimação.

Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 150 μL do substrato hipuril-histidil-leucina (4,15 mM) em tampão borato (100 mM, pH 8,3) contendo NaCl (0,3 M) e as misturas reacionais foram incubadas a 37°C durante 30 min. A reação foi paralisada mediante a adição de 500 μL de HCl (1M).

A extração de ácido hipúrico proveniente da ação da ECA sobre o substrato hipuril-histidil-leucina foi realizada pela adição de 1,5 mL de acetato de etila, agitação em vórtex por 1 min e repouso por 5 min. Alíquotas de 800 μL das amostras de acetato de etila contendo ácido hipúrico foram transferidas para tubos de centrífuga de 2,0 mL e secos em um concentrador à vácuo durante 30 min a 45°C. Após a secagem, o resíduo resultante foi solubilizado em 1,0 mL de água deionizada e agitado em vórtex até completa dissolução. A concentração de ácido hipúrico foi determinada a 228 nm utilizando espectrofotômetro.

A reação controle foi preparada pela adição de 50 µL de água deionizada em substituição às amostras de proteínas. O potencial anti-hipertensivo das amostras foi expresso em função da inibição percentual da atividade de ECA como descrito pela equação (3.20).

$$\text{Inibição ECA (\%)} = \frac{(\text{AbsCN} - \text{AbsA}) \times 100}{\text{AbsCN}} \quad \text{Eq. (3.20)}$$

Em que, AbsCN é a absorbância do controle negativo e AbsA, a absorbância das amostras.

3.11.3 Propriedades antidiabéticas

As propriedades antidiabéticas dos diferentes hidrolisados proteicos foram avaliadas por meio da inibição das enzimas α-amilase e α-glicosidase e foi determinada como descrito por Ngoh & Gan (2016) e Apostolidis *et al.* (2007), com modificações.

Para a avaliação da inibição da atividade, as soluções enzimáticas de α-amilase de *Aspergillus oryzae* (Sigma Aldrich) e α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich) foram previamente preparadas com os diferentes hidrolisados proteicos. O controle positivo das reações foi realizado mediante a substituição dos hidrolisados proteicos por água destilada.

Para a determinação da atividade de α-amilase, alíquotas de 500 µL das soluções de hidrolisados em diferentes concentrações (5 e 10 mg mL⁻¹) contendo a enzima α-amilase foram adicionadas de 500 µL de solução de amido solúvel (1% m/v), previamente preparado em tampão acetato (50 mM) pH 5,0.

As misturas reacionais foram incubadas durante 30 minutos a 50°C e as reações foram paralisadas pela adição de 1 mL de solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). A atividade de α-amilase foi calculada em função dos açúcares redutores totais determinados pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para

liberar 1 μmol de glicose por mL de mistura reacional, por minuto nas condições de reação. Os resultados foram apresentados como inibição percentual em relação ao ensaio controle (100% de atividade).

A inibição de atividade enzimática de α -glicosidase foi determinada usando a metodologia descrita por Apostolidis *et al.* (2007), com modificações. A análise foi realizada utilizando uma microplaca de 96 poços e a reação foi conduzida utilizando um leitor de microplacas.

A mistura reacional consistiu na adição de 50 μL da solução tampão fosfato (100 mM, pH 6,9) nos poços designados ao branco e de 50 μL da solução de hidrolisado proteico em diferentes concentrações (5 e 10 mg mL^{-1}) em tampão fosfato (100 mM, pH 6,9) nos poços designados a cada amostra. Em seguida, a cada poço de microplaca, foram adicionados 50 μL de substrato (solução de p -nitrofenil- α -D- glicopiranosídeo na concentração de 5 mM) e 100 μL da solução enzimática (0,1 U mL^{-1}). A reação foi conduzida a 37°C durante 5 min e as leituras realizadas a 405 nm. Os resultados foram apresentados como inibição percentual em relação ao ensaio controle (100% de atividade).

3.11.3 Ferramentas estatísticas

Os resultados (item 3.11) foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, realizado com auxílio do software Statistica, Tibco Software (EUA). As análises foram realizadas com no mínimo três replicatas e os resultados expressos como média aritmética e considerados estatisticamente diferentes quando os valores de p foram inferiores ou iguais a 0,05.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados e discussões, obtidos durante a pesquisa de avaliação da hidrólise enzimática de fígado suíno, empregando as enzimas Alcalase 2.4 L® e a NovoPro-D®, caracterização da matéria-prima e hidrolisados, bioatividades e caracterização dos potenciais.

4.1 Caracterização química elementar, de vitaminas e aminoácidos do fígado suíno *in natura*

No desenvolvimento de um hidrolisado proteico, é necessário ter conhecimento da composição química da matéria-prima a ser hidrolisada, principalmente ao que se refere ao teor de proteínas, pois este influencia diretamente nas condições de processo que serão empregadas no processo hidrolítico. Para tanto, amostras de fígado suíno *in natura*, foram submetidas à determinação quantitativa dos constituintes presentes em termos de proteína bruta (PB), lipídeos, matéria mineral (cinzas), e umidade (U), análises de vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, B8, B9, B12), composição elementar química e aminoácidos totais, sendo que os resultados encontram-se dispostos nas Tabelas 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, ainda nas mesmas Tabelas, estão apresentados os valores encontrados na literatura para estas mesmas caracterizações. A Figura 4.1 apresenta o coproduto o fígado suíno *in natura* empregado na presente pesquisa.



Figura 4.1 - Fígado suíno *in natura*

Fonte: próprio autor.

Tabela 4.1 - Composição química percentual para o fígado suíno *in natura* e valores obtidos em trabalhos reportados na literatura

Componentes	Fígado suíno <i>in natura</i>	
	Valor obtido*	Literatura
Cinzas (%)	1,4	1,3 – 1,4
Lipídeos (%)	2,5	2,4 – 6,8
Proteína total (%)	19,7	20,6 – 22,1
Umidade (%)	74,3	70,4 - 71,6

* Dados do autor.

Fonte: Adaptado de Honikel (2011); Seong *et al.* (2014)^b; Verma *et al.* (2017)

Verifica-se (Tabela 4.1), que os valores encontrados na presente pesquisa estão condizentes com a literatura. Esses valores podem ser comparados com o estudo realizado por Honikel (2011), para avaliar os constituintes do fígado suíno, em que relatou variações da composição para a proteína (18,9 - 21,6%) e lipídeos (2,4 - 6,8%). Nota-se, fatores como alimentação, clima e tempo de crescimento do animal a ser abatido influenciam na constituição dos nutrientes presentes no órgão, entretanto, os valores encontrados são semelhantes ao presente estudo.

Seong *et al.* (2015) avaliaram os aspectos da composição química e nutricional dos coprodutos de frango, tais como: fígado, moela, estômago e intestino (delgado, ceco e duodeno). Os resultados indicaram que o intervalo aproximado de composição (mínimo e máximo) desses coprodutos foram umidade (76,68 – 83,23%), gordura (0,81 - 4,53%), proteína (10,96 – 17,70%), no qual o fígado e a moela apresentaram maior teor de proteína, porém, estes valores são menores do que os encontrados no presente trabalho.

Em outro estudo de Seong *et al.* (2014)^a obtiveram em sua pesquisa referente a bovino da raça Ranwoo, maior teor de proteínas na bexiga (22,23%), seguido pelo duodeno (21,31%), útero (21,24%), coração (18,62%), fígado (18,59%) e baço (18,21%).

Diante deste contexto, quando comparados os teores de proteínas encontrados nos coprodutos cárneos conforme estudos os valores encontrados no músculo animal, como, por exemplo: lombo bovino (21%) e lombo de suíno (22,2%) (PEREIRA & VICENTE, 2013), costeletas de suíno (17,3%) e carne de pato (19,3%) (OCKERMAN & BASU, 2004). Nota-se que estes valores são similares aos encontrados nos coprodutos de origem animal, especialmente o fígado.

Assim, verifica-se o potencial apresentado pelo fígado suíno cru como fonte de proteína de alto valor biológico, capaz de atender às necessidades diárias de nutrientes, com a possibilidade de ser utilizado em indústrias hidrolíticas processos para obter novos produtos de alto valor, pois biopeptídeos são obtidos a partir de hidrólise enzimática.

Os resultados de vitaminas do fígado suíno *in natura* são reportados na Tabela 4.2. Verifica-se que houve presença significativa de todas as vitaminas do complexo B, porém, a vitamina A apresentou a maior concentração. Kim (2011) relatou, em seu estudo, que os coprodutos suínos continham maior conteúdo vitamínico que o tecido muscular.

Pode-se observar uma variação de valores entre o mesmo órgão das espécies estudadas (Tabela 4.2), isto pode ser explicado devido à diferença de raça, tipo de alimentação, sazonalidade, genética e outros fatores inerentes a própria espécie (HONIKEL, 2011; NOLLET & TOLDRÁ, 2011).

Tabela 4.2 - Conteúdo de vitaminas ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$; $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) de fígado suíno *in natura*

Fígado <i>in natura</i>						
Vitaminas	Nome estrutura	Unidade	Literatura			Valor obtido*
			Aves ¹	Bovino ²	Suínos ³	
A	Retinol	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	21676	5027	57406	9290
B1	Tiamina	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,23	0,18	0,13	0,131
B2	Riboflavina	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,74	0,41	0,92	1,8
B3	Niacina	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	6,57	12,24	28,12	17
B5	Cálcio Pantotenato	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	4,16	0,98	3,05	5,45
B8	Biotina, Biacore	mg kg^{-1}	N/D**	N/D	N/D	0,275
B9	Folato, folacina	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	N/D	N/D	N/D	259
B12	Cianocobalamina	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	N/D	N/D	N/D	15,5

* Dados do autor.

** N/D: não determinado.

¹ Seong *et al.* (2015); ² Seong *et al.* (2014)^a; ³ Seong *et al.* (2014)^b.**Tabela 4.3** - Conteúdo de minerais presentes no fígado suíno *in natura*

Fígado <i>in natura</i>				
Elementos	Nome estrutura	Literatura		Valor obtido* (mg kg^{-1})
		Seong <i>et al.</i> (2014) ^b	Honikel (2011)	
P	Fósforo	2477,24	356 - 370	6634,4
K	Potássio	3028,29	271 - 320	7730,37
Ca	Cálcio	70,40	6 -10	224,14
Cr	Cromo	0,32	--	5,20
Mn	Manganês	2,98	0,34	6,50
Fe	Ferro	148,40	19,2 - 21	495,40
Cu	Cobre	5,50	0,68	47,18
Zn	Zinco	7,04	5,76	249,68
Se	Selênio	--	--	0,76

* Dados do autor.

-- Não detectado.

Os valores obtidos para o conteúdo de minerais do fígado *in natura* estão dispostos na Tabela 4.3. Analisando os resultados, observa-se a presença em quantidades significativas dos principais macro e micronutrientes necessários para manter as funções vitais do organismo. Entre eles se encontra o ferro (Fe) que desempenha papéis vitais no desenvolvimento da função cognitiva das crianças, atuando também no metabolismo energético e sistema imunológico. Outro mineral essencial para o crescimento normal das crianças e o desenvolvimento reprodutivo é o zinco (Zn) (WYNESS *et al.*, 2011), o qual também foi obtido nesta pesquisa.

Em estudo, Garcia-Llatas *et al.* (2011) compararam a quantidade de minerais de vários coprodutos suínos e relataram que o conteúdo de Fe contidos nestes coprodutos eram superiores ao encontrados na carne suína *in natura* (8,5 mg kg⁻¹) e presunto suíno (18mg kg⁻¹).

Comparando-se os resultados deste estudo aos já reportados por Seong *et al.* (2014) e por Honikel (2011) (Tabela 4.3), é possível evidenciar que os coprodutos suínos são fontes ricas de minerais, as quais são capazes de suprir as necessidades diárias para o bom funcionamento do corpo. Diante desses resultados, pode-se demonstrar que o fígado suíno *in natura*, trata-se de uma matéria-prima com potencial de aplicabilidade em indústrias de alimentos.

Na Tabela 4.4, são apresentados os valores de aminoácidos identificados no fígado suíno *in natura*. É possível verificar que todos os aminoácidos essenciais foram detectados em quantidades equilibradas, assim como os não essenciais para fígado *in natura* (50,52% EAA). Aminoácidos essenciais não são sintetizados pelo organismo, portanto, devem ser supridos por meio de dietas balanceadas, em proporções adequadas às necessidades individuais, para que possam ser absorvidos e metabolizados pelo organismo com máxima eficiência (TIRAPEGUE, 2016).

Tabela 4.4 - Composição média de aminoácidos (%) identificado no fígado suíno *in natura*

		Fígado <i>in natura</i>			Valor obtido*
		Literatura			
Aminoácidos Essenciais (%)	Sigla	Aves ¹	Bovino ²	Suínos ³	Valor obtido*
Histidina	His	0,43	0,65	0,36	0,67
Arginina	Arg	1,04	1,02	1,22	0,97
Treonina	Thr	0,79	0,84	0,45	0,84
Valina	Val	0,83	0,84	2,01	1,20
Metionina	Met	0,38	0,32	0,36	0,44
Isoleucina	Ile	0,65	0,66	1,02	0,91
Leucina	Leu	1,41	1,78	1,05	1,82
Fenilalanina	Phe	0,76	1,01	0,94	0,98
Lisina	Lys	1,34	1,42	1,05	1,66
Triptofano	Trp	--	N/D	N/D	0,30
Σ Aminoácidos essenciais		7,63	8,54	8,46	9,79
Aminoácidos não essenciais (%)	Sigla	Aves ¹	Bovino ²	Suínos ³	Valor obtido*
Ácido Aspartico	Asp	1,49	1,68	1,69	2,10
Ácido Glutâmico	Glu	2,23	2,24	2,11	2,57
Serina	Ser	0,80	0,86	0,87	0,83
Glicina	Gly	0,81	0,93	0,77	1,08
Alanina	Ala	0,98	1,20	1,11	1,17
Prolina	Pro	0,71	0,85	1,11	0,92
Tirosina	Tyr	0,59	0,66	2,93	0,58
Cisteína	Cys	0,27	0,29	0,64	0,34
Σ Aminoácidos não essenciais		7,88	8,71	11,23	9,59
Σ Aminoácidos		15,51	17,25	19,69	19,88
% Aminoácidos essenciais		49,19	49,50	42,97	50,52

* Dados do autor.

¹ Seong *et al.* (2015); ² Seong *et al.* (2014)^a; ³ Seong *et al.* (2014)^b.

** N/D: não determinado.

Anderson (1988) em seu estudo de caracterização de coprodutos de suíno encontrou níveis variados de aminoácidos essenciais, porém semelhantes aos dos tecidos musculares do suíno. Também Aristoy & Toldrá (2011) encontraram, em coprodutos de origem animal, a presença de aminoácidos essenciais equilibrados e similares aos das proteínas musculares.

A partir dos resultados, verifica-se que o fígado suíno *in natura* se caracteriza como uma excelente fonte de proteína de elevado valor biológico, com perfil de aminoácidos equilibrados, vitaminas e minerais capazes de suprir

as necessidades diárias de nutrientes, pois possui todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas, conforme estabelece a FAO (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Recomendação nutricional diária de aminoácidos para adultos mg kg⁻¹

Aminoácidos essenciais	m kg⁻¹ p.c. dia⁻¹	mg g proteína^{-1a}
Histidina	11	17
Isoleucina	13	23
Leucina	19	52
Lisina	16	16
Metionina + Cistina	17	23
Fenilalanina + Tirosina	19	41
Treonina	9	24
Triptofano	5	6
Valina	13	29

Fonte: Adaptado de Cozzolino *et al.* (2016).
p.c. peso corporal

Diante do exposto, percebe-se o elevado potencial de aplicação do fígado suíno *in natura*, em consequência da sua composição nutricional. Sendo, um coproduto que pode ser utilizado como matéria-prima em processos biotecnológicos visando o desenvolvimento e formação de um novo produto de alto valor agregado.

4.2 Desenvolvimento dos hidrolisados proteicos de fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®

O grau de hidrólise é a medida da extensão da degradação hidrolítica de proteínas, sendo considerado o meio mais prático e conveniente para controlar o processo de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986). Diante disso, os resultados das variáveis utilizadas no DCCR referentes ao desenvolvimento dos hidrolisados proteicos de fígado suíno: proteína:água (F1) % (p/p) e enzima:proteína (F2) % (p/p), e a variável de resposta em termos de grau de hidrólise % (GH) são apresentadas na Tabela 4.6, conforme os valores reais investigados.

Tabela 4.6 - Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais das variáveis analisadas e a resposta para a hidrólise enzimática com enzima Alcalase 2.4 L® em 1 hora

Ensaio	Variáveis independentes		Variável resposta
	Proteína:água (F1) % (p/p)	Enzima:proteína (F2) % (p/p)	Grau de hidrólise (GH) %
1	10	0,5	12,43
2	20	0,5	22,47
3	10	1,5	17,05
4	20	1,5	27,85
5	8	1	15,7
6	22	1	22,34
7	15	0,3	12,29
8	15	1,7	19,75
9	15	1	18,12
10	15	1	18,6
11	15	1	19,36

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

De acordo com a Tabela 4.6, verifica-se que, o GH apresentou uma variação de 12,29%, para as condições das variáveis independentes enzima:água de 10% e de 0,3% para enzima:proteína, a 27,85%, para as variáveis independentes de proteína:água 22% e 1,5% enzima:proteína. O resultado pode estar relacionado com a variação da concentração do substrato devido a redução da água e com a maior concentração de enzima em relação à proteína, evidenciado pelas variações do GH encontrados, sendo que quando maior a concentração das variáveis, maior o valor obtido.

A análise estatística dos resultados é apresentada pelo Diagrama de Pareto (Figura 4.2), pela estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 4.7), análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.8), modelo de regressão (Eq. 4.1), gráfico dos resíduos em função dos valores preditos e valores preditos por valores observados (Figura 4.3) e as superfícies de resposta (Figura 4.4).

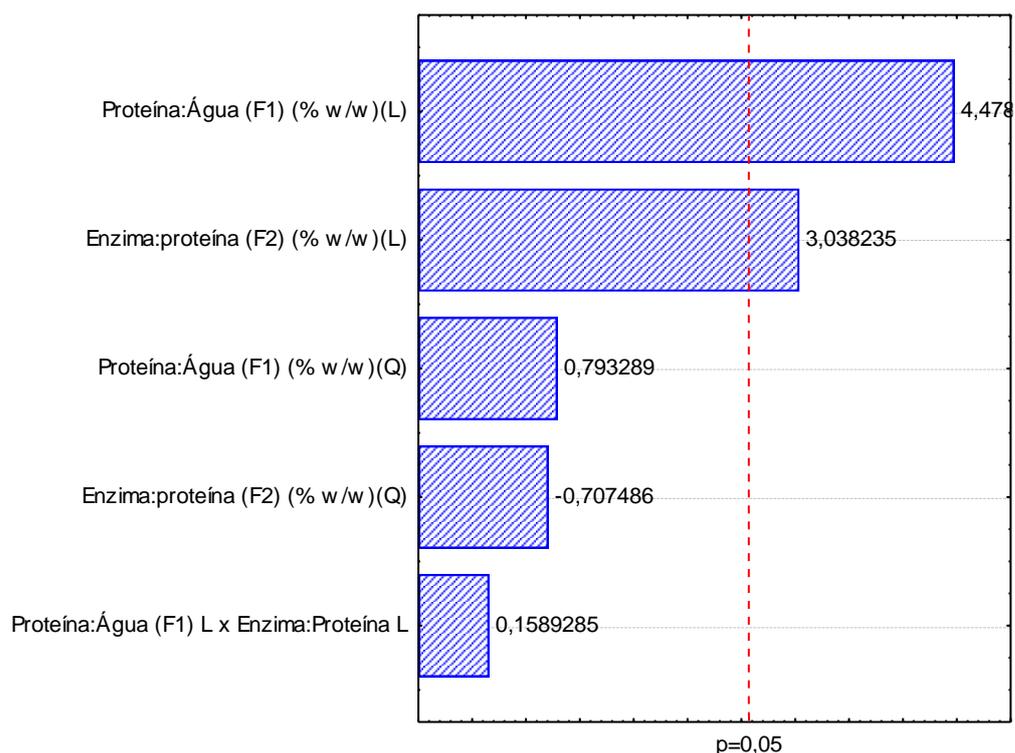


Figura 4.2 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima Alcalase 2.4 L®, temperatura hidrólise 64°C, pH 6,4 ao nível de significância de 95%

Tabela 4.7 - Estimativa dos efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima Alcalase 2.4 L®

Variáveis	Efeito	p-valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Média/Intercepto	18,66063	0,000040	18,66063	1,380264
Proteína:água (%) (L)*	7,6101	0,006527	3,80505	0,849609
Proteína:água (%) (Q)**	1,61812	0,463574	0,80906	1,019882
Enzima:proteína (%) (L)*	5,16263	0,028809	2,58131	0,849609
Enzima:Proteína (%) (Q)**	-1,4431	0,510868	-0,72155	1,019882
Proteína:água (F1) x Enzima:proteína (F2)	0,38	0,879945	0,19000	1,195506

*(L) = termo linear, ** (Q) = termo quadrático
 $R^2 = 0,8607$

De acordo com diagrama de Pareto (Figura 4.2) e o p-valor (Tabela 4.7), verifica-se que ambos os parâmetros tiveram um efeito positivo para o grau de hidrólise, sendo que o fator proteína:água foi mais significativo. Além disso, o diagrama de Pareto mostra que a interação entre as variáveis não teve efeito significativo dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p\text{-valor} > 0,05$). Pelo diagrama de Pareto (Figura 4.2), torna-se mais evidente que a variável

proteína:água apresentou maior influência sobre o processo de hidrólise enzimática com a enzima Alcalase 2.4 L®.

A Tabela 4.8 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), a qual foi utilizada na regressão dos dados experimentais e das superfícies de respostas (Figura 4.4). A partir do teste F, comparou-se o valor de F calculado (F_{calc}) com F tabelado (F_{tab}). O valor de F tabelado para um intervalo de confiança de 95% é de $F_{\text{tab } 2;5;0,05} = 5,79$ (BARROS *et al.*, 2010). As regressões obtidas (Tabela 4.7) forneceram R^2 de 0,8607, indicando que o modelo pode explicar 86,07% da variabilidade da resposta (Y1) para o grau de hidrólise.

Tabela 4.8 - Análise de variância (ANOVA) para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima Alcalase 2.4 L®

Fonte de variância	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{calc}	Coefficiente de determinação (R^2)
Modelo de regressão	167	2	83,72	11,09	0,8607
Resíduo	37,7455	5	7,55		
TOTAL	205,1869	7			

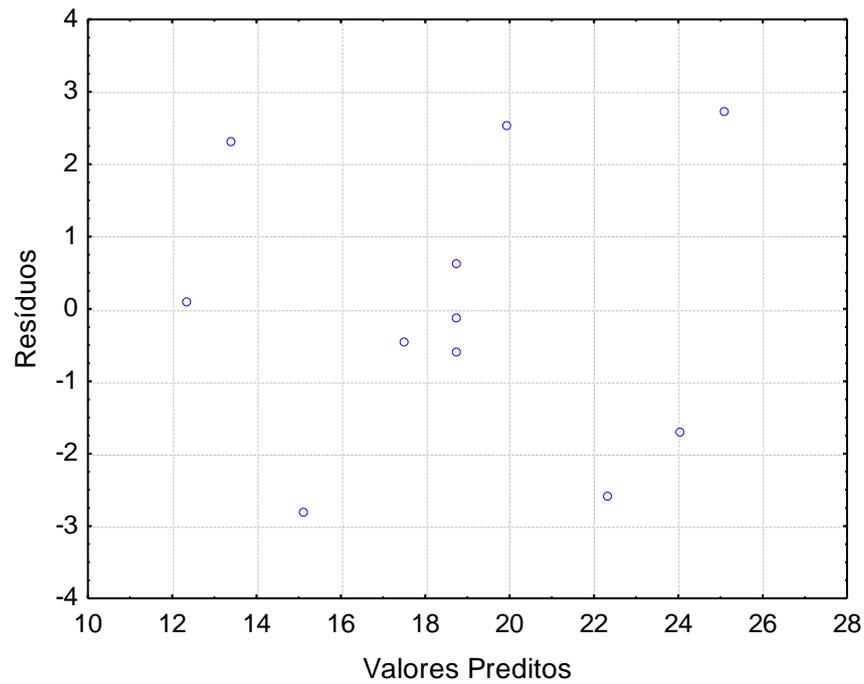
Verifica-se (Tabela 4.8) que o valor do F_{calc} é maior que o F_{tab} , dessa forma o modelo proposto é válido para a hidrólise enzimática do fígado suíno para a enzima Alcalase 2.4 L®, evidenciando que as razões proteína:água e enzima:proteína são significativos para o processo de hidrólise. A equação obtida pela análise estatística do modelo de regressão pelas variáveis codificadas é apresentada na Equação 4.1.

$$\text{GH (\%)} = 18,66 + 3,80 (F1) + 2,58 (F2) + 0,81 (F3)^2 - 0,72155 (F4)^2 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

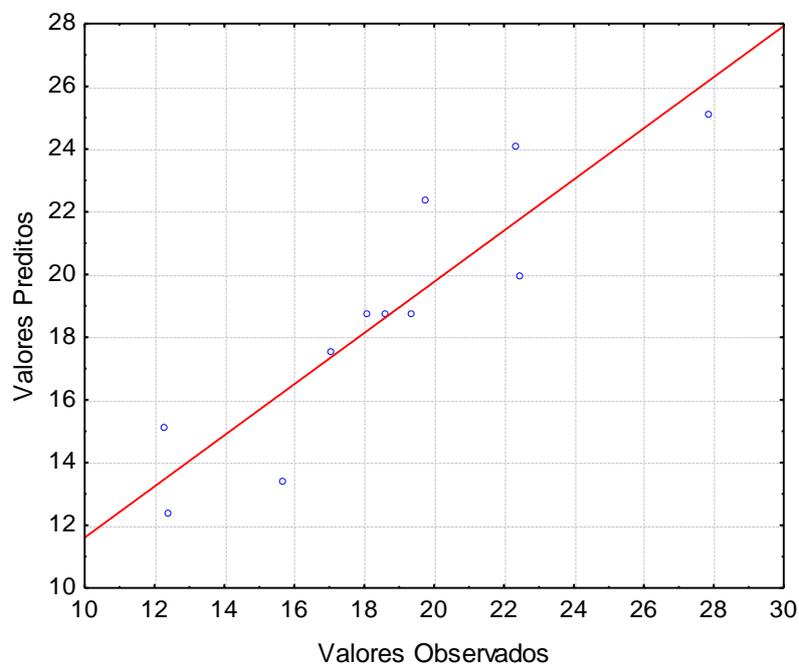
A partir da Equação 4.1, verifica-se que o coeficiente do modelo de regressão com maior relevância para o GH é o termo linear da variável proteína:água (F1), seguido do termo linear da variável, enzima:proteína (F2) e os termos quadráticos da interação entre as variáveis (F3) e (F4) com menor relevância.

A validação do modelo por meio da ANOVA pode ser corroborada pelo comportamento observado no gráfico dos resíduos em função dos valores

preditos pelo modelo de regressão e valores observados, além do gráfico da probabilidade normal dos resíduos, sendo estes apresentados na Figura 4.3.



(a)



(b)

Figura 4.3 - Resultado estatístico do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática do fígado suíno para a enzima Alcalase 2.4 L® – (a) resíduos em função dos valores preditos e (b) valores observados por preditos

Observa-se na Figura 4.3 (a) a distribuição dos resíduos apresenta-se de forma aleatória e próxima do zero para os valores preditos, assim assegura-se que há um ajuste adequado do modelo de regressão e sem tendências durante a predição dos valores calculados. Enquanto que pela Figura 4.3 (b) verifica-se a ausência de valores discrepantes ou *outliers*, uma vez que os valores estão próximos da linha. As superfícies de resposta geradas a partir da análise estatística dos resultados são apresentadas na Figura 4.4.

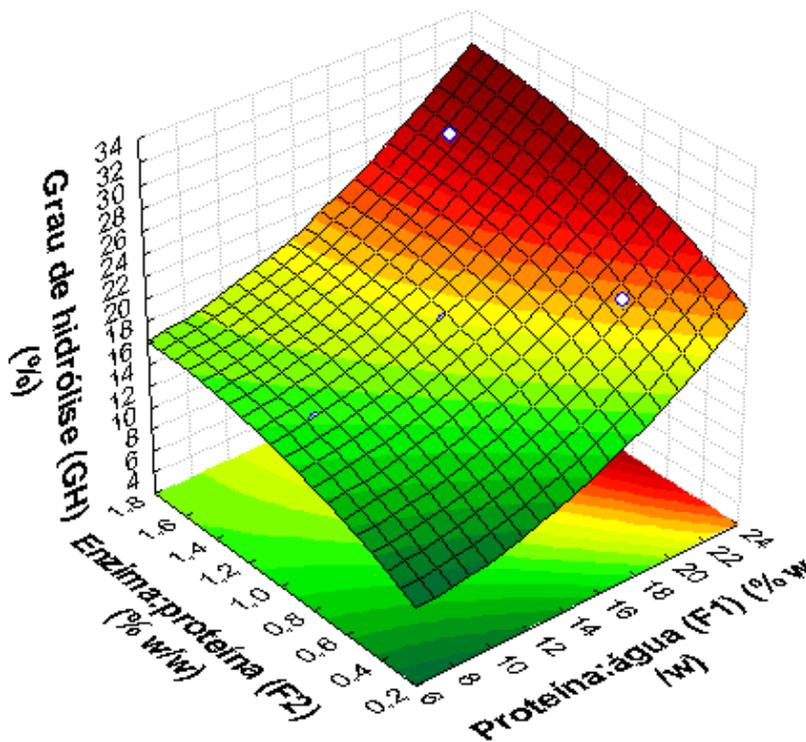


Figura 4.4 - Superfície de resposta para o grau de hidrólise do fígado suíno para a enzima Alcalase 2.4 L®

A Figura 4.4 apresenta a superfície de resposta para a hidrólise enzimática com Alcalase 2.4 L® do fígado suíno com uma função da relação proteína:água e enzima:proteína. Pode ser observado o comportamento levemente não linear indicando a pequena influência dos termos quadráticos do modelo.

A elevada concentração de enzima, favorece o aumento da taxa de reação, enquanto menores volumes de água concentram o substrato (proteína),

o que pode resultar em maior liberação de peptídeos bioativos e propriedades funcionais, bem como melhores respostas para o grau de hidrólise.

Nesse sentido, as relações existentes entre as variáveis significativas sobre o grau de hidrólise mostram que a variável proteína:água apresentou maior influência sobre a mesma, em comparação com variáveis enzima:proteína. Dessa forma, também mostrou que o volume de água e enzima adicionada no processo foi baixa, o que, a partir de industrial, é um fator importante, pois não implica custos consideráveis com a aquisição de enzima e energia para secagem do produto, contribuindo para a viabilidade econômica do processo.

Na Tabela 4.9 estão apresentados os valores de grau de hidrólise obtidos no presente estudo e os relatados na literatura utilizando a Alcalase 2.4 L® com diferentes matérias-primas e condições de hidrólise variadas. Observou-se uma variação no GH, isto pode ser devido às condições empregadas em cada processo como tempo e temperatura, e também a variedade da matéria-prima. Além disso, para Hiidenhovi *et al.* (2005) a razão entre os fatores enzima e proteína, interferem na obtenção do GH, bem como na geração e faixa de formação dos peptídeos.

Tabela 4.9 - Grau de hidrólise do fígado suíno utilizando a Alcalase 2.4 L® e dispostos na literatura.

Matéria-prima	Enzima	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Teor de Proteína (%)	Grau de Hidrólise (%)
Fígado suíno ¹	Alcalase 2.4 L®	6,4	64	1	15,4	12,43 - 27,85
Corvina ²	Alcalase 2.4 L®	8,0	50	1	49,7 - 80,3	12,2 - 43,7
Tilápia ³	Alcalase 2.4 L®	7,5	60	2	--	20,2

¹ Dados do autor; ² Centenaro & Mellado (2008); ³Roslan *et al.* (2015).

A Figura 4.5 apresenta o hidrolisado proteico do fígado suíno a partir da enzima Alcalase 2.4 L®.



Figura 4.5 - Hidrolisado proteico de fígado suíno a partir da enzima Alcalase 2.4 L®, temperatura 64°C, pH 6,4

Fonte: próprio autor.

4.2.2 Máxima resposta do Grau de hidrólise (GH) para o fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®

Como com o planejamento DCCR não foi possível obter uma condição otimizada, mas sim um indicativo das melhores relações, foram realizados ensaios conforme Tabela 3.4 para avaliar o grau de hidrólise. Os resultados são apresentados na Figura 4.6 em que fixou proteína:água (20%) e variando enzima:proteína.

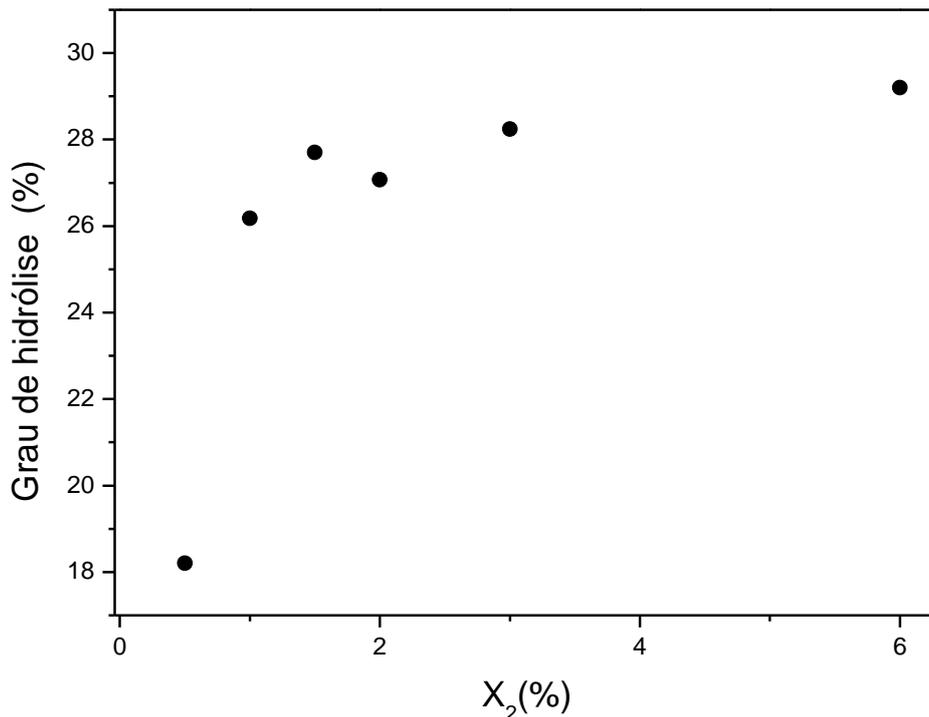


Figura 4.6 - Grau de hidrólise com a enzima Alcalase 2.4 L®, temperatura 64°C, pH 6,4, fixando proteína:água e variando enzima:proteína em expresso em porcentagem (%)

Observa-se na Figura 4.6, que a relação enzima:proteína de 1,5% foi a que apresenta maior grau de hidrólise e adotado como referência para análise, uma vez que a partir desta razão, não houve variação significativa. Diante disso, verifica-se que a variável enzima:proteína foi fundamental para obtenção do grau de hidrólise e conseqüentemente o teor de proteína.

Conforme Sadana (1991), o aumento da velocidade de agitação diminui o tamanho das gotas formadas aumentando assim a área interfacial, levando a uma extensão da hidrólise. Para a relação proteína:água superior a 24%, a reologia do produto apresentou dificuldade em manter uma velocidade homogênea do movimento da amostra, gerando regiões com velocidades menores que leva a condições menos favoráveis para uma uniformidade de produto hidrolisado.

A partir deste resultado (Figura 4.6), se fixou esta condição enzima:proteína (1,5%) e variou a relação proteína:água, conforme Figura 4.7.

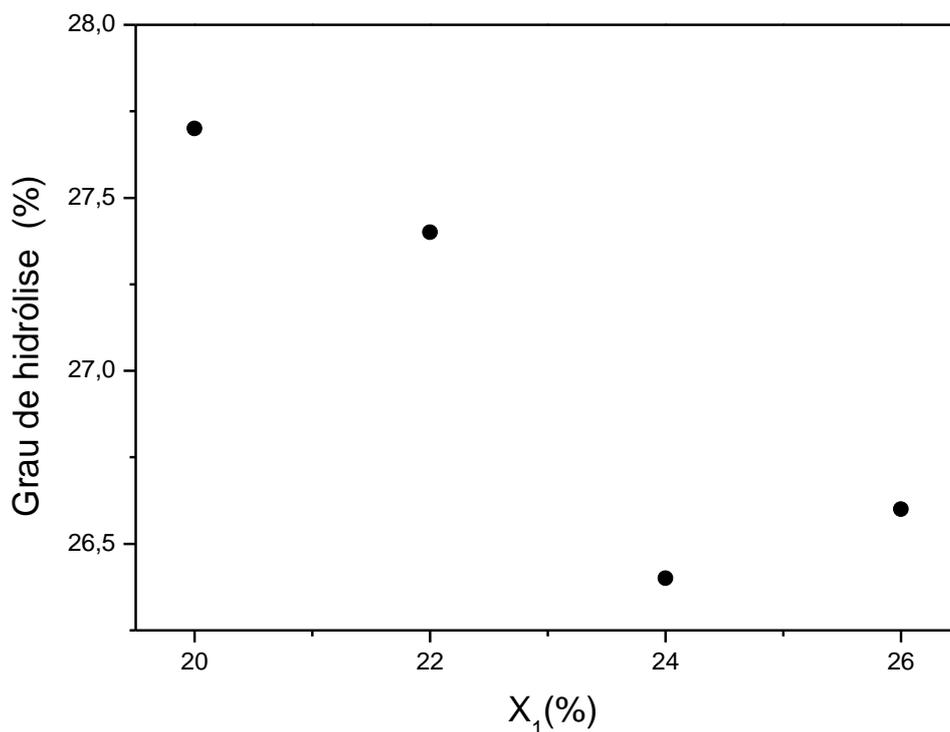


Figura 4.7 - Grau de hidrólise com a enzima Alcalase 2.4 L®, temperatura 64°C, pH 6,4, fixando enzima:proteína e variando proteína:água em expresso em porcentagem (%)

A partir da Figura 4.7, verifica-se que a variável enzima:proteína a 1,5%, foi a condição otimizada que apresentou o melhor comportamento de hidrólise na obtenção do GH. Diante disso, acompanhou-se a cinética hidrolítica no intuito de averiguar se o GH seria aumentado, para a enzima Alcalase 2.4 L®.

4.2.3 Cinética da hidrólise enzimática para o fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®

A cinética enzimática é o estudo do mecanismo pela qual as enzimas ligam substratos e os transformam em produtos. Diante disso, a cinética enzimática do fígado suíno foi realizada por um tempo de 10 h, empregando como condição para a hidrólise enzima:proteína 1,5% e água:proteína 20%, a 64°C e pH 6,4. Durante todo o processo hidrolítico foram retiradas amostras e o grau de hidrólise foi determinado. O resultado da curva cinética está apresentado na Figura 4.8.

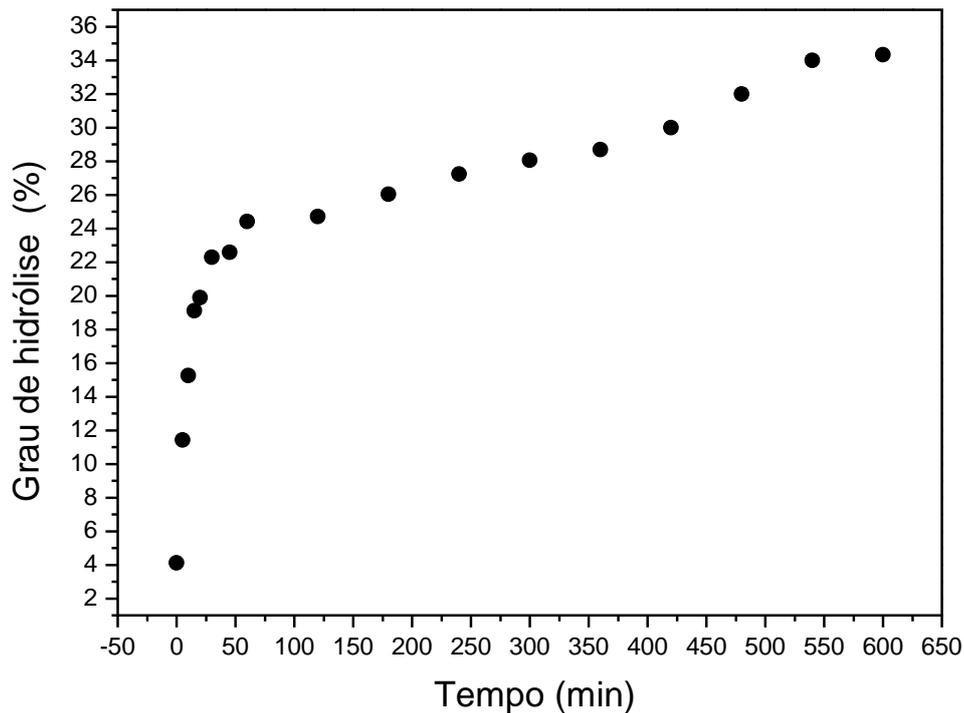


Figura 4.8 Grau de hidrólise obtido com a variação da relação proteína:água (1,5%) com a enzima Alcalase 2.4 L®, temperatura 64°C, pH 6,4

Observando a Figura 4.8, verifica-se uma elevada velocidade de reação até 90 min com aproximadamente 25% de grau de hidrólise, posteriormente, a reação tem sua velocidade de bioconversão reduzida, até atingir sua estabilidade com 600 min, promovendo um grau de hidrólise neste tempo de 34,5%. Analisando a reação em termos de aplicação industrial e os pontos de inflexão da curva com os tempos de 100 min e 450 min, pode-se otimizar o tempo do processo conforme o GH desejado e evitar custos adicionais de operação com baixo rendimento pela redução da velocidade de reação. Além disso, elevados tempos de reação favorecem a formação de peptídeos e aminoácidos com característica de amargor, o que tornaria o produto impalatável devido a sua hidrofobicidade residual (ADLER-NISSEN, 1986; SHEN *et al.*, 2012).

4.2.4 Caracterização química elementar, de vitaminas e aminoácidos do hidrolisado proteico oriundo de fígado suíno com enzima Alcalase 2.4 L®

Após a realização dos ensaios referentes ao planejamento experimental do tipo DCCR, fez-se a caracterização dos hidrolisados proteicos com a enzima Alcalase 2.4 L® na condição ótima (enzima:proteína 1,5% e água:proteína 20%), as quais estão dispostas nas Tabelas 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13

Tabela 4.10 - Composição química percentual para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®

Componentes	Hidrolisado proteico	
	Alcalase 2.4 L® (1 h)	Alcalase 2.4 L® (4 h)
Cinzas (%)	1,0	1,1
Lipídeos (%)	2,3	2,1
Proteína total (%)	15,4	16,5
Umidade (%)	79,1	78,1

Tabela 4.11 - Conteúdo de vitaminas (mg 100g⁻¹) para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®

Vitaminas	Unidade	Hidrolisado proteico		IDR*
		Alcalase 2.4 L® (1 h) (mg)	Alcalase 2.4 L® (4 h) (mg)	
A (Retinol)	µg 100 g ⁻¹	6980	5190	800
B1 (Tiamina)	mg 100 g ⁻¹	0,084	0,096	1,1
B2 (Riboflavina)	mg 100 g ⁻¹	1,92	1,92	1,4
B3 (Niacina)	mg 100 g ⁻¹	10,4	24,1	15 – 18
B5 (Cálcio Pantotenato)	mg 100 g ⁻¹	4,65	4,88	4 – 7
B8 (Biotina, Biacore)	mg kg ⁻¹	0,244	0,167	30 – 100
B9 (Folato, folacina)	µg 100 g ⁻¹	110	109	400
B12 (Cianocobalamina)	µg 100 g ⁻¹	20,2	14,6	1 – 3

** Ingestão diária recomendada.

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

Tabela 4.12 - Conteúdo de minerais para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®

Elementos	Nome estrutura	Hidrolisado proteico		
		Alcalase 2.4 L® (1 h) (mg)	Alcalase 2.4 L® (4 h) (mg)	IDR
P	Fósforo	6979,63	7360,34	800 - 1200
K	Potássio	6621,38	6658,73	3500
Ca	Cálcio	182,63	218,42	800 - 1200
Cr	Cromo	5,75	2,79	0,05 – 0,02
Mn	Manganês	5,91	6,01	2 - 5
Fe	Ferro	751,32	737,08	15
Cu	Cobre	49,74	45,93	1,5 - 3
Zn	Zinco	<1,26	<0,50	12 - 15
Se	Selênio	1,35	1,28	0,05 – 0,07

Tabela 4.13 - Composição média de aminoácidos para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®

Aminoácidos Essenciais (%)	Sigla	Hidrolisado proteico	
		Alcalase 2.4 L® (1 h)	Alcalase 2.4 L® (4 h)
Histidina	His	0,53	0,54
Arginina	Arg	0,70	0,68
Treonina	Thr	0,65	0,70
Valina	Val	0,95	1,01
Metionina	Met	0,35	0,36
Isoleucina	Ile	0,69	0,76
Leucina	Leu	1,41	1,50
Fenilalanina	Phe	0,76	0,81
Lisina	Lys	1,27	1,35
Triptofano	Trp	0,25	0,27
Σ Aminoácidos essenciais		7,56	7,98
Aminoácidos não essenciais (%)	Sigla	Alcalase 2.4 L® (1 h)	Alcalase 2.4 L® (4 h)
Ácido Aspartico	Asp	1,51	1,69
Ácido Glutâmico	Glu	1,98	2,14
Serina	Ser	0,63	0,71
Glicina	Gly	0,86	0,94
Alanina	Ala	0,92	0,97
Prolina	Pro	0,66	0,79
Tirosina	Tyr	0,38	0,54
Cisteina	Cys	0,31	0,32
Σ Aminoácidos não essenciais		7,25	8,10
Σ Aminoácidos		14,81	16,08
% Aminoácidos essenciais		51,05	49,63

Temperatura hidrólise: 64°C

pH:6,4

Quanto aos resultados dos hidrolisados de fígado suíno utilizando a enzima Alcalase 2.4 L® com hidrólise de 1 e 4 horas apresentados nas Tabelas 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13, observa-se que os teores proteicos dos hidrolisados foram inferiores ao do fígado suíno *in natura* variando de (15,41- 17,12%). Além disso, os valores de vitaminas e sais minerais da presente pesquisa estão de acordo com a literatura.

Entretanto, a redução das proteínas, não comprometeu a qualidade nutricional do hidrolisado proteico, uma vez que o teor destas proteínas continua atendendo às recomendações diárias estabelecidas pela FAO (1991). A diferença corresponde à proteína que não foi hidrolisada, permanecendo insolúvel (NEVES *et al.*, 2004), ou pelos efeitos interativos entre os parâmetros da hidrólise, por exemplo, a adição de água a qual pode influenciar a composição final do hidrolisado proteico (PAGAN & BASU, 2004).

Os resultados foram satisfatórios no que se refere aos valores de aminoácidos essenciais, não-essenciais, assim como para as vitaminas, todos são condizentes com a literatura. Pois, estes valores não apresentaram variações significativas quando comparadas com o fígado suíno *in natura*. No entanto, a avaliação dos minerais apresentou-se discrepante quando comparada com outras literaturas, este fato pode ser atribuído à diferença genética, raça, alimentação, clima entre outros (HONIKEL, 2011; NOLLET & TOLDRÁ, 2011)

Damgaard *et al.* (2014) em seu estudo notaram que em todos os tecidos, cólon, apêndice, reto, pâncreas, coração, fígado e pulmão, oriundos de suíno apresentaram atividade antioxidante quando hidrolisados, tanto com a enzima Alcalase 2.4 L® quanto para a Protamex.

4.3 Desenvolvimento dos hidrolisados proteicos de fígado suíno com enzima NovoPro-D®

4.3.1 Grau de hidrólise (GH) para o fígado suíno com enzima NovoPro-D®

Os resultados das variáveis utilizadas no DCCR referentes ao desenvolvimento dos hidrolisados proteicos de fígado suíno para a enzima NovoPro-D® para a variável de resposta em termos de grau de hidrólise % (GH) são apresentadas na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Matriz do planejamento experimental DCCR com os valores reais das variáveis analisadas e a resposta para a hidrólise enzimática com enzima NovoPro-D® em 1 hora

Ensaio	Variáveis independentes		Variável resposta
	Proteína:água (F1) % (p/p)	Enzima:proteína (F2) % (p/p)	Grau de hidrólise (GH) %
1	10	0,5	12,56
2	20	0,5	15,57
3	10	1,5	17,53
4	20	1,5	27,3
5	8	1	11,07
6	22	1	22,49
7	15	0,3	10,93
8	15	1,7	20,4
9	15	1	18,85
10	15	1	18,65
11	15	1	19,04

Temperatura hidrólise: 64°C

pH:6,4

De acordo com a Tabela 4.14, verifica-se que, o GH apresentou uma variação de 10,93 a 27,3%. O maior GH refere-se à condição utilizada no ensaio 4 com as variáveis independentes de proteína:água de 20% e 1,5% de enzima:proteína), com GH de 27,3%. Verifica-se também, que o ensaio 7 com as variáveis independentes proteína:água 15% de e 0,3% de enzima:proteína teve o menor GH 10,93%. Essas variações provavelmente ocorrem com os diferentes níveis de concentração da proteína em relação à água e enzima.

A análise estatística dos resultados para a enzima NovoPro-D® é apresentada pelo Diagrama de Pareto (Figura 4.9), pela estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 4.15), análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.16), modelo de regressão (Eq. 4.2), gráfico dos resíduos em função dos valores preditos e valores preditos por valores observados (Figura 4.10) e as superfícies de resposta (Figura 4.11).

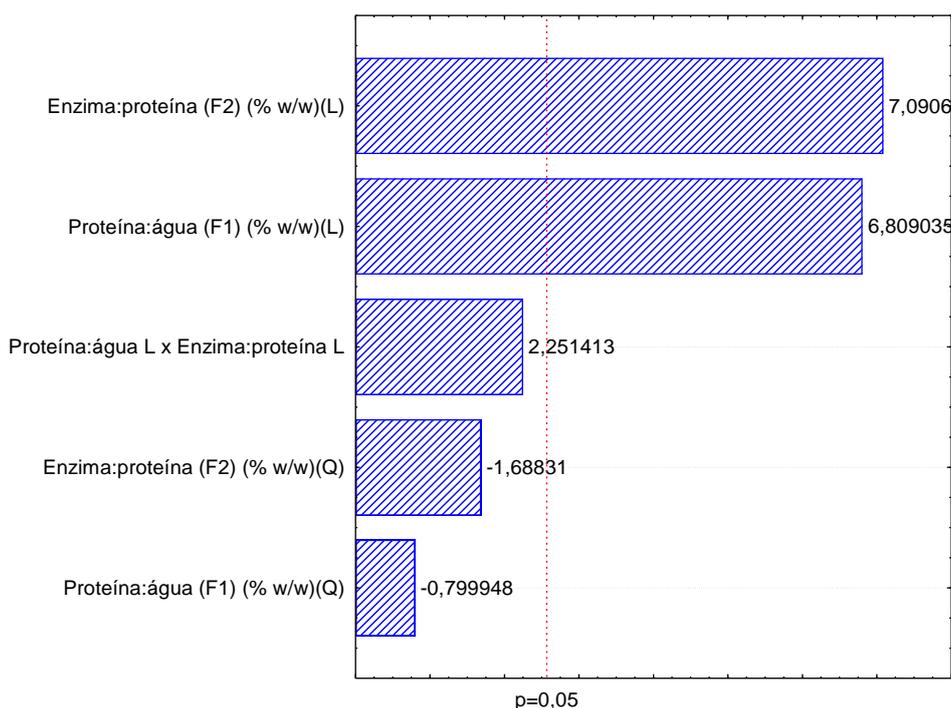


Figura 4.9 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima NovoPro-D® ao nível de significância de 95%

Tabela 4.15 - Estimativa dos efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima NovoPro-D®

Variáveis	Efeito	p-valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Média/Intercepto	18,81907	0,000004	18,81907	0,866646
Proteína:água (%) (L)*	7,26465	0,001041	3,63232	0,533456
Proteína:água (%) (Q)**	-1,02452	0,460041	-0,51226	0,640368
Enzima:proteína (%) (L)*	7,56515	0,000864	3,78258	0,533456
Enzima:Proteína (%) (Q)**	-2,16228	0,152153	-1,08114	0,640368
Proteína:água (F1) x Enzima:proteína (F2)	3,38000	0,074145	1,69000	0,750640

*(L) = termo linear, ** (Q) = termo quadrático
 $R^2 = 0,9544$

De acordo com diagrama de Pareto (Figura 4.9) e o p-valor (Tabela 4.15), verifica-se que ambos os parâmetros tiveram um efeito positivo para o grau de hidrólise, sendo que o fator enzima:proteína foi mais significativo. Além disso, o diagrama de Pareto mostra que a interação entre as variáveis não teve efeito significativo no intervalo de confiança de 95% ($p\text{-valor} > 0,05$).

Além disso, a Tabela 4.16 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), a qual foi utilizada na regressão dos dados experimentais e das superfícies de respostas (Figura 4.11) para o processo hidrolítico para a enzima NovoPro-D®. Com estes dados e teste F, comparou-se o valor de F calculado (F_{calc}) com F tabelado (F_{tab}). O valor de F tabelado para um intervalo de confiança de 95% é de $F_{\text{tab } 2;5;0,05} = 5,79$ (BARROS *et al.*, 2010).

Tabela 4.16 - Análise de variância (ANOVA) para a hidrólise enzimática do fígado suíno do planejamento experimental DCCR para a enzima NovoPro-D®

Fonte de variância	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{calc}	Coefficiente de determinação (R^2)
Modelo de regressão	218,00	2	108,94	18,54	0,9544
Resíduo	2029,29	5	405,86		
TOTAL	2247,18	7			

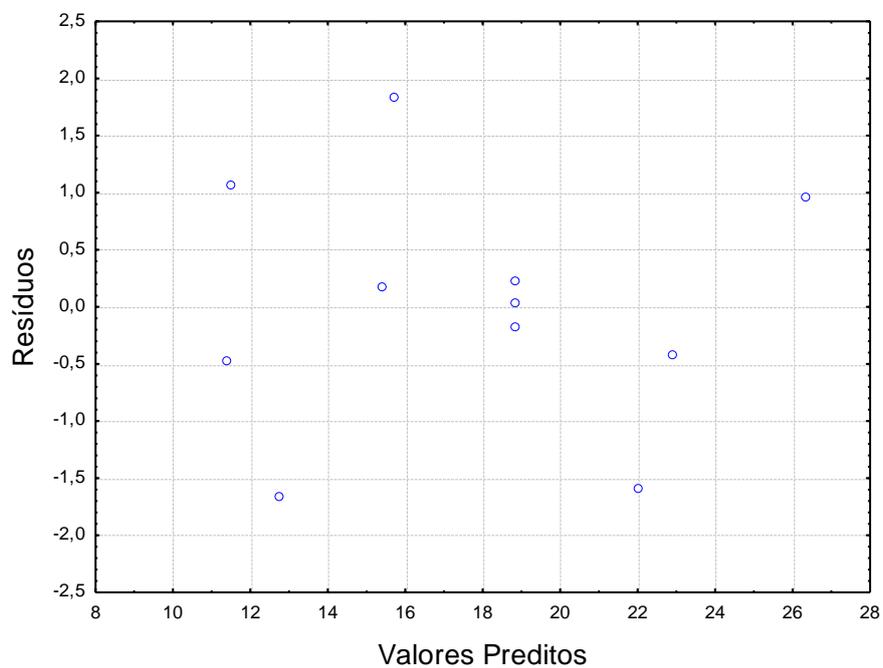
Verifica-se (Tabela 4.16) que o valor do F_{calc} é aproximadamente 3 vezes menor que o F_{tab} , dessa forma o modelo proposto é válido para a hidrólise enzimática do fígado suíno para a enzima NovoPro-D®, evidenciando que as razões proteína:água e enzima:proteína são significativos para o processo de hidrólise. A equação obtida pela análise estatística do modelo de regressão pelas variáveis codificadas é apresentada na Equação 4.2.

$$\text{GH (\%)} = 18,81 + 7,26.(F1) + 7,56.(F2) - 0,51(F3) - 1,1(F4) \quad (\text{Eq. 4.2})$$

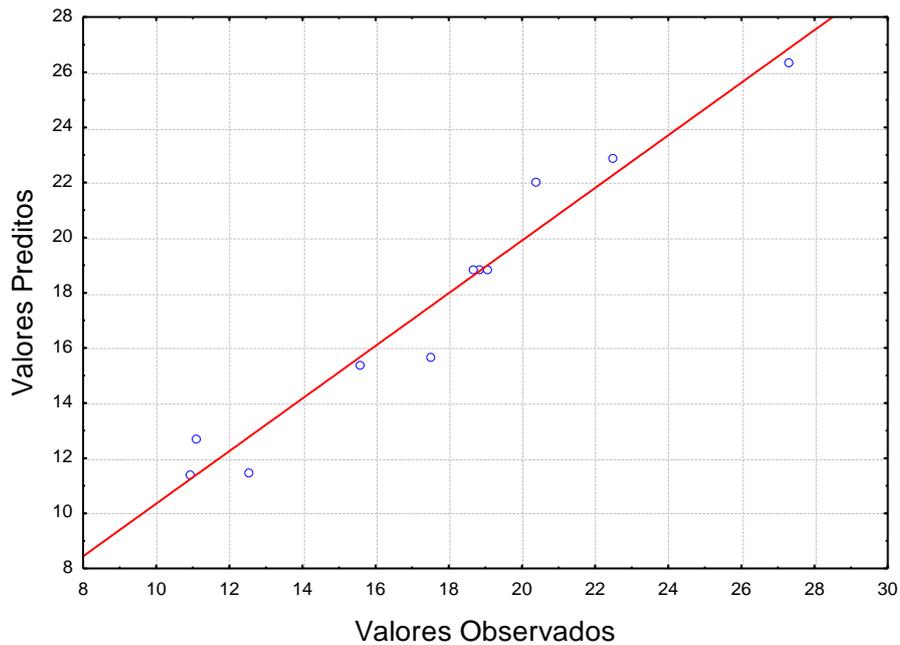
A partir da Equação 4.2, verifica-se que os termos lineares são representados pelo modelo de regressão com maior relevância para o GH. Além disso, o modelo pode representar 95,44% da variabilidade da resposta. Ademais,

evidencia-se que o volume de água e enzima adicionada no processo foi baixo, sendo industrialmente viável devido aos custos e viabilidade econômica do processo.

A validação do modelo para a hidrólise da enzima NovoPro-D® por meio da ANOVA pode ser apresentada pelos gráficos de resíduos em função dos valores preditos pelo modelo de regressão e valores observados, além do gráfico da probabilidade normal dos resíduos, sendo estes apresentados na Figura 4.11.



(a)



(b)

Figura 4.10 - Resultado estatístico do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática do fígado suíno para a enzima NovoPro-D® – **(a)** resíduos em função dos valores preditos e **(b)** valores observados por valores preditos

Observa-se na Figura 4.10 (a) a distribuição dos resíduos apresenta-se de forma aleatória e próxima do zero para os valores preditos, assim assegura-se que há um ajuste adequado do modelo de regressão e sem tendências durante a predição dos valores calculados. Enquanto que pela Figura 4.10 (b) verifica-se a ausência de valores discrepantes ou *outliers*, uma vez que os valores estão próximos da linha.

As superfícies de resposta obtidas a partir da análise estatística dos resultados são apresentadas na Figura 4.11.

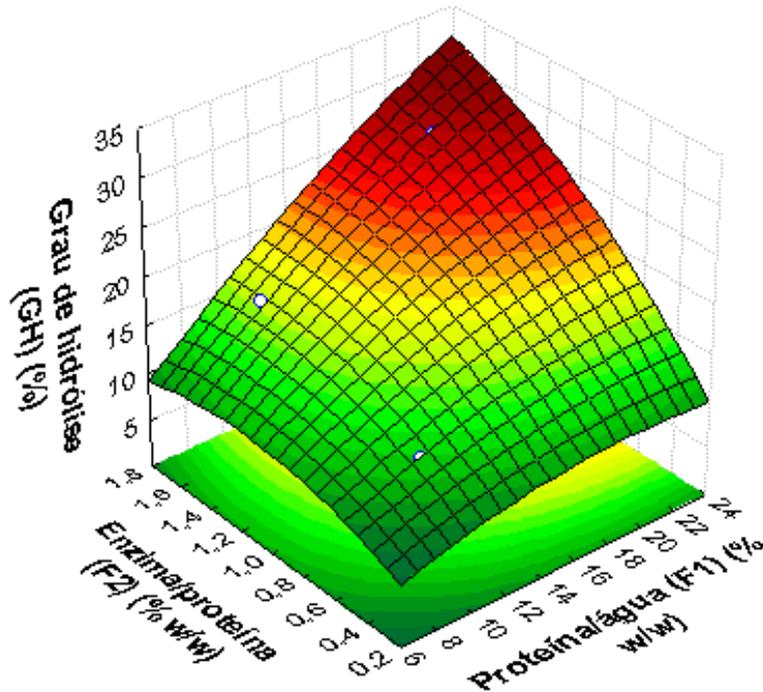


Figura 4.11 - Superfície de resposta para o grau de hidrólise do fígado suíno para a enzima NovoPro-D®

A Figura 4.11 apresenta a superfície de resposta para a hidrólise enzimática com a enzima NovoPro-D® do fígado suíno com uma função das variáveis proteína:água e enzima:proteína. Observa-se o comportamento diretamente proporcional entre a variável resposta, assim fica evidente a linearidade do modelo.

A Tabela 4.17 apresenta o grau de hidrólise do fígado suíno utilizando a enzima NovoPro-D® na condição ótima (20% de proteína:água e 1,5% de enzima:proteína) para a referida pesquisa e dados reportados na literatura.

Tabela 4.17 - Grau de hidrólise do fígado suíno utilizando a NovoPro-D® e reportado na literatura

Matéria-prima	Enzima	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Teor de Proteína (%)	Grau de Hidrólise (%)
Fígado suíno ¹	NovoPro-D®	6,4	64	1	16,2	10,93 – 27,3
Fígado suíno ²	Papaina	6,5	50	6	--	1,18 - 19,12
Carcaça de frango manualmente desossada (CMD)	Papaína, Flavourzyme, Protamex	6,5	60			20,2-51,3

¹ Dados do autor; ² Verma *et al.* (2017), ³Oliveira *et al.* (2015)

Para avaliar a enzima a Tabela 4.17 apresentada os valores de grau de hidrólise obtidos no presente estudo (10,93 – 27,3 %), não há estudos corroborados na literatura utilizando a NovoPro-D®, entretanto há estudos com fígado suíno para a enzima Papaína. Verificou-se que para o coproduto fígado suíno a enzima NovoPro-D®, apresentou-se mais eficiente para o grau de hidrólise quando comparado com a enzima Papaína, uma vez que em menor tempo obteve-se maior grau de hidrólise (1 h - 10,93 – 27,3 %)

A Figura 4.12 apresenta o hidrolisado proteico do fígado suíno a partir da enzima NovoPro-D®.



Figura 4.12 - Hidrolisado proteico de fígado suíno a partir da enzima NovoPro-D®
Fonte: próprio autor.

4.3.2 Máxima resposta do Grau de hidrólise (GH) para o fígado suíno com enzima NovoPro-D®

Baseados nos resultados da Tabela 3.4 realizou-se ensaios para avaliar condições otimizadas para a enzima NovoPro-D®. Os resultados estão dispostos na Figura 4.13 em que fixou proteína:água (20%) como condição ótima e variou-se a enzima:proteína, a linha contínua indica a estabilização da reação cinética.

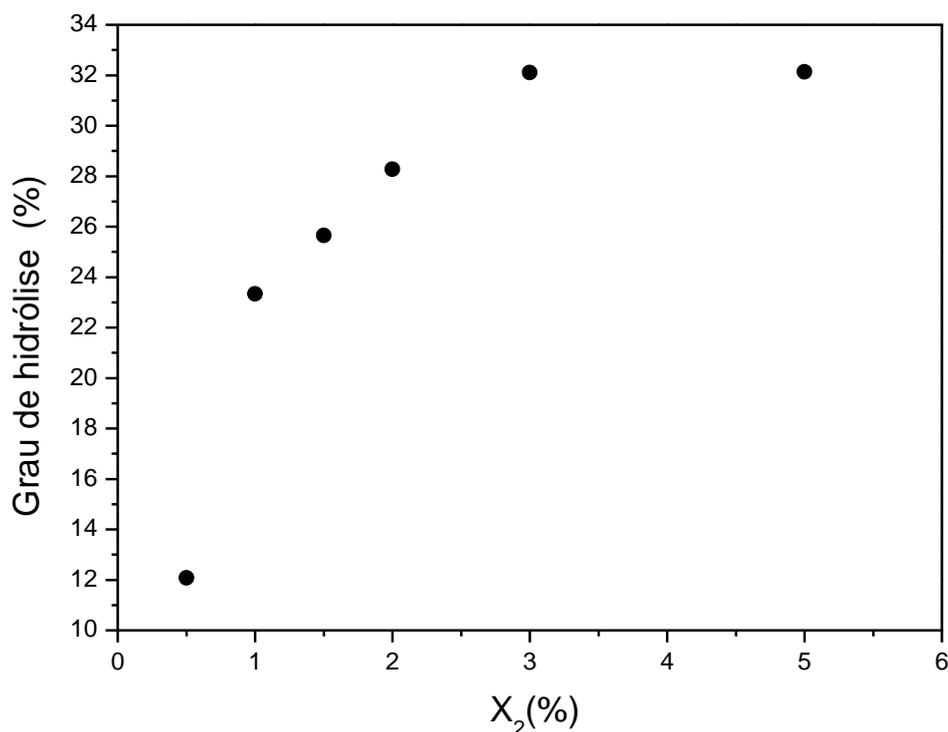


Figura 4.13 - Grau de hidrólise com a enzima NovoPro-D® fixando proteína:água e variando enzima:proteína em expresso em porcentagem (%) temperatura hidrólise 64°C e pH 6,4

Na Figura 4.13 foi possível identificar que a condição com 3,0% de enzima, proporcionou o maior grau de hidrólise, deste modo foi definida esta condição (3,0% de enzima) para avaliar a relação proteína:água para a realização da cinética. O aumento da concentração da enzima:proteína até 3% apresentou uma curva típica compatível com aumento do GH e sua estabilidade quando se aplicou a dosagem 6% de enzima:proteína, indicando que se atingiu o ponto de otimização do processo com a dosagem de 3%. A partir deste resultado (Figura 4.13).

A partir da condição de enzima:proteína fixada em 3%, variou-se a relação proteína:água, conforme Figura 4.14. Se observa que o aumento do GH tem um comportamento em linha com o esperado de se concentrar o substrato que se estabiliza em 22% e se mantém nesta condição. Devido à limitações de agitação ao se trabalhar com altas concentrações, se adotou a condição de 22% para a

relação proteína:água para a realização dos testes de cinética.

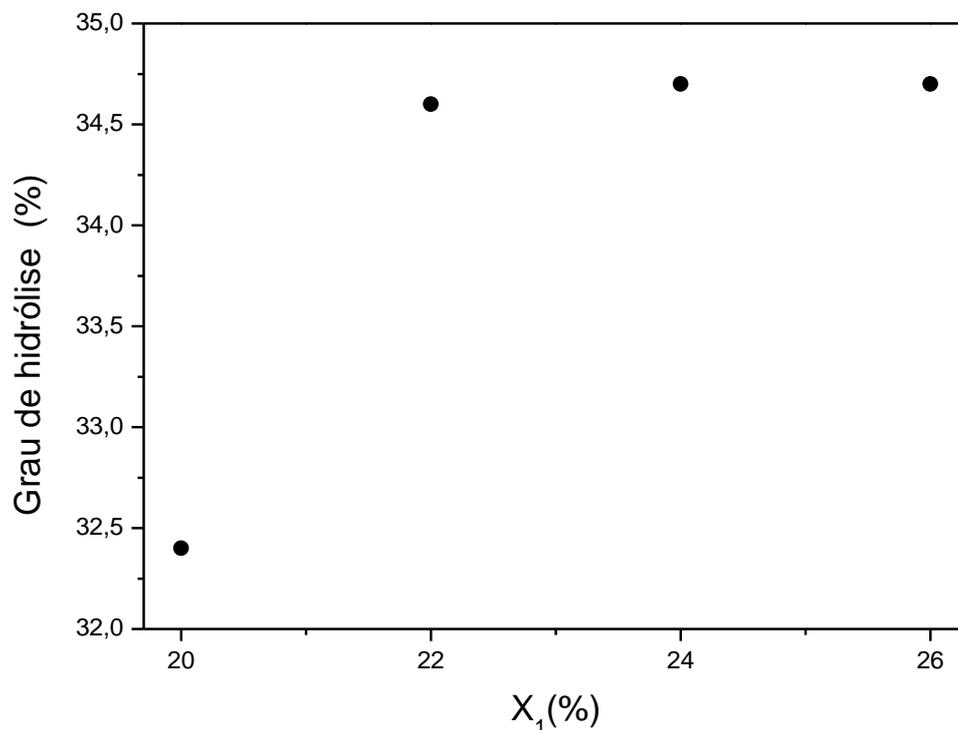


Figura 4.14 - Grau de hidrólise com a enzima NovoPro-D® fixando enzima:proteína e variando proteína:água em expresso em porcentagem (%) temperatura hidrólise 64°C e pH 6,4

Conforme elucidado nas Figuras 4.13 e 4.14, verifica-se que a variável enzima:proteína a 3,0% e a relação água:proteína de 22% apresentaram maior grau de hidrólise, obtendo assim a condição que proporciona a maior bioconversão do fígado suíno em hidrolisado proteico, e, portanto, esta foi a condição escolhida para desenvolver a cinética com a enzima NovoPro-D®.

4.3.3 Cinética da hidrólise enzimática para o fígado suíno com enzima NovoPro-D®

A cinética enzimática do fígado suíno foi realizada por um tempo de 10 horas, empregando como condição para a hidrólise enzima:proteína 1,5% e água:proteína em 20%, a 64°C, pH 6,4. Durante o tempo de processo hidrolítico

foram retiradas amostras e o grau de hidrólise foi determinado. O resultado da reação de hidrólise está apresentado na Figura 4.15.

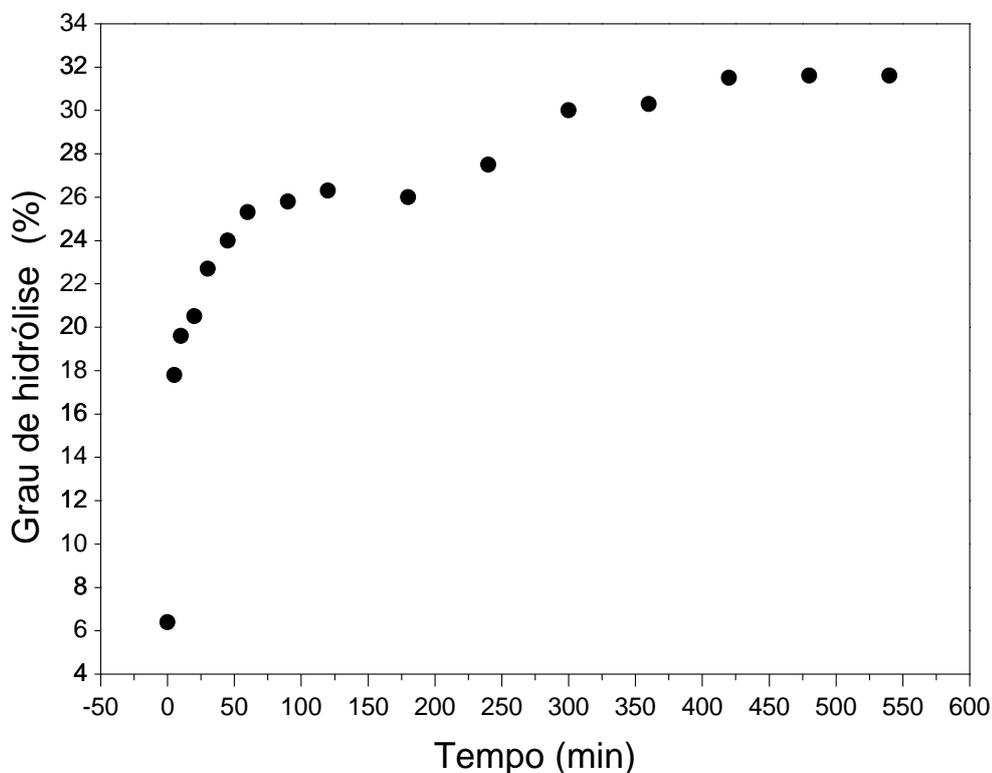


Figura 4.15 - Grau de hidrólise obtido com a variação da relação proteína:água com a enzima NovoPro-D®

Analisando-se a Figura 4.15, é possível verificar o comportamento do grau de hidrólise em relação ao tempo. Nota-se, que a curva cinética do processo de hidrólise com a enzima NovoPro-D®, durante o período avaliado (10 h), apresentou uma taxa inicial de reação alta (90 min), seguido de um aumento menos evidenciado até o final da reação. O melhor grau de hidrólise foi de 32% em 600 min, entretanto, verifica-se que a partir de 300 min (GH = 30%) até o final do processo (600 min, GH = 32%) a variação é muito pequena, não justificando a continuidade da reação devido ao elevado tempo necessário, para uma conversão de apenas 2%. Diante disso, verifica-se que o tempo adequado para uma aplicação industrial é de 250 a 300 min.

Contudo, um tempo de hidrólise de 9 h (550 min) seria economicamente inviável para a indústria devido ao tempo do processo e às mudanças que podem

surgir no hidrolisado, como a degradação dos princípios bioativos e amargor (SHEN *et al.*, 2012).

4.3.4 Caracterização química elementar, de vitaminas e aminoácidos do hidrolisado proteico oriundo de fígado suíno com enzima NovoPro-D®

Após a realização dos ensaios referentes ao planejamento experimental do tipo DCCR, fez-se a caracterização dos hidrolisados proteicos com a enzima NovoPro-D® na condição ótima, as quais estão apresentadas nas Tabelas 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21

Tabela 4.18 - Composição química percentual para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®

Componentes	Hidrolisado proteico	
	NovoPro-D® (1 h)	NovoPro-D® (4 h)
Cinzas (%)	1,0	1,1
Lipídeos (%)	2,0	3,0
Proteína total (%)	16,2	17,1
Umidade (%)	79,0	77,1

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

Tabela 4.19 - Conteúdo de vitaminas (mg 100g⁻¹) para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®

Vitaminas	Unidade	Hidrolisado proteico		IDR
		NovoPro-D® (1 h) (mg)	NovoPro-D® (4 h) (mg)	
A (Retinol)	µg 100 g ⁻¹	5050	5180	800
B1 (Tiamina)	mg 100g ⁻¹	0,064	0,105	1,1
B2 (Riboflavina)	mg 100g ⁻¹	2,3	2,41	1,4
B3 (Niacina)	mg 100g ⁻¹	19	15	15 – 18
B5 (Cálcio Pantotenato)	mg 100g ⁻¹	5	5,35	4 – 7
B8 (Biotina, Biacore)	mg kg ⁻¹	0,245	0,268	30 – 100
B9 (Folato, folacina)	µg 100 g ⁻¹	95,8	71,7	400
B12 (Cianocobalamina)	µg 100 g ⁻¹	9,41	13,5	1 - 3

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

Tabela 4.20 - Conteúdo de minerais para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®

Elementos	Nome estrutura	Hidrolisado proteico		
		NovoPro-D® (1 h) (mg)	NovoPro-D® (4 h) (mg)	IDR
P	Fósforo	6329,59	8481,96	800 – 1200
K	Potássio	5992,41	7784,59	3500
Ca	Cálcio	152,53	224,90	800 – 1200
Cr	Cromo	< 2,26	2,09	0,05 – 0,02
Mn	Manganês	4,59	7,33	2 – 5
Fe	Ferro	528,38	562,92	15
Cu	Cobre	48,31	50,11	1,5 – 3
Zn	Zinco	214,67	248,97	12 – 15
Se	Selênio	0,92	1,17	0,05 – 0,07

Tabela 4.21 - Composição média de aminoácidos para o hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®

Aminoácidos Essenciais (%)	Sigla	Hidrolisado proteico	
		NovoPro-D® (1 h)	NovoPro-D® (4 h)
Histidina	His	0,58	0,56
Arginina	Arg	0,77	0,84
Treonina	Thr	0,73	0,73
Valina	Val	1,03	1,04
Metionina	Met	0,38	0,37
Isoleucina	Ile	0,76	0,77
Leucina	Leu	1,53	1,55
Fenilalanina	Phe	0,82	0,83
Lisina	Lys	1,37	1,38
Triptofano	Trp	0,39	0,36
Σ Aminoácidos essenciais		8,36	8,43
Aminoácidos não essenciais (%)	Sigla	NovoPro-D® (1 h)	NovoPro-D® (4 h)
Ácido Aspártico	Asp	1,67	1,74
Ácido Glutâmico	Glu	2,18	2,20
Serina	Ser	0,75	0,73
Glicina	Gly	0,98	0,99
Alanina	Ala	0,99	1,01
Prolina	Pro	0,81	0,83
Tirosina	Tyr	0,56	0,57
Cisteína	Cys	0,31	0,33
Σ Aminoácidos não essenciais		8,25	8,40
Σ Aminoácidos		16,61	16,83
% Aminoácidos essenciais		50,33	50,09

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

Quanto aos resultados dos hidrolisados de fígado suíno utilizando a enzima NovoPro-D® com hidrólise de 1 e 4 horas apresentados nas Tabelas 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21, observa-se que os teores proteicos dos hidrolisados foram inferiores ao do fígado suíno *in natura* variando de (16,2 - 17,1%).

É possível notar pela Tabela 4.18, que a quantidade de proteínas apresentou uma redução, entretanto esta não foi significativa. Apesar disso, o hidrolisado proteico de fígado suíno oriundo da enzima NovoPro-D®, atende à demanda das recomendações diárias estabelecidas pela FAO (1991).

Di Bernardini (2011) obtiveram em seu estudo, utilizando fígado bovino, hidrolisado a partir da enzima termolisina que este subproduto pode ser utilizado como matéria-prima para a geração de peptídeos bioativos com atividades antioxidantes.

Diante do exposto, é possível notar que o fígado suíno *in natura* e os produtos da hidrólise enzimática apresentam um valor considerável de proteínas e baixo valor de gordura. O que beneficia o processo industrial, uma vez que o baixo teor de gordura incide em menores quantidades de enzima para o processo hidrolítico, podendo ser utilizados a fim de obter novos produtos de elevada qualidade biológica, nutricional e valor agregado.

4.4 Potencial para aplicação dos hidrolisados proteicos

4.4.1 Eletroforese

O perfil eletroforético pelo qual as proteínas são separadas baseia-se no tamanho referente aos padrões da massa molecular conhecidos (SIMPSON, 2011). A Figura 4.16 apresenta o perfil proteico das amostras de fígado suíno e hidrolisado e o tamanho molecular formado para cada enzima Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®.

Verificou-se que houve hidrólise em todas as amostras considerando a formação de peptídeos com baixo peso molecular (14 kDa), portanto ocorreu a

clivagem das ligações peptídicas. A distribuição dos peptídeos foi semelhante e compatível com a DH observado para as diferentes enzimas.

A enzima Alcalase 2.4 L® apresentou uma banda considerável na faixa de 25 a 40 kDa, os resultados estão em concordância, com os dados reportados por Anwar & Saleemuddin (1998). Enquanto que para a enzima NovoPro-D® as faixas de 35 a 45 kDa foram mais densas.

Estudos demostram que a enzima Alcalase 2.4 L® tem capacidade de produzir de peptídeos de baixo peso molecular quando há elevado grau de hidrólise (LALASIDIS *et al.*, 1978; BENJAKUL & MORRISSEY, 1997; LIASET *et al.*, 2000; ROSLAN *et al.*, 2015). este comportamento também foi observado para a enzima NovoPro-D®.

Ademais, as distribuições dos peptídeos foram semelhantes para ambas as enzimas e compatíveis com o grau de hidrólise. Ainda, é possível afirmar que houve formação de peptídeos bioativos, uma vez que a sua ocorrência se dá quando existem frações peptídicas de baixo peso molecular.

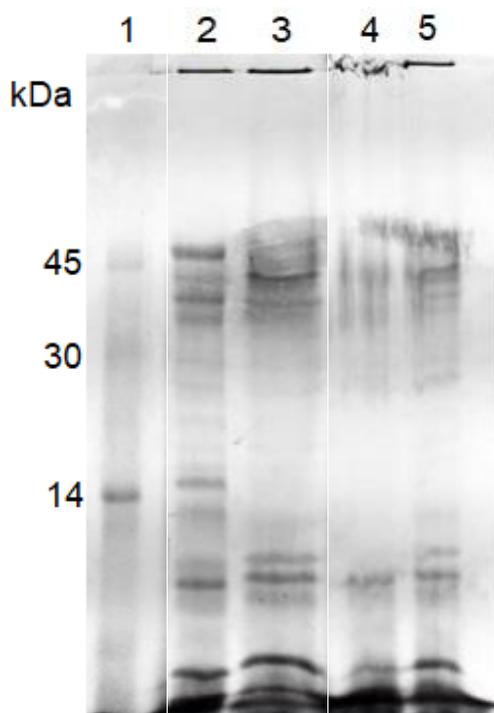


Figura 4.16 - Distribuição de peso molecular, faixa 1: controle, faixa 2: NovoPro-D® em 1 h, faixa 3: NovoPro-D® em 4 h, faixa 4: Alcalase 2.4 L® em 1 h e faixa 5: Alcalase 2.4 L® em 4 h

Ryder *et al.* (2016) investigaram o desempenho de cinco preparados de protease microbiana comercialmente disponíveis e averiguaram sua capacidade de produzir peptídeos bioativos, a partir de extratos de proteína miofibrilar e de tecido conjuntivo de carne hidrolisada oriundos da indústria. Os autores utilizaram a eletroforese para comparar a distribuição de massa molecular em diferentes condições de processo: com e sem hidrólise enzimática e tempo de hidrólise. Observaram que a formação dos peptídeos está associada a atividade antioxidante para ambas fontes proteicas, identificando nos maiores graus de hidrólise, elevada atividade antioxidante.

Aleman *et al.* (2011) verificaram a distribuição do peso molecular por eletroforese para hidrolisados de lula (*Dosidicus gigas*) empregando as proteases Rotamex, Tripsina, Neutrase, Savinase, NS37005, Esperase e Alcalase 2.4 L®. As faixas de perfis peptídicos revelaram diferenças consideráveis no grau de degradação das proteínas dependendo da enzima aplicada. Os hidrolisados com enzimas Alcalase 2.4 L®, Neutrase e Esperase apresentaram níveis elevados de peptídeos com peso molecular abaixo de 14 kDa, enquanto que hidrolisados com enzima Trypsine exibiram peptídeos com peso molecular acima de 14 kDa.

Abeyrathne *et al.* (2016) avaliaram a eletroforese para identificar a distribuição de massa molecular em diferentes condições de processo para a hidrólise enzimática de ovomucina, utilizando as proteases Alcalase 2.4 L® e Papaína. A faixa de peso molecular encontrada foi de 150 a 23000 Da. O número e o tamanho dos peptídeos encontrados foram relacionados as funcionalidades presentes nos hidrolisados. A enzima Alcalase 2.4 L® a 1% por 3 h foi a que conseguiu hidrolisar a ovomucina quase por completo, produzindo monômeros de aminoácidos e peptídeos com peso molecular menores de 700 Da.

4.4.2 Propriedades funcionais dos hidrolisados de fígado suíno

As propriedades funcionais foram avaliadas para os hidrolisados proteicos produzido com 1 e 4 h de hidrólise, para ambas as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®. As Tabelas 4.22 e 4.23 apresentam estes resultados.

Tabela 4.22 – Propriedades funcionais do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L®, temperatura 64°C, pH 6,4, em 1 h e 4 h

Propriedades funcionais	Hidrolisado proteico	
	Alcalase 2.4 L® (1 h)	Alcalase 2.4 L® (4 h)
Capacidade de absorção de água (%)*	202,2 ± 12,9	145,9 ± 12,1
Capacidade de absorção de óleo (%)	197,3 ± 10,2	179,3 ± 5,5
Capacidade emulsificante (%)	37,0 ± 2,3	49,8 ± 2,9
Estabilidade da emulsão (%)	51,6 ± 3,1	43,4 ± 4,8
Capacidade espumante (%)	17,5 ± 2,5	37,8 ± 3,8
Estabilidade da espuma (%)	11,4 ± 1,0	33,8 ± 5,4

* Base seca.

Tabela 4.23 – Propriedades funcionais do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D®, temperatura 64°C, pH 6,4, em 1 h e 4 h

Propriedades funcionais	Hidrolisado proteico	
	NovoPro-D® (1 h)	NovoPro-D® (4 h)
Capacidade de absorção de água (%)*	203,8 ± 26,7	135,6 ± 1,6
Capacidade de absorção de óleo (%)	219,0 ± 7,7	161,7 ± 9,1
Capacidade emulsificante (%)	42,1 ± 1,3	45,9 ± 4,6
Estabilidade da emulsão (%)	51,00 ± 0,3	47,9 ± 5,3
Capacidade espumante (%)	17,7 ± 2,3	50,7 ± 1,2
Estabilidade da espuma (%)	28,5 ± 0,2	60,7 ± 1,2

* Base seca.

Analisando a Tabela 4.22, o hidrolisado com enzima Alcalase 2.4 L® no tempo de 1 h apresentou elevada capacidade de absorção de água seguido de óleo, 202,2 e 197,3%, respectivamente. Enquanto, a estabilidade de espuma foi a que demonstrou menor ordem tanto na hidrólise com 1h e 4h. Já para os hidrolisados empregando a enzima NovoPro-D® (Tabela 4.23), a capacidade de absorção de óleo foi maior que a de água, 219,0 e 203,8%, respectivamente no tempo de hidrólise de 1 h.

As funcionalidades de capacidade de absorção de água e absorção de óleo são relevantes na indústria alimentícia. A capacidade de absorção de água, por exemplo, contribui para dar corpo e aumentar a viscosidade (CÂNDIDO *et al.*, 1998). Enquanto, a capacidade de absorção de óleo influencia no sabor e, ainda, tem papel importante para produtos cárneos emulsionados (ZAVAREZE *et al.*, 2009). Ademais, a capacidade de absorção de óleo varia de acordo com

o número de grupos hidrofóbicos expostos da proteína, pois, as cadeias laterais não polares das proteínas possuem afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura, o que por sua vez, contribui para a absorção de gordura (DONADEL & PRUDÊNCIO-FERREIRA, 1999).

De acordo com Tavano (2013) as enzimas proteases apresentam um grande faixa de variáveis e especificidades. Quando aplicadas de forma adequada em fonte proteica a ser hidrolisada, torna-se uma importante ferramenta para obtenção e/ou modificação das propriedades funcionais das proteínas em sistemas alimentares, incluindo mudanças na solubilidade, gelatinização, emulsificação, sabor e formação de espuma. Ademais, transformando ou liberando peptídeos bioativos para o hidrolisado.

Para Rosa *et al.* (2018) o hidrolisado de soro de leite com Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, apresentou propriedades bioativas e funcionais como capacidade e estabilidade emulsificante devido a formação de peptídeos. Este cenário, dispõe de potencial de aplicação de coprodutos lácteos, visando interesse para as indústrias de alimentos e nutraceuticas.

Na pesquisa desenvolvida por Amagliani *et al.* (2019) compararam a proteína hidrolisada de arroz com fontes proteicas comerciais empregadas como ingredientes funcionais. Os resultados obtidos pelos autores, demonstraram um aumento das propriedades funcionais do hidrolisado em relação as fontes proteicas comerciais, sendo as funcionalidades, formação e estabilidade de espuma e solubilidade, as que apresentaram os melhores valores. Os autores concluíram que os hidrolisados de arroz podem ser incluídos em ingredientes funcionais, e assim, ofertando ao mercado novas opções para formulações de alimentos, como as de bebidas esportivas e nutricionais, entéricas e produtos de nutrição, fórmulas infantis, sopas, molhos, temperos para saladas, coberturas chantilly e *creamers* de café.

Nessa perspectiva, verifica-se que matéria-prima fígado suíno, geralmente subutilizada para a produção de farinhas e óleos para nutrição animal e ou produção de compostos agrícolas, produtos de baixo valor de mercado, quando convertida por processo de hidrólise apresenta maior potencial de

aplicação, em diversos segmentos e com valor comercial considerável (FERREIRA *et al.*, 2018).

4.4.3 Comportamento reológico

Os hidrolisados proteicos de fígado suíno obtidos pela ação das enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, no tempo de 4 h (condição ótima) foram avaliados quando ao seu comportamento reológico, viscosidade aparente e tensão de cisalhamento nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C conforme demonstram as Figuras 4.17 e 4.18.

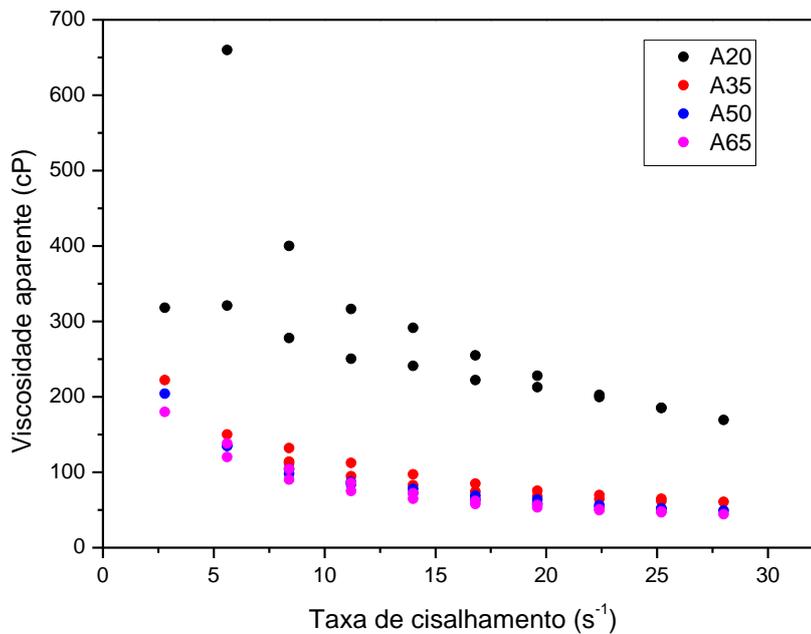


Figura 4.17 – Reograma da viscosidade vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C

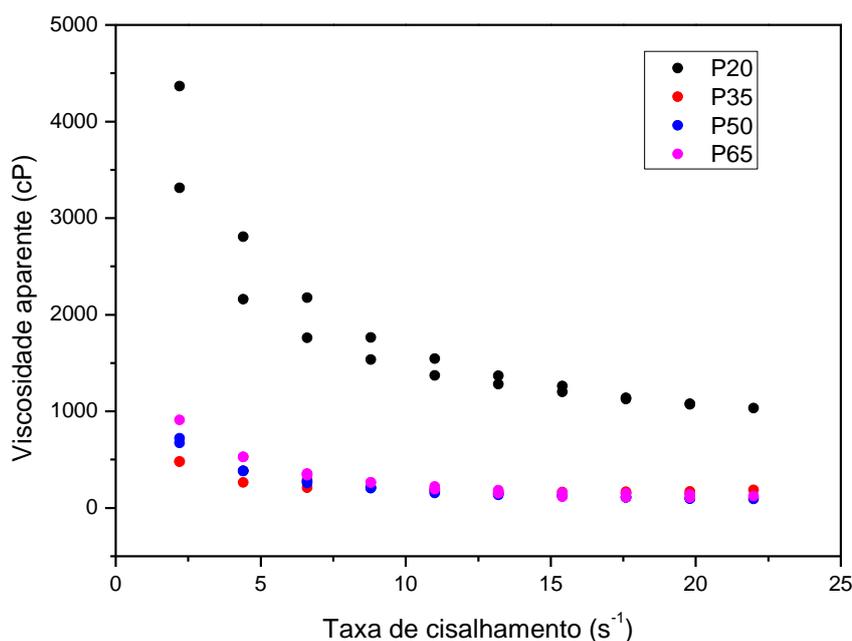


Figura 4.18 – Reograma da viscosidade vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C

Verifica-se (Figuras 4.18 e 4.19) que o comportamento reológico se apresentou não-newtoniano, caracterizado por ser pseudoplástico, no qual a viscosidade aparente diminuiu com a taxa de cisalhamento. Ainda, na temperatura de 20°C tem-se que comportamento reológico para ambos os hidrolisados é dependente do tempo, isto pode ser verificado pelo sistema de histerese entre a curva ascendente e descendente. Outrossim, nas temperaturas de 35, 50 e 65°C este estímulo (histerese) não foi detectado. A viscosidade aparente das amostras hidrolisadas não apresentaram variação significativa na faixa de 35 a 60°C.

As Figuras 4.19 e 4.20 apresentam o perfil reograma da tensão de cisalhamento *versus* a taxa de cisalhamento dos hidrolisado proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C. Tem-se que a viscosidade aumentou com o acréscimo na taxa de cisalhamento, destacando-se na temperatura de 20°C. Para as temperaturas de 35, 50 e 65°C, a tensão de cisalhamento sofreu baixa influência da taxa de cisalhamento.

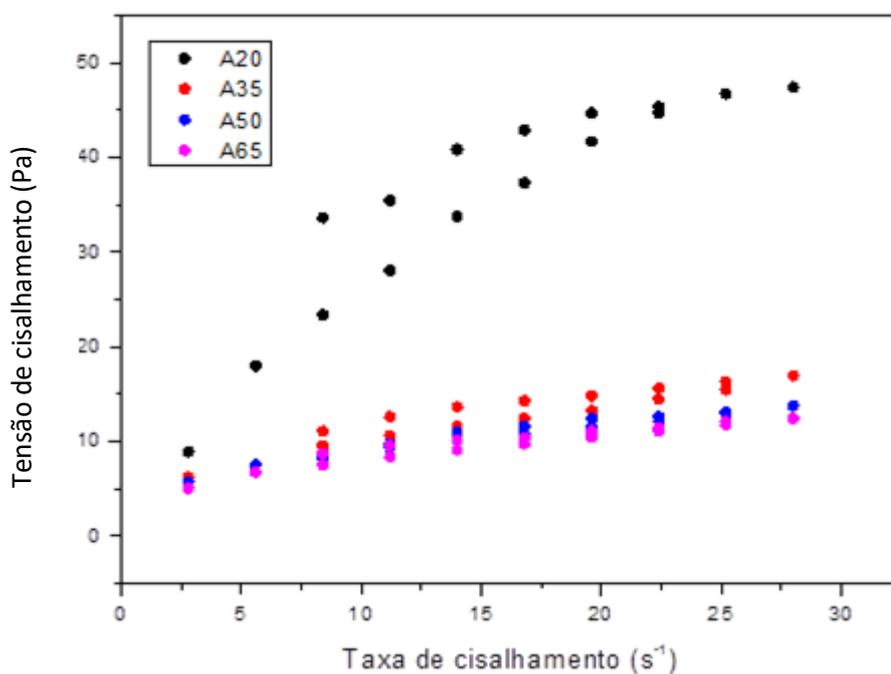


Figura 4.19 – Reograma da tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C

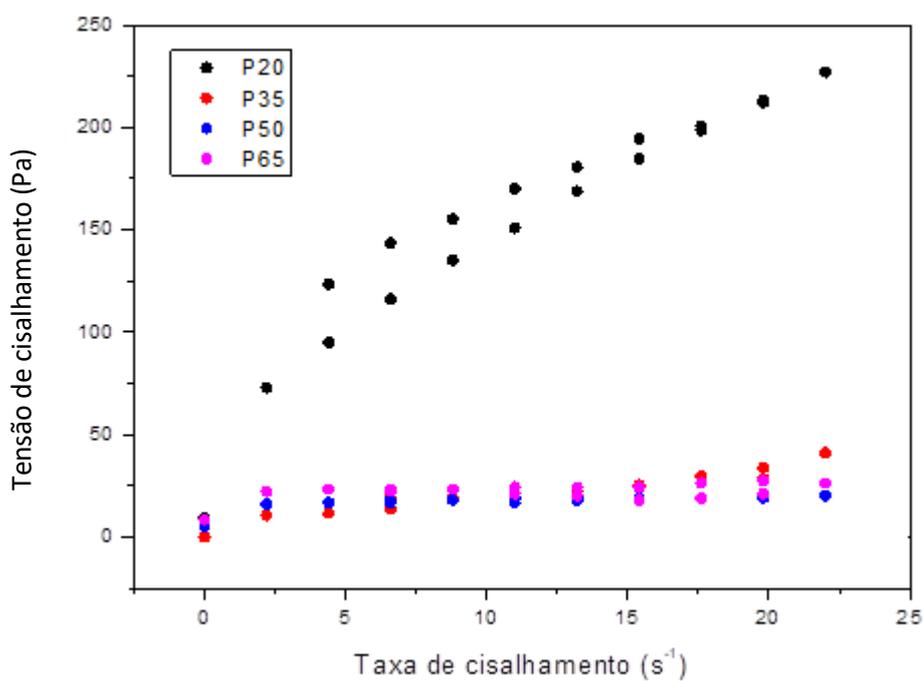


Figura 4.20 – Reograma da tensão de cisalhamento vs taxa de cisalhamento do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® nas temperaturas de 20, 35, 50 e 65 °C

De um modo geral, a enzima NovoPro-D® produziu hidrolisados proteicos de fígado suíno menos viscosos, embora os dados numéricos da viscosidade aparente sejam comparáveis aos tratamentos com o uso de um *spindle* com maior área de contato (SC4-25). Indicando que o hidrolisado proveniente da ação da enzima NovoPro-D® apresentou menor viscosidade em relação a Alcalase 2.4 L® com *spindle* SC4-34, uma vez que os torques se encontravam no intervalo de 1 a 10%, havendo a necessidade de se empregar *spindles* com maior ou menor área de contato com a amostra para os hidrolisados da enzima Alcalase 2.4 L®.

De acordo com estudos realizados por Zou *et al.* (2017) em que avaliaram a reologia da proteína isolada de fígado de pato por meio de extração convencional e extração assistida por ultrassom. Os autores observaram que para os dois modos de extração houve um comportamento de diminuição da viscosidade aparente com a taxa de cisalhamento. A diminuição da viscosidade da solução pode ser atribuída à redução no tamanho das partículas e na carga superficial. Além disso, o comportamento do fluxo das dispersões de proteínas pode ser atribuído a sua composição, assim como pela forma molecular, tamanho e, ainda, carga das proteínas (ARZENI *et al.*, 2012).

Estas características de reologia permitem aplicações em diferentes condições, como em embutidos cárneos em que a textura ou consistência do produto pode ser ajustado conforme a necessidade de aplicação e ou consumo.

4.4.5 Distribuição da massa molecular dos peptídeos dos hidrolisados de fígado suíno

Os hidrolisados proteicos de fígado suíno obtidos pela reação proteolítica das enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, no tempo de 1 h (notoriamente aplicado em escala industrial) e 4 h (condição ótima definida neste estudo), temperatura de hidrólise de 64°C e pH de 6,4, foram avaliados em relação a distribuição da massa molecular dos peptídeos, conforme apresentados nas Tabelas 4.24 e 4.25, e Figura 4.21.

Tabela 4.24 – Distribuição da massa molecular dos peptídeos do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima Alcalase 2.4 L® em 1 h e 4 h

Massa molecular (Da)	Alcalase 2.4 L® (1 h)		Alcalase 2.4 L® (4 h)	
	% Por faixa	% Abaixo da faixa	% Por faixa	% Abaixo da faixa
8000 a 9000	0	100	0	100
7000 a 8000	0	100	0	100
6000 a 7000	0	100	0	100
5000 a 6000	0	100	0	100
4000 a 5000	0,7	99,3	0	100
3000 a 4000	8,1	91,2	7,8	98,0
2000 a 3000	15,1	83,1	8,1	91,2
1000 a 2000	21,4	68,0	15,2	83,1
500 a 1000	24,5	46,6	34,6	67,9
Abaixo de 500	22,1	22,1	33,3	33,3

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

Tabela 4.25 – Distribuição da massa molecular dos peptídeos do hidrolisado proteico de fígado suíno com a enzima NovoPro-D® em 1 h e 4 h

Massa molecular (Da)	NovoPro-D® (1 h)		NovoPro-D® (4 h)	
	% Por faixa	% Abaixo da faixa	% Por faixa	% Abaixo da faixa
8000 a 9000	0	100	0	100
7000 a 8000	0,3	99,7	0	100
6000 a 7000	0,5	99,2	0	100
5000 a 6000	1,1	98,7	0	100
4000 a 5000	7,8	97,6	0	100
3000 a 4000	7,9	89,8	0	100
2000 a 3000	5,9	81,9	0	100
1000 a 2000	8,7	76,0	6,2	97,3
500 a 1000	27,9	67,3	8,4	90,7
Abaixo de 500	39,4	39,4	82,3	82,3

Temperatura hidrólise: 64°C

pH: 6,4

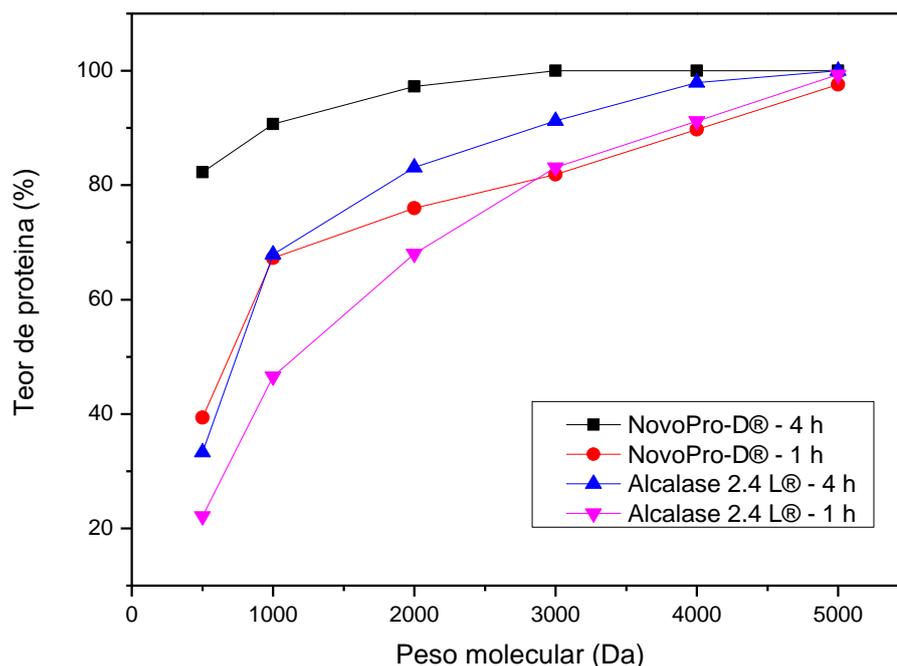


Figura 4.21 – Distribuição da massa molecular dos peptídeos do hidrolisado proteico de fígado suíno com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h, temperatura de hidrólise de 64°C e pH 6,4, respectivamente

De acordo com análise da distribuição de massas dos peptídeos, Tabelas 4.24 e 4.25, e Figura 4.21, as reação proteolítica com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D®, quando submetidas a um maior tempo de hidrólise (4 h), tem-se uma elevação na quantidade de cadeias de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres formados. De acordo com Lunelli (2015) um maior tempo de hidrólise fornece maior proporção de peptídeos de cadeias curtas e aminoácidos livres, este comportamento foi observado neste estudo empregando as enzimas Pepsina, Neutrase e Papaína em subproduto cabeça de tilápia.

Ao observamos a Figura 4.21, enzima Alcalase 2.4 L®, têm-se que a obtenção de peptídeos de baixo peso molecular para 1 h de hidrólise foi de 5 kDa, e para 4 h, 4 kDa. Enquanto, para a enzima NovoPro-D®, 100% dos peptídeos formados está abaixo de 8kDa para o hidrolisado com 1 h de reação, já o hidrolisado com 4 h a formação de peptídeos ficou abaixo de 3kDa. Desta forma, é possível concluir que em termos de tempo de hidrólise e enzima, o

tempo de 4 h e a NovoPro-D® apresentaram-se como melhores para a formação de peptídeos bioativos.

No estudo de Siow *et al.* (2013) avaliaram a formação de peptídeos bioativos antioxidantes e anti-hipertensivos a partir da semente de *Parkia speciosa* com a enzima Alcalase. Na condição de hidrólise a 50°C, relação substrato:enzima a 50% por 2 h, exibiu a maior atividade de eliminação de radicais DPPH (2,9 mg GAE g⁻¹), reduzindo o poder (11,7 mM) de atividade inibidora da ECA (80,2%), com bioatividades mais fortes para fracionamento peptídico <10 kDa. Os autores, sugeriram aplicações para os peptídeos bioativos nas indústrias nutracêuticas e alimentícias.

Há inúmeras aplicações para os hidrolisados proteicos as quais são estabelecidas em virtude do peso molecular dos peptídeos. Sendo assim, peptídeos com peso molecular entre 5 e 20 kDa são comumente utilizados como fonte de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e, também, para suplementos alimentares para adultos. Enquanto, os peptídeos com peso molecular menor que 5 kDa, os quais são resultantes de processo hidrolíticos com grau de hidrólise elevados, são empregados em formulações hipoalergênicas (MAHMOUD, 1994).

Nesse sentido, os peptídeos formados pelos hidrolisados podem ser empregados na indústria de alimentos e nutracêuticos. Pois segundo Pogorzelska-Nowicka *et al.* (2018) a matéria-prima carne e seus derivados são fontes apreciáveis de compostos bioativos com efeitos positivos para a saúde humana devido a presença de vitaminas, minerais, peptídeos ou ácidos graxos.

4.4.6 Determinação de atividades biológicas formadas nos hidrolisados de fígado suíno

4.4.6.1 Atividade anti-hipertensiva

A atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados e do fígado suíno *in natura* foram determinadas pelo método de inibição da atividade enzimática da ECA (enzima conversora de angiotensina), os resultados são apresentados na Tabela 4.26.

Tabela 4.26 - Propriedades anti-hipertensivas do fígado suíno *in natura* e dos hidrolisados proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h, temperatura hidrólise 64°C e pH 6,4

Amostras	Atividade anti-hipertensiva (inibição % da ECA)		
	0,10 mg mL ⁻¹	0,25 g mL ⁻¹	0,50 mg mL ⁻¹
Fígado suíno <i>in natura</i>	36,02 ± 2,74 ^c	70,28 ± 8,54 ^{a, b}	67,55 ± 4,05 ^{b, c}
Alcalase 2.4 L® (1 h)	41,81 ± 8,74 ^{b, c}	59,77 ± 10,53 ^b	63,98 ± 9,09 ^{b, c}
Alcalase 2.4 L® (4 h)	51,98 ± 5,29 ^b	52,20 ± 8,70 ^b	55,66 ± 8,67 ^c
NovoPro-D® (1 h)	48,77 ± 4,89 ^{b, c}	61,88 ± 2,88 ^b	70,22 ± 8,07 ^{a, b}
NovoPro-D® (4 h)	51,68 ± 6,93 ^b	57,87 ± 6,70 ^b	52,41 ± 13,75 ^c

Os resultados estão expressos como a média (n=3)±desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que o resultado é significativamente diferente (p<0,05).

Os resultados para atividade anti-hipertensiva (Tabela 4.26) demonstram que, a hidrólise enzimática das proteínas de fígado suíno aumentou a capacidade de inibição da ECA (%), quando as amostras foram avaliadas na concentração de 0,10 mg mL⁻¹. No entanto, em concentrações superiores (0,25 e 0,50 mg mL⁻¹), os hidrolisados apresentaram capacidade similar ou inferior à amostra não hidrolisada (fígado suíno *in natura*).

Os fígados de suíno hidrolisados por ambas as enzimas apresentaram a presença de bioatividade anti-hipertensiva. A enzima NovoPro-D®, apresentou um nível maior de peptídeos com bioatividade pelos resultados encontrados.

As variações de valores resultantes dos produtos hidrolisados estão próximos ao da matéria-prima no estado *in natura*, sugere ser devido ao produto *in natura* já possuir a característica de capacidade anti-hipertensiva antes da hidrólise, e que foi mantida em valores próximos.

Conforme esta mesma (Tabela 4.26) o aumento do GH para a concentração de 0,10 mg mL⁻¹ foi acompanhado pelo aumento da capacidade anti-hipertensiva e em concentrações maiores, o aumento do GH indicou uma redução da capacidade hipertensiva.

A presença de atividade anti-hipertensiva no fígado *in natura* é uma característica natural do produto e o processo de hidrólise é uma opção viável para o seu processamento sem perda desta bioatividade pois o fígado hidrolisado apresenta níveis estáveis e preservados após o processo e apta para

o consumo, observando porém que é de baixo ou nenhum impacto para o aumento em relação ao produto in natura.

Ambas as enzimas tiveram comportamento semelhante sem diferença estatística independentemente do método e tempo de hidrólise sendo, portanto, indiferente a enzima utilizada neste experimento para obtenção da bioatividade anti-hipertensiva.

Os peptídeos presentes em produtos cárneos provaram efeitos benéficos na saúde, devido a existência de diferentes bioatividades, incluindo atividades anti-hipertensivas, antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobiana, anticancerígenas (UDENIGWE *et al.*, 2012).

Segundo Albenzio *et al.* (2017), os peptídeos bioativos de produtos cárneos mais extensamente estudados são a enzima conversora de angiotensina I (ACE-I), provavelmente devido à sua implicação na regulação da pressão sanguínea. Portanto, a inibição da (ACE) pode estar ligada à prevenção de doenças cardiovasculares (AHMED *et al.*, 2010).

No estudo realizado por Escedero *et al.* (2010), utilizando proteases de pepsina e pancreatina, isolaram *in vitro* vinte e dois peptídeos (ACE-I) em carne de suíno. A maior atividade anti-hipertensiva foi observada nas sequências de peptídeos KAPVA e PTPVP. Posteriormente, os mesmos autores (ESCUDERO *et al.*, 2012), investigaram *in vivo*, a bioatividade de KAPVA e PTPVP e RPR em ratos e encontraram uma grande diminuição da pressão sanguínea após 8 horas de administração oral destes bioativos.

De acordo com Lucas *et al.* (2020) diversas variedades de insetos como matéria-prima e utilizaram as enzimas α -amilase, Pepsina, Pancreatina, Alcalase, Termolisina e R-chymotrypsin, obtiveram peptídeos com atividade anti- hipertensiva.

Na pesquisa desenvolvida por Roslan *et al.* (2014) empregaram subproduto de Tilápia e utilizaram a enzima Alcalase para a realização da hidrólise enzimática. Os resultados evidenciaram a presença de peptídeos com bioatividade anti-hipertensiva.

Segundo estudos realizados por Abeyrathne *et al.* (2015) em que utilizaram ovomucina, glicoproteína sulfatada, e as enzimas Pepsina, Tripsina, Papaína e Alcalase 2.4 L® para a obtenção de hidrolisados proteicos e o resultado. Os autores concluíram a presença de peptídeos com bioatividade anti-hipertensiva.

4.4.6.2 Atividade antioxidante

Pelos resultados apresentados na Figura 4.21, foi identificado presença de peptídeos de baixa massa molecular e compatível com as faixas onde se encontra as atividades biológicas e presentes para o fígado suíno *in natura* e nos hidrolisados de fígado para ambas as enzimas, para as condições hidrolíticas no tempo de 1 h e 4 h. As propriedades antioxidantes foram determinadas pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, os resultados estão demonstrados na Tabela 4.27.

Tabela 4.27 - Propriedades antioxidantes do fígado suíno *in natura* e dos hidrolisados proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h, temperatura hidrólise 64°C e pH 6,4

Amostras	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol de TE g}^{-1}\text{amostra}$)		
	ABTS	DPPH	FRAP
Fígado suíno <i>in natura</i>	13,67 \pm 2,62 ^e	4,33 \pm 0,52 ^c	2,99 \pm 0,33 ^d
Alcalase 2.4 L® (1 h)	43,02 \pm 0,54 ^c	15,64 \pm 3,33 ^{a, b}	23,18 \pm 0,98 ^b
Alcalase 2.4 L® (4 h)	55,18 \pm 1,93 ^a	20,18 \pm 2,92 ^a	37,65 \pm 1,04 ^a
NovoPro-D® (1 h)	42,66 \pm 0,63 ^c	10,07 \pm 0,64 ^b	15,44 \pm 1,25 ^c
NovoPro-D® (4 h)	50,45 \pm 1,67 ^b	14,38 \pm 2,38 ^b	25,01 \pm 1,42 ^b

Os resultados estão expressos como a média (n=3) \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que o resultado é significativamente diferente ($p < 0,05$).

Observa-se (Tabela 4.27) que independentemente do método utilizado para determinar as propriedades antioxidantes das amostras de hidrolisados, enzimas e tempos avaliados, verifica-se que a hidrólise do fígado suíno é positiva, e melhora (disponibiliza) as propriedades antioxidantes das proteínas presentes na matéria-prima fígado.

Ainda, Tabela (4.27), é possível constatar que o tempo de hidrólise, indiferente da enzima utilizado no processo hidrolítico, melhora a atividade

antioxidante do hidrolisado, este fenômeno ocorre, independentemente do método analítico utilizado para a quantificação.

No estudo desenvolvido por Iwaniak *et al.* (2016), evidenciaram que os peptídeos de 3 a 16 aminoácidos tem maior atividade antioxidante que os peptídeos de maior cadeia, compatível com os resultados apresentados na Tabela (4.27) visto que quanto maior o GH maior será a presença da bioatividade de antioxidante.

Ao avaliarmos o potencial antioxidante (Tabela 4.27) frente as enzimas utilizadas no processo de hidrólise do fígado suíno, verifica-se que a Alcalase 2.4 L® foi a que demonstrou maior efeito para a atividade antioxidante.

Ao compararmos o potencial antioxidante (Tabela 4.27) do fígado suíno *in natura* com os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase 2.4 L®, método ABTS, tem-se que, após 1 e 4 h de hidrólise, houve elevação do potencial de 215 e 304%, respectivamente, na atividade antioxidante frente a matéria-prima *in natura*. Enquanto os hidrolisados proteicos de fígado suíno com a NovoPro- D®, após 1 e 4 h apresentaram aumentos de 212 e 269% na atividade antioxidante, respectivamente, em comparação com o fígado (*in natura*).

Para as atividades antioxidantes avaliadas pelos métodos DPPH e FRAP, a hidrólise enzimática também afetou positivamente as propriedades biológicas das proteínas de fígado. Nesse caso, ficou evidente que a hidrólise utilizando a enzima Alcalase 2.4 L® durante 4h foi o processo hidrolítico mais adequado para obter hidrolisados com maiores atividades antioxidantes, apresentando aumentos de 3 e 11 vezes, na capacidade de inibição de radicais DPPH e capacidade de redução do íon ferro, FRAP, respectivamente, em relação à amostra de proteínas de fígado não hidrolisada (*in natura*).

Em todos os métodos e tempos de hidrólise analisados, a enzima Alcalase 2.4 L®, se manteve sempre superior à enzima NovoPro- D®, para a formação da bioatividade antioxidante, sendo conforme estudo, mais indicada para esta finalidade.

Também se observa neste estudo que um maior GH favoreceu ao aumento da formação de bioatividade anti-oxidante.

Estudos de Bechaux *et al.* (2019) relataram que a bioatividade antioxidante, conforme o banco de dados BIOPEP, é a segunda mais identificada, com 622 sequências reportadas de um total de 3786 sequências identificadas.

Em trabalhos realizados por Verma *et al.* (2017) empregaram fígado suíno para a obtenção de hidrolisados proteicos com a utilização da enzima Alcalase 2.4 L® com o intuito de pesquisar a bioatividade. O resultado encontrado foi a presença de peptídeo com atividade antioxidante.

Em outro estudo os mesmos autores Verma *et al.* (2018) analisaram hidrolisados obtidos de sangue suíno, utilizando as enzimas Alcalase, Tripsina e Papaína, avaliaram a influência do tempo e GH em diferentes pH's. Os resultados identificaram que com o aumento do GH há o aumento da atividade anti-oxidante.

Os resultados obtidos por Chen *et al.* (2019), na hidrólise enzimática de plasma suíno utilizando a enzima Alcalase 2.4 L®, também identificaram a presença de peptídeos com atividade antioxidante.

Pesquisa realizadas por Chakka *et al.* (2015) investigaram a formação de peptídeos antioxidantes utilizando o processo de fermentação e hidrólise enzimático, empregando a enzima Alcalase 2.5 L e identificaram a formação desta bioatividade.

4.4.6.3 Atividade antidiabética

A atividade antidiabética das amostras hidrolisadas e do fígado suíno *in natura* foi determinada em função da inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase, os resultados estão apresentados na Tabela 4.28.

Tabela 4.28 - Propriedades antidiabéticas do fígado suíno *in natura* e dos hidrolisados proteicos com as enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro-D® em 1 h e 4 h, temperatura hidrólise 64°C e pH 6,4

Amostras	Inibição (%) da atividade de α -amilase	
	5 mg mL ⁻¹	10 mg mL ⁻¹
Fígado suíno <i>in natura</i>	33,02 ± 6,76 ^{a,b}	37,04 ± 4,92 ^c
Alcalase 2.4 L® (1 h)	33,49 ± 8,52 ^{a,b}	59,00 ± 3,59 ^b
Alcalase 2.4 L® (4 h)	28,33 ± 8,46 ^{a,b}	48,49 ± 6,11 ^{b,c}
NovoPro-D® (1 h)	26,81 ± 12,07 ^{a,b}	39,39 ± 7,56 ^c
NovoPro-D® (4 h)	20,31 ± 6,48 ^b	35,58 ± 6,39 ^c

Amostras	Inibição (%) da atividade de α -glicosidase	
	5 mg mL ⁻¹	10 mg mL ⁻¹
Fígado suíno <i>in natura</i>	20,16 ± 1,25 ^a	26,21 ± 0,78 ^a
Alcalase 2.4 L® (1 h)	20,79 ± 2,83 ^a	24,83 ± 1,50 ^a
Alcalase 2.4 L® (4 h)	18,30 ± 1,69 ^a	21,10 ± 2,88 ^a
NovoPro-D® (1 h)	18,45 ± 2,35 ^a	27,01 ± 4,54 ^a
NovoPro-D® (4 h)	21,58 ± 2,74 ^a	25,34 ± 0,70 ^a

Os resultados estão expressos como a média (n=3)±desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que o resultado é significativamente diferente (p<0,05).

Os resultados em função da concentração de amostra para inibição da atividade de α -amilase (Tabela 4.28), apresentaram distintos entre as atividades. Na concentração de 5 mg mL⁻¹, os hidrolisados proteicos apresentaram capacidade de inibição da atividade de α -amilase, similar ou inferior ao fígado suíno *in natura* (não hidrolisado). Entretanto, esta capacidade foi maior com o aumento da concentração da amostra de hidrolisado proteico (10 mg mL⁻¹). O melhor resultado foi para o hidrolisado de fígado utilizando a enzima Alcalase 2.4 L® após uma 1h de hidrólise, a inibição foi de 59% (Tabela 4.28), enquanto que o fígado *in natura* na concentração de 10 mg mL⁻¹ obteve inibição máxima de 37,04%.

Para atividade de α -glicosidase, os níveis de inibição foram inferiores aos observados para α -amilase e não apresentaram diferença significativa (p< 0,05) quando comparadas as amostras hidrolisadas e *in natura*, independente da concentração de amostra. Nota-se também, que o aumento na concentração das amostras resulta em um pequeno aumento na capacidade de inibição enzimática. O valor máximo de redução na atividade de α -glicosidase foi detectado para a amostra de proteína de fígado hidrolisada com NovoPro-D®,

durante 1 h, atingindo 27,01% na concentração de 10 mg mL⁻¹, mas, sem diferença significativa para as demais amostras avaliadas na mesma concentração (Tabela 4.28).

Para inibição da atividade de α -amilase a enzima Alcalase 2.4 L® teve um desempenho melhor que a enzima NovoPro-D®, sendo que o aumento do GH tendeu a uma redução da bioatividade.

Para a inibição da atividade α -glicosidase,, ambas as enzimas foram semelhantes estatisticamente e o aumento do GH se apresentou sem diferença estatística para obtenção desta bioatividade.

4.5 Considerações finais e potencial de aplicação do hidrolisado de fígado suíno

O fígado suíno é uma matéria prima que tem variáveis de processo que foram otimizadas e tornam sua aplicação possível em escala industrial, por apresentar parâmetros compatíveis com os indicados pelos fabricantes de enzima e dentro de faixas de aplicações brandas considerando temperatura e pH.

Outro ponto importante para destacar, a manutenção dos níveis de vitaminas e minerais, comprovando a condição favorável de se preservar as condições naturalmente encontradas no fígado in natura.

Na distribuição de massa molecular, se observa que o produto se encontra em faixas inferiores a 10.000 Da, e na maior parte, mais de 90%, abaixo de 3.000 Da sendo um produto para aplicação como hipoalergênico e que atualmente já tem um grande mercado na indústria PET, onde já é um produto produzido em escala industrial e com potencial para ser utilizado para outras espécies e aplicações na área.

Os produtos obtidos, apresentam diversas características de funcionalidade, sendo que a capacidade de absorção de água e óleo apresentaram resultados de maior potencial, para as duas enzimas empregadas. Também apresentaram características como capacidade emulsificante e de estabilidade de emulsão. Estas características são desejáveis para diversos segmentos da indústria alimentícia, onde além de base proteica, auxilia na formulação, estabilidade e homogeneização dos diversos ingredientes das formulações.

Em relação à bioatividades, se observou que a bioatividade anti-oxidante, apresentou o maior potencial de aplicação para o hidrolisado de fígado suíno. A enzima Alcalase 2.4 L® teve um melhor desempenho assim como um maior GH impactou positivamente no aumento desta bioatividade. Esta performance do produto, possibilita o uso em formulação de alimentos com finalidade nutracêutica e se pode aplicar para vários públicos alvos, como atletas,

convalescentes e mesmo para compor a base nutricional de uma alimentação saudável, seja para alimentação para humanos como para animais.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

O fígado suíno apresenta potencial para utilização no desenvolvimento de novos produtos alimentares e nutracêuticos, devido sua composição ser formada por vitaminas, minerais e elevado teor de proteínas, contemplando todos os aminoácidos essenciais.

Quanto as propriedades funcionais identificaram-se a capacidade de absorção de água e óleo, capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão, capacidade e estabilidade da espuma permitindo que passe a ser uma alternativa de aplicação para indústria de alimentos e uma opção para redução de aditivos em alimentos.

Enquanto à reologia apresentaram comportamento reológico não-newtoniano, com a característica de que a viscosidade aparente diminuiu com a taxa de cisalhamento, compatível com pseudoplástico.

Pela análise qualitativa de eletroforese identificou a presença de peptídeos de baixa massa molecular. Condição confirmada por análise quantitativa, em tamanhos compatíveis às faixas relacionadas com a presença de peptídeos bioativos, que se encontram abaixo de 8.000 Ka, tanto para os hidrolisados proteicos produzidos com a enzima Alcalase 2.4 L®, sendo 6000 Da abaixo de 100% com 1h e 100% abaixo de 4000 Da com 4h, e para a NovoPro-D®, os resultados foram 9000 Da e 3000 Da, respectivamente.

Em relação as atividades biológicas, verifica-se que a hidrólise, afetou positivamente as propriedades antioxidantes do substrato. Sendo que, a enzima Alcalase 2.4 L® no tempo de 4h apresentou-se mais adequada para obter hidrolisados com alta atividade antioxidante; comprovando a presença de peptídeos bioativos. Para atividade anti-hipertensiva, todas as amostras proporcionaram capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).

As propriedades antidiabéticas avaliadas em função da inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase, mostraram que na

concentração de 10 mg mL^{-1} , foi possível observar o efeito positivo da reação hidrolítica, sendo o hidrolisado oriundo da Alcalase 2.4 L® 1h, obteve inibição da atividade de α -amilase em 59%. Enquanto que o fígado *in natura* apresentou capacidade máxima de inibição de 37,04%.

Diante do explanado, nota-se que pelo grau de hidrólise (variação), pode-se obter produtos com diferentes características funcionais e de bioatividades, comprovando o potencial de aplicação do fígado suíno como matéria-prima alternativa e promissora. Possibilitando a ampliação do portfólio de produtos industriais de modo a atender as demandas do mercado, a partir de produtos com alto valor nutricional e nutracêutico.

CAPÍTULO 6 – DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Artigo publicado: Optimization of porcine liver enzymatic hydrolysis conditions, na revista Journal of Food Process Engineering em 17 de dezembro de 2019.

Em 10 de dezembro de 2019, a patente intitulada “Funcionalidades do hidrolisado proteico integral de fígado suíno” foi depositada pelo INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Além da apresentação e publicação em anal (ISSN: 2447-2816) dos trabalhos completos intitulados “Functional properties assessment of hydrolyzed protein from pork liver raw material”, “Effect of protein/water ratio in the hydrolytic process of the meat industry processing waste” e “Evaluation of the enzyme:protein factor effect in enzymatic hydrolysis of meat residual raw material” no XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, em Uberlândia-MG.

CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a elaboração de trabalhos futuros, sugere-se que sejam realizadas:

- A determinação da sequência de aminoácidos formados nos hidrolisados proteicos;
- Sugere-se também, que sejam avaliados diferentes métodos e agentes microencapsulantes;
- Realização de testes de vida de prateleira do produto obtido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCS - Associação Brasileira de carne suína: Disponível em:
<<https://www.suinculturaindustrial.com.br/imprensa/carne-suina>>.
Acesso em: 2017.

ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; JO, C.; SUH, J. W.; AHN, D. U.
Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. *Food Chemistry*, v.192 p. 107-113, February. 2016.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. São Paulo, p.68. 2017.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. São Paulo, p.72. 2018.

ADJE, E. Y.; BALTI, R.; KOUACH, M.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME,
N. α 67- 106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food Research and Technology*, v. 232, n. 4, p. 637–646, january. 2011.

ADLER-NISSEN, J. **Enzimic hydrolysis of food proteins.** Barking: Elsevier Applied Science, 1986, 427 p.

AHMED, A. M.; MUGURUMA, M. **A review of meat protein hydrolysates and hypertension.** *Meat Science*, v. 86, n.1, p.110-118, september. 2010.

AHN, C. B.; JE, J. Y.; CHO, Y. S. **Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis.** *Food Research International*, v.49, n.1, p. 92-98, november. 2012.

- AKAGÜNDÜZ, Y.; MOSQUERA, M.; BEGONÁ, G.; ALEMÁN, A.; PILAR, M.; GÓMEZ-GUILLÉN, M., C. **Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides.** *Food, Science and Technology*, v. 55, n. 2, p. 579-585, march. 2014
- ALAVI, F.; JAMSHIDIAN, M.; REZAEI, M. **Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme Alcalase.** *Food Chemistry*. v. 277, n. 30, p. 314-322, march. 2019.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M, MALVA, A.D.; MARINO, M. **Bioactive Peptides in Animal Food Products.** *Foods*, v. 5, n.6, p.35, march. 2017.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã.** Florianópolis: Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado).
- ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. **Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity.** *Food Research International*, v.44, n.4, p.1044-1051, may. 2011.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; SCHMITT, C.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. **Characterisation of the physicochemical properties of intact and hydrolysed rice protein ingredients.** *Journal of Cereals Science*, v. 88, p. 16-23, july. 2019.
- ANDERSON, B. A. **Edible Meat By-Products, Advance in Meat Research.** Pearson, A. M. and Dutson, T. R (eds) Elsevier Applied Science

Publisher Ltd., London, UK, 1988. Comparison and nutritional value of edible meat by-products. p. 15-45.

ANTUNES, A.B.; ATANASIO, N.M.; BRÍGIDA, A.I.S.; GOMES, F.S.; SILVA, C.M.; STEPHAN, M.P. **Capacidade hidrolítica de Alcalase versus Novo pro D na hidrólise de CMS de tilápia.** X CIGR Section IV International Technical Symposium. Food: the three that sustains life. 24 a 27 de outubro de 2016.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. **Alkaline proteases: A review.** *Bioresource Technology*. v. 64, n. 3, p. 175-183, June. 1998.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis.** 2010.

AOAC, A. O. Chapter 39, **Official Methods of Analysis**, 2016.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.; I.; SHETTY, K. **Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension.** *Food Biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 217–236, August. 2007.

ARAÚJO, L. de F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A. de; JÚNIOR, S. **O Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal.** *Tecnologia & Ciência. Agropecuária*, v. 3, n. 3, p. 47-53, September. 2009.

ARISTOY, M.C.; TOLDRÁ, F. L. **Handbook of analysis of edible animal by-products.** M.L.Nollet; F.Toldrá (Eds.), New York, CRC Press, 2011. Essential Amino Acids. 123-135.

- ARZENI, C.; MARTÍNEZ, K.; ZEMA, P.; ARIAS, A.; PÉREZ, O. E.; PILOSOFF, A. M. R. **Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality.** *Journal of Food Engineering*, v. 108, n. 3, p. 463–472, february. 2012.
- ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. **Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera.** *Process Biochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1957 – 1966, april. 2005.
- BAEK, H. H.; CADWALLADER, K.R. J. **Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products.** *Journal of Food Science*, v. 60, p. 929-935, september. 1995.
- BAH, C.S.F.; BEKHIT, A.; EL-DIN, A.; MCCONNELL, M. A.; CARNE, A. **Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using fungal proteases,** *Food Chemistry*, v. 213, p. 98-107, december. 2016.
- BARAC, M.; CABRILO, S.; STANOJEVIC, S.; PAVLICEVIC, M.; ZLATKOVIC, B.; JANKOVIC, M. **Functional properties of protein hydrolysates from pea (*Pisum sativum*, L) seeds,** *Food Science & Tecnology*, v. 47, p. 1457-1467, february. 2012.
- BARROS NETO B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos - Aplicações na ciência e na indústria,** 4.ed, Editora Bookman, 2010.
- BECHAUX, J.; GATELLIER, P.; LE PAGE, J. F.; DRILLET, Y.; LHOUTELLIER, V.,S. **A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications.** *Food & Function*, n. 10, p. 6244-6266, september. 2019.

- BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. **Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3423-3430, september. 1997.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70- 76, july. 1996.
- BERNARDI, D. M.; PARIS, L. D.; DIETERICH, F.; SILVA, F. G. D.; BOSCOLO, W. R.; SARY, C.; SIGNOR, A.; BERTOL, T. M.; SGARBIERI, V. C. **Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity.** *Food Science and Technology*, v.36, n. 4, p.709-716. december. 2016.
- BEYOND, R.; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes*. 2^a ed. Oxford: Oxford University Pres, 2001, 340p.
- BOUGATEF, A.; HAJJI, M.; BALTI, R.; LASSOUED, I.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. **Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases.** *Food Chemistry*, v. 114, n. 4, p. 1198–1205, june. 2009.
- BRASIL (2014), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Suínos**, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 2017.
- CÂNDIDO, L. M. B.; NOGUEIRA, A. K.; SGARBIERI, V. C. **Functional properties of fish protein concentrates prepared by various methods.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v.1, n. 1, p. 77-89. 1998.
- CANO-MEDINA, A.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; DENDOOVEN, L.; HERRERA, R.P.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; ESCAMILLA-SILVA, E. M. **Emulsifying**

and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International*, v. 44, n. 3, p. 684–692, april. 2011.

CASTRO, R. J. S. **Experimental mixture design as a tool for proteases production by *Aspergillus niger* and obtaing of protein hydrolysates with multiple functional and biological properties.** Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2013. Tese (Doutorado).

CASTRO, R. J. S.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. **Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes.** *Current Opnionin Food Science*, v. 1, p. 64-69, february. 2015.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S. **Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*).** *Química Nova*, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, april. 2008.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. **Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review.** *Food Chemistry*, v.135, n. 4, p.3020–3038, december. 2012.

CHALAMAIAH, M.; JYOTHIRMAYI, T.; BHASKARACHARY, K.; VAJRESWARI, A.; HEMALATHA, R.; KUMAR, B.D. **Chemical composition, molecular, mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases.** *Food Research International*, v. 52, n. 1, p. 221-229, june. 2013.

CHAKKA, A. K.; ELIAS, M.; JINI, R.; SAKHARE, P.Z.; BHASKAR, N. **In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and**

- enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 12, p. 8059-8077, june. 2015.
- CHEN, Y.; JIANG, S.; CHEN, Q.; LIU, Q.; KONG, B. **Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid.** *Process Biochemistry*. v. 79, p. 105-113, april. 2019.
- CORÍCI, L. N.; FRISSEN, A. E.; VAN ZOELLEN, D. J.; EGGEN, I. F.; PETER, F.; DAVIDESCU, C. M.; BOERIU, C. G. **Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.73, n. 1–4, p. 90–97, december. 2011.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes.** In: TIRAPEGUI, J.; CASTRO, I. A.; ROSSI, L. (Ed). *Biodisponibilidade de Proteínas*, s/n., 2006.
- CRUZ, J.; ORTIZ, C.; GUZMAN, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R. **Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 20, p. 2299–2321, june. 2014.
- IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M.; SIENIAWSKI, K.; STAEOWICZ, P. **BIOPEP database of sensory peptides and amino acids.** *Food Research International*, v. 85, p. 155-161, july. 2016.
- DAMGAARD, T. D.; JEANETTE, A.H.; OTTE, L. M.; JENSEN, K.; LAMETSCH, R. **Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues.** *Food Science & Nutrition*, v.2, n. 3 p. 282-288, may. 2014.
- DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. **Antioxidant and antimicrobial peptidic**

hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, v. 124, n. 4, p. 1296–1307, february. 2011.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W. R.; PACHECO, M. T. B.; SILVA, V. S. N.; 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, november. 2014.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. **Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido.** *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.19, n. 3, p. 380-386, december. 1999.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. **A review on microbial alkaline proteases.** *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 61, p. 690-704. 2002.

ESCUADERO, E.; SENTANDREU, M.A.; ARIHARA, K.; TOLDRA, F. **Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 5, p. 2895–2901, february. 2010.

ESCUADERO, E.; TOLDRÁ, F.; SENTANDREU, M. A.; NISHIMURA, H.; ARIHARA, K. **Antihypertensive activity of peptides derived from the in vitro gastrointestinal digestion of pork meat.** *Meat Science*, v. 91, n. 3, p.306–311, july. 2012.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A.N.; DE PAULI, A.R.; PALÁCIO, S.M. **Analysis of Trace Elements in Groundwater Using ICP-OES and TXRF Techniques and Its Compliance with Brazilian Protection Standards.** *Water Air Soil Pollut*, v. 226, n. 32, p. 1-12, february. 2015.

- FALANGA, A.; LOMBARDI, L.; FRANCI, G.; VITIELLO, M.; IOVENE, M. R.; MORELLI, G. **Marine antimicrobial peptides: nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria.** *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n. 5, p. 785–803, may. 2016.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Protein quality evaluation.** Rome, Italy. 1991.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development.** 35p. 2015.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Protein and amino acids requirements in human nutrition.** Report a Joint. Roma, Itália. 2017.
- FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; 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*, p. 48, p. 669–677, december. 2010.
- FERREIRA, A.; KUNH, S. S.; CREMONEZ, P. A.; DIETER, J.; TELEKEN, J. G.; SAMPAIO, S. C.; KUNH, P. D. **Brazilian poultry activity waste: Destinations and energetic potential.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.81, n. 2, p. 3081-3089, january. 2018.
- FIORESE, M. L.; MAESTRE, K. L.; PASSOS, F. R.; BACH, F. Biotecnologia como perspectiva para o desenvolvimento sustentável. In. FIORESE, M. L.; FIORENTIN-FERRARI, L. D.; SLUSARSKI-SANTANA, V. Princípios e aplicações da engenharia no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. 1ªed. Curitiba: Appris, 217p, p. 19-104. 2018.

- GARCIA-LLATAS, G.; ALEGRIA, A.; BARBERA, R.; FARRE, R. **Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products**. Nollet, L. M. L. and Toldra, F (eds) CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Minerals and trace elements, p. 183-203. 2011.
- GARCIA-MORENO, P. J.; BATISTA, I; PIRES, C.; BANDARRA, N. M.; ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, A.; GUADIZ, E. M. **Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species**. *Food Research International*, v. 65, p.469–476, november. 2014.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; LÓPEZ DE LACEY, A.; ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. **Sea by-products as a real material: new ways of application**. Kerala: Transworld Research Network Signpost. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. p. 89-115. 2010.
- GONZALESTELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAEZ, M. P.; GUADIX, E. M. **Enzymatic hydrolysis of whey proteins. I. Kinetic models**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, n.4, p. 523-8, august. 1994.
- HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. **Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatization and Liquid-Chromatography of Amino-Acids In Food**. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 72, n. 6, p. 912-916, december. 1989.
- HALL, G. M.; AHMAD, N.H. **Processing Technology**. In: BLACK ACADEMIC & PROFESSIONAL. New York: VCH Publishers. Cap. 9 Functional properties of fish protein hydrolysates, p. 248-274, 1992.
- HARNEDY, P. A.; PARTHSARATHY, V.; MCLAUGHLIN, C. M.; KEEFFE, M. B.; ALLSOPP, P. J.; MCSORLEY, E. M.; ITZGERALD, R. J. **Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with in**

- vitro and in vivo antidiabetic properties.** *Journal of Functional Foods*, v. 40, p. 137–145, january. 2018.
- HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. **Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP).** *Food Research International*. v.50, n. 1, p.289-297, january. 2013.
- HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; NADIAH, W. A. W. **The tuna fishing industry: A new outlook on fish protein hydrolysates.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, p.195–207, june. 2011.
- HIIDENHOVI, J.; HIETANEN, A.; MÄKINEN, J.; HUOPALAHTI, R.; RYHÄNEN, E.-L. **Hydrolysis of ovomucin by different enzymes.** XI th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products Doorwerth, The Netherlands, 23-26 May, p. 215-257. 2005.
- HONIKEL, K.O. **Handbook of analysis of edible animal byproducts.** Boca Raton, FL, Usa: Crc Press. Chapter Composition and Calories. p. 105-121. 2011.
- HOYLE, N. T.; MERRITT, J.H. **Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*).** *Journal of Food Science*, v. 59, n. 1, p. 76-79, january. 1994.
- HSIAO, N.W.; CHEN, Y.; KUAN, Y.C.; LEE, Y.C.; LEE, S.K.; CHAN, H.H.; KAO, C.H. **Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. Electronic.** *Journal of Biotechnology*, v.17, n. 2, p. 89–94, march. 2014.
- JANAS, R. M.; RYBAK, A.; WIERZBICKA-RUCIŃSKA, A.; SOCHA, P.; ŚNITKO, R.; SZAFIARSKA-POPIŁAWSKA, A.; STOLARCZYK, A.; ORALEWSKA, B.; CYTRA-JAROCKA, E.; IWAŃCZAK, B.; GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, U.; CICHY, W.; CZAJA-BULSA, G.; SOCHA, J.

Serum concentrations of insulin, ghrelin, adiponectin, leptin, leptin receptor and lipocalin-2 in children with celiac disease who do and do not adhere to a gluten-free diet. *Gut and Liver*, v. 10, n. 4, p. 587–594, june. 2016.

KAMNERDPETCH, C.; WEISS, M.; KASPER, C.; SCHEPER, T. **An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems.** *Enzyme and Microbial Technology, Callinstr*, v. 40, n. 4, p. 508–514, 2007.

KIM, S. K.; NGO, D. H.; VO, T. S. **Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents.** *Advances in Food and Nutrition Research*, v.65, p.249–260. 2012.

KIM, Y. N. **Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products.** CRC Press, Boca Raton, FL, USA, Chapter Vitamins, p. 161-182. 2011.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.. **Utilization of tuna processing byproducts: protein hydrolysate from skipjack tuna (*Katsuwonus Pelamis*) viscera.** *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 41, june. 2016.

KLOST, M.; DRUSCH, S. **Functionalization of pea protein by tryptic hydrolysis e Characterization of interfacial and functional properties.** *Food Hydrocolloids*. v. 66, p. 42-50. 2016.

KÖHN, C. R.; FONTOURA, A. M.; KEMPKA, A. P.; DEMIATE, I. M.; KUBOTA, E.H.; PRESTES, R. C. **Assessment of different methods for determining the capacity of water absorption of ingredients and additives used in the meat industry.** *International. Food Research Journal*. v. 22, n. 1, p. 356–362. 2015.

- KORHONEN, H. **Milk-derived bioactive peptides: From science to applications.** *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 2, p. 177-187, april. 2009.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. **Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties.** *Food Science and Nutrition*, v.32, p.1-39, june. 2000.
- LACOU, L.; LEONIL, J.; GAGNAIRE, V. **Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products.** *Food Hydrocolloids*, v. 57, p.187-199, june. 2016.
- LAEMMLI, U. **Cleavage os structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4.** *Nature*, p. 680-685. 1970.
- LAFARGA, T.; HAYES, M. **Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients.** *Meat Science*, v. 98, n. 2, p. 227–239, october. 2014.
- LAJOLO, F. M; **Ciências nutricionais.** São Paulo: Sarvier. Chapter Proteínas e aminoácidos. p. 39-60. 1998.
- LALASIDIS, G.; BOSTROM, S.; SJOBERG, L. B. **Low Molecular Weight Enzymatic Fish Protein Hydrolysates: Chemical Composition and Nutritive Value.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 51-57, september. 1978.
- LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. **Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources.** *Waste Management*, v. 33, n. 3, p. 552-565, march. 2013.
- LATORRES, J.; M.; RIOS, D. G.; SAGGIOMO, G.; WASIELESKY, W.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. **Functional and antioxidant properties**

of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science and Technology*, v. 55, p. 721-729, december. 201.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª edição, editora Sarvier, São Paulo, SP, 1995.

LI, Y.; YU, J.; GOKTEPE, I.; AHMEDNA, M. **The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour**. *Food Chemistry*. v. 196, p. 1338–1345, april. 2016.

LIASET, B; LIED, E.; ESPE, M. **Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 5, p. 581–589, july. 2000.

LIU, R.; XING, L.; FU, Q.; ZHOU, G.H.; ZHANG, W.G. **A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products**. *Antioxidants*. v. 5, n. 3, p. 5-32, september. 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265 – 275, november. 1951.

LUCAS, A.J.S.; OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M. **Edible insects: An alternative nutritional, functional and bioactive compounds**. *Food Chemistry*. v. 311, p. 1 -11, december. 2020.

LUNELLI, T. **Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisado proteico como coproduto**. 2015. Piracicaba: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Dissertação (Mestrado).

- MARTINEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. **Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review.** *Food Research International*, v. 73, p. 204-212, july. 2015.
- MAHMOUD, M.I. **Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products.** *Food Technology*, v.48, n.10, p.89-95, 1994.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Capítulo V - **Métodos Quantitativos**, Instrução Normativa nº 20, de 21 de junho de 1999.
- MEJIA, E. G.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; ROMAN, M.; BRINGE, N. A. **Fatty acid synthase and in vitro adipogenic response of human adipocytes inhibited by α and α' subunits of soybean β -conglycinin hydrolysates.** *Food Chemistry*, v. 119, n. 4, p. 1571–1577, april. 2010.
- MÉNDEZ, E.; MATAS, R.; SORIANO, F. **Complete automatization of peptide maps by reversedphase liquid chromatography using o-phthalaldehyde pre-column derivatization.** *Journal of Chromatography*. v.323, n. 2, p. 373-382. 1985.
- MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. **Antioxidant properties of a radicalscavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatine hydrolysate.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n. 3, p.581–587, december. 2004.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.** *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, march. 1959.

- MIRANDA, L. **Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos de proteínas do farelo de soja.** São Carlos: Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, 2012. Dissertação (Mestrado).
- MOHANTY, D.; JENA, R.; CHOUDHURY, P. K.; PATTNAIK, R.; MOHAPATRA, S.; SAINI, M. R. **Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review.** *International Journal of Food Properties*, v.19, n. 4, p. 837–846, may. 2016.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. **Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate.** *Food Chemistry*, v. 28, n. 1, p. 17-30. 1988.
- MORA, L.; REIG, M.; TOLDRÁ, F. **Bioactive peptides generated from meat industry by-products.** *Food Research International*, v.65, p.344-349, november. 2014.
- MORALES-MEDINA, R.; TAMN, F.; GUADIX, E.M.; DRUSCH, S. **Functional and antioxidante properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying.** *Food Chemistry*, v. 194, n. 4, p. 1208-1216, may. 2016.
- MULLEN, A. M.; ÁLVAREZ, C.; ZEUGOLIS, D. I.; HENCHION, M.; O'NEILL, E.; DRUMMOND, L. **Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains.** *Meat Science*, v. 132, p.90-98, october. 2017.
- MUZAIFA, M.; SAFRIANI, N.; ZAKARIA, F. **Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis.** *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation International. Journal of the Bioflux Society*, v. 5, n. 1, p. 36-39. 2012.

- NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. **A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications.** *Peptides*, v. 33, n. 1, p.178–185, january. 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**, 3 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002, 975p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NEVES, R.; MIRA, N. D.; MARQUEZ, U. L. **Caracterização de Hidrolizados Enzimáticos de Pescado.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p.101-108, março. 2004.
- NGOH, Y. Y.; GAN, C. Y., **Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto).** *Food Chemistry*, v. 190, p. 331-337, January. 2016.
- NGO, D. H.; VO, T. S.; NGO, D. N.; WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. **Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, n. 2, p. 378–383, novemebr. 2012.
- NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMAN, C. **Improved method for determining Food Protein Degree of Hydrolysis.** *Food Chemistry and Toxicology*, v. 66, n. 5, p. 642 – 646, july. 2001.
- NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of analysis of edible animal by-products.** Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, Chapter Introduction, Offal meat: Definitions, regions, cultures. Generalities. p. 3-11. 2011.

- NOVOZYMES. **Ficha de informação do produto: NovoPro-D®**. 2011.
- OCKERMAN, H. W.; BASU, L. **Encyclopedia of meat sciences**. Elsevier Academic Press, Amsterdam, London, Chapter By-products. p. 104-112. 2004.
- OLIVEIRA, M. S. R.; FRANZEN, F. L.; TERRA, N. N.; KUBOTA, E. H. **Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente**. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 18, n. 3, p.199-210, septemebr. 2015.
- OLIVO, R.; OLIVO, N. **O Mundo das Carnes: Ciência, Tecnologia e Mercado**. Editora do autor. 3ª ed. Criciúma, SC, 2006.
- OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; MEJIA, E. G.; DIA, V. P.; AMAYA-LLANO, S. L. **Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF-κB pathways**. *Food Chemistry*, v. 127, n. 3, p. 1175–1185, august. 2011.
- PAGÁN, J.; IBARZ, A.; FALGUERA, V.; BENITEZ, R. **Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bonés**. *Journal of Food Engineering*, v.119, p. 55-659, june. 2013.
- PASUPULETI V. K; BRAUN S. **State of the art manufacturing of protein hydrolysates**. In: PASUPULETI VK, DEMAIN AL. Protein hydrolysates in biotechnology. New York: Springer Dordrec., p.11-32. 2010.
- PEREIRA, P. M. C. C.; VICENTE, A. F. R. B. **Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet: Review**. *Meat Science*, v. 93, n. 3, p. 586-592, march. 2013.

- POGORZELSKA-NOWICKA, E.; ATANASOV, A.; HORBAŃCZUK, J.; WIERZBICKA, A. **Bioactive Compounds in Functional Meat Products.** *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 1 -19, january. 2018.
- PRZYBYLSKI, R.; FIRDAOUS, L.; CHÂTAIGNÉ, G.; DHULSTER, P.; NEDJAR, N. **Production of an antimicrobial peptide derived from slaughtering by-product and its potential application on meat as preservative.** *Food Chemistry*, v. 211, n. 15, p. 306-313, november. 2016.
- QUEIROZ, A. L. Obtenção e Caracterização de Hidrolisados Proteicos de Subprodutos do Abate de Caprinos. João Pessoa, Brasil. 2017.**
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical & Biology Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, may. 1999.
- RISSO, E. M.; FARFAN, A. J. **Melhoramentos na metodologia para determinação de aminoácidos-ptc por hplc.** In: II SIMCRO. São Pedro/SP. 2006.
- RODRIGUES, M. E. IEMA, A. F. **Planejamento de experimentos & Otimização de processos.** 3ª Edição. Editora Cárita. 2014.
- ROJAS, M. J.; SIQUEIRA, P. F.; MIRANDA, L. C.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. **Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production.** *Industrial Crops and Products*. v.61, p. 202–210, november. 2014.

- ROJAS, M J. **Produção de etanol e hidrolisado proteico da casca de soja.**
São Carlos: Universidade Federal de São. Carlos - UFSCar. 2012. 93 f.
Dissertação (Mestrado).
- ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. **Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína.** *Revista de Nutrição*, v.18, n. 1, p. 75-83, fevereiro. 2005.
- ROSA, L. O. L.; SANTANA, M. C.; AVEZEDO, T. L.; BRÍGIDA, A. I. S.; GODOY, R.; PACHECO, S.; MELLINGER-SILVA, C.; CABRAL, L. M. C. **A comparison of dual-functional whey hydrolysates by the use of commercial proteases.** *Food Science of Technology*. v. 38, n. 1, p. 31-36, december. 2018.
- ROSLAN, J.; MUSTAPA KAMAL, S. M.; MD. YUNOS, K. F.; ABDULLAH, N. **Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product using response surface methodology.** *International Food Research Journal* v. 22, n. 3, p. 1117-1123, december. 2015.
- ROSLAN, J.; YUNOS, K.F.M.; ABDULLAH, N.; MAZLINA, S.; KAMAL, M. **Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product.** *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 2, p. 321-319. 2014.
- RYDER, K.; BEKHIT, A.; EL-D.; MCCONNELL, M.; CARNE, A. **Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases.** *Food Chemistry*. v. 208, n. 1, p. 42-50, october. 2016.
- SADANA, A. **Biocatalysis Fundamentals of Enzyme Deactivation kinetics**
Prentice Hall, New Jersey, 1991.

SÁNCHEZ A.; VAZQUEZ, A. A. **Bioactive peptides: A review.** *Food Quality and Safety*, v.1, n. 1, p. 29–46, march. 2017.

SANTOS, S. D., MARTINS, V.G., SALAS-MELLADO, M., PRENTICE, C. **Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotuspunctatus*) obtained with different microbial enzymes.** *Food Bioprocess and Technology*, v. 4, n. 8, p.1399–1406, december. 2009.

SANTOS, A. C. F.; KALSCHNE, D. L.; VIEGAS, M. C.; VANINI, L. S.; BENASSI, M. T.; LONNI, A. A. A. S. G. **Development of a cosmeceutic formulation for the eyes with green coffee extract standard.** *Visão Acadêmica*, v. 18, n. 3, p. 18-34, julho. 2017.

SCHMIDT, C. G. **Hidrólise Enzimática de Carne de Frango.** Rio Grande-RS: Curso de Engenharia e Ciência Dos Alimentos, Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande. 2008. 143 f. Dissertação (Mestrado).

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. **Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango.** *Química Nova*, v. 32, n. 5, p. 1144–1150, maio. 2009.

SEONG, P. N.; KANG, G. H.; PARK, K. M.; CHO, S. H.; KANG, S. M.; PARK, B. Y.; MOON, S. S.; BA H. V. **Characterization of Hanwoo bovine by-products by means of yield, physicochemical and nutritional composition.** *Food Science of Animal Resources*. v. 34, n.4, p.434–447, august. 2014a.

SEONG, P. N.; PARK, K. M.; CHO, S. H.; KANG, G. H.; KANG, S. M.; PARK, B. Y.; MOON, S. S. **Characterization of Edible Pork By-products by Means of Yield and Nutritional Composition.** *Korean Journal For Food Science Animal Resources*, v.34, n. 3, p.297-306, june. 2014b.

- SEONG, P. N.; PARK, K. M.; CHO, S. H.; KANG, G. H.; KANG, S. M.; PARK, B. Y.; MOON, S. S.; BA, H. V. **Characterization of chicken By-products by Mean of Proximate and Nutritional Compositions.** *Korean Journal For Food Science of Animal Resources.* v.35, n. 2, p.179-188, april. 2015.
- SGARBIERI, V C. **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades - Degradações** - Modificações. São Paulo, Sp: Varela, 517p. 1996.
- SHARMA, S.; SINGH, R.; RANA, S. **Bioactive peptides: a review.** *International Journal Bioautomation,* v.15, n. 4, p. 223-250, june. 2011.
- SHEN, Q.; GUO, R.; DAI, Z.; ZHANG, Y. **Investigation of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Properties of Protein Hydrolysate from Fish Muscle (*Collichthys niveatus*) and Evaluation of Its Functional Properties.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 60, n. 20, p. 5192–5198, may. 2012.
- SILVA, J.; RIBEIRO, K.; SILVA, J.; CAHÚ, T.; BEZERRA, R. **Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate.** *Animal of Food Science and Technology,* v. 196, p.96-106, october. 2014.
- SILVA, T. C.; ROCHA, J. D. M.; MOREIRA, P.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W. R. **Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* v.52, n. 7, p.485-492, july. 2017.
- SIMPSON, R. J. *Proteins and proteomics.* New York. Colda Sprong Harbor Laboratory Press, 926p. 2011.
- SINGH, H. **Milk protein products: functional properties of milk proteins.** In *ENCYCLOPEDIA OF DAIRY SCIENCES.* Edited by John WF, Patrick FF, Paul LHM. Academic Press; p.887-893. 2011.

- SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. **Functional significance of bioactive peptides derived from soybean.** *Peptides*, v. 54, p. 171-179, april. 2014.
- SLOW, H-L.; GAN, C-Y. **Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds.** *Food Chemistry*, v. 141, n. 4, p. 3435–3442, december. 2013.
- SLIZYTE, R.; ROMMI, K.; MOZURAITYTE, R.; ECK, P.; FIVE, K.; RUSTAD, T. **Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones.** *Biotechnology Reports*, v. 11, p. 99-109, september. 2016.
- SOUZA, M. W. S.; BIASUTTI, E. A. R.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M. P. C. **Obtaining oligopeptídeos from whey: use of subtilisin and pancreatin.** *American Journal of Food Technology*, v. 3, n. 5, p. 315-324, march. 2008.
- SREBERNICH, S. M.; GONÇALVES, G. M.; DOMENE, S. M. **Fortifying pork liver mixture: preparation and physicochemical characteristics.** *Food Science and Technology*, v. 38, n. 4, p. 647-652, december. 2017.
- SREBERNICH, S. M.; SILVEIRA, E. T.; GOLÇALVES, G. M.; ORMENESE, R. D.; MORGANO, M. A. **Development and evaluation of iron-rich meatloaves containing pork liver for schoolchildren.** *Food Science and Technology*, v. 35, n. 3, p. 460-467, september. 2015.
- SUJITH, P. A.; HYMAVATHI, T. V. **Recent developments with debittering of protein hydrolysates.** *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, v.4, n. 6, p. 365-381, january. 2011.
- TAVANO, O. L. **Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 90, p. 1–11, june. 2013.

- TIRAPEGUI, J. O.; YAHVA, Z. A.; BATES, P. C.; MILLWARD, D. J. **Dietary energy, glucocorticoids and the regulation of long bone and muscle growth in the rat.** *Clinical Science.* v.87, n. 5, p. 599-606, november. 1994.
- TIRAPEGUI, J.; ROGERO, M. M. **Aspectos actuales sobre ejercicio físico y nutrición.** *Cuadernos Nutricion. México,* v. 29, n. 1, p. 165-72. 2006.
- TOLDRÁ, F.; M.-CONCEPCIÓN, A.; MORA, L.; REIG, M. **Innovations in value-addition of edible meat byproducts.** *Meat Science.* v.92, n. 3, p. 290-296, november. 2012.
- TOLDRÁ, F.; MORA, L. REIG, M. **New insights into meat by-product utilization.** *Meat Science.* v. 120, p. 54-59, october. 2016.
- TONDRÁ. F.; REIG, M. **Innovations for healthier processed meats.** *Trends in Food Science & Technology.* v.22, n. 9, p. 517-522, september. 2011.
- TSOU, M. J.; KAO, F. J.; TSENG, C. K.; CHIANG, W. D. **Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration.** *Food Chemistry.* v. 122, n. 1, p. 243–248, september. 2010a.
- TSOU, M.; LIN, W.; LU, H.; TSUI, Y.; CHIANG, W. **The effect of limited hydrolysis with Neutrane and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein.** *Process Biochemistry.* v. 45, n. 2, p. 217–222, february. 2010b.
- UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. **Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits.** *Journal of Food Science.* v.71, n. 1, p. 11-24, november. 2012.

USDA, 2016 - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<https://www.usda.gov>>. Acesso em: 12 dez 2017.

VENTURIN, A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S.; SKORONSKI, E.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. H. P. **Soluble fraction of sardine protein hydrolysates in the feeding of the south american catfish.** *Boletim Instituto da Pesca*, São Paulo, v.42, n.4, p. 878-888, maio. 2017.

VERMA. A. K.; CHATLI. M.K.; KUMAR. P.; MEHTA. N **Antioxidant and Antimicrobial Efficacy of Peptidic Hydrolysate Obtained from Porcine Blood.** *Agricultural Research*, v. 116, n; 1, p. 116–124, august. 2018.

VERMA. A. K.; CHATLI. M.K.; KUMAR. P.; MEHTA. N. **Antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysate extracted from porcine liver.** *Indian Journal of Animal Sciences*, v.87, n .6, p. 711–717, june. 2017.

VERMELHO, A.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A.; BRANDELI, A.; BON, E. **Enzimas Queratinolíticas: Aplicações Biotecnológicas.** In: BON, E. P.; FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. (Ed.). *Enzimas em Biotecnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, v.1, p.506. 2008.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. **Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties.** *Food Chemistry*. v. 224, n. 1, p.160-171, june. 2017.

WARD, O. P. **Proteolytic enzymes.** In: BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C. (Eds.). *Comprehensive biotechnology*. Oxford: Pergamon Press Ltda., v. 3, p. 789-817. 1985.

- WISUTHIPHAET, N.; KONGRUANG, S. **Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis.** *Journal of Medical and Bioengineering*, v. 4, n. 6, p. 466-470, december. 2015.
- WHITAKER, R. **Principles of Enzymology for Food Science.** Marcel Decker, NewYork.1994.
- WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. **An Evaluation of The Waters Pico-Tag System For The Amino-Acid-Analysis Of Food Materials.** *Journal of Automatic Chemistry*, v. 8, n.4, p. 170-177, december. 1986.
- WITONO, Y.; TARUNA, I.; WINDRATI, W. S.; AZKIYAH, L.; NORMA, T. **Wader (*Rasbora jacobsoni*) Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Funcional Properties.** *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v.9, p. 482-492, 2016.
- WU, J.; JAHANDIDEH, F.; YU, W.; MAJUMDER, K. **Bioactive Peptides from Meat Proteins as Functional Food Components, in Functional Polymers** in Food Science: From Technology to Biology (eds G. Cirillo, U. G. Spizzirri and F. Iemma), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2015.
- WYNESS, L.; WEICHSELBAUM, E.; O'CONNOR, A.; WILLIAMS, E. B.; BENELAM, B.; RILEY, H.; STANNER, S. **Red meat in the diet: an update.** *Nutrition bulletin*, v. 36, n. 1, p.34-77. 2011.
- YANG. B.; YANG. H.; LI. J.; LANG.Y. **Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidante activity of protein hydrolysates of soy sauce lees.** *Food Chemistry*, v. 124, n.2, p. 551-555, january. 2011.

- YU, H.-C.; TAN, F.-J. **Effect of ultrasonic pretreatment on the antioxidant properties of porcine liver protein hydrolysates.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 6, p.1392-1399, april. 2017.
- ZAREI, M.; EBRAHIMPOUR, A.; ABDUL-HAMID, A.; ANWAR, F.; BAKAR, F.A.; PHILIP, R.; SAARI, N. **Identification and characterization of papain-generated antioxidante peptides from palm kernel cake proteins.** *Food Research International*, v. 62, p. 726–734, august. 2014.
- ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. **Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrina (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas.** *Química nova*, v. 32, n. 7, p. 1739-1742, agosto. 2009.
- ZOU, Y.; WANG, L.; LI, P.; CAI, P.; ZHANG, M.; SUN, Z.; SUN, C.; GENG, Z.; XU, W.; XU, X.; WANG, D. **Effects of ultrasound assisted extraction on the physiochemical, structural and functional characteristics of duck liver protein isolate.** *Process Biochemistry*, v. 52, p. 174-182, january. 2017.
- ZHENG, Z.; SI, D.; AHMAD, B.; LI, Z.; ZHANG, R. **A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate.** *Food Research International*, v. 106, p. 410–419, april. 2018.
- ZHOU, C.; LIU, H.; YUAN, F.; CHAI, H.; WANG, H.; LIU, F.; LU, F. **Development and application of a 9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 122, p. 329–337, february. 2019.

ANEXOS

ANEXO A

Ficha de especificação técnica das enzimas Alcalase 2.4 L® e NovoPro- D® disponibilizado pela Novozymes.

