



***Produção de hidrolisados de proteína de peixe (HPP)
a partir de subprodutos da indústria do peixe de
Peniche – Aplicações***

Maria de Fátima Gonçalves dos Santos

[2011]



***Produção de hidrolisados de proteína de peixe (HPP)
a partir de subprodutos da indústria do peixe de
Peniche – Aplicações***

Maria de Fátima Gonçalves dos Santos

Trabalho de projeto apresentado à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do
Mar do Instituto Politécnico de Leiria para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Trabalho de projeto realizado sob a orientação da Doutora Susana Filipa Jesus Silva,
Professora Adjunta da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto
Politécnico de Leiria

[2011]

Título: Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – Aplicações

Copyright © Maria de Fátima Gonçalves dos Santos
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À eterna memória do meu Avô,
à minha mãe e irmã,
ao Rodolfo

Agradecimentos

Agradeço especialmente à Doutora Susana Silva, por todo o apoio, ombro amigo e ajuda neste meu caminho. Por tudo o que lhe devo de conhecimentos adquiridos;

À Doutora Susana Mendes, pela ajuda incessante e disponibilidade, mesmo quando precisava de tempo para o seu trabalho;

Reconheço toda a ajuda prestada pela Ana Augusto e Joana Manecas, sem elas não era possível realizar tanto trabalho, pelas horas passadas e dedicadas a este projeto;

Ao Doutor Paulo Nunes pelo apoio;

Agradeço à minha colega Susete e à Márcia pela ajuda e recomendações, e também pela força e disponibilidade incondicional;

Um agradecimento muito especial à Doutora Ana Danielle Nunes, que me fez amar cada vez mais os animais, e por me apoiar mesmo quando estava com dias de muita carga de trabalho, uma grande amiga para toda a vida – Obrigada!

Ao Rodolfo, pelo companheirismo e por nunca me deixar desistir, pelas horas e horas passadas no laboratório e pela amizade incondicional;

E por último, mas as mais importantes de todas, agradeço à minha Mãe, Maninha e meu Padrasto (verdadeiro pai), porque sem elas nada disto era possível, por nunca me deixarem desistir, porque sempre foram, são e serão a razão do meu viver e da minha luta de manter a palavra desistir longe do meu dicionário.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a produção de hidrolisados proteicos a partir de subprodutos de sardinha (*Sardina pilchardus*) da indústria local e a avaliação do seu potencial como aditivos alimentares. A enzima utilizada foi a Neutrase®, tendo sido testados diferentes concentrações de enzima (0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 3%) e tempos de hidrólise (0, 20, 40 e 60 minutos) de modo a obter um varrimento das características funcionais dos hidrolisados produzidos em diferentes condições. Os hidrolisados líquidos foram sujeitos a secagem por *spray drying* para redução de volume e aumento da sua estabilidade.

Foram obtidos rendimentos médios de recuperação proteica de 22% e 10% para os hidrolisados líquidos e em pó, respetivamente. Os hidrolisados em pó apresentaram o teor de humidade médio de 4,4% e tonalidade clara. Não foi observado um efeito significativo da concentração de enzima nem do tempo de hidrólise no grau de hidrólise dos hidrolisados obtidos, tendo sido obtido um grau de hidrólise médio de $22 \pm 6\%$.

O potencial de utilização dos hidrolisados como aditivos alimentares foi avaliado através dos seguintes parâmetros: capacidade antioxidante pela redução do DPPH, capacidade de formação e estabilização de emulsões, capacidade de formação e estabilização de espumas, efeito da adição de soluções de hidrolisados na textura, perda de água e alteração de cor em salmão e pescada refrigerados e congelados.

Os hidrolisados líquidos obtidos apresentaram capacidades de redução do radical DPPH entre 10 e 50%. Foi observada uma redução significativa da capacidade de redução do radical DPPH nos hidrolisados sólidos, associada à temperatura selecionada para a secagem: 135°C.

A adição dos hidrolisados produzidos com 0.5 e 3% de enzima e 20 minutos de hidrólise a cubos pescada fresca resultou numa redução da percentagem de perda de água 3 semanas após congelação. A alteração global da cor de pescada congelada durante 3 semanas e refrigerada durante 7 dias foi minimizada com a adição de hidrolisados produzidos com 1% de Neutrase® (tempo de hidrólise de 20 minutos). Os hidrolisados produzidos com 0.5% de Neutrase® (20 min de hidrólise) minimizaram a alteração global da cor em cubos de salmão congelado.

Relativamente ao potencial da utilização dos hidrolisados como agentes emulsificantes e estabilizantes, foi observada uma capacidade de emulsificação em azeite e óleo comparável à do caseinato de sódio na maioria das amostras testadas. As amostras produzidas na ausência de Neutrase®, aos tempos de 0 e 20 minutos formaram

emulsões estáveis com azeite e óleo (35% do volume inicial da emulsões permaneceu após 24 horas a 2200xg durante 3 minutos à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos sugerem o potencial da aplicação da hidrólise enzimática de subprodutos de sardinha na produção de agentes crioprotectores em pescado congelado, aditivos antioxidantes e agentes emulsificantes, tecnologia que poderá gerar produtos de elevado valor acrescentado. Uma investigação sobre a utilização de diferentes enzimas, recorrendo a vasos reacionais com agitação mecânica e uma otimização das condições de secagem para rentabilizar o rendimento de recuperação proteica global do processo e minimizar alterações funcionais no passo de secagem serão essenciais para uma avaliação mais detalhada das funcionalidades destes hidrolisados e da relação entre essas funcionalidades e as condições de produção.

Palavras-chave: Hidrolisados de proteína de pescado (HPP), Grau Hidrólise (GH), Atividade antioxidante, Aplicação HPP em pescado; Propriedades emulsificantes; Propriedades antimicrobianas

Abstract

The production of protein hydrolysates using by-products of *Sardina pilchardus*, a very important fish for local industries in Portugal, and the evaluation of potential food additives from those hydrolysates, are the base of this study. The enzyme Neutrase® was applied at different concentrations (0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 3%) and hydrolyse reaction times (0, 20, 40 e 60 minutes) for established the functional characteristics of the hydrolysates at different conditions. The *spray drying* technique was important for volume reduction and the increase of the stability of hydrolysates.

The results suggested medium incomes of protein recovery of 22% for liquid hydrolysates and 10% for those turn into powder. The enzyme concentration, or the hydrolyse reaction time; with a medium degree of hydrolysis ($22\pm 6\%$) didn't presented a significative effect. Powder hydrolysates, with light shade obtained an average moisture content of 4,4%.

To ensure the full potential of hydrolysates, to be used as food additives, several parameters were analyzed, like the antioxidant capacity, by the reduction of DPPH , resulting in 10 and 50% of reduction, a significant value in the dried hydrolysates, associated to one Temperature studied (135°C). Others like capacity and stabilization of emulsions, stabilization of foams, effect of addition of solutions to the hydrolyzed in texture, water loss and colour changes were analysed in salmon and chilled (fishes frozen and hake).

The chilled fresh fish (in cubes) with the addition of 0,5% and 3% enzyme produced (20 minutes of hydrolyse) presented a reduction for water loss (%) 3 weeks after the hake. Also, the addiction of 1% the Neutrase® (hydrolyse time of 20 minutes) minimized the colour (globally) after 3 weeks and when chilled for 7 days. For the salmon cubes (hake) the same result was observed with 0.5% de Neutrase®, for the same period of time.

Food additives were also tested to ensure that by-products could be applied as emulsifier and stabilizer agents, using olive oil and oil to compare with sodium caseinate, used as control. Hydrolysates at 20 minutes without Neutrase®, formed stable emulsions with the 2 oils (35% of initial volume of emulsions were equal after 24hours, 2200xg, for 3 minutes, at room temperature).

At the end of the several studies was concluded that protein hydrolysates, and the application of enzymatic hydrolyses have an elevated potential for crioprotection agents, to be used in frozen fishes. For future studies the use of several enzymes, with reactor

vessels (mechanic agitation), and the optimization of dried techniques to ensure the income of global protein recovery, and minimize functional modifications are necessary to better understand the relationship between several production methods and their respective functions.

Keywords: Fish protein hydrolysates (PPH), Degree of Hydrolysis (GH), Antioxidant activity, Activity HPP in seafood; Emulsifying properties; Antimicrobial properties.

Índice

| | Página |
|---|--------|
| Resumo | 1 |
| Abstract | 3 |
| 1. Introdução | |
| 1.1. Subprodutos da Indústria do pescado e sua valorização | 11 |
| 1.2. Área de estudo | 12 |
| 1.3. Interesse da utilização de <i>Sardina pilchardus</i> | |
| 1.3.1. Caracterização geral | 13 |
| 1.3.2. Importância comercial | 14 |
| 1.4. Hidrolisados de proteína de pescado – produção e caracterização | 15 |
| 1.5. <i>Spray Drying</i> – Secagem do hidrolisado | 20 |
| 1.6. Propriedades antimicrobianas | 21 |
| 1.7. Capacidade emulsificante de hidrolisados | 22 |
| 1.8. Capacidade de Formação de espuma | 22 |
| 2. Objetivos | 25 |
| 3. Material e Métodos | |
| 3.1. Período de amostragem | 27 |
| 3.2. Preparação dos resíduos de <i>S. pilchardus</i> | 27 |
| 3.3. Processo de hidrólise | 27 |
| 3.4. Secagem dos hidrolisados por “ <i>Spray Dried</i> ” | 28 |
| 3.5. Avaliação da quantidade de proteína bruta na amostra | 29 |
| 3.6. Grau de Hidrólise | 30 |
| 3.7. Capacidade Antioxidante | 31 |
| 3.8. Aplicação do Hidrolisado em pescado: Salmão e Pescada | |
| 3.8.1. Percentagem de perda de água durante armazenamento | 32 |
| 3.8.2. Avaliação da cor | 32 |
| 3.8.3. Avaliação da textura | 33 |
| 3.9. Avaliação da cor dos pós | 33 |
| 3.10. Determinação do Teor de Humidade nos pós | 34 |
| 3.11. Avaliação das propriedades de formação e estabilidade de espuma | 34 |
| 3.12. Avaliação de propriedades emulsificantes e estabilizantes | 35 |
| 3.13. Propriedades Antimicrobianos | |
| 3.13.1. Preparação dos meios de cultura | 36 |
| 3.13.2. Avaliação da capacidade antimicrobiana | 36 |

| | |
|--|----|
| 4. Resultados e Discussão | |
| 4.1. Rendimento do processo de hidrólise para líquidos e sólidos | 38 |
| 4.2. Avaliação de características dos pós | |
| 4.2.1. Teor de Humidade dos pós | 42 |
| 4.2.2. Avaliação da cor | 43 |
| 4.3. Grau de Hidrólise | 44 |
| 4.4. Avaliação da capacidade Antioxidante dos hidrolisados | 47 |
| 4.5. Aplicação do hidrolisado em pescado: Salmão/Pescada | |
| 4.5.1. Percentagem de perda de água durante armazenamento | 49 |
| 4.5.2. Avaliação da cor no pescado | 51 |
| 4.5.3. Avaliação da textura no pescado | 52 |
| 4.6. Avaliação das propriedades de formação e estabilidade de espuma | 54 |
| 4.7. Avaliação das propriedades emulsificantes e estabilidade | 55 |
| 4.8. Avaliação da capacidade antimicrobiana | 59 |
| 5. Conclusão | 61 |
| 6. Perspetivas Futuras | 63 |
| 7. Bibliografia | 65 |
| 8. Anexos | 69 |

Lista de figuras

| | Páginas |
|--|---------|
| Figura 1.1 - Localização espacial da Península de Peniche (A) e da Fábrica de pescado (B) (Google Earth Maps,2008) | 12 |
| Figura 1.2 - Distribuição geográfica de <i>Sardina pilchardus</i> (A) e visualização de um exemplar da espécie (B) (Froese, R. and D. Pauly , 2010). | 14 |
| Figura 1.3 – Reação OPA. OPA reage com o primeiro grupo de aminoácido e o grupo do composto SH (ditiotreitól, DTT) que absorve radiação a 340nm (Nielsen e colaboradores 2001). | 18 |
| Figura 4.1 - Esquema representativo da recuperação de proteína, desde os resíduos de sardinha até ao hidrolisado em pó, associados ao processo de hidrólise. (Utilizou-se como base uma massa inicial de proteína de 100g e os valores médios dos rendimentos dos ensaios realizados). | 38 |
| Figura 4.2 – Exemplo de biorreactor que poderia ter sido utilizado (Lian e colaboradores 2005). | 40 |
| Figura 4.3 – Gráfico representativo do rendimento do hidrolisado líquido obtido em relação à enzima em função do tempo. Para realizar este estudo quantificou-se a quantidade de proteína presente na amostra através do Método de Kjeldahl. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão [Erro Padrão = Desvio padrão / RaizQ (número de réplicas)] (n=2). | 41 |
| Figura 4.4 - Gráfico representativo do rendimento do hidrolisado sólido obtido, após <i>Spray Drying</i> em relação à concentração de enzima em função do tempo. Para realizar este estudo quantificou-se a quantidade de proteína presente na amostra através do Método de Kjeldahl. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=2). | 42 |
| Figura 4.5 – Gráfico representativo do Grau de hidrólise, dos hidrolisados de subprodutos de sardinha, nos líquidos, com o Método do reagente OPA. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=4). | 46 |
| Figura 4.6 - Capacidade antioxidante através da redução do radical DPPH dos hidrolisados líquidos e respetivos hidrolisados sólidos. [300], [100], [30], [10], [3] e [1] representam as concentrações de BHT usadas como base de comparação. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=3). | 48 |
| Figura 3.7 – Percentagem de perda de água nas amostras verificado nas amostras de salmão sujeita a congelamento durante três períodos de tempo (uma, duas e três semanas). Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=2) | 49 |
| Figura 4.8 - Percentagem de perda de água nas amostras verificado nas amostras de pescada sujeita a congelamento durante três períodos de tempo (uma, duas e três semanas). Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=2). | 50 |

Figura 4.9 - Capacidade da emulsão do azeite com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo de caseinato (n=2 com erro padrão associado). 56

Figura 4.10 - Capacidade da emulsão do óleo com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo (n=2 com erro padrão associado). 57

Figura 4.11 – Estabilidade de emulsão do azeite com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo (n=2 com erro padrão associado). 57

Figura 4.12 – Estabilidade de emulsão do óleo com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo (n=2 com erro padrão associado). 58

Figura 8.1.

Figura 8.2.

Lista de tabelas

Tabela I.I. – Valores constantes de α , β e h_{tot} para proteína de diferentes fontes. 19

Tabela IV.I - Teor de humidade nos pós dos hidrolisados (sólidos) de resíduos de sardinha e da maltodextrina adicionada aos hidrolisados líquidos (n=1). 43

Tabela IV.II - Dados obtidos dos hidrolisados em pó através do colorímetro com os respetivos valores de a^* (*redness*), b^* (*yellowness*), L^* (*lightness*), *Hue angle* e *Chroma*. Cada valor é expresso como a média de quatro leituras que o aparelho fornece automaticamente. 44

Tabela IV.III - Valores do vetor de deslocação da cor na aplicação dos hidrolisados no pescado estudado: Salmão e Pescada, nas condições de fresco e congelado. Cada amostra continha quatro réplicas com erro padrão associado. 52

Tabela IV.IV - Valores da textura na aplicação dos hidrolisados no pescado estudado: Salmão e Pescada, nas condições de fresco e congelado (n=4, média +/- erro padrão)54.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Subprodutos da indústria do pescado e sua valorização

Os subprodutos da indústria do pescado correspondem a aproximadamente 75% do total de pescado capturado, sendo que estes podem originar péptidos de elevado interesse (Slizyté, R., 2009 e, Ravallec-Plé.,2001). Do total de captura mundial de pescado, cerca de 72% são utilizados como pescado fresco, congelado, enlatado e salgado, os 28% restantes seguem para o preparo de ração animal. A produção de farinha e óleo de pescado têm sido uma alternativa para o aproveitamento dos subprodutos de pescado que não são utilizados diretamente para o consumo humano (Padilha e colaboradores, 2007).

A indústria do pescado de sardinha (*Sardina pilchardus*) representa mais de 10% do total mundial de pescado capturado (Food and Agriculture Organization - FAO) e, por isto, um recurso sustentável e de interesse à economia de suplementos alimentares e em alimentos para animais. No caso da indústria da sardinha, cerca de 40%, dos subprodutos são constituídos pela cabeça, vísceras, cauda e algum músculo. Tendo em conta que até aproximadamente 2005, foram capturados e processados 50000t de sardinha, a quantidade de subprodutos gerados é na ordem 20000t [Ravallec-Plé.,2001].

Segundo Batista, I. 2009, dados de FAO confirmam que nos últimos anos, o crescimento de subprodutos de pescado tem sido de, aproximadamente 8%. O pescado fresco é um dos produtos alimentares mais suscetíveis ao processo de deterioração devido ao pH, à elevada atividade de água nos tecidos e ao teor de nutrientes que facilmente são utilizados por microrganismos (podem encontrar-se em todas as superfícies externas e nos intestinos dos peixes vivos, ou recém-capturados), principalmente as proteínas, ao teor de lípidos insaturados, à rápida ação destrutiva de enzimas naturalmente presentes nos tecidos e à alta atividade metabólica microbiana. Após a morte, o sistema imunitário do pescado deixa de funcionar, pelo que as bactérias podem proliferar na superfície do peixe, principalmente na base das escamas.

Com um aumento drástico da população mundial e uma captura de peixes mundial atualmente à beira de ultrapassar o limite sustentável, estimado em 100

milhões de toneladas por ano, existe uma necessidade crescente de utilizar os recursos marinhos de forma racional (Kristinsson & Rasco, 2000b).

A valorização dos subprodutos está dependente do desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis que permitam a sua transformação em produtos comercializáveis e de elevado valor acrescentado. O principal destino atual dos subprodutos da indústria de transformação de pescado é a sua venda a baixo custo para incorporação em rações animais. Estes subprodutos são ricos em compostos com elevado potencial económico (óleos de peixe, proteínas, colagénio e enzimas), que atualmente não são aproveitados pelo sector do pescado (Sliyzytyje, R e Mozuraityte, R, et al, 2009).

A aplicação de tecnologia enzimática para recuperar e modificar a proteína de peixe pode produzir um amplo espectro de ingredientes ou produtos industriais alimentares com uma vasta gama de aplicações, contribuindo para um melhor aproveitamento de subprodutos de proteína (Kristinsson & Rasco, 2000a).

1.2 . Área de estudo

Portugal é um país que depende em grande parte do sector da pesca. As comunidades pesqueiras de Portugal dividem-se em dois tipos: primeiro, os que dependem de atividades relacionadas com a pesca em termos de emprego, estrutura e desenvolvimento económico, e a segunda, os empregos na pesca (pescadores), embora este seja de menor relevância. Sendo assim, as comunidades pesqueiras tendem a encontrar-se em pequenas cidades costeiras como é o caso de Peniche, onde se insere a pesca e agricultura (sector primário) (Moriz e colaboradores 2008).



Figura 3.1 - Localização espacial da Península de Peniche (A) e da Fábrica de pescado (B) (©Google Earth Maps,2008).

Peniche pertence ao distrito de Leiria e tem uma área total de aproximadamente 77,7Km² e engloba o arquipélago das Berlengas, Reserva Natural, do qual faz parte a Berlenga grande, Estelas e Farilhões (perfazem uma superfície de 104ha). O concelho de Peniche é limitado a oeste pelo Oceano Atlântico, a norte e a leste pelo concelho de Óbidos e a sul pelo concelho da Lourinhã (Moniz e colaboradores, 2008).

A figura 1.1 mostra a fábrica de processamento de pescado – Indústria de Alimentação IDAL, SA – Conservas Peniche - situada na península de Peniche (39°21'12,90"N e 9°23'06,15"W). Esta empresa produz enlatados, mas também saladas, produtos estes que são exportados pela Europa, principalmente para França. Os excedentes que sobram do processamento de pescado são tratados para produção de farinha de peixe ou exportada para Espanha com o mesmo objetivo. Uma das fábricas receptoras destes excedentes situa-se em Peniche, denominando-se como Fábrica de Farinha de Peixe, ou Fábrica do Guano (<http://www.google.com/earth/index.html> e Moniz e colaboradores, 2008).

1.3. Interesse da utilização de *Sardina pilchardus*

1.3.1. Caracterização geral

Sardina pilchardus Walbaum, 1792, de nome comum, sardinha é uma espécie oceanódroma, presente em água doce, estuarina e marinha, sendo que é habitual ser encontrada entre os 10 – 100m de profundidade. Esta espécie distribui-se ao longo do nordeste do Atlântico: Islândia e Mar do Norte, Sul da Baía de Gorée no Senegal, Mar Negro e Mar de Marmara e é comum no Mediterrâneo na parte oeste do Mar Adriático (região Subtropical: 68°N – 14°N, 32°W – 43°E), como é possível visualizar na figura 1.2 (Fish base, 2010).

S. pilchardus pode atingir um comprimento máximo de 27,5 cm e apresentar uma esperança média de vida máxima de 15 anos.

Como o período de manutenção da qualidade do peixe cru é curto, boa parte da sardinha capturada é industrializada, sendo mais comum a produção de conservas. A qualidade da conserva depende não só das condições de processo, mas também da

matéria-prima utilizada, no entanto, alguns parâmetros estipulados pela legislação sofrem influência do processamento (Gomes, Carlos 2002).

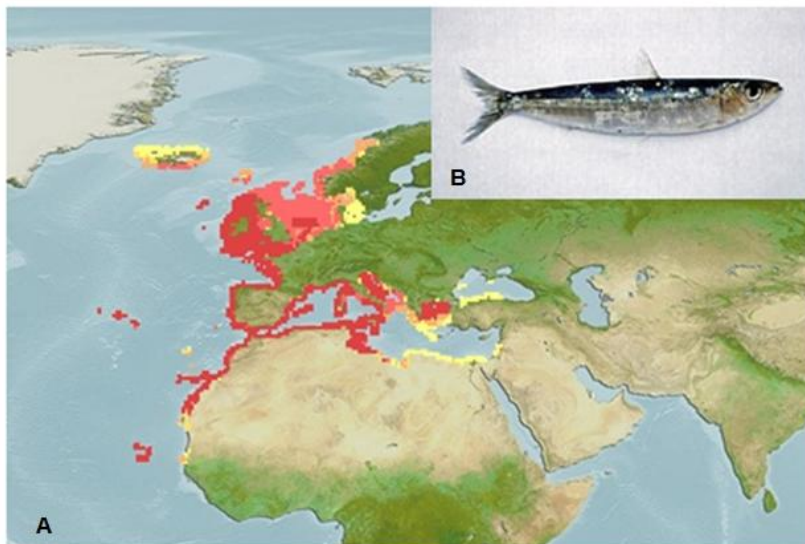


Figura 1.4 - Distribuição geográfica de *Sardina pilchardus* (A) e visualização de um exemplar da espécie (B) (Froese, R. and D. Pauly, 2010).

Ao chegar à indústria, dependendo de sua capacidade instalada, o pescado pode ser congelado e armazenado, ou ir diretamente para o processamento. A armazenagem é realizada com temperatura inferior a -18°C . Para sardinhas o mais usual é a fabricação de conservas ou enlatamento, onde o pescado é eviscerado, pré-cozido, enlatado e esterilizado comercialmente (Gomes, Carlos 2002).

1.3.2. Importância comercial

No dia 15 de Janeiro de 2010, no Auditório da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, foi atribuída à sardinha portuguesa o certificado de qualidade MSC (Marine Stewardship Council). Este certificado prova que a sardinha portuguesa é a única da Península Ibérica e a 60ª a nível mundial a adquirir este estatuto, comprovando a existência de práticas que tendem a minimizar o impacto ambiental e contribuir para a sustentabilidade das pescas. Pretende-se que estas práticas sejam continuadas e adaptadas pelos produtores e industriais, permitindo aumentar o valor da nossa sardinha (Jornal de Peniche, acedido a 01 Fevereiro de 2011 e, Chagas e colaboradores 2010).

Esta prática é de elevada importância para a economia de Peniche, visto que permite aumentar o número de ativos envolvidos direta e indiretamente às pescas, assim como aumentar volume de pescado transacionado na lota da cidade, tornando-o um dos portos mais importantes a nível nacional (Jornal de Peniche, acedido a 01 Fevereiro de 2011).

A ANPOCERCO (Associação Nacional das Organizações de Produtores da Pesca do Cerco) representa 95% das capturas de sardinha em Portugal, com níveis de captura superiores a 50000 toneladas, que podem apresentar o eco rótulo azul do MSC, reconhecido internacionalmente (Jornal de Peniche, acedido a 01 Fevereiro de 2011 e, Chagas e colaboradores 2010).

1.4. Hidrolisados de proteína de pescado – produção e caracterização

A produção de hidrolisados através do tratamento enzimático apresenta perfis peptídicos bem definidos que podem ser aplicados em rações humanas e de animais. No entanto, o processo de hidrólise e as condições de reação diferem consoante a enzima e o substrato usado, conferindo propriedades e compostos que podem apresentar características e comportamentos completamente distintos. Os hidrolisados têm sido bem estudados no que diz respeito à sua produção, bioquímica e funcionalidade. Este método permite obter, de subprodutos alimentares, péptidos com capacidades bioativas e que podem ser usados em aplicações farmacêuticas e alimentares (Chalamaiah e colaboradores 2010).

A hidrólise enzimática resulta na liquefação do tecido do pescado e tem como objetivo a recuperação de proteínas de espécies subutilizadas ou de resíduos de processamento que seriam desperdiçados, através do emprego de enzimas proteolíticas para solubilização da proteína do pescado. Daí resultam duas frações: fração insolúvel pode ser aplicada em rações animais e a fração solúvel, que contém a proteína hidrolisada, pode ser aplicada como ingrediente de alimentos elaborados e destinados ao consumo humano. Este processamento é uma forma de evitar alguma poluição aquando da eliminação dos subprodutos (Furlan e colaboradores 2002).

Segundo Batista e colaboradores 2009, a hidrólise enzimática é um método alternativo eficaz para a recuperação dos lípidos e fosfolípidos de subprodutos da

indústria do pescado. Estes compostos ficam preferencialmente retidos na fração lipídica insolúvel do hidrolisado. Segundo este autor, o rendimento da fração lipídica varia consoante a enzima utilizada na hidrólise, sendo que, o óleo libertado dos subprodutos forma uma emulsão. A formação desta emulsão sugere que os péptidos produzidos apresentam regiões hidrofóbicas mais acessíveis para interagirem com os lípidos. A distribuição de óleo e de emulsão não seguem o mesmo padrão, dependendo da enzima utilizada, do tempo de exposição da mesma. Foram observadas percentagens mais elevadas das frações de óleo nos hidrolisados a partir de sardinha cozinhada.

Os hidrolisados proteicos são soluções aquosas de polipéptidos de vários tamanhos resultantes da clivagem química e enzimática das proteínas presentes no pescado (Kristinsson e colaboradores 2000b e, Chalamaiah e colaboradores 2010). Os hidrolisados de proteína de peixe (Fish Protein Hydrolysate – FPH) podem ser obtidos basicamente por três métodos: hidrólise ácida, alcalina e enzimática. A hidrólise ácida das proteínas é mais frequente do que a alcalina. A hidrólise ácida envolve uma reação das proteínas de peixe com ácido clorídrico (HCl) ou, em alguns casos, ácido sulfúrico (H₂SO₄). As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos a altas temperaturas e frequentemente a altas pressões. O uso de reagentes alcalinos, principalmente hidróxido de sódio (NaOH), pode afetar negativamente o valor nutritivo do hidrolisado (Kristinsson e Rasco, 2000b).

A hidrólise enzimática é um dos métodos que permite aproveitar os subprodutos de origem animal, permitindo valorizar os mesmos. Os hidrolisados de proteína de peixe (HPP) apresentam boa solubilidade mesmo que a solução apresente uma elevada carga iónica ou variação de pH, e normalmente tolera elevadas temperaturas sem que os hidrolisados precipitem. Estes hidrolisados possuem boas propriedades funcionais e podem contribuir para a retenção de água em pescado congelado. Slizyté e colaboradores 2009, e Cheung e colaboradores 2009 observaram que a adição de hidrolisados proteicos a pescado aumentou a capacidade de retenção de água após descongelamento do produto. Estes resultados sugerem o potencial de aplicação dos hidrolisados de proteína de pescado (HPP) na extensão do tempo de prateleira de pescado congelado.

A composição dos HPP reflete a matéria-prima que lhe deu origem. Frequentemente, o HPP apresenta sabor amargo cuja intensidade depende do grau de

hidrólise e da especificidade da protease utilizada, ou seja, do tamanho dos péptidos gerados e da intensidade da quebra das ligações. Também existem estudos recentes recorrendo ao uso direto de células microbianas na hidrólise de proteínas. Este procedimento confere características desejáveis ao produto, como uma incorporação direta no produto em formulações alimentares (Furlan e Oetterer, 2002).

Hidrolisados de proteína de peixe obtidos de diferentes fontes, recorrendo a diferentes enzimas têm demonstrado funcionalidades dependentes das condições de hidrólise selecionadas e do tamanho e composição dos polipéptidos presentes. A hidrólise enzimática possui as vantagens sobre hidrólise química:

- A especificidade de ação da enzima que torna possível o controlo das características do produto final;
- A digestão sob condições moderadas, evitando pH e temperaturas extremas que poderiam comprometer a qualidade nutritiva do hidrolisado;
- A taxa de hidrólise controlada através da desativação da enzima por aquecimento; propriedades funcionais atrativas, como a solubilidade e a dispersibilidade;
- Recuperação do valor nutricional da proteína (Furlan e Oetterer, 2002).

A adição de enzimas para hidrolisar proteínas alimentares é um processo de importância considerável que pode melhorar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas, sem prejudicar o seu valor nutritivo (Kristinsson e Rasco, 2000a). A utilização de enzimas de origem bacteriana em vez de enzimas comerciais ou endógenas oferece muitas vantagens porque permite um bom controlo da hidrólise e, assim, das propriedades dos produtos resultantes (Kristinsson e Rasco, 2000b).

A clivagem de proteínas tem como objetivo fragmentar as proteínas em pedaços menores (péptidos). Os fatores determinantes das propriedades do produto da hidrólise enzimática são o pH, a enzima selecionada, a razão enzima/substrato, a temperatura e o tempo de reação (Fontes e colaboradores 2007).

Nos hidrolisados de proteína, o parâmetro que permite monitorizar a reação é designada por grau de hidrólise. Vários métodos têm sido descritos para monitorizar o grau de hidrólise, como por exemplo, *pH stat*, *osmometry*, nitrogénio dissolvido e o ácido trinitro-benzene-sulfónico (TNBS). O método TNBS é baseado numa reação com o

primeiro grupo de aminoácidos com o grupo TNBS. No entanto, existem variados inconvenientes com este método. Nielsen e colaboradores 2001, verificaram que era moroso, visto que não se conseguem resultados de forma rápida o suficiente para poder acompanhar o processo de hidrólise. Este reagente é instável, tóxico e tem que ser manuseado com cuidado, podendo ser explosivo. Para fornecer o desenvolvimento básico e um método sustentável, foi selecionada uma reação entre os grupos amino e *o-phthaldialdehyde* (OPA) na presença de beta-mercaptoetanol que ao interagirem formam um composto colorido a 340nm no espectrofotômetro. A reação é representada na figura 1.3.

Este método foi descrito por Church e colaboradores (1983), que sugeriu que para seguir a proteólise das proteínas de leite na pesquisa em ciências lácteas. Neste método, o composto ditioneitol (DTT) foi usado em vez do β -mercaptoetanol. Outra alteração que Nielsen e colaboradores (2001) fizeram ao método de Church foi a seleção do padrão de serina, isto porque a reação apresentada pela serina é muito perto da resposta média de um aminoácido. A tabela I.I representa os valores fixos que são necessários para determinar o grau de hidrólise.

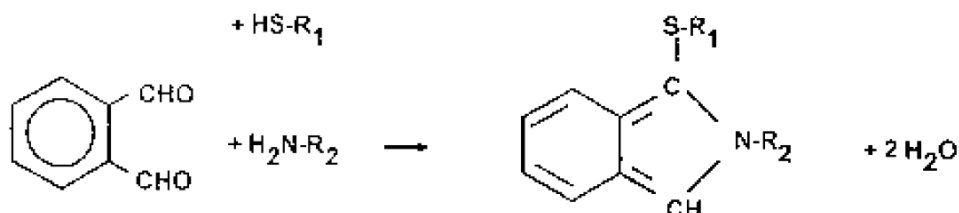


Figura 2.3 – Reação OPA. OPA reage com o primeiro grupo de aminoácido e o grupo do composto SH (ditiotreitól, DTT) que absorve radiação a 340nm (Nielsen e colaboradores 2001).

Segundo Centenaro e colaboradores 2009, pode-se avaliar a relação entre o grau de hidrólise e determinadas capacidades funcionais do hidrolisado, como a solubilidade, capacidade de emulsão, capacidade retenção de água, antioxidantes, entre outros. Quando efetuaram testes na solubilidade verificaram que maior grau de hidrólise representava maior solubilidade e quanto menor for o GH, menor será a solubilidade. O mesmo acontece com os outros testes que efetuaram. Estas capacidades também foram observadas por Gbogouri e colaboradores 2004.

Tabela I.I. – Valores constantes de α , β e h_{tot} para proteína de diferentes fontes.

| Proteína | A | B | h_{tot} |
|-----------------|----------|----------|-----------------------------|
| Soja | 0,970 | 0,342 | 7,800 |
| Glúten* | 1,000 | 0,400 | 8,300 |
| Caseína | 1,039 | 0,383 | 8,200 |
| Soro de leite* | 1,000 | 0,400 | 8,800 |
| Gelatina | 0,796 | 0,457 | 11,100 |
| Carne* | 1,000 | 0,400 | 7,600 |
| Peixe* | 1,000 | 0,400 | 8,600 |

Nota: * Quando o material ainda não tem valor estabelecido, então α e β são estimados de 1,00 e 0,4 respetivamente (Nielsen e colaboradores 2001).

A enzima selecionada neste estudo foi a Neutrase®, uma endoprotease bacteriana, sendo que esta é aprovada para aplicações alimentares (*food grade*) que pode ser usada na maior parte dos casos em que as proteínas tenham que ser quebradas, quer moderadamente, quer mais extensivamente para péptidos. As condições ótimas de funcionamento são a um pH entre 5.5 e 7.5 e a uma temperatura de 45 - 55°C (Slizyte, 2005a).

A principal aplicação dos HPP nos alimentos é na aromatização de sopas e sucedâneos de marisco. Nas rações é empregado como substituto do leite de animais e como elemento atrativo em rações para peixe e animais (Furlan e Oetterer, 2002). HPP obtidos a partir de subprodutos de espécies comercialmente representativas tais como bacalhau (*Gadus morhua*), cavala (*Scomber austriasicus*), arenque (*Clupea harengus*) e sardinha (*Sardina pilchardus*) contêm polipéptidos funcionais com um largo espectro de propriedades que os tornam potenciais ingredientes da indústria alimentar: emulsificantes (Slizyte e colaboradores 2009b, e Kristisson e colaboradores 2000), estabilizadores de espumas (Chalamaiah e colaboradores 2010), agentes hipotensores (Batista e colaboradores 2009), crioprotectores (Slizyte e colaboradores 2005^a, e Jain e colaboradores 2007), antimicrobianos (Miller e colaboradores 2003) e antioxidantes (Slizyte e colaboradores 2009b). Alguns estudos mostraram que os HPP podem também contribuir para aumentar a capacidade de retenção de água em formulações alimentares (Ravallec-Plé e colaboradores 2001 e, Slizyté e colaboradores 2009).

Alguns estudos indicaram que os péptidos obtidos através de derivados de proteína de peixe têm propriedades antioxidantes de diferentes sistemas oxidativos

(Slizyté e colaboradores 2009), assim como podem apresentar atividade antiproliferativa em determinadas linhas celulares, como é retratado por Picot e colaboradores 2006, em relação ao cancro da mama.

1.5. *Spray Drying* – Secagem do hidrolisado

A aplicação comercial dos HPP como aditivos e/ou ingredientes alimentares exigirá que o produto final tenha uma elevada estabilidade. A hidrólise enzimática origina soluções aquosas de polipéptidos, suscetíveis de degradação química e microbiológica. A desidratação destes líquidos recorrendo à liofilização ou á secagem por atomização (Azizah e colaboradores 2001, e BUCHI labortechnik AG, 1997-2002) permite, além de uma redução do volume do produto, reduzir a atividade da água prolongando assim a sua conservação. Azizah, Abul-Hamid 2002 utilizou a técnica de *spray drying* na preparação de hidrolisados em pó de *Black Tilapia* verificando que a qualidade nutricional destes não era afetada pela secagem.

Segundo Azizah, Abul-Hamid 2002, os hidrolisados de proteína de peixe são manuseados, usualmente, de forma líquida. No entanto, existem métodos, como o *Spray Drying* (secagem por atomização), que permitem converter os líquidos num produto sólido, aumentando o tempo de prateleira, a durabilidade do mesmo e aumenta a estabilidade das propriedades do produto, e permite reduzir, significativamente, o volume dos hidrolisados. Esta técnica é utilizada na produção de leite em pó, detergentes, corantes, entre outros. Tem como princípio a evaporação da humidade do alimento atomizado, misturando o *spray* e o meio de secagem (este meio é tipicamente ar). Quando o teor de humidade é alcançado, as partículas são pulverizadas e o produto é então separado do ar. A mistura a ser pulverizada pode ser um solvente, emulsão, suspensão ou dispersão (BUCHI labortechnik AG, 1997-2002).

O processo de *spray drying* pode dividir-se em quatro passos: a dispersão é produzida através de um bico de pressão (por vácuo, disco rotativo ou bico ultrassónico); tipos diferentes de energia podem ser usados para dispersar o corpo líquido em partículas mais finas; a seleção do atomizador (condições do *spray dryer*: caudal, temperatura de entrada e saída) depende da natureza e quantidade de alimento e as características desejadas do produto seco, e por último, as características desejadas do

produto seco. Quanto maior a energia para a dispersão, menores são as gotas geradas (BUCHI labortechnik AG, 1997-2002 e Food Processing Technology 2000)

Food Processing Technology 2000, indica alguns dos aspetos característicos deste tipo de secagem/desidratação. É uma técnica de sucesso para alimentos fáceis de secar (como por exemplo, vegetais e leguminosas), funcionam a pressão atmosférica, no entanto, em alimentos sólidos pode causar danos a nível estrutural pela dissecação, o odor fica intensificado, pode escurecer o produto desidratado, e normalmente não é o apropriado para carnes.

1.6. Propriedades antimicrobianas

A procura incessante por novas fontes antimicrobianas tem sido um dos objetivos da Humanidade para o tratamento de doenças. O uso de plantas medicinais tem aumentado nos últimos anos, mesmo que esta prática, da Medicina Tradicional seja milenar (remonta a 2000a.C). No entanto, a constante evolução dos microrganismos tem sido uma barreira, devido à constante alteração e adaptação das vias metabólicas destes. Sendo assim, pode-se afirmar que os medicamentos antimicrobianos contra microrganismos patogénicos é um dos grandes feitos da Medicina Moderna (Gad, 2005 e Scheper et al.,2005).

A capacidade de adaptação de um determinado microrganismo depende da sua capacidade de, na presença de um fármaco, criar mutações no seu genoma. Estas mutações, dadas as características particulares de divisão celular destes seres, podem passar facilmente de geração para geração e originando novas populações microbianas resistentes (Hall et al., 2001).

De acordo com Pellefrini e colaboradores 2004, existem péptidos antimicrobianos distribuídos pela natureza, podendo estar presentes no homem, animais e plantas, e a sua principal função é conferir alguma imunidade inata aos organismos. Existem péptidos antimicrobianos que também podem ser gerados através da digestão proteolítica de proteínas (hidrólise). Estudos recentes têm incidido sobre determinados peptídeos antimicrobianos gerados a partir de proteínas de alimentos. Estas proteínas podem fornecer uma larga fonte de péptidos antimicrobianos e ajudar a fortalecer o sistema imunitário de organismos.

1.7. Capacidade emulsificante de hidrolisados

As propriedades emulsificantes e de formação de espuma são características que estão associadas a propriedades de superfície. Isto porque ambos estão relacionados. Segundo Kristinsson (2000), as propriedades emulsificantes de HPP estão ligados às suas propriedades de superfície, ou seja, o hidrolisado reduz a tensão interfacial entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos nos alimentos. Isto acontece, porque adsorvem a superfície de óleo recém-formado durante a homogeneização fazendo com que a membrana que se forma impeça que as gotas arrebenem. Este processo tem três passos: capacidade de absorver rapidamente a interface, capacidade de reorientar a interface (em caso de fase crítica de desfazer emulsão) e a capacidade de, uma vez na interfase, interagir com moléculas vizinhas e formar uma coesão forte, um filme viscoelástico que pode resistir a calor e/ou forças de movimentos.

A capacidade emulsificante e de estabilização da mesma, dois métodos geralmente usados para medir a capacidade dos hidrolisados de apresentar estas características. Os hidrolisados produzem emulsões de baixa viscosidade, sendo que a melhor forma de avaliar esta capacidade é por titulação do óleo, assim como o súbito aumento da resistência quando o máximo da capacidade é atingido (Kristinsson e colaboradores 2000).

Segundo Kristinsson e colaboradores 2000, existe uma relação entre as propriedades emulsificantes de hidrolisados e o grau de hidrólise. Este aspeto foi confirmado, apresentando uma influência negativa sobre a capacidade de formar e estabilizar emulsões como o grau de hidrólise aumentou para os hidrolisados de sardinha e salmão. Li-Chan e colaboradores 1984, também verificaram essa relação com hidrolisados de carne, ou Slizyté e colaboradores 2009 que através de hidrolisados de proteína de *Gadus morhua* estudou, entre outras funcionalidades, a capacidade de emulsão dos HPP.

1.8. Capacidade de Formação de espuma

A química que se encontra associada às propriedades de formação de espuma em hidrolisados de proteínas apresenta propriedades comuns com a capacidade emulsificante. Segundo Kristinsson e colaboradores 2000, poucos estudos têm sido

realizados sobre este tema porque acarreta muitas limitações, tais como, pobre reprodutibilidade em laboratórios e nem sempre se consegue que as condições de estudo sejam mantidas, entre outras. Uma espuma consiste na dispersão de gotículas de ar (alvéolos) numa fase contínua líquida contendo agentes surfatantes responsáveis pela redução da tensão superficial na interface gás-líquido.

A capacidade de formação de espuma de um determinado composto pode ser avaliada através do parâmetro *overrun*. *Overrun* é definido como a percentagem de aumento de volume registado ao agitar uma determinada solução incorporando ar, relativamente ao volume inicial. A estabilidade da espuma, outro parâmetro importante em dispersões alimentares está relacionada com o valor do *overrun* ao longo do tempo (Philips e colaboradores 1981).

Vários autores sugerem que existe uma relação entre a capacidade de formação de espumas e o grau de hidrólise do hidrolisado estudado. Relativamente às proteínas do soro de leite foi observado que um aumento do grau de hidrólise resultou numa maior capacidade de formação de espuma e, numa redução da estabilidade da espuma. Este comportamento foi relacionado com o facto de os polipéptidos de menores tamanhos serem mais flexíveis para a agregação na interface gás-líquido, mas menos eficazes na sua estabilização (Kristinsson e colaboradores 2000).

O pH do meio de dispersão afeta a estabilidade da espuma, sendo esta maximizada a valores próximos do ponto isoelétrico das proteínas envolvidas. A utilização de hidrolisados de proteína na formação de espumas relativamente à utilização de proteínas, tem como vantagens a sua estabilidade e insensibilidade a mudanças de pH (Kristinsson e colaboradores 2000).

Com este trabalho laboratorial pretende-se produzir hidrolisados de proteína de pescado em pó, avaliar o grau de hidrólise e caracterizar algumas das suas propriedades funcionais.

2. OBJETIVOS

Os subprodutos de pescado têm revelado propriedades de interesse relevantes para a indústria do pescado e conserveira, como escoamento destes resíduos, e na descoberta de novas fontes com propriedades de conservação de pescado, entre outros. Sendo assim, os objetivos deste trabalho são a produção, caracterização e aplicação de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de subprodutos da indústria local conserveira de sardinha (*Sardina pilchardus*).

Neste trabalho pretende-se produzir hidrolisados funcionais de proteína de pescado, utilizando a enzima Neutrase®. Os Hidrolisados de Proteína de Pescado (HPP) foram produzidos com razões enzima/substrato e com diferentes tempos de hidrólise com o objetivo de estabelecer quais as condições de produção adequadas a diferentes propriedades funcionais do produto final.

Os diferentes HPP obtidos foram caracterizados da seguinte forma:

1. Rendimento de recuperação de proteína;
2. Grau de hidrólise;
3. Capacidade antioxidante dos hidrolisados em estado líquido e sólido;
4. Avaliação da capacidade antibacteriana através do método de difusão em disco contra bactérias gram negativas;
5. Capacidade de emulsificação e estabilização de emulsões;
6. Capacidade de estabilização de espumas;
7. Avaliação do efeito da aplicação dos hidrolisados em salmão e pescada frescos (salmão e pescada) na retenção de água, textura, cor e teor de humidade durante o armazenamento refrigerado;
8. Avaliação do efeito crioprotetor dos hidrolisados em pescada e salmão congelados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Período de amostragem

No dia 15 de Janeiro de 2011 foram recolhidos 41Kg de resíduos de *S.pilchardus*, na fábrica Indústria de Alimentação IDAL, SA, em sacos de amostra pretos e levados de automóvel até ao laboratório da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM). Esta quantidade de sardinha foi recolhida no tanque de recolha de excedentes, resultante do processamento da sardinha no interior da fábrica. Procedeu-se à recolha de toda a amostra para que o pescado fosse proveniente do mesmo lote, assim como, minimizar a interrupção do trabalho fabril.

Os resíduos foram triturados (Picadora Pikatti 1705FL potência:700W), de forma a reduzir o tamanho, aumentando a área de superfície da amostra e obter pedaços de volume mais uniforme. Os subprodutos triturados foram divididos em sacos de 500g devidamente identificados e armazenados a -20°C numa câmara frigorífica doméstica (BEKO No Frost & Electronic).

3.2. Preparação dos resíduos de *S.pilchardus*

As amostras foram descongeladas a 4°C, durante a noite, num frigorífico doméstico (Iberna classe A). Os sacos de amostras foram mantidos em gelo, antes do processo, para evitar a ativação das enzimas endógenas, até imediatamente antes do processo de hidrólise.

3.3. Processo de Hidrólise

O processo de hidrólise enzimática foi adaptado de Slizyte e colaboradores (2009b) e, Kristinsson e Rasco (2000).

As amostras foram suspensas em água destilada na proporção de 1/3 (m/m). A suspensão, assim obtida, foi homogeneizada com um polytron (Fisatom inopat modelo 712), a 300 rpm, ao mesmo tempo que aquecia até atingir os 70°C (Velp scientifica, ARE Heating Magnetic Stirrer), durante 5 minutos, para a inativação das enzimas endógenas.

A suspensão foi colocada num erlenmayer, num banho de aquecimento agitado a 50°C. Quando a temperatura atingiu 50°C, a temperatura ótima de funcionamento da enzima selecionada, foi adicionada a quantidade desejada de enzima Neutrase® 0,8L (Novozymes, Bacterial Protease de National Centre of Biotechnology Education – NCBE) quando a temperatura da solução estabilizou a 50°C, sendo esta mantida durante 0, 20, 40 e 60 minutos de hidrólise (t0, t20, t40, t60), recorrendo-se ao banho-maria (Julabo SW22) a uma velocidade constante de 90 rpm. As razões de enzima/substrato (m/m) utilizado foram 0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 3. O pH (Symphony SP 708 VWR™) foi medido antes e depois da adição da enzima e de dez em dez minutos e devidamente registado.

Para a inativação da enzima adicionada, colocou-se a solução num outro banho-maria (Pselecta, Precistern) tendo-se efetuado o tratamento térmico a 75°C durante 5 minutos. Após a inativação enzimática, procedeu-se à separação das partes sólidas (espinhas, escamas, pele, músculos e olhos), pela passagem da solução por um crivo de 150 µm. Posteriormente, centrifugou-se (Eppendorf-Centrifuge 5804R) o líquido resultante da crivagem durante 30 minutos, a 4°C e a 2600g, seguido de armazenamento a 4°C. Após esta fase, foi recolhida e pesada a fase lipídica que se formou à superfície, assim como do pellet. A fração solúvel obtida foi filtrada (Whatman® 4 Qualitative filter: 20 µm), pesada e congelada a -80°C (Thermo, Electron corporation, Farma -86°C ULT Freezer), até posterior secagem-análise.

3.4. Secagem dos hidrolisados por “Spray Dried”

O procedimento seguido para desidratar as amostras no Spray Dryer foi adaptado de Hamid e colaboradores (2002).

Para poder submeter as amostras de hidrolisado líquido ao Spray Dryer (SD-Basic Lab Plant™), estas foram descongeladas à temperatura ambiente. Seguidamente, foi adicionado 10% do volume (m/v) de amostra em g de maltodextrina (Maltodextrin white pure) a cada uma. A mistura foi agitada continuamente para prevenir a sedimentação da maltodextrina e ligeiramente aquecida para que a maltodextrina pudesse gelatinizar e encapsular os compostos voláteis do hidrolisado. As condições de desidratação no Spray Dryer foram as seguintes: de caudal de alimentação de hidrolisado de $5,14 \cdot 10^{-2}$ ml.s⁻¹, temperatura de *inlet* de 135°C e temperatura de *outlet* de 75°C.

O produto resultante foi armazenado, em frascos fechados, num local fresco, seco e protegido da luz, sendo registado o seu peso para cálculos de rendimento do processo global de produção de hidrolisado.

3.5. Avaliação da quantidade de proteína bruta na amostra

A concentração de proteína do hidrolisado (líquido e sólido) foi determinada com base no método de Kjeldahl, segundo a Norma Portuguesa 2030: Determinação do teor de proteína bruta (1996).

Os principais processos deste método são a digestão ácida, destilação e titulação.

A digestão inicia-se na adição de Acido sulfúrico a 95-97% (H₂SO₄, Fluka) à amostra, de seguida os tubos são colocados num digestor de Kjeldahl (Foss, Digestor 2006). Esta fase é constituída por dois passos: primeiro a 200°C durante 30 minutos, seguida pelo aumento da temperatura para 400°C durante 90 minutos; e por último, retoma-se à temperatura de 200°C até retirada dos tubos do digestor. Após esta fase, procede-se à destilação num destilador automático de Kjeldahl (Foss, Kjeltec™ 2100) com Hidróxido de sódio a 40% (m/v) (NaOH, Merci, VWR) e por fim a titulação é realizada manualmente, sendo o titulante Ácido clorídrico a 0,1N (HCl, Panreac, JMGS). Foram realizados duplicados de cada amostra, para o hidrolisado líquido, hidrolisado sólido, gordura, pellet e dos subprodutos da sardinha (amostra bruta, antes do tratamento).

A quantidade de proteína em cada amostra é determinada segundo a fórmula:

Em que, a percentagem de azoto (equivalente à percentagem de proteína) é determinada segundo a fórmula:

Onde: V_a = volume do titulante usado para a amostra (ml); V_b = volume do titulante usado para o branco (ml); m = massa da amostra (g)

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Quantidade de proteína do hidrolisado}}{\text{Quantidade de proteína dos subprodutos}}$$

3.6. Grau de Hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado pelo método de OPA (o-phthaldialdehyde), adaptado de Lian e colaboradores (2005).

Neste método, os principais passos a realizados foram: a preparação do reagente de OPA, do padrão de Serina (β -Hydroxyalanine, Sigma, Sigma-Aldrich Química SA), das amostras seguido e a leitura das mesmas a 340nm no espectrofotômetro (Helios α TM – Thermo Electron corporation).

A preparação das amostras foi realizada diluindo 1mL de amostra num balão de 50mL.

Nas cuvetes para leitura em espectrofotômetro adicionaram-se 3mL de reagente OPA e 400 μ L de amostra/branco ou padrão, agitando suavemente a cuvette. Após este passo, aguardaram-se 2 minutos, antes da leitura, para que a reação ocorresse. Foram efetuados duplicados de cada amostra.

O grau de hidrólise é determinado segundo a fórmula:

Em que:

Onde: serina-NH₂= meqv serina NH₂/ g de proteína; β = 0,40; α =1,00; X= g de amostra; P= percentagem de proteína na amostra; V=volume de amostra num L

3.7. Capacidade Antioxidante

Este procedimento foi adaptado do autor Slizyte (2009b).

Preparou-se previamente uma solução de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Aldrich, Sigma-Aldrich Química SA) 0,4mM em etanol absoluto (CH₃CH₂OH, Panreac), protegendo a solução da luz. De seguida, prepararam-se amostras de Butylated hydroxytoluene (BHT, C₁₈H₂₄O, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Química SA) com as concentrações de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 mg/mL dissolvidas em Dimethyl sulfoxide (DMSO Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Química SA). O BHT serve de controlo positivo, visto ser um antioxidante sintético.

Num frasco de 2mL juntaram-se 10µL de amostra e 990µL da solução de DPPH, agitou-se e preservou-se a mistura no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se então à leitura das mesmas a 517nm no espectrofotómetro (Helios αTM – Thermo Electron corporation). Foram realizados triplicados de cada amostra para o hidrolisado líquido e hidrolisado sólido.

Para ter uma base de comparação entre a capacidade antioxidante dos hidrolisados líquidos e em pó, as amostras foram preparadas de forma a ter a mesma concentração final de proteína (concentração de sólido = concentração de líquido).

Calculou-se a capacidade de redução do DPPH através da seguinte fórmula:

Em que: Abs DPPH – Absorvância da solução DPPH sem amostra; Abs amostra – Absorvância da amostra em teste (sol. DPPH + amostra); Abs branco – Absorvância do etanol absoluto.

3.8. Aplicação do Hidrolisado em pescado: Salmão e Pescada

Para a aplicação do hidrolisado em pó em Salmão e Pescada, adquirido na PROFRESCO - Peniche, adaptou-se o método de Slizyte (2005a).

Do músculo do salmão/pescada, cortaram-se cubos (~1x1 cm) que foram submersos em diferentes soluções de hidrolisado (1g de pó/ 10mL de água destilada) e apenas embebidos em água destilada (controle). Os hidrolisados selecionados para este estudo foram as amostras que demonstraram ter uma maior capacidade antioxidante pelo método descrito por Slizyte (2009b).

Realizaram-se ensaios positivos (salmão/pescada submerso em água destilada). Antes de submeter o peixe ao hidrolisado, cada cubo foi pesado para posteriores cálculos da Capacidade de Retenção de Água. Este procedimento foi realizado para ambos os peixes, sendo uma parte submetida a congelação (-20°C) durante 1, 2 e 3 semanas, e outra a refrigeração (4°C) com uma duração de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias. Foram realizados duplicados de cada concentração de hidrolisado.

Para a descongelação do pescado, o mesmo foi colocado sobre uma rede à temperatura ambiente, durante duas horas.

Para o pescado congelado (em cada semana) e para o fresco (a cada dia), foram realizados as seguintes análises:

3.8.1. Percentagem de perda de água durante armazenamento

Para a determinação da % de perdas de água, foi adaptado do método de Chien e colaboradores (2007).

Cada cubo de peixe foi pesado após hidrolisado (Dhaus: Scout Pro) (minicial) e após armazenamento a 4°C (pescado fresco) e -20°C (pescado congelado) (mfinal). A percentagem de perdas de água foi determinada segundo a seguinte fórmula:

3.8.2. Avaliação da Cor

A determinação da cor foi adaptada de Nollet e Toldrá (2008).

O Colorímetro (Chroma meter CR-400) foi calibrado e efetuou-se a leitura à superfície do cubo de pescado. Foram realizados duplicados de cada amostra.

O objetivo desta técnica é avaliar a cor dos produtos traduzindo essa coloração em escala numérica. O resultado é expresso em CIELAB, ou seja, sistema mais usado para avaliar a cor de um alimento, quer seja proveniente de amostras sólidas, pastosas, pós ou líquidas. Para as nossas amostras o aparelho forneceu-nos medições de L^* (*lightness*), a^* (*redness*), b^* (*yellowness*), *hue angle* [$\tan^{-1} (b^*/a^*)$] e *chroma* [$(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$]. Os valores de L medem a claridade da amostra e varia entre 0 (preto total) e 100 (branco total); 0° representa $+a^*$ com tendência para o vermelho; 270° representa $-a^*$ com tendência para o verde; 90° representa $+b^*$ com tendência para o amarelo e 180° representa $-b^*$ com tendência para o azul. Os valores de **chroma** é uma expressão da saturação ou intensidade e clareza da cor. Na avaliação do efeito da aplicação dos hidrolisados em pescado, o vetor de deslocação foi colocado, através da seguinte equação:

$$\text{Vetor de deslocação} \rightarrow \Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

$$\Delta L^* = L^*_{\text{sample}} - L^*_{\text{standard}} \text{ (diferença da luminosidade)}$$

$$\text{Diferença (vermelho/verde) do padrão de } \Delta a^* = a^*_{\text{sample}} - a^*_{\text{standard}}$$

$$\text{Diferença (amarela/azul) do padrão de } \Delta b^* = b^*_{\text{sample}} - b^*_{\text{standard}}$$

3.8.3. Avaliação da Textura

A determinação da textura em peixe foi adaptada de Jain (2007). O Texturómetro (TA.XT.Plus) foi calibrado e efetuou-se o estudo da compressão/penetração aplicando a sonda (P5/S: 5mm Sph. Stainless) do equipamento sobre o filete de peixe. A distância de penetração utilizada para análise do salmão foi de 7 mm, por sua vez, para a pescada foi de 4 mm. Os dados foram recolhidos pelo software Texture Exponente 32: Stable Micro Systems. Foram realizados quaduplicados de cada amostra.

3.9. Avaliação da Cor dos pós

A determinação da cor foi adaptada de Nollet e Toldrá (2008). O Colorímetro (Chroma meter CR-400) foi calibrado e efetuou-se a leitura à superfície do pó de cada

hidrolisado em pó. Foram realizados quadruplicados de cada amostra. O teste foi realizado à maltodextrina, utilizada como agente secante na desidratação dos hidrolisados por Spray Drying.

3.10. Determinação do Teor de Humidade nos pós

Para a determinação do teor de humidade nos pós, utilizou-se um analisador automático (Mettler Toledo HB43 Halogen), onde se colocou, aproximadamente, 0,500g de amostra.

3.11. Avaliação das propriedades de formação e estabilização de espuma

Para a elaboração desta atividade, adaptou-se o protocolo de Chalamaiah, 2010.

Preparou-se diferentes concentrações de hidrolisado: 0,3% e 3% em água destilada e ajustou-se o pH a 6.5 (volume de 35mL). Homogeneizou-se a mistura durante 1 minuto no vórtex (Velp® Scientifica 2X³). De seguida, mediu-se o volume de espuma formado no falcon de 50mL.

Colocou-se 1 esfera (uniformes de tamanho e massa – 0,074g) e registou-se o a passagem (p) ou não passagem (n) da mesma pela espuma formada. Para avaliar a estabilidade da espuma formada, mediu-se o volume de espuma formado ao tempo zero (t0) e passado 5 minutos (t5).

Realizaram-se os passos anteriores com caseinato de sódio (Acros) (controlo positivo), de forma a comparar resultados. Como controlo negativo, foi utilizado água destilada e para verificar a capacidade da maltodextrina presente nos pós, efetuaram-se as mesmas concentrações que para as amostras.

Para cada amostra e respetivos controlos efetuaram-se duas réplicas por concentração de hidrolisado. A seguinte fórmula permite-nos avaliar a capacidade de formação de espuma (FE):

$$\% \text{ FE} = \frac{\text{Volume após agitação} - \text{Volume antes agitação}}{\text{Volume antes agitação}} \times 100$$

Estabilidade da formação de espuma é medida por (EFE):

$$\% \text{ EFE} = \frac{\text{Volume final de espuma (mL)}}{\text{Volume inicial de espuma formada (mL)}}$$

3.12. Avaliação de propriedades emulsificantes e estabilizantes

Adaptado de Slizyte (2009b) e Kristisson (2000).

Misturou-se 5mL de azeite virgem (Oliveira da Serra Clássico 0,7% acidez máxima) /óleo (Vaqueiro) com 5mL de soluções de hidrolisado (previamente preparada com água destilada a 16%) em falcons de 15mL. A mistura foi sujeita ao vórtex (Velp® Scientifica 2X³) durante 60 segundos a 40Hertz.

O Caseinato de sódio a 1,6% foi o controlo positivo (emulsionante já utilizado na indústria alimentar). Como controlo negativo, substituiu-se o hidrolisado por água destilada. Para verificar a interferência da maltodextrina no processo, foram investigadas segundo o mesmo protocolo das propriedades de uma solução de 10% maltodextrina.

$$\text{Capacidade emulsão} = \frac{\text{Volume emulsão}}{\text{Volume total de solução inicial}} \times 100$$

Determinou-se o volume de emulsão, registando-se os diferentes volumes observados (t0). Após 30 minutos (t1) registou-se o valor. Após 90 minutos (t2) centrifugou-se (Eppendorf-Centrifuge 5804R) as réplicas a 2200xg durante 3 minutos. Após 24h (t3) repetiu-se a medição dos volumes. Calculou-se a diferença de tempos e esta permite avaliar a estabilidade da emulsão (EE):

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Volume total} - \text{volume aquoso}}{\text{Volume total de solução inicial}} \times 100$$

Cada amostra e controlos foram realizados em duplicados.

3.13. Propriedades Antimicrobianas

3.13.1. Preparação dos meios de cultura

Utilizaram-se dois meios de cultura distintos: o meio LB líquido (Luria-Bertani Broth) (Merck, Whitehouse Station, EUA) para o crescimento de *Escherichia coli* e de *Salmonella typhi* e o meio Mueller Hinton (Merck, Whitehouse Station, EUA) para a realização dos antibiogramas. Os meios LB e Mueller Hinton foram preparados conforme as instruções fornecidas pelo fornecedor.

3.13.2. Avaliação da capacidade antibacteriana

De forma a avaliar a capacidade antibacteriana dos hidrolisados de proteína de pescado líquidos (antes do Spray Dried), foram utilizadas duas bactérias modelo Gram-, nomeadamente *Salmonella typhi* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 10536 e CECT 434). As bactérias encontravam-se em *stock* a -80°C (Thermo, Electron Corporation), a partir do qual se retiraram 100µL, transferindo-os para 100mL de meio LB e posterior incubação a 37°C, 150 rpm (Heidolph Inkubator 1000). Ao fim de 24 horas retirou-se para tubos de ensaio com meio salino 0,85% cloreto de sódio (NaCl), a quantidade de cultura necessária para atingir 0,5 na escala de Mcfarland (equivalente a 5×10^5 unidades formadoras de colónias (ufc)/mL) (Treyaprasert e colaboradores, 2007), sendo a comparação feita com os padrões Mcfarland (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Para a avaliação da capacidade antibacteriana dos hidrolisados de proteína de pescado líquido recorreu-se ao método da realização de antibiogramas descrito por Vandepitte e colaboradores (2003). Para tal realizou-se um espalhamento com o auxílio de uma zaragatoa estéril numa placa com meio Muller-Hinton. Foram então colocados 10µL de cada amostra de hidrolisado de proteína de pescado em discos estéreis de 6mm, (30-300µg/disco) e outros contendo 10µL de água Milli-Q (controlo negativo) sendo posteriormente transferidos com o auxílio de uma pinça estéril para a placa previamente semeada. Como controlo positivo utilizaram-se discos comerciais contendo antibiótico, nomeadamente a ampicilina (10µg/disco) (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Por fim as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, procedendo-se no dia seguinte à medição dos halos de inibição correspondentes a cada disco. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de hidrólise enzimática, foram testadas as seguintes condições: concentrações de enzima (0% (g/g), 0,5% (g/g), 1% (g/g), 1,5% (g/g), 3% (g/g)), cada uma com tempos de hidrólise associados (0, 20, 40 e 60 minutos), tendo sido realizados triplicados de cada condição testada.

A enzima usada, Neutrase[®], catalisou a hidrólise das proteínas existentes na amostra. A utilização de enzimas proteolíticas no pescado permite alterar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas presentes no pescado, sem prejudicar o seu valor nutricional (Furlan e Oetterer, 2002).

Não existem dados que permitam determinar com clareza qual o tipo de pescado que apresenta um processo de hidrólise ideal. A escolha da matéria-prima usada depende da disponibilidade do fabricante, das especificações exigidas pelo cliente e, fundamentalmente, da disponibilidade do recurso no meio ambiente. De acordo com Furlan e Oetterer, 2002, a matéria-prima mais usada atualmente são as sobras do processamento de pescado magro, pois permite evitar o desenvolvimento de aromas intensos e desagradáveis existentes dos processados de pescado gordo. Este facto foi sentido nos nossos hidrolisados líquidos, visto que a sardinha é um peixe gordo. Uma proteólise prolongada pode resultar na formação de péptidos extremamente solúveis, sem funcionalidades desejáveis e promover um gosto amargo no hidrolisado (Furlan e Oetterer, 2002 e, Bhaskar e coladores 2008).

Para a realização do processo de hidrólise e obtenção dos hidrolisados de proteína de resíduos de sardinha, o tempo de hidrólise não foi superior a 60 minutos. Segundo Furlan e Oetterer, 2002, hidrolisados de proteína produzidos a partir de peixes gordos serão preferencialmente produzidos com uma digestão inferior a 90 minutos à temperatura de 55°C, temperatura de atuação da enzima que usamos. Com este tipo de pescado, o passo de centrifugação contínuo a frio origina três fases: óleo, sólidos insolúveis e hidrolisado (parte líquida).

Um aumento no tempo de hidrólise ou na relação enzima/substrato resulta numa diminuição do comprimento médio da cadeia peptídica na fração solúvel (proteína hidrolisada) pela quebra das ligações peptídicas, afetando as propriedades físico-

químicas dos hidrolisados resultantes levando à diminuição do pH (Kristinsson e Rasco, 2000a).

4.1. Rendimento do processo de hidrólise para líquidos e sólidos

O esquema seguinte (figura 1) representa a distribuição da proteína presente na matéria-prima inicial de resíduos de sardinha até à formação dos hidrolisados de proteína de pescado em pós, permitindo armazenar o produto e manter as suas propriedades organoléticas.

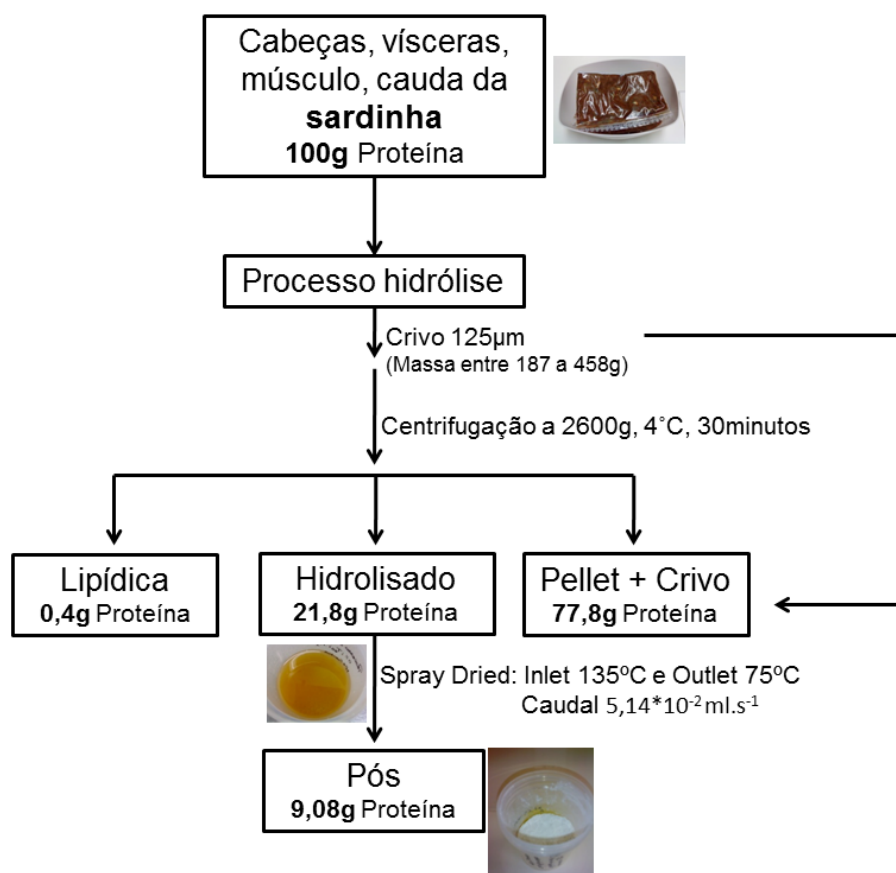


Figura 4.1 - Esquema representativo da recuperação de proteína, desde os resíduos de sardinha até ao hidrolisado em pó, associados ao processo de hidrólise. (Utilizou-se como base uma massa inicial de proteína de 100g e os valores médios dos rendimentos dos ensaios realizados).

Como é possível observar na figura 4.1, grande parte da proteína permaneceu no *pellet* formado no passo de centrifugação ou na crivagem do processo de hidrólise.

De acordo com A. Abdul-Hamid e colaboradores 2002, a quantidade de proteína existente na amostra reduz, significativamente, com o aumento da temperatura de

funcionamento do *Spray Dryer*, podendo atingir rendimentos que variam entre 23,9% e 59,8% para 150°C e 180°C, respetivamente. A temperatura de *inlet* selecionada para a secagem dos hidrolisados no presente estudo foram os 135°C, tendo por base a minimização da adesão de produto às paredes do equipamento e a condensação da fase gasosa na câmara de secagem. A utilização de temperaturas mais baixas, uma vez que a humidade do ar de secagem não era possível de controlar e dadas as condições atmosféricas a que foi realizada a secagem, conduzia à condensação do produto na câmara de secagem. Abdul-Hamid e colaboradores 2002 declaram que não se verificaram alterações significativas nas cinzas dos hidrolisados, no entanto, a quantidade de hidratos de carbono aumentou, possivelmente, devido à maltodextrina. A adição de maltodextrina tem como função uma melhoria do produto final e um aumento do rendimento da secagem. A maltodextrina microencapsula o hidrolisado, ou seja, o produto líquido é embebido numa matriz sólida, permitindo “aprisionar” os compostos voláteis e não voláteis do hidrolisado líquido, fazendo com que as propriedades e características existentes neste, sofram a menor alteração possível (Buchi Labortechnik AG e, Abdul-Hamid e colaboradores 2002).

Uma possível solução, para ultrapassar as limitações verificadas no processo de desidratação das amostras de hidrolisados de resíduos de sardinha, seria utilizar um liofilizador. Quando se compara com a secagem tradicional efetuada pelo *Spray dried*, a liofilização não conduz a alterações no produto. No entanto, o uso do liofilizador, para um futuro *scale up* do processo, poderia ser economicamente inviável devido aos custos energéticos aumentados, volumes tratados. Por sua vez, também existem vantagens associadas ao uso do liofilizador, como por exemplo, a coloração do produto mantém-se, assim como o odor e sabor mantêm-se inalterado (Food Processing Technology 2000).

Através análise das figuras 4.3 e 4.4 verifica-se que o rendimento, em relação à proteína total, do hidrolisado líquido é superior ao do sólido. Esta diminuição ocorreu porque houve adesão de matéria aos constituintes do aparelho, desde a câmara de secagem até ao tubo de exaustão.

Como se pode observar na figura 4.3, foi obtida uma recuperação média de proteína no hidrolisado líquido de 21,8%. Tendo em conta o objetivo da recuperação das qualidades nutritivas e funcionais da proteína presente nos subprodutos seria desejável aumentar este rendimento. A utilização de um biorreactor mecanicamente agitado teria

permitindo uma mistura mais eficaz, promovendo o contacto entre o substrato (subprodutos de sardinha) e a enzima, o que poderia ter influenciado o rendimento do processo. Para além de controlar melhor as condições de hidrólise, a utilização de um biorreactor na escala de 4-5 litros teria também permitido a recolha contínua das amostras com volume suficiente para submeter ao processo de secagem (de acordo com Lian e colaboradores 2005).

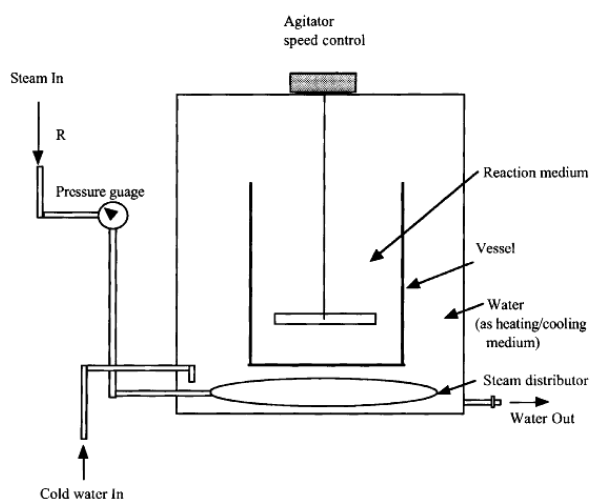


Figura 4.2 – Exemplo de biorreactor que poderia ter sido utilizado (Lian e colaboradores 2005).

Segundo Batista e colaboradores 2009, a percentagem de nitrogénio dissolvido, medido e determinado através do método de Kjeldahl, não é influenciada pela maioria das enzimas quando o tempo de hidrólise não é superior a 1h, como é o caso do nosso estudo, o que é relevante em relação aos custos energéticos nos princípios de produzir um produto de valor acrescentado, sem acréscimo de custos.

Segundo o mesmo autor que utilizou, entre outras, enzima Neutrase® utilizada neste estudo, um grau de hidrólise mais elevado foi observado na sardinha crua quando comparada com a utilização de subprodutos cozinhados.

Na figura 4.3 estão representados os rendimentos para os hidrolisados líquidos e é possível visualizar que não existem efeitos significativos do tempo de hidrólise. Isto pode dever-se à não atuação da enzima na proteína presente na parte triturada dos resíduos sólidos, mas sim, na proteína solubilizada no meio líquido.

Podemos verificar que Batista e colaboradores 2009, realizaram processos de hidrólise a produtos de sardinha crua e cozinhada, sem efetuarem o passo de inativação das endógenas antes de iniciar o processo de hidrólise. Os mesmos autores referem ainda que, a pré-cozedura dos subprodutos pode levar à desnaturação das proteínas, tornando o ataque enzimático mais difícil. Em relação ao nosso trabalho, os subprodutos foram pré tratados a 70°C durante 5 minutos para inativação das endógenas. Este passo pode ter induzido a uma prévia desnaturação das proteínas de pescado, mesmo que tivesse sido de forma suave. Este fato pode justificar a adição da enzima Neutrase® ao meio reacional não conduzir a um aumento significativo na recuperação de proteína.

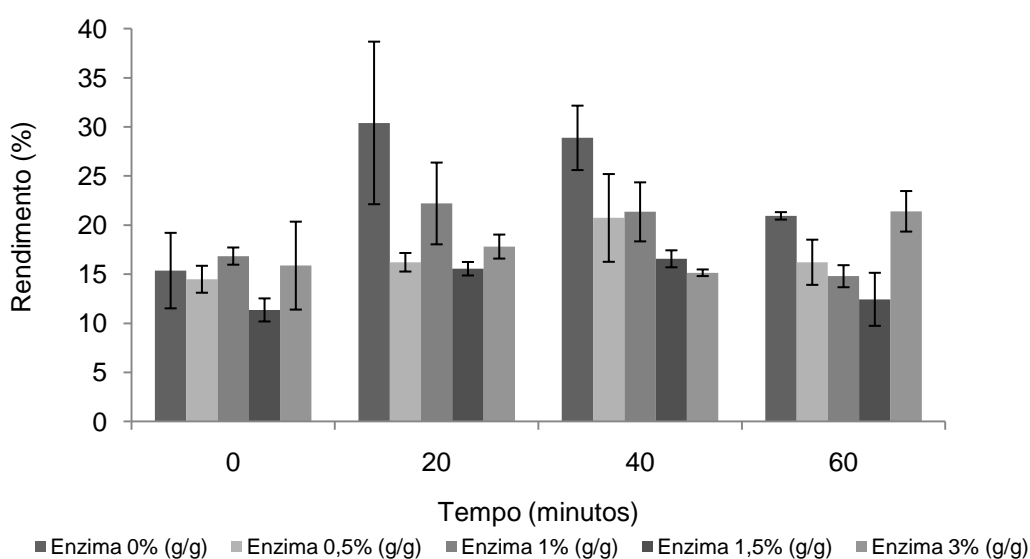


Figura 4.3 – Gráfico representativo do rendimento do hidrolisado líquido obtido em relação à enzima em função do tempo. Para realizar este estudo quantificou-se a quantidade de proteína presente na amostra através do Método de Kjeldahl. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão [Erro Padrão = Desvio padrão / RaizQ (número de réplicas)] (n=2).

Por último, é de salientar que de 100g de proteína de subprodutos de sardinha, e através das condições de hidrólise experimentadas, conseguimos produzir cerca de 9g de proteína no hidrolisado em pó, sugerindo um rendimento final de aproximadamente 10%.

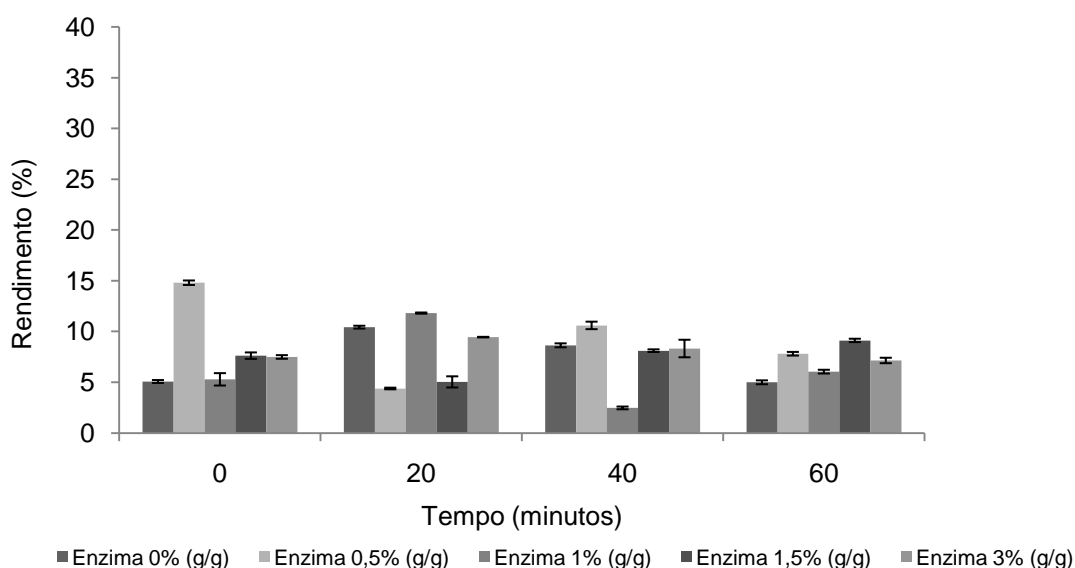


Figura 4.4 - Gráfico representativo do rendimento do hidrolisado sólido obtido, após *Spray Drying* em relação à concentração de enzima em função do tempo. Para realizar este estudo quantificou-se a quantidade de proteína presente na amostra através do Método de Kjeldahl. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=2).

A figura 4.4 demonstra o rendimento de recuperação proteínica após *Spray Drying*, onde é visível um decréscimo de aproximadamente 50% na generalidade das amostras. Este fato deve-se à adesão de material às paredes do equipamento de secagem e perdas no tubo de exaustão. Uma melhor otimização das condições de secagem seria necessária para melhorar o rendimento global da produção de hidrolisados em pó.

Shahidi e colaboradores 1995, na hidrólise de subprodutos de *Mallotus villosus* com a utilização da Alcalase® obtiveram recuperações de proteína na ordem dos 60% nos primeiros 60 minutos. A extensão da reação aos 120 min, resulta na recuperação de 70% (apenas mais 10% relativamente ao tempo 60 minutos). Este fato indica que numa determinada fase do processo de hidrólise é atingido um valor máximo de recuperação de proteína, a partir do qual, e mesmo estendendo o tempo de reação, este não se altera significativamente.

4.2. Avaliação de características dos pós

A avaliação das características físicas dos pós permite-nos verificar a coloração dos pós, assim como a percentagem de humidade dos mesmos depois de serem sujeitos à secagem pelo *Spray Dryer*. O teor de humidade será um parâmetro indicador da

eficácia do processo de secagem na manutenção da qualidade do produto final. A avaliação da cor permite avaliar de forma adequada a utilização dos hidrolisados sólidos como aditivos alimentares, pretendendo-se uma aparência neutra que não interfira no apelo visual dos produtos, aos quais este composto vai ser adicionado.

4.2.1. Teor de Humidade dos pós

Obtiveram-se hidrolisados sólidos com um teor de humidade baixo (valor médio de 4,4%) o que permite o seu armazenamento e um maior tempo de prateleira do produto. De acordo com Contreras e colaboradores 2011, uma percentagem de humidade baixo confere ao produto um maior tempo de prateleira e diminui a possibilidade de perdas e deterioração nutricional (Food Processing Technology 2000). Estes autores também informam da intensificação do odor, sabor e coloração de produtos alimentares sujeitos a *spray drying*.

Tabela IV.I - Teor de humidade nos pós dos hidrolisados (sólidos) de resíduos de sardinha e da maltodextrina adicionada aos hidrolisados líquidos (n=1).

| Amostras | %Humidade | Amostras | %Humidade |
|------------------|------------------|----------------------|------------------|
| 0%, t0 | 5,17 | 1%, t40 | 4,55 |
| 0%, t20 | 4,37 | 1%, t60 | 3,35 |
| 0%, t40 | 4,17 | 1,5%, t0 | 4,18 |
| 0%, t60 | 3,56 | 1,5%, t20 | 6,24 |
| 0,5%, t0 | 4,57 | 1,5%, t40 | 4,11 |
| 0,5%, t20 | 4,13 | 1,5%, t60 | 4,58 |
| 0,5%, t40 | 3,98 | 3%, t0 | 4,32 |
| 0,5%, t60 | 3,58 | 3%, t20, | 6,69 |
| 1%, t0 | 5,05 | 3%, t40 | 7,8 |
| 1%, t20 | 4,5 | 3%, t60 | 7,75 |
| | | Maltodextrina | 6,04 |

4.2.2. Avaliação da cor

Na avaliação dos dados fornecidos pelo colorímetro sobre os pós obtidos pelos hidrolisados líquidos, podemos comprovar, através dos valores de L*, que as amostras apresentam aproximação do branco total (100 corresponde ao branco total na claridade da amostra). Os valores observados de a* e b*, representados na tabela II, mostram-nos que os pós dos hidrolisados tendem, de cor, para o verde e amarelo, respetivamente. Os valores de b* confirmam o que é visível a olho nu, quando reidratamos as amostras é observada uma tonalidade ligeiramente amarela.

A coloração tem que ser o mais neutra possível, para que a aceitação por parte do consumidor seja positiva. Nos pós obtidos, a coloração é pouco acentuada, podendo mesmo ser confundida um bege, logo não seria impeditivo para a sua utilização na indústria alimentar.

Tabela IV.III. - Dados obtidos dos hidrolisados em pó através do colorímetro com os respetivos valores de a^* (*redness*), b^* (*yellowness*), L^* (*lightness*), *Hue angle* e *Chroma*. Cada valor é expresso como a média de quatro leituras que o aparelho fornece automaticamente.

| | a^* | b^* | L^* | Hue angle | chroma |
|----------------------|-------|-------|-------|-----------|--------|
| 0%, t0 | -0,29 | 7,54 | 95,85 | -1,53 | 58,51 |
| 0%, t20 | -0,23 | 9,46 | 91,05 | -1,55 | 91,24 |
| 0%, t40 | -0,58 | 7,24 | 94,10 | -1,49 | 54,40 |
| 0%, t60 | -0,44 | 8,68 | 94,77 | -1,52 | 77,14 |
| 0,5%, t0 | -0,63 | 7,95 | 95,70 | -1,49 | 65,28 |
| 0,5%, t40 | -0,83 | 8,44 | 93,49 | -1,47 | 73,48 |
| 0,5%, t60 | -1,39 | 11,00 | 87,31 | -1,44 | 124,62 |
| 1%, t0 | -0,83 | 8,22 | 96,70 | -1,47 | 69,86 |
| 1%, t20 | -0,81 | 9,38 | 96,32 | -1,48 | 90,20 |
| 1%, t40 | -0,72 | 9,62 | 95,98 | -1,49 | 94,61 |
| 1%, t60 | -0,77 | 8,32 | 96,77 | -1,47 | 71,51 |
| 1,5%, t0 | -0,68 | 8,93 | 96,35 | -1,49 | 81,85 |
| 1,5%, t20 | -0,64 | 8,24 | 96,16 | -1,49 | 69,96 |
| 1,5%, t40 | -0,93 | 8,33 | 96,67 | -1,45 | 71,82 |
| 1,5%, t60 | -0,68 | 7,95 | 97,08 | -1,48 | 65,32 |
| 3%, t0 | -0,66 | 7,24 | 96,95 | -1,47 | 54,54 |
| 3%, t20 | -0,88 | 7,15 | 97,63 | -1,44 | 53,54 |
| 3%, t40 | -0,61 | 7,74 | 96,78 | -1,49 | 61,96 |
| 3%, t60 | -0,67 | 8,53 | 96,64 | -1,49 | 74,86 |
| Maltodextrina | -0,58 | 1,41 | 99,40 | -1,17 | 3,97 |

4.3. Grau de hidrólise

A determinação do Grau Hidrólise (GH) através do reagente OPA foi considerada por Nielsen e colaboradores 2001, como o método menos moroso já que bastam 2 minutos para se determinar o GH na produção de hidrolisados. Também é considerado mais ecológico que métodos com o mesmo objetivo e o reagente é mais estável que o reagente TNBS. Pode ser utilizado para determinação do GH em produtos alimentares e de rações para animais.

Os valores do grau de hidrólise obtidos nas diferentes condições testadas estão representados na figura 4.5. Como é possível visualizar na figura, as amostras com 0% de enzima já apresenta um grau de hidrólise superior a 7,5% indicando que ocorreu autólise no processamento e transporte de pescado. Isto acontece porque desde a captura até ao congelamento dos subprodutos de sardinha houve um espaço temporal de aproximadamente 24h. Neste espaço de tempo, as enzimas endógenas de decomposição presentes no pescado (tanto pele como vísceras) começaram a atuar sobre as proteínas do pescado. Shahidi e colaboradores, 1995, investigaram a hidrólise de *Mallotus villosus*, comparando os processos de autólise, hidrólise com Neutrase® e hidrólise com Alcalase®. Estes autores também observaram a autólise dos subprodutos utilizados como matéria-prima para a hidrólise, tendo sido registado um aumento de 45% no grau de hidrólise com a utilização de Neutrase® e de 70,6% com a adição de Alcalase®. Na hidrólise dos subprodutos de sardinha, no presente estudo, a adição de Neutrase®, independentemente da concentração resultou num aumento do grau de hidrólise entre 10-20% relativamente aos ensaios sem adição de enzima.

Segundo Ravallec-Plé e colaboradores 2001, o fator mais importante na produção de hidrolizados de proteína de pescado, para produzir polipeptídeos com as características funcionais desejadas, não é uma extensão do tempo de hidrólise, mas sim a utilização da enzima adequada. Uma razão ótima entre a $[E]/[S]$ (E representa Enzima, e S o Substrato) será o parâmetro decisivo para obtenção de produtos de elevado interesse.

Quando observamos o grau de hidrólise da figura 4.5, verificamos que o este é superior em todos os ensaios em que foi adicionada enzima, indicando-nos que existiu atuação por parte da enzima e que houve quebra da proteína que se encontrava solubilizada no meio. Por outro lado, a quantidade de proteína retirada do crivo e pellet indica-nos que em grande parte da proteína inicial não ocorreu clivagem proteica com a consequente liquefação dos subprodutos. Este baixo rendimento de recuperação proteica poderá também estar relacionado com o grau de mistura do vaso reacional, com a escala de tempos selecionados e, com o pré tratamento efetuado aos subprodutos que ao induzir desnaturação poderá ter aumentado a energia de ativação necessária à ação da Neutrase®.

A amostra produzida nas condições de 0% de Neutrase® adicionada e 60 minutos de hidrólise apresenta um grau de hidrólise comparável às amostras produzidas na presença de Neutrase®. Este resultado é contraditório com o passo de inativação das enzimas endógenas efetuado previamente, podendo ser atribuído a uma inativação incorreta das enzimas endógenas, fazendo com que estas clivassem ou hidrolisassem mais proteínas. A utilização de uma temperatura de inativação superior à usada e durante um período de tempo superior forneceria uma margem de segurança acrescida no passo de inativação. No entanto, as condições de inativação selecionadas foram mais agressivas que as reportadas por Shahidi e colaboradores 1995, visto que estes autores não procederam à inativação das enzimas endógenas dos subprodutos e após o processo de hidrólise com a Neutrase® inativaram a enzima baixando o pH (3,0) e aquecendo a 70°C durante 10 minutos.

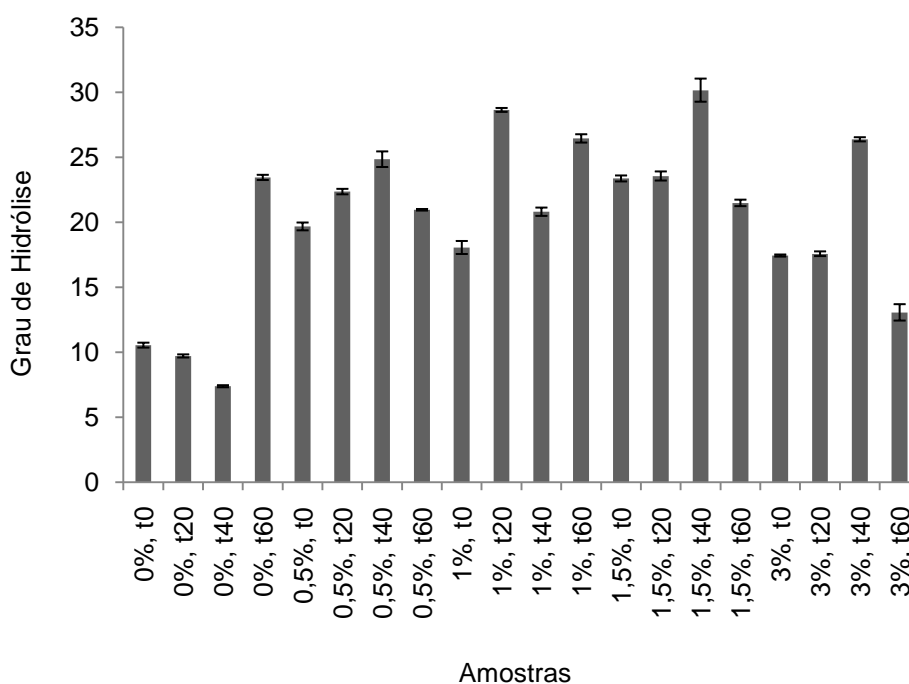


Figura 4.5 – Gráfico representativo do Grau de hidrólise, dos hidrolisados de subprodutos de sardinha, nos líquidos, com o Método do reagente OPA. Cada valor é expresso como a média ± erro padrão (n=4).

Kristinson e colaboradores 2000 recomendam o arrefecimento rápido após a inativação da enzima através da introdução do hidrolisado num banho com gelo. Esta etapa de arrefecimento permite um armazenamento mais rápido do hidrolisado, minimizando risco de contaminação microbiológica e degradação química do produto,

que poderão interferir na propriedades funcionais do produto e comprometer a segurança da sua utilização como ingrediente/aditivo alimentar.

Relativamente às amostras produzidas com a adição de enzima Neutrase® para as condições de hidrólise selecionadas, não foi verificado um efeito significativo do tempo de hidrólise nem da concentração de enzima no grau de hidrólise ($p > 0,05$), tendo sido obtido um grau de hidrólise médio de $22 \pm 6\%$.

Ravallec-Plé e colaboradores 2001 verificaram que com 5% de Alcalase®, com apenas 30 minutos de atuação de enzima, o grau de hidrólise máximo foi atingido. Segundo Batista e colaboradores 2009, verificaram que na hidrólise de subprodutos de sardinha, com diferentes enzimas (Alcalase®, Neutrase® e Protomex®) foi obtido um grau de hidrólise duas vezes superior com Alcalase® relativamente à utilização da Neutrase®. Com este fato, e extrapolando para o nosso trabalho experimental, se se utilizar este tipo de enzima (Alcalase®), pode ser que a hidrólise apresente valores de clivagem de proteínas em maior quantidade. Pode ser uma possível solução para aproveitar ao máximo os subprodutos de sardinha.

4.4 Avaliação da capacidade Antioxidante dos hidrolisados

Em termos alimentares, os antioxidantes são compostos que estão aptos para retardar ou prevenir o processo de auto oxidação. Antioxidantes sintéticos, como o BHT (Butylated hydroxutoluene) são usados na preservação dos alimentos para retardar a oxidação lipídica, no entanto, já foi provado que a sua utilização na alimentação humana está associada a diversas patologias relacionadas com alteração de lípidos e enzimas, ou em casos mais graves, efeitos carcinogénicos (Rocha e colaboradores, 2007; Matsukawa e colaboradores, 1997; Bernardini e colaboradores, 2011).

Esta experiência servirá como termo de comparação entre os valores das amostras líquidas e sólidas dos hidrolisados de proteína de sardinha. Com esta observação pode-se verificar se houve alguma influência do método de secagem.

A capacidade antioxidante foi determinada nos hidrolisados líquidos e sólidos através da redução do radical DPPH. O DPPH é um radical livre relativamente estável, podendo ser reduzido por moléculas antioxidantes. Este ensaio baseia-se na capacidade

de moléculas antioxidantes funcionarem como doadores de hidrogénios ou redutores de radicais livres.

Podemos verificar nos hidrolisados líquidos maior capacidade redutora na maioria das concentrações de enzima aos diferentes tempos de hidrólise comparando com os hidrolisados sólidos na figura 3.6. Este facto pode ser justificado pela utilização do *Spray Drying*, visto que a capacidade antioxidante é afetada pela temperatura, podendo interferir com os aminoácidos ou péptidos que funcionam como doadores de eletrões e podem reagir com radicais livres para formar produtos mais estáveis (Thiansilakul et al, 2006). Esta constatação foi a base para a análise da capacidade antioxidante dos hidrolisados de proteína de sardinha, líquidos e sólidos.

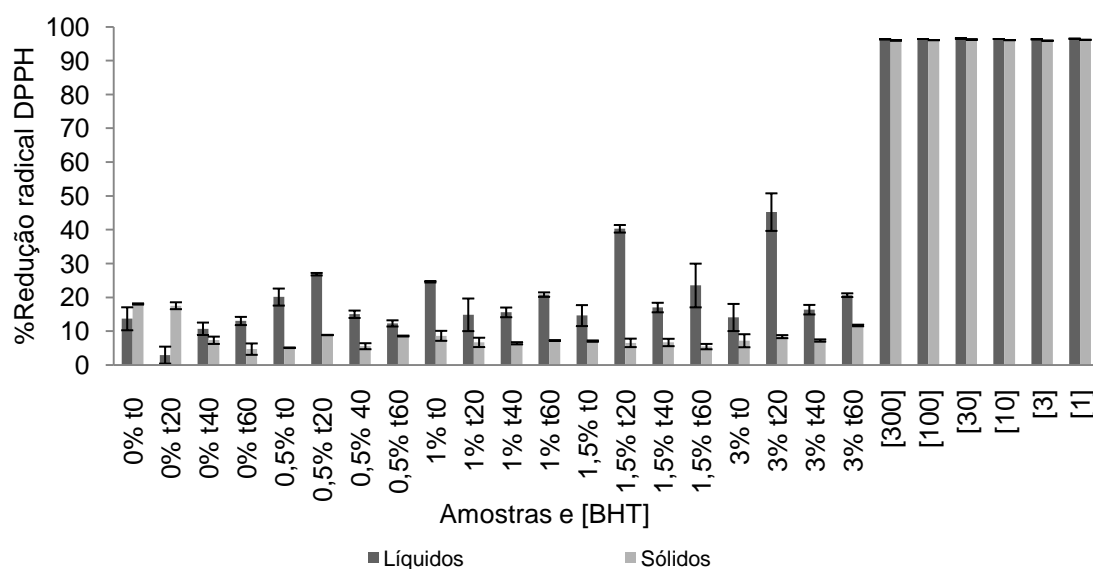


Figura 4.6 - Capacidade antioxidante através da redução do radical DPPH dos hidrolisados líquidos e respetivos hidrolisados sólidos. [300], [100], [30], [10], [3] e [1] representam as concentrações de BHT usadas como base de comparação. Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=3).

A oxidação lipídica é um fator importante ligado à deterioração de alimentos com elevados níveis de gorduras insaturadas. O peixe, em particular, contém elevados níveis de lípidos celulares insaturados que rapidamente se deterioram por peroxidação, desenvolvendo sabores e odores desagradáveis (German e Kinsella, 1985).

No hidrolisado líquido, foram observadas condições experimentais que permitiram obter hidrolisados com uma maior capacidade antioxidante, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$). A que apresentou maior valor foi a enzima a 1,5% e 3% ao tempo

de hidrólise de 20 minutos. Pode-se apurar que neste tempo de hidrólise o hidrolisado líquido apresenta maior capacidade antioxidante para todas as concentrações de enzima.

Tendo em conta que a maior parte dos valores da capacidade redutor do radical DPPH ser no tempo 20 minutos, foram estes os tempos selecionados, com as respetivas percentagens de enzima, para os testes da aplicação dos hidrolisados no pescado. Esta seleção não invalida o interesse da avaliação das restantes amostras, apenas teve como objetivo a redução dos ensaios experimentais e pescado utilizado.

Segundo Food Processing Technology 2000 existe uma redução do valor nutricional que pode dever-se às temperaturas elevadas de secagem ter reduzido a capacidade antioxidante, assim como uma acentuação do odor e coloração.

Podemos verificar nos hidrolisados líquidos maior capacidade redutora na maioria das concentrações de enzima aos diferentes tempos de hidrólise comparando com os hidrolisados sólidos na figura 4.6. Este facto pode ser justificado pela utilização do Spray Dryer visto que a capacidade antioxidante é afetada pela temperatura, podendo interferir com os aminoácidos ou péptidos que funcionam como doadores de eletrões e podem reagir com radicais livres para formar produtos mais estáveis (Thiansilakul et al, 2006). Esta constatação foi a base para a análise da capacidade antioxidante dos hidrolisados de proteína de sardinha, líquidos e sólidos.

4.5 Aplicação do Hidrolisado em pescado: Salmão/Pescada

O pescado selecionado para a aplicação do FPH foi o salmão e a pescada, uma vez que se tratam de um peixe gordo (Salmão: 1,2g de gordura insaturada/100g) e de um peixe magro (Pescada: 0,59g de gordura insaturada/100g), respetivamente (Bandarra *et al*, 2004), de modo a estudar o efeito da adição dos hidrolisados na degradação dos dois tipos de peixe.

4.5.1 Percentagem de perda de água durante armazenamento

As figuras 4.7 e 4.8 apresentam as percentagens de perda de água medida em amostras de pescada e salmão congelados durante uma, duas e três semanas, em amostras imersas em soluções de hidrolisados de sardinha e no controlo (imerso em

água). A perda de água é indicadora de alterações na microestrutura do pescado relacionadas com mecanismos de degradação, sendo indesejável na manutenção da qualidade de pescado congelado.

A adição de hidrolisados proteicos de pescado a pescado congelado conduziu uma melhor capacidade de retenção de água após descongelamento em peixe moído (Slizytė e colaboradores 2005, Slizytė e colaboradores 2009b e, Cheung e colaboradores 2009). Relativamente à aplicação de HPP de sardinha não foram encontradas na literatura dada sobre o efeito da sua aplicação na conservação do pescado.

Os hidrolisados são compostos por proteínas hidrolisadas, estando este efeito protetor relacionado com a formação de um filme proteico à superfície do pescado que irá limitar a transferência de humidade entre o pescado e o meio ambiente (Slizytė e colaboradores 2009b).

Neste estudo verificou-se que a imersão do pescado em soluções de hidrolisados, diminuiu a perda de água no caso da pescada. Ao final de três semanas de armazenamento a -20°C , o pescado imerso nos hidrolisados produzidos 0,5% e 3% de Neutrased[®] apresenta perdas de água significativamente menores que o controlo ($p < 0,05$) (Figura 4.6). Estes resultados indicam o potencial da utilização dos hidrolisados de sardinha como agentes crioprotectores neste tipo de produto alimentar.

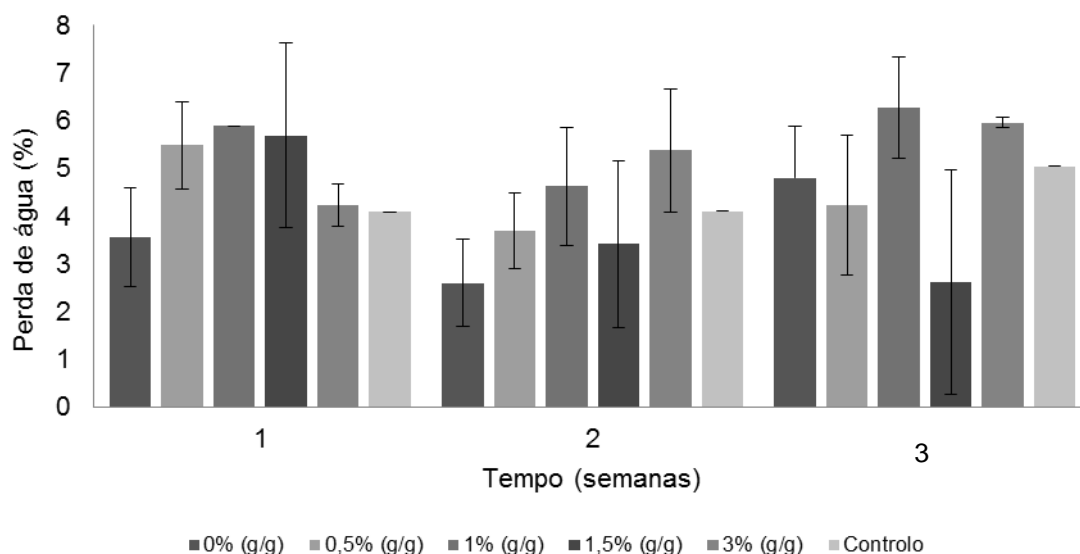


Figura 3.7 – Percentagem de perda de água nas amostras verificado nas amostras de salmão sujeita a congelamento durante três períodos de tempo (uma, duas e três semanas). Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão ($n=2$)

Relativamente ao salmão não houve um efeito significativo na retenção de água observado com o tratamento com os hidrolisados testados. Podemos, no entanto, verificar que na segunda e terceira semanas, a perda de água foi mais reduzida para a concentração de 1,5%.

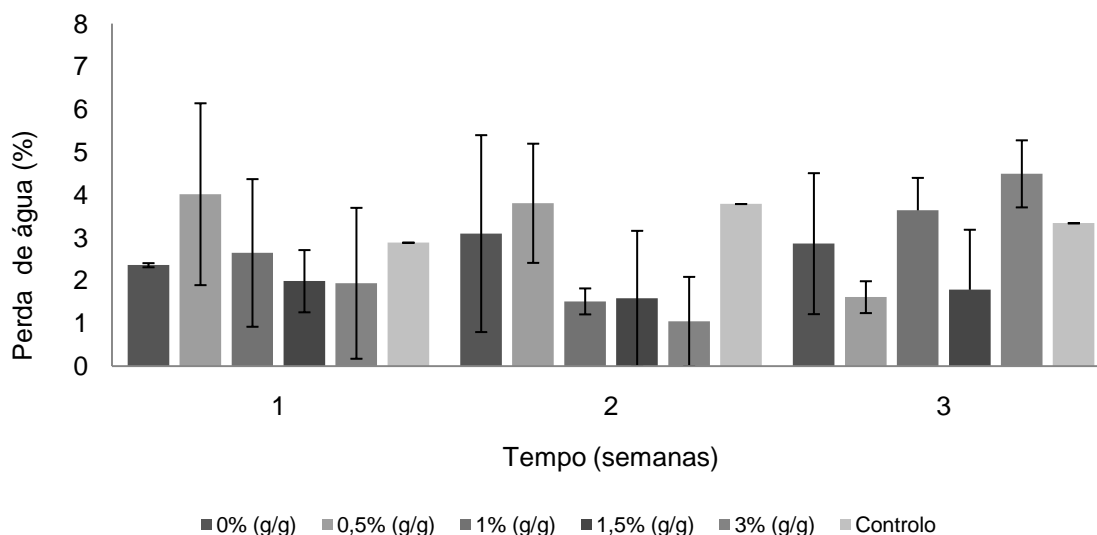


Figura 4.8 - Percentagem de perda de água nas amostras verificada nas amostras de pescada sujeita a congelamento durante três períodos de tempo (uma, duas e três semanas). Cada valor é expresso como a média \pm erro padrão (n=2).

4.5.2 Avaliação da cor no pescado

O vetor de deslocação de cor de um alimento permite-nos avaliar a cor de um dado alimento ao longo do tempo. Na tabela III podemos observar o comportamento colorimétrico da pescada e do salmão no final da experiência realizada. Quanto menor for o resultado do vetor de deslocação da amostra, melhor é o resultado.

Sendo assim, podemos observar no caso do pescado congelado que no pescado que foi sujeito a congelamento, a imersão em hidrolisados produzidos com as concentrações de 1% e 1,5% de Neutrased para a pescada e salmão, respetivamente, minimizaram significativamente a alteração global da cor no pescado (após 3 semanas de congelamento). Relativamente ao o pescado armazenado no frigorífico durante 7 dias (pescado fresco) foi a concentração de enzima de 1% no salmão e de 3% na pescada que apresentou uma menor alteração de cor.

Tabela IV.III. - Valores do vetor de deslocação da cor na aplicação dos hidrolisados no pescado estudado: Salmão e Pescada, nas condições de fresco e congelado. Cada amostra continha quatro réplicas com erro padrão associado.

| Vetor Deslocação | | | | |
|-------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Congelado | | Fresco | |
| | Salmão | Pescada | Salmão | Pescada |
| Controlo | 31,60 ± 13,24 | 65,60 ± 5,17 | 62,14 ± 10,49 | 54,08 ± 50,83 |
| 0% | 37,64 ± 10,96 | 39,41 ± 15,99 | 92,04 ± 19,62 | 76,76 ± 45,10 |
| 0,5% | 111,36 ± 47,99 | 19,01 ± 8,85 | 27,42 ± 9,17 | 91,23 ± 35,82 |
| 1% | 40,61 ± 12,09 | 16,62 ± 6,16 | 22,39 ± 7,95 | 84,22 ± 35,77 |
| 1,5% | 21,73 ± 8,32 | 13,71 ± 23,92 | 413,08 ± 227,13 | 37,98 ± 31,23 |
| 3% | 50,76 ± 13,24 | 56,32 ± 5,17 | 43,04 ± 17,00 | 9,60 ± 4,42 |

No entanto é de realçar que no teste do pescado fresco, a partir do terceiro (para o salmão), quarto dia (para a pescada), verificou-se uma alteração do cheiro dos filetes de pescado. Este fato pode dever-se a dois fatores fundamentais: o pescado escolhido para este teste, já que o salmão é um peixe gordo muito suscetível a mecanismos de oxidação lipídica, ou pelo fato dos hidrolisados aplicados nos filetes serem de sardinha, um peixe gordo, que mesmo com os passos de centrifugação a frio no processo de hidrólise, alguma da gordura existente estar presente no hidrolisado preparado, causando o odor e aroma intenso que se sentia no teste (Furlan e Oetterer, 2002).

4.5.3 Avaliação da textura no pescado

A textura é uma das variáveis que mais preocupa os produtores de aquicultura, assim como de fabricantes de processamento de pescado. Este parâmetro fornece-nos dados em relação à qualidade do alimento, sempre que estamos a comparar o início com o final do teste. Este aspeto deve-se à capacidade de perda de textura ou firmeza aquando a deterioração de um dado alimento (Jain e colaboradores 2007).

No que diz respeito aos valores observados no pescado congelado, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes semanas ($p < 0,05$).

No que diz respeito ao salmão que foi sujeito a congelamento durante três semanas apresenta diferenças estatisticamente significativas na terceira semana para a concentração de 1% enzima. Apresenta maior área de penetração neste espaço de

tempo verificando-se que é superior ao controlo. Em relação à pescada congelada foi possível notar diferenças em todas as semanas de estudo da Textura ($p < 0,05$). Todas as amostras imersas em hidrolisado apresentaram valores de firmeza inferiores ao controlo.

No pescado fresco, as concentrações de enzima que conferem maior firmeza são a 1,5% e a 0,5% para o salmão e a pescada, respetivamente.

Quanto ao pescado congelado, o salmão apenas apresenta diferenças na semana 3, sendo a concentração de 1% de enzima a que apresenta maior valor de área de curva de penetração. Relativamente à pescada, até à concentração de enzima de 3%, todos os valores eram inferiores ao controlo, logo, não surtem qualquer efeito neste caso.

A utilização de pescado moído como descrito por (Slizyté e colaboradores 2005, Slizyté e colaboradores 2009b e, Cheung e colaboradores 2009) teria conduzido a uma maior homogeneidade das amostras analisadas. Neste estudo, no entanto pretendeu-se analisar a qualidade de espécies comercialmente representativas em Portugal e no formato no qual são usualmente vendidas e consumidas, pelo que se optou por amostras de pescado cortado intacto em detrimento da homogeneidade.

Tabela IV.IV. - Valores da textura na aplicação dos hidrolisados no pescado estudado: Salmão e Pescada, nas condições de fresco e congelado (n=4, média +/- erro padrão).

| | Congelado | | | | | | Fresco | | | | | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Pescada | | | Salmão | | | Pescada | | | Salmão | | |
| | 1ª semana | 2ª semana | 3ª semana | 1ª semana | 2ª semana | 3ª semana | 1 dia | 4 dia | 7 dia | 1 dia | 4 dia | 7 dia |
| 0% | 0,16 ± 0,01 | 0,14 ± 0,02 | 0,12 ± 0,00 | 0,59 ± 0,02 | 0,45 ± 0,02 | 0,34 ± 0,02 | 0,19 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,37 ± 0,06 | 0,65 ± 0,06 | 0,60 ± 0,03 |
| 0,5% | 0,11 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,54 ± 0,06 | 0,51 ± 0,02 | 0,39 ± 0,03 | 0,18 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,58 ± 0,03 | 0,69 ± 0,09 | 0,54 ± 0,08 |
| 1% | 0,15 ± 0,01 | 0,11 ± 0,00 | 0,11 ± 0,02 | 0,43 ± 0,02 | 0,43 ± 0,01 | 0,54 ± 0,06 | 0,17 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,57 ± 0,04 | 0,56 ± 0,03 | 0,52 ± 0,03 |
| 1,5% | 0,12 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,35 ± 0,06 | 0,53 ± 0,01 | 0,36 ± 0,06 | 0,17 ± 0,00 | 0,15 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 | 0,79 ± 0,20 | 0,42 ± 0,02 | 0,55 ± 0,03 |
| 3% | 0,13 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,14 ± 0,00 | 0,40 ± 0,06 | 0,48 ± 0,02 | 0,46 ± 0,05 | 0,15 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,16 ± 0,02 | 0,45 ± 0,07 | 0,55 ± 0,05 | 0,41 ± 0,07 |
| Controlo | 0,20 ± 0,01 | 0,15 ± 0,03 | 0,19 ± 0,01 | 0,43 ± 0,07 | 0,44 ± 0,02 | 0,39 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,17 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | 0,65 ± 0,02 | 0,47 ± 0,04 | 0,38 ± 0,03 |

4.6. Avaliação das propriedades de formação e estabilidade de espuma

Neste teste verificamos que apenas o controlo de caseinato formava espuma e esta mantinha-se estável durante cerca de 30 minutos. Em relação às amostras, de forma geral, com exceção das de 0% de enzima apresentavam formação de espuma, no entanto esta desaparecia poucos segundos depois de desligar o aparelho. Sendo assim, não se verificava estabilidade e consistência na espuma formada.

Segundo Centenaro e colaboradores 2009, uma das propriedades funcionais dos hidrolisados de pescado é a sua ação como emulsificantes e formadores de espuma, mas são afetados pela solubilidade do hidrolisado. A hidrólise enzimática permite diminuir o tamanho molecular de proteínas, aumentando a hidrofobicidade das mesmas, logo aumenta a solubilidade. A capacidade de estabilização de espumas está relacionada com o tamanho dos péptidos. Kinsella 1984 indica que as propriedades desejáveis para a estabilização de uma espuma por proteínas são de peso molecular superior a 20kDa um mínimo de carga líquida, presença de sítios de ligações hidrofóbicas e, uma conformação flexível. Para o autor, não somente fatores relacionados com o grau de hidrólise podem

influir no desempenho das propriedades de formação de espuma dos hidrolisados, mas também a composição dos hidrolisados.

Centenaro e colaboradores 2009 investigaram as propriedades de formação de espuma e emulsificação de hidrolisados obtidos através da Alcalase 2,4L®. Foram obtidas percentagens de emulsão na ordem dos 70%, assim como a estabilidade, após 60 minutos, rondava os 50%. Os resultados destes autores demonstraram um crescimento significativo na formação e estabilidade de espuma dos hidrolisados formados pela Alcalase® comparativamente com a Papainase®. Afirmam que, para obter uma boa formação e estabilidade de espuma, a proteína ou polipeptídeo deve ser capaz de migrar rapidamente da interface ar-água. O aumento da concentração da proteína provoca uma elevada taxa de difusão.

O controlo utilizado para a avaliação de propriedades emulsão e formação de espuma com respetivos testes de estabilidade foi o caseinato de sódio, que de acordo com bibliografias é um composto utilizado na Indústria Alimentar. Sendo considerado um aditivo alimentar para utilizar em emulsões e formação de espuma (Geirsdottir e colaboradores 2011, Gbogouri e colaboradores 2004, Kristinsson e colaboradores 2000).

4.7. Avaliação das propriedades emulsificantes e estabilidade

A capacidade de emulsificação é geralmente usada para medir a habilidade dos hidrolisados de proteína produzirem emulsão com uma fase lipídica adicionada. Um elevado grau de hidrólise, com a conseqüente diminuição do tamanho médio dos polipéptidos, pode resultar num decréscimo das propriedades emulsificantes que podem existir. As condições ideais para a emulsão e estabilização são péptidos de elevado tamanho molecular e em concentrações elevadas no meio, respetivamente. (Chalamaiah e colaboradores 2010).

Os valores representados nas figuras 4.9 e 4.10 indicam que os hidrolisados formados no processo de hidrólise com Neutrase® apresentaram capacidade de emulsão com percentagens razoáveis, na sua grande maioria superiores a 50% para as emulsões. No entanto, os valores (de concentração de enzima e respetivos tempos) mais baixos da capacidade de emulsão do azeite não se verificaram nas emulsões formadas pelo óleo. Sendo assim, os resultados de melhor capacidade emulsificante será do óleo.

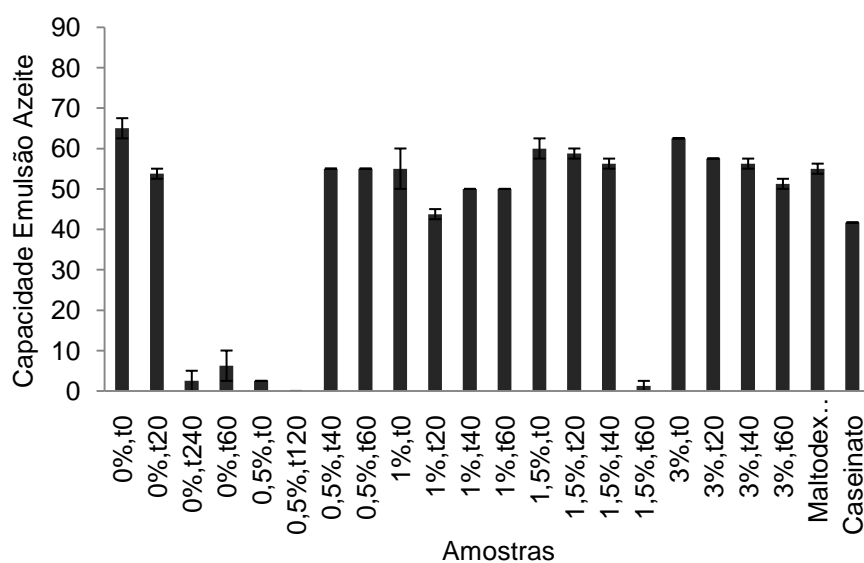


Figura 4.9 - Capacidade da emulsão do azeite com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo de caseinato (n=2 com erro padrão associado).

Como já foi discutido anteriormente noutros testes realizados, não era de esperar que a capacidade se mantivesse constante entre as concentrações de enzima aplicadas nos subprodutos e até mesmo entre os tempos existentes dentro de cada percentagem de enzima. Como detalhou Chalamaiah e colaboradores 2010, seria de esperar que existissem variações nas amostras que apresentassem elevada quantidade de péptidos com peso molecular elevado contribuindo também para a estabilidade de emulsificação. Por outro lado e dado o resultado que se obteve no grau de hidrólise, se realmente não ocorreu hidrólise das proteínas das vísceras, mas sim das proteínas que se encontravam no meio circundante, os resultados obtidos na emulsão são coerentes.

Segundo Chalamaiah e colaboradores 2010, nos ensaios efetuados com Alcalase® e Papainase®, os hidrolisados formados por estas enzimas, verificaram que com o elevado grau de hidrólise obtido com a Alcalase® originou capacidade de emulsão mais baixa que com hidrolisados de Papainase®. É importante salientar que hidrólises enzimáticas de proteína muito longas originam emulsões de baixa capacidade.

No que diz respeito à estabilidade das emulsões formadas, segundo os dados obtidos através da ANOVA, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as emulsões produzidas em azeite e óleo. Ou seja, independentemente da utilização de azeite ou de óleo, a estabilidade de emulsão não se altera.

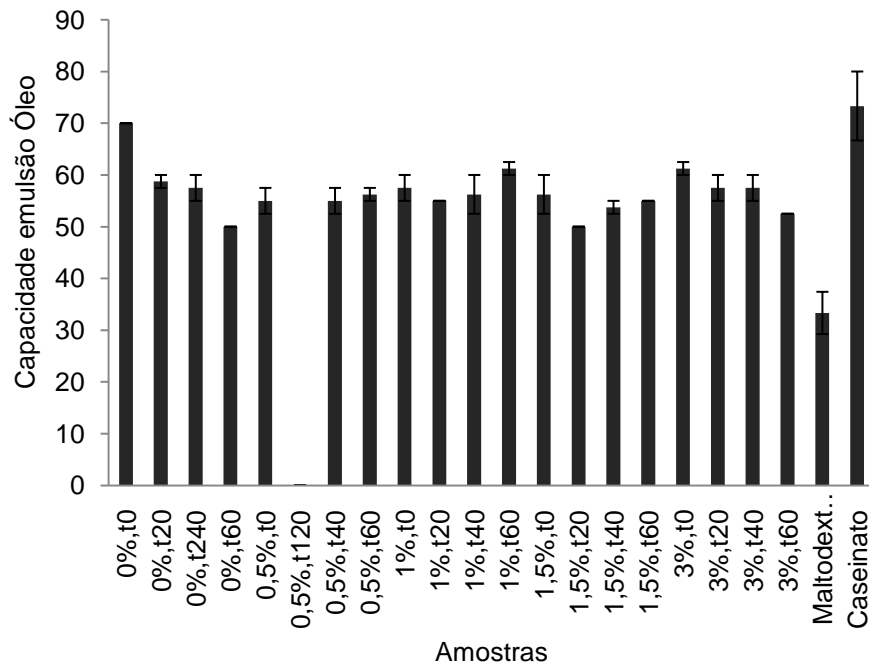


Figura 4.10 - Capacidade da emulsão do óleo com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo (n=2 com erro padrão associado).

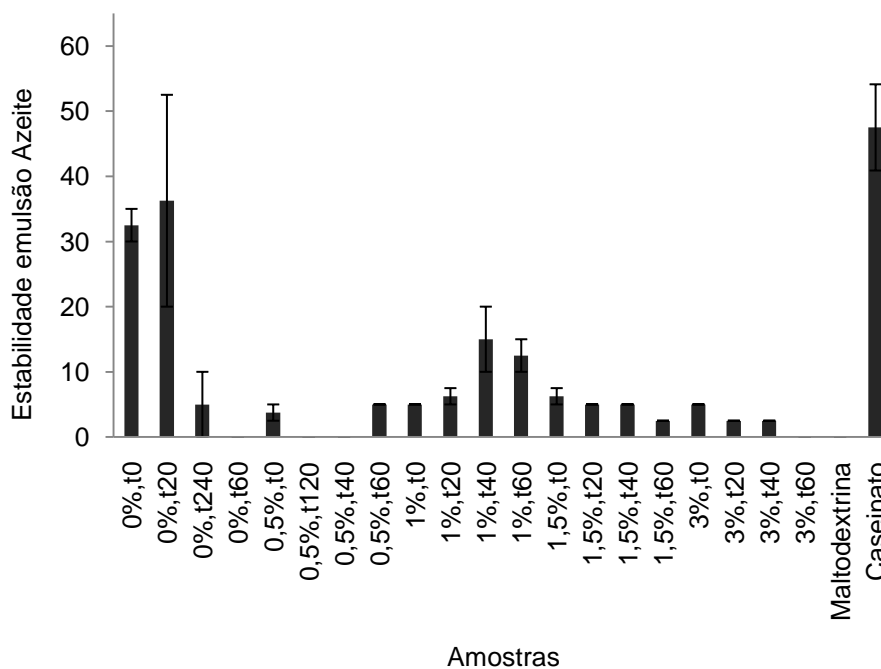


Figura 4.11 – Estabilidade de emulsão do azeite com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo (n=2 com erro padrão associado).

Na figura 4.11 e 4.12 está representada a estabilidade em relação ao azeite e óleo. Como se pode verificar, da emulsão produzida com caseinato é superior a qualquer uma das emulsões produzidas pelos hidrolisados. Em relação às amostras apenas a 0% t0 e t20 apresentam uma capacidade de estabilidade do azeite foram superiores às restantes. Este efeito estabilizante será, provavelmente, independente da presença de maltodextrina uma vez que a emulsão produzida pela maltodextrina, ao final de 24h estava completamente separada.

Ao comparar as figuras 4.11 e 4.12, verifica-se que o azeite é o que apresenta mais percentagem de estabilidade, no entanto, através de estudos estatísticos não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre a estabilidade de emulsão do azeite e do óleo.

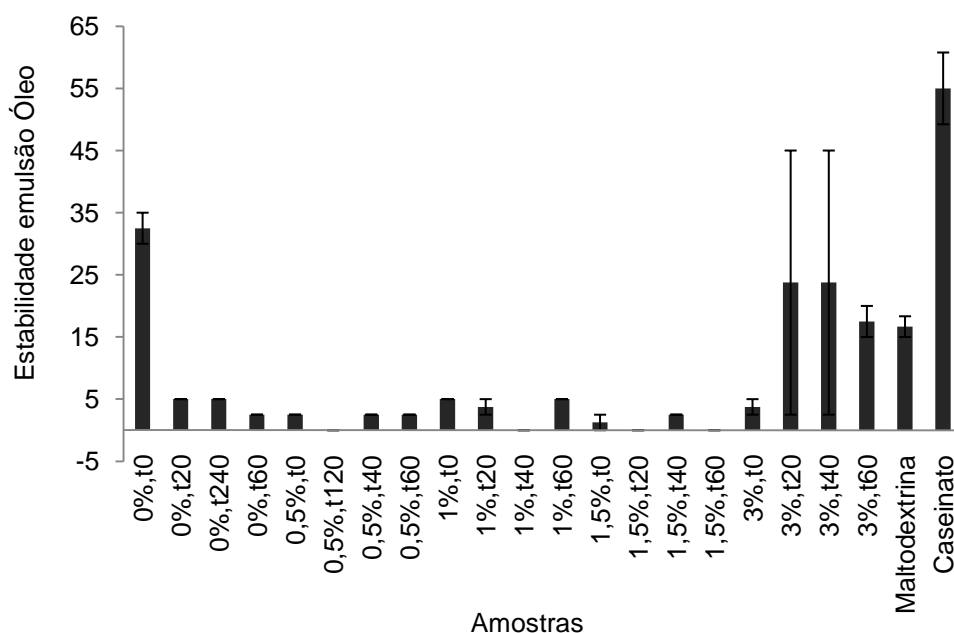


Figura 4.12 – Estabilidade de emulsão do óleo com solução de amostras, maltodextrina e respetivo controlo (n=2 com erro padrão associado).

No que diz respeito à estabilidade da emulsão, péptidos com maior peso molecular contribui para uma maior estabilidade de emulsão. Os hidrolisados de proteína são materiais de superfície ativa visto que promove a interação entre a água e o óleo devido às alterações de hidrofiliicidade e hidrofobicidade e das alterações das características destes grupos (Chalamaiah e colaboradores 2010).

4.8. Avaliação da capacidade antimicrobiana

Na avaliação da capacidade antimicrobiana, não se verificou atividade para as estirpes estudadas, no entanto, não quer dizer que os hidrolisados de proteína de sardinha produzidos não possuam essas propriedades. Apenas podemos afirmar que *Salmonella typhi* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 10536 e CECT 434) não apresentam esta atividade. Como os controlos apresentaram os resultados esperados e houve crescimento bacterial, pode-se validar este método.

Salampessy e colaboradores 2010, Rajanbabu e colaboradores 2011, comprovam que existem peixes que secretam diferentes tipos de péptidos e polipéptidos envolvidos no mecanismo de defesa. Riscos ambientais e do efeito de estufa conduzem à procura de novas fontes de drogas, vacinas e conseqüentemente tratamentos para doenças patológicas. Estes péptidos possuem aminoácidos que se encontram carregados positivamente e vão ligar-se a substâncias e a moléculas que se encontram carregadas negativamente nas membranas de organismos patogénicos. Relatam também inúmeros relatórios que comprovam a existência desta atividade em bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella*, entre outros) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Lactococcus sp.*). Para além de péptidos originados de hidrolisados de proteína de pescado, também se pode obter através do leite, ovo, entre outros.

5. CONCLUSÃO

Este estudo confirmou o potencial da aplicação da hidrólise enzimática na valorização dos excedentes das indústrias conserveiras. Foram produzidos hidrolisados de proteína a partir de subprodutos de sardinha com propriedades que indicam o seu potencial de aplicação na indústria alimentar:

- Os hidrolisados líquidos de subprodutos de sardinha produzidos neste trabalho apresentaram capacidades de redução do radical DPPH entre 10 e 50%;
- A aplicação dos hidrolisados em pescado resultou, para determinadas condições de hidrólise) numa redução da percentagem de perda de água após armazenamento refrigerado e congelado;
- A aplicação dos hidrolisados em salmão congelado reduziu a alteração global de cor após 3 semanas de congelamento;
- Foi observada uma capacidade de emulsificação em azeite e óleo comparável à do caseinato de sódio na maioria das amostras testadas;
- As amostras produzidas na ausência de Neutrase®, aos tempos de 0 e 20 minutos formaram emulsões estáveis com azeite e óleo;

O rendimento global de recuperação de proteína no processo de hidrólise foi de 10%. Uma vez que a obtenção de produtos estáveis será um fator determinante na aplicação dos hidrolisados como aditivos alimentares, foi incluído processo um passo de secagem por *spray drying* que resultou em perdas de 50% de proteína. Uma otimização das condições de secagem será essencial para um aumento do rendimento deste passo e para a minimização das alterações induzidas pela temperatura nas propriedades do hidrolisado em pó.

O rendimento de recuperação de proteína da hidrólise enzimática foi de 21.8%. O rendimento de recuperação de proteína não foi sido significativamente alterado pela adição de Neutrase®, no entanto o aumento do grau de hidrólise nas amostras

produzidas na presença de Neutrase® é indicador da ação proteolítica da enzima adicionada. Estas observações indicam que a hidrólise ocorreu em proteína solubilizada no meio e não na proteína presente nos materiais sólidos e sugerem que o aumento do rendimento de recuperação de proteína da hidrólise enzimática passará pela promoção de melhores.

6. PERSPETIVAS FUTURAS

Após este trabalho, e com as conclusões retiradas do mesmo, pode-se sugerir o seguinte trabalho no futuro:

- Poderá ser utilizado um biorreactor com agitação mecânica, de forma a garantir um elevado grau de mistura entre a fase líquida e os subprodutos durante o processo de hidrólise;
- Pesquisar as características nutricionais, físico-químicas e biológicas do material que ficou no crivo durante o processo de hidrólise;
- Investigar o efeito de tempos de hidrólise mais prolongados: 120 minutos, 160 minutos e 360 minutos (Batista e colaboradores 2009);
- Investigar a utilização de outra enzima, como por exemplo, uma Alcalase®. Esta enzima tem demonstrado uma melhor capacidade de solubilização de proteína que a utilizada neste trabalho (Batista e colaboradores 2009, e Shahidi e colaboradores 1995);
- Determinação do tamanho molecular dos péptidos e polipéptidos existentes nos hidrolisados através de SDS-PAGE (Lian e colaboradores 2005), de modo a relacionar as propriedades analisados com o tamanho das frações presentes nos hidrolisados
- Avaliação do potencial dos hidrolisados de sardinha como agentes antiproliferativos em linhas celulares de cancro de mama e do cólon (Picot e colaboradores 2006, e Samaranayaka e colaboradores 2010);
- Avaliação da bioatividade dos hidrolisados de sardinha no decréscimo dos índices de colesterol e valores de HDL no fígado de ratos (Wergedahl e colaboradores 2004);
- Investigação sobre o efeito hipotensor e imunoestimulante dos hidrolisados de sardinha (Batista e colaboradores 2009, e Geirsdottir e colaboradores 2011).

7. BIBLIOGRAFIA

Sites eletrônicos:

Google Maps, 2008. Acedido através do endereço <http://www.google.com/earth/index.html>, no dia 10 de Fevereiro de 2011

Froese, R. and D. Pauly, Editors. 2000. FishBase 2000: concepts, design and data sources. ICLARM, no website <http://www.fishbase.org/>, acedido no dia 20 de Novembro de 2010

Artigos:

Abdul-Hamid A., Bakar J., Bee G.H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Food Chemistry 78: 69–74.

Adler-Nissen J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. J. Agric. Food Chem. Vol. 27, No. 6, 1256–1262.

Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M, Nunes M.L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry 45: 18–24.

Batista I., Ramos C., Mendonça R., Nunes M.L. (2009). Enzymatic Hydrolysis of Sardine (*Sardina pilchardus*) By-products and Lipid Recovery Journal of Aquatic Food Product Technology, 18:120–134.

Bernardini R. D., Harnedy P., Bolton D., Kerry J., O'Neill E., Mullen A. M., Hayes M. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. Food Chemistry 124: 1296-1307.

Bhaskar N., Mahendrakar N.S. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of *Catla* (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. Bioresource Technology 99: 4105–4111.

Bochi V.C., Weber J., Ribeiro C.P., Victório A.M., Emanuelli T. (2008). Fishburgers with silver catfish (*Rhamdia quelen*) filleting residue. Bioresource Technology 99: 8844–8849.

Centenaro G.S., Prentice-Hernández C., Salas-Mellado M., Netto F.M. (2009). Efeito da Concentração de Enzima e de Substrato no Grau De Hidrólise e Nas Propriedades Funcionais de Hidrolisados Proteicos de Corvina (*Micropogonias furnieri*). Quim. Nova Vol. 32, No. 7, 1792-1798.

Chalamaiah M., Rao G.N., Rao D.G., Jyothirmayi T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties Food Chemistry Vol.120, Issue 3, 652-657.

Chegini G.R., Ghobadian B. (2007). Spray Dryer Parameters for Fruit Juice Drying World Journal of Agricultural Sciences 3: 230-236.

Cheung I.W.Y., Liceaga A.M., Li-Chan E.C.Y. (2009). Pacific Hake (*Merluccius Productus*) Hydrolysates as Cryoprotective Agents in Frozen Pacific Cod Fillet Mince. Journal Of Food Science Vol.74, Nr.8, 588-594.

Chien P-J., Sheu F., Yang F-H. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. Journal of Food Engineering 78: 225–229.

- Contreras M.M., Sevilla M.A., Monroy-Ruiz J., Amigo L., Gómez-Sala B., Molina E., Ramos M., Recio I. (2011). Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *International Dairy Journal* 21: 470e476.
- Daniells S. (2008). Fish protein hydrolysates beat alternatives for foods. *Food Chemistry* Vol. 109, Issue 4, Pages 782-789.
- Furlan E.F., Oetterer M. (2002) Fish Protein Hydrolysed. *Revista de Ciência e Tecnologia* Vol. 10, Nº19, 79-89.
- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J., Parmentier M. (2004). Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *Journal Of Food Science* Vol. 69, Nr. 8, 615-622.
- Geirsdottir M., Sigurgisladottir S., Hamaguchi P.Y., Thorkelsson G., Johannsson R., Kristinsson H.G., Kristjansson M.M. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*); Functional and Bioactive Properties. *Journal of Food Science* Vol. 76, Nr. 1, 14-20.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* Vol.40, Issue 9, 1107-1121.
- Jain D., Pathare P.B., Manikantan M.R. (2007). Evaluation of texture parameters of Rohu fish (*Labeo rohita*) during iced storage. *Journal of Food Engineering* 81: 336–340.
- Kim S-K., Mendis E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International* 39: 383–393.
- Kristinsson H.G., Rasco B.A. (2000). Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmosalar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Agric. Food Chem.* 48: 657-666.
- Kristinsson H.G., Rasco B.A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 43–81.
- Lian P.Z., Lee C.M., Park E. (2005). Characterization of Squid-Processing Byproduct Hydrolysate and Its Potential as Aquaculture Feed Ingredient. *J. Agric.Food Chem.* 53: 5587-5592.
- Liceaga-Gesualdo A.M., Li-Chan E.C.Y. (1999). Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal Of Food Science* Vol.64, No. 6, 1000-1004.
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H., Shahidi F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry* 124: 1354–1362.
- Nannipieri P., Eldor P. (2009). The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components *Soil. Biology & Biochemistry* 41: 2357–2369.
- Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal OF Food Science* Vol. 66, No. 5, 642-646.
- Pacheco-Aguilar R., Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suárez J.C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry* 109: 782–789.
- Padilha M.E.S., Ruiz W.A. (2007). Enzymatic hydrolysis of the fish oil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27: 285-290.
- Pellegrinia A., Hulsmeierb A.J., Hunziker P., Thomasa U. (2004). Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1672 76– 85.

Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G., Berge J.P., Guérard F., Chabeaud A., Piot J.M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry* 41: 1217–1222.

Rajanbabu V., Chen J.-Y. (2010). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* 42: 415-425.

Ravallec-Plé R., Charlot C., Pires C., Braga V., Batista I., Wormhoudt A.V., Le Gal Y., Fouchereau-Péron M. (2001). The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine *Sardina pilchardus*. *Journal Sci food Agric.* 81: 1120-1125.

Salampessy J., Phillips M., Seneweera S., Kailasapathy K. (2010). Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia sp.*) insoluble proteins. *Food Chemistry* 120: 556–560.

Samaranayaka A.G.P., Kitts D.D., Li-Chan E.C.Y. (2010). Antioxidative and Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) Fish Protein Hydrolysate Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion and Caco-2 Cell Permeation. *J. Agric. Food Chem.* 58: 1535–1542.

Samaranayaka A.G.P., Li-Chan E.C.Y. (2008). Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*) *Food Chemistry* 107 768–776.

Shahidi F., Han X.-Q., Synowiecki J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53: 285-293.

Slizyte R., Dauksasa E., Falcha E., Storrøa I., Rustad T. (2005) Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry* 40: 2021–2033.

Slizyte R., Mozuraityte R., Martínez-Alvarez O., Falch E., Fouchereau-Peron M., Rustad T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones *Process Biochemistry* 44: 668–677.

Valente A.M., Alexandre V.M., Cammarota M.C., Freire D.M.G. (2010). Enzymatic hydrolysis of fat from fish industry effluents aimed at increasing methane production. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30: 483-488.

Villadiego A.M.D., Soares N.F.F., Andrade N.J., Puschmann R., Minim V.P.R., Cruz R. (2005) Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. *Revista Ceres* 52: 221-244.

Wergedahl H., Liaset B., Gudbradsen O.A., Lied E., Espe M., e Muna Z. (2004) Fish protein hydrolysate reduces plasma cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol and lowers acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *Journal of Nutrition* 134,.....<-

8. ANEXOS

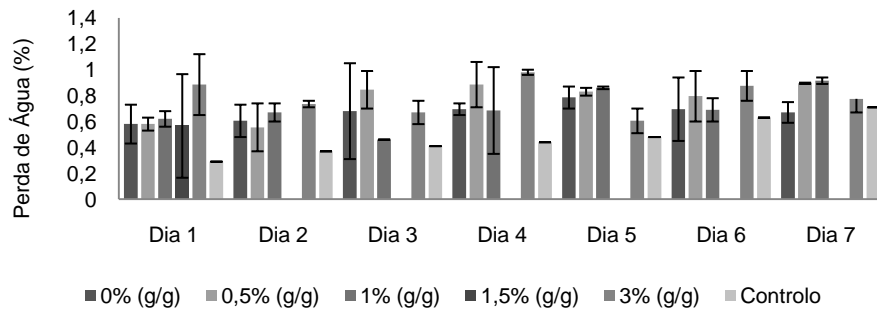


Figura 8.1. – Representação gráfica da percentagem de perda de água, no salmão fresco, durante 7 dias. (n=4, média +/- erro padrão).

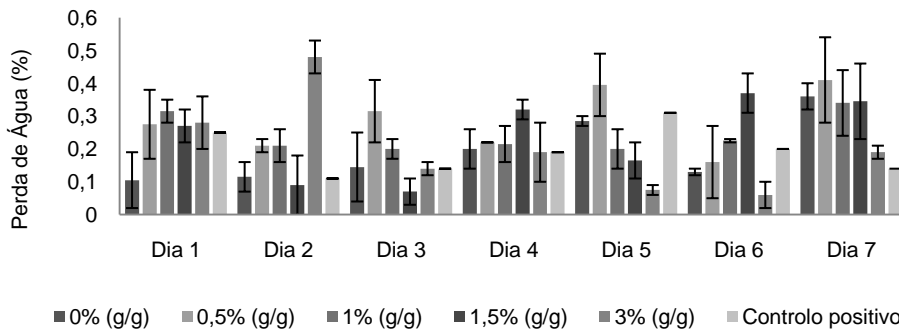


Figura 8.2. – Representação gráfica da percentagem de perda de água, na pescada fresco, durante 7 dias. (n=4, média +/- erro padrão).