

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Enquadramento do tema

Devido à sua localização geográfica, junto ao Oceano Atlântico, e ao facto do mar ser parte integrante da sua identidade, cultura e tradições, Portugal tem um dos mais elevados consumos de produtos da pesca e aquacultura da Europa, situando-se em mais de 55 Kg/ano por habitante (Ratola, 2012).

Este grande consumo de produtos da pesca traz, além das diversas vantagens para os consumidores, ao nível nutricional, algumas desvantagens, tais como: a sobre-exploração dos recursos pesqueiros; um elevado volume de rejeições a bordo; intensos impactes ambientais, que ocorrem desde a captura até ao consumidor; grandes quantidades de subprodutos gerados nas cadeias de produção. É de salientar que cerca de 10-30% do pescado capturado é rejeitado a bordo e que as retiradas em lota representam, aproximadamente 6% das capturas efectuadas, sendo estes valores correspondentes a uma estimativa anual de 6000 t (Figura 1.1).

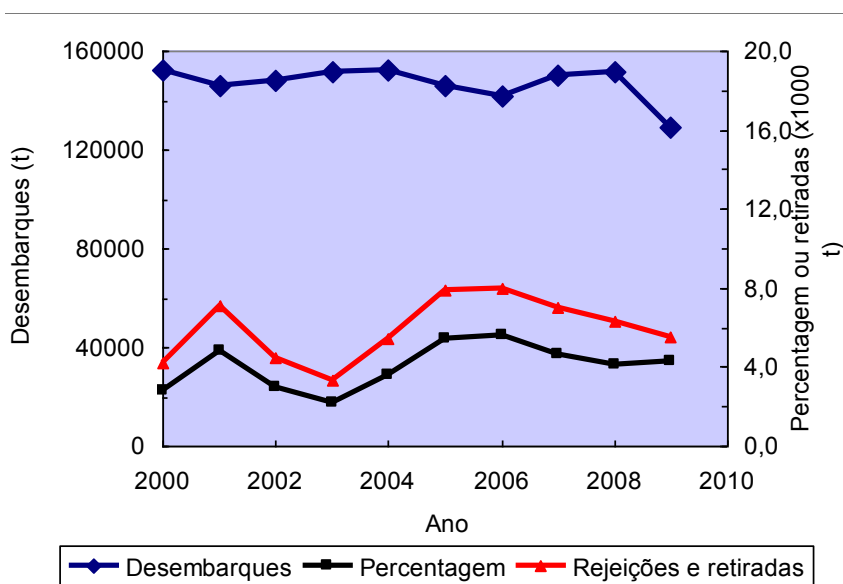


Figura 1.1 - Estimativa anual de quantidades de pescado desembarcado correspondente a rejeições e retiradas, em toneladas e percentagem (INE, 2013)

Ao nível das indústrias, as quantidades de subprodutos provenientes das linhas de produção, são também elevadas: nas indústrias conserveiras apenas 60% da matéria-

prima incorpora o produto final, sendo os restantes 40% subprodutos. Nas indústrias de congelados este valor é de 10-50% (INE, 2013).

Atendendo às elevadas quantidades de pescado considerado sem qualquer valor, ao aumento drástico da população mundial e aos totais de captura estarem cada vez mais próximos do limite sustentável, é cada vez mais necessário utilizar, de forma inteligente e consciente, os recursos marinhos (Kristinsson e Rasco, 2000b), e criar e desenvolver medidas e processos de valorização destes produtos.

A biomassa proveniente de rejeições, as retiradas e os subprodutos são essencialmente constituídos por espécies sem qualquer valor comercial, subaproveitadas, deterioradas e/ou rejeitadas, que não têm o tamanho mínimo de captura permitido, e partes que não são utilizadas para consumo e/ou que não têm qualquer outra finalidade: cabeças, espinhas, pele, escamas, vísceras.

Actualmente, o principal destino dos subprodutos das indústrias de transformação de pescado, além da sua reposição ao mar, é a reciclagem em produtos de baixo valor acrescentado, como a incorporação em rações animais, através da produção de farinhas e óleos de peixe. A maioria dos subprodutos são considerados desperdício, não sendo dado qualquer outro uso de forma a tirar melhor proveito deles (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Várias alternativas andam a ser estudadas de forma a dar uma melhor utilização a estes resíduos, visto serem de grande potencial. No entanto, para a indústria desenvolver processos de recuperação, a utilização dos subprodutos tem de ser economicamente mais viável do que descartá-los (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Através da aplicação da tecnologia enzimática para a recuperação de proteína no processamento do pescado, é possível obter um amplo campo de ingredientes alimentares ou produtos industriais para uma vasta gama de aplicações. Este processo pode aplicar-se a subprodutos de pescado, materiais secundários (resíduos) provenientes das cadeias de produção e espécies subvalorizadas que, de outra forma, seriam descartadas (Kristinsson e Rasco, 2000b).

A hidrólise proteica, obtida através da adição de enzimas, origina produtos com elevado valor nutritivo e várias funcionalidades (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Além da recuperação proteica, a hidrólise enzimática pode ser também utilizada para a recuperação de lípidos e fosfolípidos (Daukšas, *et al.*, 2005).

Os hidrolisados proteicos de pescado (HPP) têm, na sua composição, um elevado conteúdo de aminoácidos essenciais, minerais importantes, um perfil único de ácidos gordos e várias outras moléculas que podem ter diversas aplicações (Shan, *et al.*, 2013).

O ambiente marinho representa uma fonte rica de proteínas e compostos bioactivos. Muitos dos recursos que fazem parte deste meio, estão ainda inexplorados. No entanto, podem ser uma mais valia para a nova geração de compostos bioactivos, que podem ser aplicados, além de na indústria alimentar, também na indústria farmacêutica (Shan, *et al.*, 2013).

A nível laboratorial têm sido testadas várias das propriedades biológicas dos HPP (Batista, *et al.*, 2009):

- Hipotensivas;
- Reguladoras da actividade hormonal;
- Antioxidantes;
- Estimulantes de crescimento;
- Antiproliferativas de células cancerosas;
- Imunoestimulantes.

A introdução de hidrolisados proteicos nos alimentos, irá facilitar a intervenção do organismo quando este necessitar destes constituintes, uma vez que estes já os fornecem na forma simplificada (Slizyté, *et al.*, 2005).

Também ao nível da sua introdução na alimentação animal, verifica-se que os hidrolisados estimulam o consumo da ração (uma vez que exercem um efeito atractivo, melhoram o sabor e as propriedades físicas desta), apresentam elevada digestibilidade e permitem uma boa utilização da ração para o crescimento (uma vez que aumentam o seu valor nutricional), nomeadamente aquando da sua incorporação em rações para peixes (Batista, *et al.*, 2009).

Uma outra utilização dos HPP é em meios de cultura bacterianos, para a produção de biomassa e metabolitos, visto serem uma fonte de azoto, elemento indispensável para o desenvolvimento bacteriano (Batista, *et al.*, 2009).

1.2. Área de estudo

Peniche e o respectivo concelho localizam-se na faixa costeira ocidental de Portugal continental (Figura 1.2 A). Tem uma área de aproximadamente 77,7 Km², tendo uma componente continental e outra insular, denominada de Arquipélago das Berlengas, da qual fazem parte a Berlenga grande, as Estelas e os Farilhões. O concelho de Peniche é limitado a nordeste pelo concelho de Óbidos e a sul pelo concelho da Lourinhã.

Os subprodutos utilizados na elaboração deste trabalho foram cedidos pela Indústria Conserveira Ramirez & C^a (Filhos), S.A. (Figura 1.2 B), situada em Peniche (Coordenadas geográficas: 39°21'43.77"N e 9°22'48.43"O). Esta empresa é a mais antiga conserveira do mundo em laboração (fundada em 1853) e produz uma imensa variedade de enlatados, tanto de pescado (essencialmente: atum, cavala e sardinha; mas também: bacalhau, pota, lulas e mexilhão), como de legumes, com um vasto mercado nacional e internacional, sendo das Indústrias mais prestigiadas do mundo.

A Ramirez & C^a (Filhos), S.A. encaminha os subprodutos resultantes das suas linhas de produção, para uma Fabrica de recepção de subprodutos de peixe e produção de Farinhas e Óleos de Peixe, a Empresa Narciso Dias & Filhos, Lda (Figura 1.2 C), localizada junto ao Porto de Pesca de Peniche (39°21'13.14"N e 9°21'53.46"O).



Figura 1.2 - Localização espacial da Península de Peniche (A), da Indústria Conserveira (B) e da Fábrica de Farinha e Óleo de Peixe (©Google Earth, 2009).

1.3. Espécie utilizada: Cavala (*Scomber colias*)

Scomber colias (Gmelin, 1789) é uma espécie pelágica que se encontra em águas temperadas, sobre a plataforma continental, preferindo profundidades entre os 0 e os 300 metros, distribuindo-se pelo Oceano Atlântico. Anteriormente a Cavala designava-se como *Scomber japonicus*, no entanto, chegou-se à conclusão que as populações de cavala do Oceano Atlântico são distintas das do Oceano Pacífico, daí a diferença na designação da espécie. Tem o corpo alongado e fusiforme, cabeça cónica, ligeiramente comprimida nos lados, focinho pontiagudo e boca grande. As barbatanas são pouco desenvolvidas. A cor varia desde o dorso, entre tonalidades azuladas e esverdeadas e o ventre é prateado. Podem atingir até 64 cm, sendo o mais comum os 30 cm. A sua época reprodutiva é entre os meses de Fevereiro e Abril e vivem normalmente em cardumes, encontrando-se perto da superfície (Fishbase, 2013).

Caracterizam-se por serem peixes de forte impulso, devido à existência de uma barbatana caudal bifurcada (ACOPE, 2012).

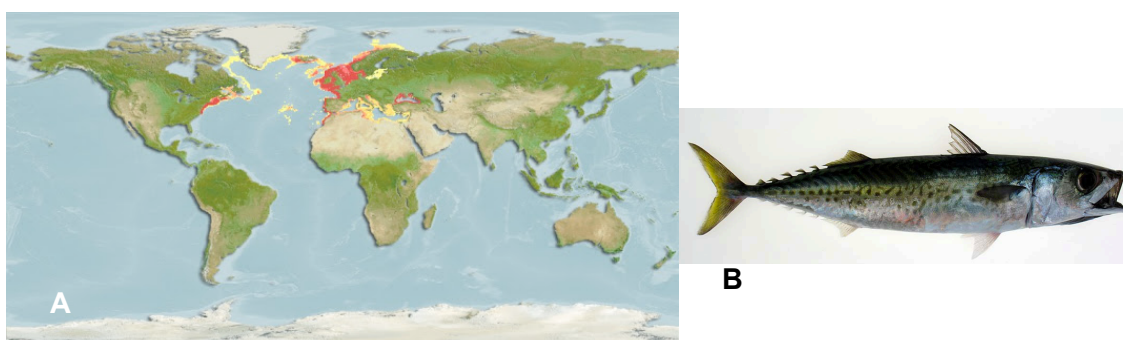


Figura 1.3 – (A) Distribuição geográfica da espécie *Scomber colias* (Fishbase, 2013); (B) Exemplar da espécie (Lord, 2008).

Nutricionalmente são peixes ricos em ómega-3, ácidos gordos cujo consumo regular tem sido relacionado com a prevenção do aparecimento de doenças cardiovasculares, redução do colesterol e o crescimento de células cancerígenas. Contém um elevado teor de gordura, que é variável consoante a época de captura, podendo oscilar entre os 5 e os 10%. Alimento baixo em calorias e rico em vitaminas e sais minerais, contém proteínas com diversos aminoácidos essenciais ao organismo (ACOPE, 2012).

VALORES POR 100 G DE PARTE EDÍVEL													
Peixes	Energia (Kcal)	Água (g)	Proteína (g)	Gordura total (g)	Ácidos gordos polinsaturados (g)	Vitamina A (µg)	Vitamina D (µg)	Vitamina B12 (µg)	Potássio (mg)	Cálcio (mg)	Fósforo (µg)	Ferro (mg)	Zinco (mg)
➤ Abrótea	70	81,5	17,2	0,1	0,0	1	0,4	0,4	358	11	229	0,2	0,5
➤ Atúm	140	68,7	24,1	4,9	0,8	11	4,2	2,4	355	4	257	2,2	1,5
➤ Bacalhau (seco, salgado e demoldado)	80	76,2	19,0	0,4	0,1	4	4,5	1,0	36	33	116	0,2	0,8
➤ Cação	82	79,0	20,0	0,2	0,1	3	0,4	3,3	294	14	186	0,1	0,3
➤ Carapau	105	75,6	19,7	2,9	0,9	15	4,1	5,7	403	69	263	1,2	1,2
➤ Cavala	202	64,3	20,3	13,4	4,7	28	2,4	14,0	360	39	282	1,1	2,2
➤ Corvina	94	76,7	20,4	1,4	0,2	1	16,0	0,3	430	13	233	0,3	0,5
➤ Dourada	167	68,9	19,7	9,8	2,8	11	12,0	4,8	383	15	252	0,4	0,8

Figura 1.4 – Valores nutricionais da Cavala, por 100 g de Parte Edível (adaptado de ACOPE, 2012).

Com um potencial pouco explorado até há alguns anos, as capturas de cavala têm vindo a aumentar significativamente. Segundo dados do INE (2013), as capturas de *S. colias* subiram 64% entre os anos de 2010 e 2012, o que revela a crescente valorização que tem sido feita, desta espécie. Só no ano 2012 foram capturados 37.113 Kg de cavala.

Além do seu elevado valor nutricional e das vantagens associadas ao seu consumo, a Cavala é um recurso pesqueiro de grande abundância na Costa portuguesa (pelo que ainda não apresenta restrições ao nível da sua captura) e verifica-se atualmente um

crescimento no desenvolvimento de novos mercados para este recurso, consequência das limitações impostas à captura de Sardinha, como a fixação de Totais Admissíveis de Captura (TAC's) e a imposição de épocas de defeso desta mesma espécie, de forma a preservar este recurso, que tem sido ao longo dos anos, alvo de sobrepesca (INE, 2013). O mercado da cavala é, actualmente, o da indústria conserveira, podendo também, a de menor calibre, destinar-se à alimentação de atuns em cativeiro.

A actual tendência de valorização desta espécie resultará num aumento de massa anual de subprodutos, pois quanto maior o consumo, maior será a produção e, consequentemente, maior será a quantidade de resíduos resultantes.

1.4. Produção e caracterização de Hidrolisados Proteicos de Pescado (HPP)

1.4.1. Produção de HPP

Os hidrolisados proteicos podem ser definidos como proteínas que são quimicamente ou enzimaticamente quebradas, originando péptidos de vários tamanhos (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Os hidrolisados proteicos são produzidos para uma ampla variedade de utilizações na indústria alimentar, incluindo substitutos do leite, suplementos proteicos, estabilizantes em bebidas e intensificadores de sabor utilizados na confecção de produtos (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Os Hidrolisados Proteicos de Pescado resultam da quebra das ligações peptídicas por via química ou enzimática, com a adição de uma molécula de água. Os aminoácidos, unidades constituintes das proteínas, estão unidos através de ligações peptídicas que ao serem fragmentadas, quer em maior quer em menor extensão, originam aminoácidos e péptidos (fragmentos que apresentam dois ou mais aminoácidos na sua constituição) de diferentes tamanhos (Batista, *et al.*, 2006).

Os processos de hidrólise mais utilizados a nível industrial são os químicos (tanto ácidos como básicos), sendo a sua maior desvantagem a formação de compostos tóxicos ou provocar alterações estruturais ao nível dos aminoácidos.

Desta forma, a hidrólise enzimática é uma das mais promissoras na valorização dos subprodutos, na medida em que é menos drástica; permite recuperar o valor nutricional e funcional das proteínas presentes; e não provoca alterações negativas nos aminoácidos nem leva à formação de compostos tóxicos (Batista, *et al.*, 2006).

Na figura 1.5 é possível visualizar um esquema de produção de hidrolisados proteicos de pescado, pelo método enzimático, a partir de subprodutos.

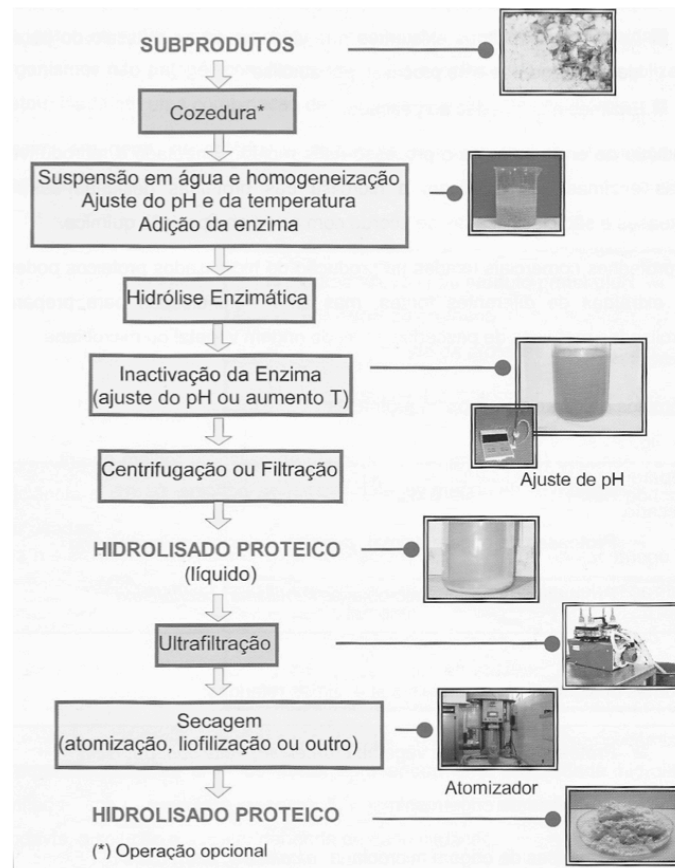


Figura 1.5 – Esquema geral de preparação de hidrolisados proteicos (retirado de Batista, *et al.*, 2006).

As ligações proteicas são quebradas por enzimas (além da adição de água) que podem ser as endógenas, isto é, as existentes nas vísceras e músculo do peixe (denominando-se este processo por autólise) ou enzimas adicionadas ao pescado.

O processo de autólise é de difícil controlo uma vez que a presença de algumas enzimas digestivas bem como a sua concentração é variável consoante a estação do ano, a idade e o sexo do pescado, e é bastante diferente entre espécies (Aspmo *et al.*, 2005). As enzimas endógenas formam complexos enzimáticos com diferentes requisitos e atividades, que originam produtos com diferentes perfis moleculares, sendo os estudos

feitos com HPP obtidos por ação destas enzimas, no que respeita à sua aplicação na alimentação humana, ainda muito limitados (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Para produzir hidrolisados proteicos com características funcionais e propriedades específicas é necessário ter controlo sobre o processo. A adição de enzimas exógenas permitem que se conheçam as propriedades funcionais dos hidrolisados, factor fundamental para avaliar se podem ser incluídos em alimentos formulados (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Esta adição vai acelerar o processo de hidrólise, tornando-o controlado e reproduzível. As enzimas que catalisam a hidrólise designam-se por proteases e apresentam a sua classificação de acordo com a sua composição química (Batista, *et al.*, 2006).

Existem proteases de origem vegetal, animal e microbiana sendo que, as que são utilizadas na preparação de hidrolisados proteicos são as de origem microbiana pois são as que oferecem uma ampla variedade de actividades catalíticas e têm uma boa estabilidade quer ao nível do pH quer ao nível da temperatura (Diniz e Martin, 1997).

Diferentes enzimas têm actividades específicas diferentes bem como diferentes parâmetros óptimos de funcionamento. Assim, originam produtos com diferentes propriedades químicas e funcionais (See, *et al.*, 2011).

Deste modo, segundo Batista, *et al.* (2006), na selecção da enzima indicada, deve ter-se em consideração os seguintes pontos:

- Características do produto pretendido;
- Eficiência da protease;
- Disponibilidade da protease no mercado;
- Preço.

É importante salientar que, uma vez que este processo envolve enzimas, factores como pH, temperatura e razão enzima/substrato vão influenciar a actividade enzimática.

Neste estudo, utilizaram-se duas enzimas de origem microbiana, ambas aptas para aplicações alimentares: a Neutrase® 0,8L e a Alcalase® 2,4L. A primeira é uma endoprotease de *Bacillus amyloliquefaciens* que pode ser utilizada sempre que se pretende uma quebra mais moderada e extensiva das ligações peptídicas. As suas

condições óptimas de funcionamento são num intervalo de pH 5.5 – 7.5 e num intervalo de temperatura 45 – 55°C (Slizytė, *et al.*, 2005). A segunda é uma protéase de *Bacillus licheniformis* com grande habilidade para solubilizar proteínas de pescado. Pode ser utilizada sempre que se pretende uma clivagem peptídica mais agressiva. As suas condições óptimas de pH variam entre 8 e 10 e de temperatura entre os 50 – 70°C. O facto de o seu funcionamento óptimo ser em valores de pH elevados pode ser um factor positivo uma vez que reduz o risco de contaminação microbiana (See, *et al.*, 2011).

As condições utilizadas no processo de hidrólise diferem do tipo de substrato e das enzimas utilizadas e também dependem do que se pretende obter (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Consoante as condições de hidrólise utilizadas, o tamanho dos péptidos formados e a intensidade da quebra das ligações, os hidrolisados podem apresentar características e propriedades completamente diferentes (Chalamaiah, *et al.*, 2010).

Quando se pretende terminar o processo de hidrólise deve inactivar-se (por aquecimento ou via química) a enzima para que a hidrólise das proteínas não prossiga, sendo a temperatura, normalmente, entre 75 e 100°C, durante 5 a 30 minutos, dependendo da estabilidade da enzima. Posteriormente, procede-se à separação do material hidrolisado solubilizado (por centrifugação ou filtração) das proteínas não digeridas, por centrifugação ou filtração (Batista, *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática permite também a recuperação de lípidos e fosfolípidos desta biomassa descartada. Estes ficam retidos na fracção insolúvel do hidrolisado, formando uma camada de gordura à superfície ou formando uma emulsão com a parte solúvel deste. O rendimento associado à formação desta fracção varia consoante a enzima utilizada no processo e o tempo de exposição da mesma (Batista, *et al.*, 2009).

1.4.2. Caracterização de HPP

Os HPP apresentam na sua constituição uma grande variedade e quantidade de péptidos sendo que a sua distribuição (baseada nas suas massas moleculares) depende da enzima utilizada e do tempo de hidrólise e pode ser caracterizada a partir de técnicas cromatográficas (Batista *et al.*, 2006).

Relativamente à sua composição química, depende da matéria-prima e da técnica que lhes deu origem. Sathivel, *et al.* (2003) realizaram um estudo com hidrolisados proteicos obtidos a partir de subprodutos de Arenque (espécie semelhante à utilizada neste trabalho), por ação da Alcalase, tendo obtido os resultados presentes na tabela 1.1., relativamente à composição química aproximada dos subprodutos que deram origem aos HPP produzidos.

Tabela 1.1 – Composição aproximada de subprodutos de Arenque (*Clupea harengus*). Valores apresentam-se na forma de Média \pm Desvio-padrão.

Parâmetro analítico	Composição (%)
Proteína	16,9 \pm 0,5
Gordura	6,6 \pm 0,7
Humidade	74,4 \pm 0,1
Cinzas	2,0 \pm 0,2

Segundo Batista, *et al.* (2006), os hidrolisados proteicos de pescado geralmente apresentam a composição representada na tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Composição química típica de Hidrolisados Proteicos de Pescado (retirado de Batista *et al.*, 2006).

Humidade (%)	3 – 8
Proteína (%)	70 – 87
Gordura (%)	1 – 23
Cinza (%)	2 – 9
Fósforo (%)	0,4 – 0,8
Cálcio (%)	0,1 – 0,8
Cloretos (%)	2 – 3
Ferro (%)	40 – 50

Os HPP produzidos a partir de subprodutos de espécies como a Cavala (*Scomber austriasicus*), a Sardinha (*Sardina pilchardus*), o Bacalhau (*Gadus morhua*) e o Arenque (*Clupea harengus*) são potenciais ingredientes da indústria alimentar tendo sido reportadas na literatura diversas funcionalidades em diferentes estudos: emulsionantes, estabilizadores de espumas, agentes hipotensores, crioprotectores, antimicrobianos e

antioxidantes (Ravallec-Plé, *et al.*, 2011; Slizyté, *et al.*, 2009; Batista, *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2009). São tipicamente sujeitos a um processo de secagem, formando um pó fino, mas podem também ser comercializados líquidos, destinando-se a aplicações especiais (Batista, *et al.*, 2006).

Os radicais livres formam-se durante o metabolismo do oxigénio, em que cada molécula deste elemento é constituída por átomos que formam uma estrutura estável e electrões desemparelhados, que são altamente reactivos com outras moléculas (Klompong, *et al.*, 2007). Em condições normais, os sistemas endógenos antioxidantes podem eliminar os radicais livres. No entanto, nem sempre isso é possível, o que resulta em danos celulares que levam a doenças como a arterosclerose, artrite, diabetes e cancro (Sarmadi & Ismail, 2010). Existem antioxidantes sintéticos que são utilizados como suplementos, no entanto, constituem um potencial risco para a saúde. Assim, há um grande interesse em encontrar antioxidantes obtidos a partir de recursos naturais que tenham poucos ou nenhuns riscos para a saúde (Mendis, *et al.*, 2004).

HPP produzidos a partir de espécies como *Ohnius belengerii* (Mendis, *et al.*, 2004), bacalhau (Guerard and Sumaya-Martinez, 2003) e cavala (Wu, *et al.*, 2003) demonstraram ter propriedades antioxidantes mais elevadas do que os utilizados normalmente, produzidos de forma sintética. A hidrólise enzimática quebra a estrutura proteica fazendo com que os aminoácidos estejam mais expostos, o que conduz a uma melhor capacidade antioxidativa, em comparação com a proteína intacta (Sarmadi and Ismail, 2010). Assim, a actividade antioxidante dos HPP depende das proteases (Jun, *et al.*, 2004) e das condições de hidrólise utilizadas (Jao & Ko, 2002; Jun, *et al.*, 2004; Pena-Ramos & Xiong, 2003).

Jun, *et al.* (2004) verificou que hidrolisados proteicos de *Limada áspera*, obtidos a por acção de Pepsina e com baixos valores de grau de hidrólise, tinham uma elevada capacidade antioxidante, comparativamente aos produzidos com outras enzimas como a Alcalase, a Pepsina, a Tripsina e a Neutrase.

Wu, *et al.* (2003) verificou também que, hidrolisados de cavala (*Scomber austriasicus*), produzidos com Protease N, que apresentavam menor GH apresentavam uma elevada actividade antioxidante.

A actividade antioxidante dos HPP pode ser também utilizada para aumentar o tempo de prateleira de produtos alimentares, na medida em que melhora a estabilidade lipídica e retarda a descoloração e deterioração resultante da oxidação (Herpandi, *et al.*, 2011).

Os HPP podem também apresentar actividade anti-hipertensiva. Hosomi, *et al.* (2012) compararam a actividade anti-hipertensiva dos hidrolisados de proteína de paloco do alaska (*Theragra Chalcogramma*), obtidos por acção da Papaína, e concluíram que estes podem proporcionar melhores benefícios para a saúde como a diminuição do teor de colesterol no sangue, prevenindo o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Picot, *et al.* (2006) estudaram também a atividade anti-proliferativa de hidrolisados proteicos obtidos, por acção de Protamex e Alcalase, a partir de várias espécies de pescado: bacalhau (*Gadus morhua*), salmão (*Salmo salar*), solha (*Pleuronectes platessa*), verdinho (*Micromesistius poutassou*), bica (*Lethrinus atlanticus*), paloco (*Pollachius pollachius*) e carocho (*Centroscymnus coelolepis*), em linhas celulares de cancro de mama humano, e observaram que os hidrolisados obtidos foram identificados como inibidores de crescimento nas duas linhas celulares de cancro utilizados no estudo.

A evolução do processo de hidrólise pode ser seguida através do Grau de Hidrólise (GH). Este indica a relação entre a percentagem de ligações peptídicas clivadas e o número inicial de ligações, sendo um dos parâmetros que influencia as propriedades dos hidrolisados e precisa de ser controlado durante a hidrólise proteica pois várias propriedades dos hidrolisados estão relacionadas com ele. Quanto maior for o grau de hidrólise, maior é a ruptura de ligações peptídicas e, conseqüentemente, maior é a formação de aminoácidos livres e péptidos de cadeia curta (Batista, *et al.*, 2006).

Para monitorizar o grau de hidrólise (GH) têm sido descritos vários métodos na literatura, como: pH-stat, osmometria, azoto dissolvido e o método de trinitro-benzeno-sulfónico (TNBS). Este último baseia-se numa reacção de grupos amina primários com reagente TNBS. No entanto, por este ser um método bastante trabalhoso e com o qual não se obtinham rapidamente resultados, e o reagente TNBS ser instável e tóxico, Nielsen *et al.* (2001), criaram uma alternativa: de forma a utilizar um método sustentável, o reagente TNBS foi substituído pelo *o-phthalaldehyde* (OPA), e o beta-mercaptoetanol pelo dithiothreitol (DTT). Neste novo método utiliza-se a serina como padrão, uma vez que a serina apresenta uma reacção muito próxima da resposta dos aminoácidos.

Este método baseia-se no facto de os grupos α -amino libertados por hidrólise reagirem com o OPA e ditioneitol (DTT), para formar um composto, detectável por análise espectrofotométrica, que absorve fortemente a 340 nm (Khiari, 2010).

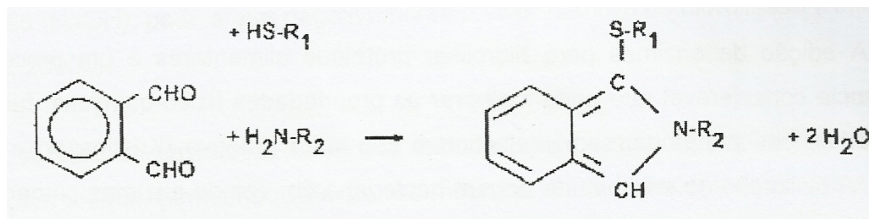


Figura 1.6 – Reacção OPA. O reagente OPA reage com o primeiro grupo de aminoácidos e com o grupo do composto SH (ditiotreitolo, DTT) formando um composto que absorve radiação a 340 nm (retirado de Nielsen *et al.*, 2001).

Para determinar o grau de hidrólise através deste método é também necessário ter em consideração as constantes, representados na tabela 1.2.

Através do estudo de Nielsen *et al.* (2001) verificou-se também que a solubilidade dos hidrolisados tem com o grau de hidrólise uma relação de proporcionalidade direta, isto é, quanto maior for o GH, maior a solubilidade e vice-versa.

Tabela 1.3 – Valores das constantes α , β e h_{tot} para as diferentes matérias-primas que contém proteínas (retirado de Nielsen, *et al.*, 2001).

Proteína	α	β	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

* Para as matérias-primas que não constam nesta tabela, assumem-se valores de α e β de 1,000 e 0,400, respectivamente.

1.4.3. Teor de Proteína Bruta – Método de Kjeldahl

As proteínas são polímeros de aminoácidos, pelo que variam de acordo com o tipo, número e sequência destes. Como resultado, têm estruturas moleculares, características nutricionais e propriedades físico-químicas diferentes.

São componentes importantes dos alimentos, uma vez que são uma importante fonte de energia, e de aminoácidos, essenciais para a saúde humana, que o organismo não consegue sintetizar.

O método padrão para a determinação da quantidade de proteína contida num alimento é o Método de Kjeldahl. O alimento é digerido com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) de modo a haver libertação de azoto que pode, numa segunda fase do processo, ser determinada por titulação com HCl. A quantidade de proteína presente é então calculada a partir da concentração de azoto libertada (Persson *et al.*, 2008).

Para se obter a percentagem de proteína na amostra é necessário um factor de correlação “F” para converter a concentração de azoto numa concentração de proteína. Cada proteína tem o seu factor de conversão específico, dependendo da sua composição de aminoácidos (Tabela 1.3). Assim, multiplica-se o factor pelo valor total de N obtido.

Tabela 1.4 – Factores de correlação “F” para as várias amostras de produtos alimentares (retirado de Park e Antonio, 2006).

Produto	Factor F
Geral	N x 6,25
Gelatina	N x 5,55
Ovos	N x 6,68
Produtos lácteos	N x 6,38
Soja	N x 6,00
Farinha trigo	N x 5,70
Arroz	N x 5,95
Carnes	N x 6,25

Este método divide-se, então, em três passos: a digestão ácida, a destilação e titulação.

A amostra a ser analisada é digerida por aquecimento na presença de ácido sulfúrico. Este aquecimento é feito em duas fases: primeiro a 200°C durante 30 minutos e depois aumenta-se a temperatura para os 400°C durante 90 minutos. Na digestão o azoto contido no alimento é convertido em amoníaco, e a matéria orgânica em CO_2 e H_2O (Persson *et al.*, 2008).

Após a digestão procede-se à destilação. Nesta fase, a solução torna-se alcalina, pela adição de hidróxido de sódio (NaOH), que converte o sulfato de amónia em amoníaco

gasoso. O destilado é recolhido num erlenmeyer contendo Ácido Bórico (Persson *et al.*, 2008).

O teor de azoto é então determinado através da titulação, com ácido clorídrico, da solução formada, uma vez que concentração de iões H^+ necessários para atingir o ponto final é equivalente à concentração de azoto que estava no alimento (Persson *et al.*, 2008).

1.4.4. Teor de Gordura – Método Bligh & Dyer

Os lípidos são um dos principais constituintes dos alimentos e são importantes por inúmeras razões. São uma das maiores fontes de energia e fornecem nutrientes lipídicos essenciais ao organismo. No entanto, um consumo excessivo de alimentos com determinados componentes lipídicos pode ser prejudicial, em especial no caso das gorduras saturadas. Os lípidos são solúveis em solventes orgânicos, como o éter, o clorofórmio ou o hexano, mas insolúveis em água (McClements, 2005).

Em muitos alimentos, o teor lipídico desempenha um papel importante na determinação das suas características gerais, como: a textura, o sabor e a aparência. Por esta razão é difícil desenvolver alternativas de baixo teor de gordura, pois se esta for removida algumas das características físicas do alimento perdem-se. No entanto, muitas gorduras são propensas à oxidação lipídica, o que resulta na formação de sabores desagradáveis (McClements, 2005).

Um dos mais recomendados métodos de determinação de lípidos totais em tecidos biológicos é o Bligh & Dyer, que utiliza a mistura de três solventes: clorofórmio, metanol e água, e baseia-se nas propriedades dos mesmos, isto é, no facto do clorofórmio ser parcialmente miscível em água e do metanol ser totalmente miscível em ambos (Šližytė, *et al.*, 2005).

Neste método, os lípidos são extraídos para a mistura, formando inicialmente um sistema de uma fase. Depois da extração, formam-se duas fases. A fase inferior, que contém a gordura segue para um evaporador rotativo onde se dá a evaporação do solvente, ficando um resíduo sólido (gordura), que será pesado para determinação do teor de gordura (Šližytė, *et al.*, 2005).

Recentemente, a hidrólise enzimática foi introduzida na extração de óleo de peixe, a fim de aumentar o rendimento de extração e para se obter óleos com concentrações mais elevadas de ácidos gordos ómega-3 (Šližytė, *et al.*, 2005).

1.4.5. Teor de Cinzas

A água e os materiais voláteis presentes no alimento, quando sujeitos a aquecimento em mufla, a temperaturas elevadas, são evaporados e a matéria orgânica é queimada, na presença de O₂, H₂O e N₂. A cinza é o resíduo orgânico que resulta deste processo. Os minerais não são destruídos por aquecimento e têm uma baixa volatilidade em comparação com outros constituintes do alimento (McClements, 2005).

O teor de cinzas é a quantidade total de minerais presentes num alimento. A sua determinação, segundo McClements (2005) é importante por diversas razões:

- rotulagem nutricional – o rótulo de um alimento deve conter a concentração e o tipo de minerais presentes;
- qualidade – a qualidade de muitos alimentos depende da concentração e do tipo de sais minerais que contêm, incluindo o seu sabor, aparência, textura e estabilidade;
- estabilidade microbiológica – um elevado teor de minerais retarda, por vezes, o crescimento de determinados microrganismos;
- nutrição – alguns minerais são essenciais para uma dieta saudável (cálcio, fósforo, potássio e sódio, por exemplo), enquanto outros podem ser tóxicos (chumbo, mercúrio, cádmio e alumínio, por exemplo);
- processamento – é importante saber o conteúdo mineral dos alimentos durante o seu processamento pois este afecta as suas propriedades físico-químicas.

1.4.6. Teor de Humidade

A determinação do teor de humidade é um dos parâmetros mais importantes e utilizados na análise alimentar. Está relacionado com a estabilidade, qualidade e composição do alimento e pode afectar várias características do produto (Park e Antonio, 2006):

- Alimentos com elevada humidade deterioram-se mais rapidamente;

- Se o alimento apresentar uma humidade excessiva, a própria embalagem pode favorecer a ocorrência de deterioração;
- A quantidade de água é importante no processamento de vários produtos.

O teor de humidade é um dos factores determinantes na perecibilidade dos alimentos (Park e António, 2006).

O conhecimento do teor de humidade das matérias-primas é fundamental para a conservação e armazenamento, de forma a manter a sua qualidade e no processo de comercialização (Park e Antonio, 2006)

1. OBJECTIVOS

O objectivo deste trabalho foi estabelecer a relação entre o tipo de enzima e a extensão da reacção de hidrólise e as características dos hidrolisados proteicos obtidos a partir de subprodutos do enlatamento de filetes de cavala (*Scomber colias*).

Para tal, pretende-se investigar em termos de rendimento de recuperação de azoto, grau de hidrólise, teor de gordura, teor de cinzas e teor de humidade, hidrolisados produzidos recorrendo a: a) Enzimas endógenas, b) Neutrase[®] 0,8L e c) Alcalase[®] 2,4L, utilizando diferentes tempos de reacção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A produção e as análises que permitiram a caracterização dos hidrolisados proteicos obtidos a partir de subprodutos de cavala, foram realizadas nos laboratórios da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM) do Instituto Politécnico de Leiria.

Os HPP foram produzidos com diferentes condições de hidrólise: foram testados três tempos de reacção (0 minutos, 60 minutos e 120 minutos) e duas enzimas exógenas. As enzimas Neutrase[®] 0,8L e Alcalase[®] 2,4L (provenientes de Novozymes, Bacterial Protease, National Centre of Biotechnology Education – NCBE). Testou-se ainda a actividade das enzimas de degradação do pescado (endógenas) na produção de HPP, não tendo estas sido previamente inactivadas.

A parte experimental deste trabalho realizou-se em três fases: a primeira consistiu na recolha dos subprodutos de cavala; a segunda na produção do HPP; numa terceira fase iniciou-se o processo de caracterização dos HPP produzidos, através da determinação dos seguintes parâmetros:

- Teor de Azoto
- Grau de Hidrólise
- Teor de Gordura Total
- Teor de Cinzas
- Teor de Humidade

2.1. Recolha dos subprodutos de cavala

No dia 7 de Março de 2012 foram recolhidos 5 Kg de resíduos de *Scomber colias* nas instalações da indústria conserveira Ramirez & C^a (Filhos), S. A., em sacos de amostragem. A cavala que lhes deu origem foi submetida a tratamento térmico (cozida em água, a 100°C, em bacines) para posteriormente seguir para a linha de fabrico de filetes. Os subprodutos eram constituídos por espinhas, aparas, músculo e pele, resultantes deste processo.

Após a recolha, os subprodutos foram transportados, à temperatura ambiente, de automóvel, até ao laboratório da ESTM.

2.2. Preparação dos resíduos de *S.colias* para o Processo de Hidrólise

Os resíduos foram triturados (Picadora Pikatti 1705FL, Potência: 700W), de forma a ficarem mais homogêneos e aumentar a superfície de contacto da enzima/substrato, e divididos em sacos de amostragem de 200 g, devidamente identificados. Foram, posteriormente, armazenados a -20°C numa câmara de congelação doméstica (BEKO No Frost & Electronic).

Durante a noite anterior à realização do processo de hidrólise, procedeu-se à descongelação das amostras, em refrigeração (lberna Classe A), a 4°C.

2.2.1. Processo de Hidrólise

O Processo de Hidrólise foi adaptado de Batista, *et al.* (2009).

Inicialmente foi colocado em cada vaso reaccional (erlenmeyer de 250 ml), 50g de amostra (pesados numa balança Sartorius TE 124S, precisão 0,1 mg), aos quais foram adicionados 50 ml de água destilada (1 mL de água destilada por cada grama de amostra). A solução foi homogeneizada, manualmente e colocada em banho de aquecimento com agitação (Julabo SW22) a uma velocidade constante de 90 rpm. Quando foram atingidos os 50°C (temperatura óptima de funcionamento das enzimas utilizadas), adicionou-se a enzima, com uma concentração de 0,5% (0,5 g / 100 g de subproduto). A hidrólise decorreu durante os tempos 0, 60 e 120 minutos, com o cuidado de manter sempre a temperatura constante.

Procedeu-se à medição de pH (WTW Series InoLab) das soluções antes da adição da enzima, durante o Processo de Hidrólise (de 10 em 10 minutos) e no final deste, procedendo ao acerto do mesmo no caso das enzimas exógenas (para o valor óptimo de actuação da enzima respectiva) sempre que necessário. Aquando das medições de pH durante o processo, procedeu-se também à agitação manual das soluções.

Terminado o tempo estipulado para o Processo de Hidrólise, procedeu-se à inactivação das enzimas, colocando as soluções num microondas durante, aproximadamente, 2 minutos, na potência máxima (para a solução atingir os 80-90°C). Após esta inactivação,

a mistura reaccional foi centrifugada (Eppendorf-Centrifuge 5804R) durante 20 minutos, a 4°C e a 6500 rpm, havendo separação de três fases: fase lipídica, fase solúvel e pellet. Recolheu-se a gordura formada à superfície, bem como o pellet depositado no fundo. A fracção solúvel obtida foi submetida a filtração (Filtres Fiorini – Qualitative Filter paper 110 mm) e, posteriormente quantificada e armazenada a -20°C.

Foram efectuadas 3 réplicas para cada conjunto de condições de hidrólise, consoante o desenho experimental representado na tabela I.

Tabela 3.1 - Desenho Experimental da Hidrólise Enzimática (n= número de réplicas)

Tempo (min)	Enzima		
	0% (g/g)	Neutrase 0,5% (g/g)	Alcalase 0,5% (g/g)
0	n=3	n=3	n=3
60	n=3	n=3	n=3
120	n=3	n=3	n=3

Das três réplicas obtidas pelo processo de hidrólise, para as diferentes condições, seleccionaram-se duas (as que apresentavam maior volume de hidrolisado produzido) para proceder à sua caracterização relativamente a: Teor de proteína, grau de hidrólise, teor de gordura, teor de cinzas e teor de humidade.

2.2.2. Teor de Proteínas

A concentração de proteína contida nos hidrolisados foi determinada através do método de Kjeldahl, de acordo com a NP 2030 (1996) para determinação do teor de azoto total nos produtos da pesca e aquicultura.

Inicialmente foi adicionado Ácido Sulfúrico a 96% (H₂SO₄, Sigma-Aldrich) à amostra e esta foi colocada num digestor de Kjeldahl (Digestor 2006 Foss based on Tecator™ Technology). De seguida fez-se a destilação num destilador automático (Foss Kjeltac™ 2100), com Hidróxido de Sódio a 40% (m/v) (NaOH, Merci, VWR), sendo a solução de recolha o Ácido Bórico a 4% (H₃BO₃, Merck). No final destes dois processos, foi feita a titulação manual, com Ácido Clorídrico (HCl, Panreac, JMGS).

O teor de azoto é calculado em função da quantidade de amónia produzida. Calcula-se o teor de proteína bruta multiplicando o resultado por um fator convencional de 6,25.

$$\% \text{ Azoto Total} = \frac{(V_a - V_b) * N * 0,014 * 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína Bruta Total} = \% \text{ Azoto Total} * 6,25 \quad (\text{equação 1})$$

Sendo que: V_a é o volume (ml) da solução de ácido clorídrico gasto na titulação; V_b é o volume (ml) de solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco; N é a concentração (N) da solução de ácido clorídrico utilizada e m é a massa (g) da toma para análise.

Para calcular o rendimento final de recuperação de azoto no hidrolisado líquido utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento Final (g/100g)} = \frac{\text{massa de azoto no hidrolisado} * 100}{\text{massa de azoto nos subprodutos}} \quad (\text{equação 2})$$

2.2.3. Grau de Hidrólise (GH)

O método para determinação do Grau de Hidrólise foi adaptado de Nielsen *et al.* (2001), cujos procedimentos mais importantes foram: preparação do reagente de OPA (*o-phthaldehyde*, Sigma, Sigma-Aldrich Química SA), do padrão serina (β -Hydroxyalanine, Sigma, Sigma-Aldrich Química SA) e das amostras.

Para obter uma boa leitura no espectrofotómetro (Helios α TM – Thermo Electron Corporation), todas as amostras foram diluídas da seguinte forma: 1 ml de amostra em 50 ml de água destilada.

As cuvets foram preparadas da seguinte forma: 2 para o padrão; 2 para o branco; 2 para a amostra.

Análise do padrão

Foram adicionados 400 µL de Serina (0,1 g/L) a cada cuvete, contendo 3 mL de reagente OPA, adicionados previamente, agitando levemente, 5 segundos. A solução reagiu durante, exactamente ,2 minutos antes da leitura no espectrofotómetro a 340 nm.

Análise do branco

Foram adicionados 400 µL de água destilada a cada cuvete, contendo 3 mL de reagente OPA, adicionados previamente, agitando suavemente, 5 segundos.

Análise das amostras

Foi adicionado 1 mL de amostra aos 3 mL de reagente OPA previamente adicionados, agitando levemente por 5 segundos.

O Grau de Hidrólise obtém-se através da seguinte fórmula:

$$GH = h/h_{tot} * 100\%$$

Sendo, $h = ((\text{serina} - \text{NH}_2) - \beta) / \alpha$ (equação 2)

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

Onde, Serina- NH₂ = meqv serina NH₂/g de proteína; β = 0,40; α = 1,00; X = massa de amostra P = percentagem de proteína na amostra; V = volume da amostra (L).

2.2.4. Teor de Gordura

O teor de gordura total foi determinado por um método adaptado de Bligh, E. G. & Dyer, E. J. (1959).

A 6 mL de amostra foram adicionados 4 mL de água, 5 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol, seguido de agitação, formando-se uma única fase. De seguida adicionaram-se 5

mL de clorofórmio e 5 mL de água, agitou-se e centrifugou-se a 4°C, a 3000rpm durante 5 minutos. Após este passo, verificou-se a existência de duas fases: a fase superior (água e metanol) e a inferior (fase orgânica – clorofórmio e lípidos). Procedeu-se ao isolamento da fase orgânica e evaporação do clorofórmio, através de um evaporador rotativo (Laborota 4000, Heidolph) a 90 rpm e a 45°C. Após evaporação total do solvente, procedeu-se à pesagem (Sartorius TE 124S, precisão 0,1 mg) do resíduo seco obtido (gordura).

O teor de gordura foi determinado através da seguinte equação:

$$\text{Teor de gordura(\%)} = \frac{\text{massa de resíduo seco} * 100}{\text{massa amostra}} \quad (\text{equação 3})$$

O valor da % de recuperação de gordura nos hidrolisados foi determinado através da seguinte equação:

$$\% \text{ Gordura recuperada} = \frac{\text{Teor gordura hidrolisado} * \text{massa hidrolisado} * 100}{\text{Teor gordura na matéria-prima} * \text{massa matéria-prima}} \quad (\text{equação 4})$$

2.2.5. Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado através do método gravimétrico, adaptado da NP 2032 (1988) para determinação do teor de cinzas em pescado.

Começou-se por pesar cerca de 5 g de amostra, para uma cápsula de porcelana, adequada para o efeito.

Cada amostra foi feita em duplicado, sendo posteriormente colocadas na mufla (Nabertherm, Controller B170) a 500°C durante 8 horas. Por fim, procedeu-se à pesagem das mesmas, de forma a determinar o teor de cinzas das amostras, expresso em percentagem em massa, através da seguinte equação:

$$\text{Teor de Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa de amostra após incineração} - \text{massa cadinho}}{\text{massa cadinho mais amostra} - \text{massa cadinho}} * 100$$

(equação 5)

2.2.6. Teor de Humidade

O teor de humidade dos HPP foi determinado através de um analisador automático (Mettler Toledo HB43 Halogen), onde se colocou, aproximadamente, 0,500g de amostra. As análises decorreram a uma temperatura de 120°C e o tempo de cada análise foi entre 7 a 15 minutos.

2.2.7. Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar as diferenças, para os valores médios da % de azoto solubilizado, grau de hidrólise e % de gordura recuperada, quer ao longo do tempo (T0, T60 e T120), quer entre as enzimas (Endógenas, Neutrase e Alcalase) realizou-se uma Análise de Variância (ANOVA), com dois fatores (Zar, 2010). De referir que todos os pressupostos inerentes à realização da ANOVA (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Adicionalmente, sempre que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, realizaram-se os respetivos testes de comparações múltiplas, nomeadamente, o teste de *Least Significant Difference* (LSD) (Zar, 2010). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância (α) de 5% (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0,05$). Todos os resultados são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (2DP).

Todos os cálculos foram efetuados com recurso ao software IBM SPSS Statistics 20.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de hidrólise foram realizadas 27 amostras, no total: três condições de tempo (0, 60 e 120 minutos) para três tipos de enzimas (endógenas – 0% (g/g) – neutrase – 0,5 % (g/g) – e alcalase – 0,5% (g/g)), tendo sido realizados triplicados de cada condição testada (Tabela 3.1). A composição química dos subprodutos utilizados no estudo está representada na tabela 4.1

Tabela 4.1 – Composição química (%) dos subprodutos de cavala. Valores apresentam-se sob a forma de média \pm Desvio-Padrão (n=2).

Parâmetro Analítico (%)	Subprodutos de cavala
Proteína	20,5 \pm 1,0
Gordura	8,62 \pm 0,10
Humidade	58,30 \pm 1,00
Cinzas	2,17 \pm 0,21

Os valores obtidos relativamente à composição química dos subprodutos de *Scomber colias* são muito semelhantes aos obtidos por Sathivel, *et al.* (2003) para o arenque (Tabela 1.1).

4.1. Composição química dos HPP

Os HPP obtidos neste trabalho apresentavam a composição química representada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição química (%) dos subprodutos de cavala. Valores apresentam-se sob a forma de média \pm Desvio-Padrão (n=2).

	Hidrolisado		
Parâmetro analítico	Endógenas T0	Endógenas T60	Endógenas T120
Proteína	4,31 \pm 0,63	2,77 \pm 0,49	2,38 \pm 0,60
Gordura	8,43 \pm 1,15	6,01 \pm 0,90	10,78 \pm 0,42
Humidade	94,53 \pm 0,91	95,96 \pm 1,30	95,84 \pm 0,67
Cinzas	2,18 \pm 0,49	7,41 \pm 0,16	7,08 \pm 0,36
Parâmetro analítico	Neutrase T0	Neutrase T60	Neutrase T120
Proteína	4,65 \pm 0,63	3,78 \pm 0,61	4,17 \pm 0,08
Gordura	7,69 \pm 0,92	6,38 \pm 0,71	3,58 \pm 0,34
Humidade	95,71 \pm 2,09	92,08 \pm 2,83	94,62 \pm 0,85
Cinzas	4,17 \pm 0,92	1,96 \pm 0,13	2,22 \pm 0,55
Parâmetro analítico	Alcalase T0	Alcalase T60	Alcalase T120
Proteína	4,40 \pm 4,51	6,23 \pm 0,98	6,88 \pm 0,24
Gordura	5,44 \pm 0,71	3,53 \pm 0,33	4,58 \pm 0,93
Humidade	94,62 \pm 0,85	92,20 \pm 2,28	91,34 \pm 3,41
Cinzas	9,36 \pm 0,40	7,58 \pm 0,43	8,01 \pm 0,02

4.2. Produção dos HPP

Verificou-se que um maior tempo de hidrólise permitiu a obtenção de um maior volume de hidrolisado.

Em relação à fase insolúvel, a quantidade de pellet obtida variou entre 27,40g (Alcalase, Tempo 60 minutos, R3) e 70,10g (Neutrase, Tempo 120 minutos, R2). A quantidade de gordura desta mesma fase, separada por centrifugação, variou entre 0,05g (Neutrase, Tempo 120 minutos, R2) e 16,48g (Alcalase, Tempo 120 minutos, R1).

No decorrer do processo de hidrólise verificou-se uma ligeira diminuição do pH, no caso da Neutrase e das enzimas endógenas, sendo mais acentuada no caso da Alcalase. Este foi sendo acertado ao longo do processo, sempre que era medido se verifica-se um desvio do valor óptimo (5,5 – 7,5 para a Neutrase e 8,0 – 10,0 para a Alcalase).

O facto de a mistura reacional durante a hidrólise com Neutrase apresentar uma diminuição de pH ao longo do processo de hidrólise está relacionado com o facto de, em soluções aquosas de pH neutro, a maioria dos aminoácidos estar na forma ionizada, pelo que o grupo amina encontra-se protonado ($-\text{NH}_3^+$) e o ácido carboxílico desprotonado ($-\text{COO}^-$). Havendo a libertação de aminoácidos com resíduos $-\text{NH}_3^+$ expostos, o pH tende a diminuir, sendo tanto menor quanto maior a concentração de $-\text{NH}_3^+$.

A mistura reacional durante a hidrólise com Alcalase, apresentou variações mais acentuadas de pH por esta ser uma enzima com um ataque mais agressivo. Segundo Rebeca, *et al.* (1991), geralmente as proteases alcalinas exibem actividades mais elevadas do que as proteases ácidas e neutras.

O produtos resultantes do processo de autólise (Enzima 0% (g/g)) apresentavam-se, aparentemente, mais viscosos do que os hidrolisados. Isto deve-se, possivelmente, ao facto destas enzimas formarem um complexo de mistura de enzimas, todas com diferentes locais de corte, o que origina produtos com diferentes perfis moleculares (Kristinsson e Rasco, 2000b).

4.3. Rendimento da Recuperação de Azoto

Determinou-se a recuperação de azoto nos hidrolisados líquidos, bem como dos subprodutos, através da Equação 1. Tendo estes valores, foi possível obter o rendimento total da hidrólise enzimática recorrendo a um balanço de massa à proteína relacionando o rendimento da recuperação de azoto nos hidrolisados com o presente nos subprodutos (Equação 2).

Na figura 4.2 é possível observar o rendimento da recuperação de azoto dos subprodutos de cavala em relação ao tipo de enzima utilizada, nos três tempos de hidrólise testados.

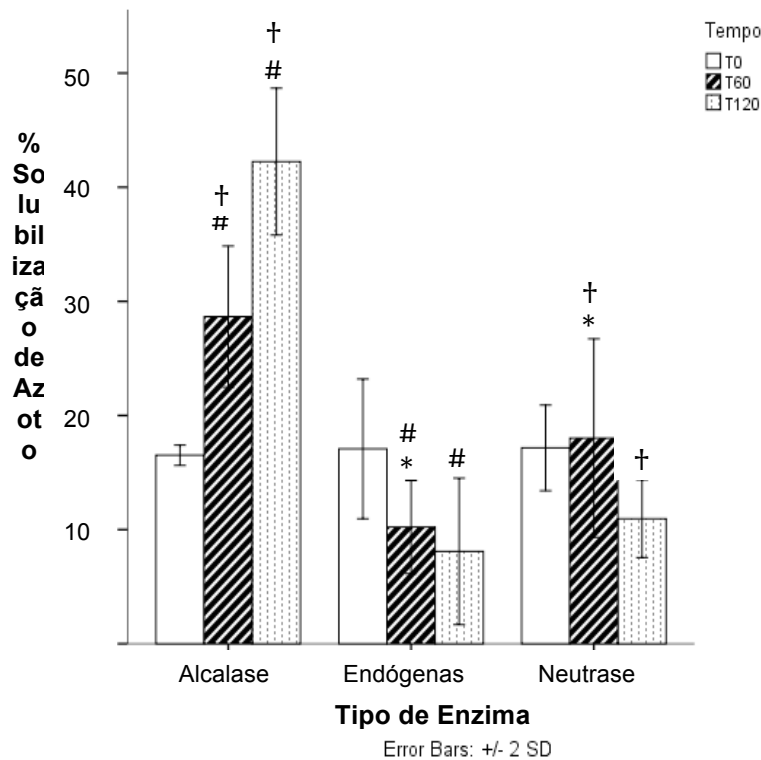


Figura 4.2 - Recuperação de azoto pelas três enzimas em estudo ao longo dos três tempos de hidrólise (T0 – 0 minutos; T60 – 60 minutos; T120 – 120 minutos); Valores apresentam-se sob a forma de média \pm 2DP (n = 2). Diferenças estatisticamente significativas (p -value<0,05; ANOVA, teste LSD): (*)entre Endógenas e Neutrased; (#)entre Endógenas e Alcalase ; (†) entre Neutrased e Alcalase.

A análise de resultados (Figura 4.2) permite concluir que a adição de enzimas exógenas tem influência no rendimento de recuperação de azoto dos subprodutos de cavala, tendo este sido superior nos hidrolisados obtidos pela acção da Neutrased e da Alcalase comparativamente à acção das enzimas endógenas (autólise) que permitem uma menor recuperação de azoto.

No entanto, verifica-se que o aumento do tempo de reacção não resulta numa maior solubilização de azoto com as endógenas e com a neutrased. Comparando estas duas enzimas, verifica-se que apenas existem diferenças estatisticamente significativas no tempo de hidrólise de 60 minutos. Tendo em conta que neste trabalho não se procedeu à inactivação das endógenas, a sua acção tem influencia nos valores obtidos referentes aos vários parâmetros analisados, para os HPP.

Assim, considera-se recuperação efetiva a diferença entre o valor médio obtido por ação da enzima e o valor médio obtido por ação das endógenas. Isto é, para um tempo de reacção de 60 minutos, a Neutrased apenas contribuiu para um aumento de solubilização de azoto de 10% (20% Azoto recuperado por Neutrased e Endógenas – 10% Azoto recuperado por Endógenas = 10% Azoto efetivamente recuperado por Neutrased).

Pode observar-se que para o tempo de hidrólise inicial (0 minutos), a quantidade de azoto solubilizado é semelhante aquando da acção das três enzimas, sendo que não há diferenças estatisticamente significativas entre elas (ANOVA, teste LSD, $p\text{-value}>0,05$).

Relativamente à Alcalased, verifica-se que atingiu um rendimento crescente ao longo do tempo, isto é, quanto maior o tempo de hidrólise maior a recuperação de azoto a partir dos subprodutos.

Esta enzima permitiu um maior rendimento de solubilização de azoto, comparativamente ao da Neutrased, tanto para os 60 minutos (em que permitiu uma recuperação de 28,67%) como para os 120 minutos de hidrólise (recuperou 42,24% de azoto). Era espectável ter estes resultados uma vez que num estudo realizado por Batista, *et al.* (2009), em hidrolisados proteicos de *Sardina pilchardus* (sardinha), o rendimento de recuperação de azoto com a Alcalased foi superior ao obtido com a Neutrased.

Também em relação às enzimas endógenas, a Alcalased permite a obtenção de melhores resultados de rendimento. As diferenças verificadas entre estas enzimas nos tempos referidos são estatisticamente significativas (ANOVA, teste LSD, $p\text{-value}<0,05$).

A Neutrased apresenta valores de rendimento semelhantes às enzimas endógenas, sendo estes significativamente diferentes apenas aos 60 minutos de hidrólise (ANOVA, teste LSD, $p\text{-value}<0,05$).

Os valores de recuperação de azoto obtidos, recorrendo à Alcalased, foram semelhantes aos obtidos por Batista *et al.* (2009) na produção de HPP de subprodutos de sardinha, submetidos a tratamento térmico. Este autor investigou a produção de hidrolisados em subprodutos crus e submetidos a tratamento térmico tendo verificado rendimentos de recuperação na ordem dos 40%, no segundo caso, para os tempos de hidrólise de 60 e 120 minutos (Batista *et al.*, 2009). Para os mesmos tempos obteve-se (como é possível

observar na Figura 4.2), aproximadamente, 30 e 40% de recuperação de azoto, respectivamente.

4.4. Grau de Hidrólise

Na figura 4.3 é possível verificar-se o valor de GH dos subprodutos de cavala (calculado através da Equação 2), em relação ao tipo de enzima nos três tempos de hidrólise testados.

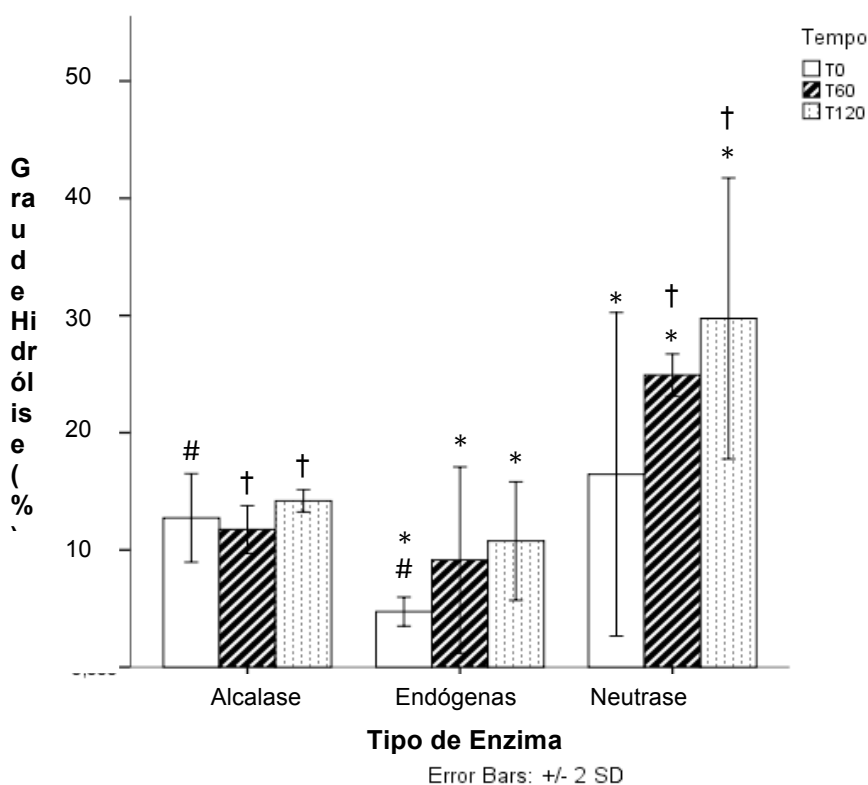


Figura 4.3 – Grau de Hidrólise obtido pelas três enzimas em estudo ao longo dos três tempos de hidrólise (T0 – 0 minutos; T60 – 60 minutos; T120 – 120 minutos); Valores apresentam-se sob a forma de média \pm 2DP (n = 2). Diferenças estatisticamente significativas (p -value<0,05; ANOVA, teste LSD): (*)entre Endógenas e Neutrased; (#)entre Endógenas e Alcalase ; (†) entre Neutrased e Alcalase.

Analisando os resultados obtidos (Figura 4.3), verifica-se que em todos os ensaios onde houve adição das enzimas comerciais Neutrased e Alcalase, o valor de GH é superior, indicando que existiu atuação por parte da enzima e que houve quebra da proteína que se encontrava solubilizada no meio.

Relativamente ao Grau de Hidrólise verifica-se que a Neutrased permitiu uma maior clivagem das proteínas solubilizadas (Figura 4.3), ao contrário do estudo de Batista, et al. (2009) com sardinha, em que o GH obtido com Alcalase foi duas vezes superior ao do obtido com Neutrased.

Sathivel, et al. (2003), num estudo realizado com HPP obtidos por ação da Alcalase (0,5% g/g), a partir de subprodutos de Arenque (*Clupea harengus*), obtiveram resultados de GH semelhantes (em média 13,6%) aos obtidos neste trabalho para esta enzima, num tempo de reação de 75 minutos.

Considerando os resultados de recuperação de azoto obtidos, verifica-se que a Alcalase recuperou maior quantidade de proteína bruta (Figura 4.2), enquanto que a Neutrased originou maior quantidade de péptidos e polipéptidos (uma vez que o grau de hidrólise está directamente relacionado com o número de clivagens). A percentagem dessa clivagem foi tanto maior quanto maior o tempo de hidrólise, tendo-se obtido o valor máximo aos 120 minutos (29,75%).

Estes resultados parecem indicar que enquanto que a Alcalase atuou preferencialmente sobre a proteína presente na matéria-prima, a Neutrased preferiu a proteína solubilizada.

Comparando a ação da Neutrased com as outras enzimas, verifica-se que para os tempos de 60 e 120 minutos foram obtidos GH significativamente superiores (ANOVA, teste LSD, $p\text{-value}<0,05$) aos obtidos nas mesmas condições com as enzimas endógenas e com a Alcalase.

Relativamente à Alcalase, apresenta diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste LSD, $p\text{-value}<0,05$) relativamente às endógenas para tempos de hidrólise de 0 minutos, sendo as percentagens de ligações proteicas quebradas significativamente diferentes (ANOVA, teste LSD, $p\text{-value}<0,05$), quando comparada com a Neutrased, para os tempos de hidrólise de 60 e 120 minutos. No primeiro tempo a Alcalase clivou 12% das ligações proteicas enquanto que a Neutrased quebrou 25% dessas ligações. De igual modo, no tempo máximo estudado, a Neutrased atingiu os 30% de ligações peptídicas quebradas, contra a Alcalase que apenas atingiu 14%.

Tendo em conta que as enzimas foram adicionadas na mesma proporção enzima/substrato o facto de os valores de GH serem diferentes pode estar relacionado com o facto das especificidades das enzimas serem diferentes.

O facto da Alcalase ter originado menores valores de GH em comparação com a Neutrase, pode estar relacionado com a baixa concentração de enzima utilizada ou com os tempos de hidrólise estudados serem curtos. No estudo efectuado por Khiari (2010), de produção de HPP a partir de vísceras de sarda (*Scomber scombrus*), espécie da mesma família da cavala, obteve-se um GH de 32%, para os HPP obtidos por acção da Alcalase com uma razão enzima/substrato de 0,1%, sendo o tempo de reacção de 360 minutos.

De acordo com Amiza et al. (2011), num estudo efectuado sobre produção de HPP a partir de peixe-gato, a Alcalase permite obter uma maior quantidade de quebras de ligações proteicas nas seguintes condições: temperatura de 55°C; tempo de hidrólise de 163 minutos; pH de 9,45 e concentração enzimática de 2%.

Também o facto de ter originado uma maior recuperação de azoto pode estar relacionado com o facto do grau de hidrólise obtido pela Alcalase ter sido menor pois, segundo Baek e Cadwallader (1995), uma elevada % de GH não coincide com um elevado rendimento de recuperação proteica. Ou seja, ao haver uma grande concentração de substrato, a enzima não consegue quebrar tantas ligações peptídicas que quebraria caso esta fosse menor. Uma elevada concentração substrato pode causar a saturação da enzima, isto é, toda a enzima pode já encontrar-se na forma de complexo enzima-substrato.

Segundo Ravallec-Plé, et al., (2001) uma razão óptima entre a concentração de enzima/concentração de substrato será o parâmetro decisivo para a obtenção de produtos com elevado interesse.

No entanto, ao analisar individualmente o trabalho das duas enzimas verifica-se que os resultados de GH obtidos foram elevados, comparativamente a outros estudos. Os valores obtidos neste trabalho, para a Neutrase, foram muito superiores aos da literatura (Batista, et al., 2009). Num tempo de hidrólise de 60 minutos, com a Neutrase obteve-se um GH de cerca de 25 %, aumentando para, aproximadamente 30% aos 120 minutos.

4.5. Teor de gordura

Na figura 4.4 é possível verificar-se a % de gordura recuperada nos hidrolisados (obtida pela equação 4) dos subprodutos de cavala, em relação ao tipo de enzima nos três tempos de hidrólise testados.

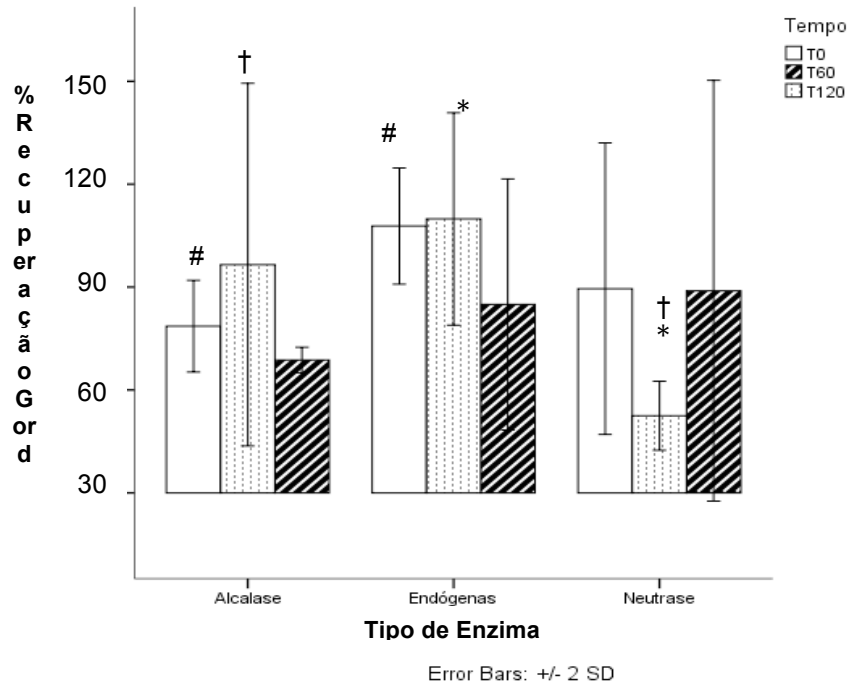


Figura 4.4 – Recuperação de gordura pelas três enzimas em estudo ao longo dos três tempos de hidrólise (T0 – 0 minutos; T60 – 60 minutos; T120 – 120 minutos); Valores apresentam-se sob a forma de média \pm 2DP (n = 2). Diferenças estatisticamente significativas (p -value < 0,05; ANOVA, teste LSD): (*) entre Endógenas e Neutrase; (#) entre Endógenas e Alcalase ; (†) entre Neutrase e Alcalase.

Os hidrolisados de proteína podem produzir uma emulsão, com uma fase lipídica adicionada. Quanto maior a quantidade de gordura incorporada maior é a capacidade de emulsificação dos hidrolisados.

Pela observação da Figura 4.4 verifica-se que os HPP formados por autólise apresentam uma grande capacidade de emulsão (cerca de, em média, 71% de gordura recuperada a partir dos subprodutos).

Verifica-se também que as enzimas endógenas e a Alcalase apresentam diferenças estatisticamente significativas (LSD, p -value < 0,05) para tempos de hidrólise extremos

(de 0 e 120 minutos). A Alcalase e a Neutrase diferem significativamente (LSD, p -value < 0,05) no tempo máximo de reacção.

A quantidade de lípidos presentes na emulsão, pode estar relacionada com a composição e tamanho dos polipéptidos formados durante a hidrólise, o que vai determinar as interacções lípido-proteína (Batista, *et al.*, 2009).

A capacidade de ligação das proteínas às moléculas lipídicas, permite determinar o tipo de proteínas presentes no HPP. Uma maior % de gordura recuperada está relacionada com a presença de péptidos com características hidrofóbicas (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Segundo Chalamaiah *et al.* (2010), as condições ideais para a formação da emulsão e estabilização são a presença de polipéptidos de elevado tamanho molecular e em elevadas concentrações no meio. Deste modo, um elevado grau de hidrólise, ao qual está associada uma diminuição do tamanho médio dos polipéptidos, pode estar associado a uma diminuição das propriedades emulsificantes. Esta relação entre a % de gordura recuperada nos hidrolisados e a % de ligações peptídicas clivadas (GH) pode ser observada na figura 4.5. Comprova-se que com um aumento dos valores de GH há uma tendência para a diminuição da % de gordura recuperada.

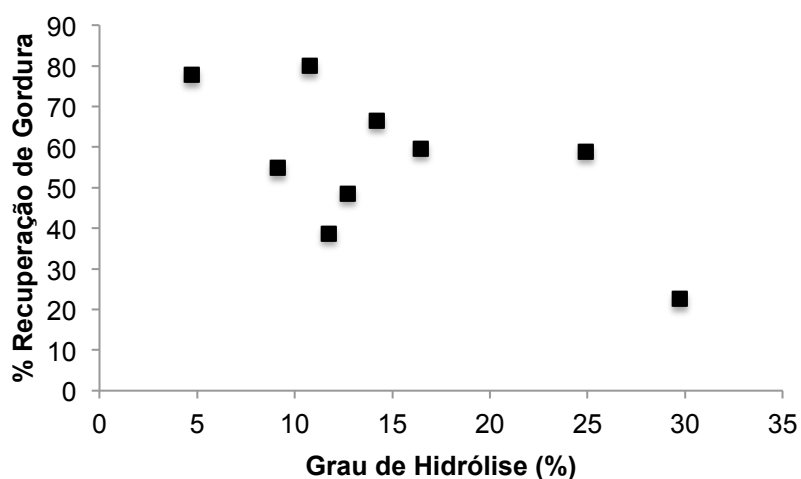


Figura 4.5 – Relação entre a % de recuperação de gordura vs grau de hidrólise.

Assim se pode explicar o facto do valor de recuperação de gordura por acção da Neutrasede ser tão baixo comparativamente às restantes enzimas testadas. Uma vez que foi a enzima que mais ligações peptídicas clivou, atingindo o maior GH obtido neste estudo, foi também a que conduziu à menor % de gordura recuperada a partir dos subprodutos.

Deste modo, pode afirmar-se que os péptidos obtidos por acção da Neutrasede aos 120 minutos de reacção, têm características hidrofílicas, o que vem reforçar o que já foi anteriormente referido na secção 4.4, relativamente ao facto desta enzima ter tido preferência em atacar a proteína solubilizada.

De uma forma geral, em termos de recuperação de azoto, efectiva, a acção da Alcalasede foi superior à da Neutrasede, tendo a primeira possibilitado um rendimento de recuperação efectiva de 17,35% contra 3,58% recuperado pela segunda. No entanto, esta última permitiu a quebra efectiva de um maior número de ligações peptídicas (em média, 15,49%) e, conseqüentemente, uma menor recuperação de gordura, sendo o maior valor obtido pelas endógenas (em média 69,27%). Deste modo, os HPP obtidos por acção da Alcalasede e das enzimas endógenas poderão apresentar maior capacidade emulsificante.

4. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a confirmação do potencial da aplicação da hidrólise enzimática na valorização de subprodutos de pescado. Foram produzidos hidrolisados proteicos a partir de subprodutos de *Scomber colias*, com propriedades que indicam o seu potencial na aplicação na indústria alimentar.

A quantidade de proteína obtida na cavala foi de 20,5% (g/100g produto), sendo superior ao referido na literatura, em relação à sardinha (Batista, *et al.*, 2009).

Nos hidrolisados, a recuperação de azoto foi maior aquando da utilização da Alcalase, sendo tanto maior quanto maior o tempo de hidrólise tendo, portanto, este factor um efeito significativo.

Relativamente ao GH, a Neutrase permitiu uma maior clivagem de proteínas solubilizadas. Consequentemente, originou uma menor recuperação de gordura (que está relacionada com o tamanho dos péptidos formados) quando comparada com a Alcalase e as enzimas endógenas, estando de acordo com os resultados obtidos por Batista, *et al.* (2009). Deste modo, a Neutrase mostrou ter preferência pela proteína solubilizada, enquanto a Alcalase pela que está contida na matéria-prima.

Os HPP produzidos pela ação das enzimas endógenas apresentaram uma % de recuperação de gordura superior aos restantes HPP. Esta incorporação é indicadora do poder emulsionante destes hidrolisados sendo, no entanto, indesejável para a aplicação comercial destes produtos pois irá favorecer processos de oxidação lipídica, comprometendo o tempo de prateleira do produto.

Os HPP obtidos apresentaram também um teor de humidade elevado. Para a comercialização bem sucedida destes produtos, a inclusão de uma etapa de secagem (*spray drying*) seria essencial, de forma a ser possível a manutenção das suas características por períodos de tempo que permitam a sua distribuição e aplicação.

Os resultados obtidos sugerem o potencial da aplicação de hidrolisados proteicos de pescado na tecnologia de processamento de produtos com valor acrescentado para criar uma nova geração de produtos funcionais, transformando matéria anteriormente considerada de baixo valor comercial numa fonte de lucro.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras seria interessante estudar/investigar:

- Outras propriedades dos hidrolisados proteicos de cavala como as propriedades antioxidantes, de estabilização de espumas, conservantes, espessantes e antimicrobianas.
- Avaliar o potencial de aplicação destes hidrolisados em vários tipos de alimentos que não apenas pescado.
- Os tamanhos dos polipéptidos obtidos, tanto pela Neutrase como pela Alcalase, uma vez que estas tiveram valores de GH distintos.
- Testar tempos de hidrólise mais curtos a fim de analisar as propriedades emulsionantes dos hidrolisados, uma vez que a hidrólise excessiva leva à perda de propriedades emulsionantes (Chobert, *et al.*, 1988).
- Avaliação da bioactividade dos hidrolisados de cavala na diminuição dos índices de colesterol e valores de HDL (Wergedahl, *et al.*, 2004).
- Caracterizar a fracção insolúvel (pellet e gordura) resultante do processo de hidrólise.

O elevado custo do processo enzimático, ao longo do tempo de processamento, poderá constituir uma barreira para a produção industrial. Uma possível solução para isto é incluir no processo microondas intensificadas, o que gera maiores rendimentos em menores tempos de reacção. Izquierdo, *et al.* (2008) analisaram os efeitos de aplicação destas microondas em processos de hidrólise e descobriram que estas aumentam a proteólise de todas as enzimas.

Do ponto de vista da segurança alimentar dos hidrolisados proteicos de pescado, sobre a qual ainda não existem registos de preocupações, é importante ter especial atenção aos registos de histamina pois, uma vez que estes hidrolisados estão relacionados com a proteína de peixe, de forma concentrada, também os níveis de histamina poderão ser concentrados. O mesmo se aplica no caso dos alérgenos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Sites electrónicos:

ACOPE –Associação dos Comerciantes de Pescado, através do site <http://www.cope.pt/>,
acedido a 21 de Setembro de 2012.

Google Earth, 2009. Acedido através do endereço
<http://www.google.com/earth/index.html>, no dia 21 de Setembro de 2012.

Froese, R. and D. Pauly, Editors, 2013. FishbaseWorld Wide Web electronic publication,
no website <http://www.fishbase.org/>, acedido a 12 de Agosto de 2013.

Artigos e manuais:

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

Adler-Nissen, J. (1979), **Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid**, J. Agric. Food Chem., 27, N° 6, 1256-1262.

Aspmo, S.I.; Horn, S. J.; Eijsink, V.G. H. (2005), **Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera**, Process Biochemistry, 40: 1957-1966.

Batista, I.; Pires, C.; Nunes, M. L., (2006) Hidrolisados Proteicos de Pescado: preparação, propriedades e utilização – Vol. 14, Publicações Avulsas IPIMAR.

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*) Byproducts and Lipid Recovery, Journal of Aquatic Food Product Technology, 18: 120-134.

Baek, H. H.; Cadwallader, K. R. (1995), **Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products**, Journal of Food Science, 60, 929.

Benjakul, S.; Morrissey, M. T. (1997), **Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3423–3430.

Bligh, E. G; Dyer, E. J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 911

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.

Chobert, J. M.; Bertrand-Harb, C.; Nicolus. M. G. (1988), **Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36: 883–892.

Dauksas, E.; Falch, E.; Slizyte, R.; Rustad, T. (2005), **Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products**. Process Biochemistry, 40: 2659-2670.

Diniz, A. M.; Martin, A. M. (1997), **Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates**, International Journal of Food Science and Nutrition, 48: 191-200.

Gbogouri, G. A.; Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. (2004), **Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates**, Journal of Food Science, Vol. 69: 615–622.

Hoyle, N.; Merritt, J. H. (1994), **Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*)**, Journal of Food Science, 59: 76-79 129.

Instituto Nacional de Estatística (INE), I. P. (2013), Estatísticas da Pesca 2012, Edição 2013, Lisboa, Portugal.

Izquierdo, F. J., Penas, E., Baeza, M. L., & Gomez, R. (2008), **Effects of combined micro- wave and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins**, International Dairy Journal, 18(9): 918–922.

Kato, A.;Komatsu, K.; Fujimoto, K.; Kobayashi, K. (1985), **Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by protease susceptibility**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33: 931–934.

Khiari, Z. (2010),**Functional and bioactive components from mackerel (*Scomberscombrus*) and blue whiting (*Micromesistiuspoutassou*) processing waste**,Thesis submitted in fulfillment of requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. School of Food Science and Environmental Health, Dublin Institute of Technology (Ireland).

Klompong, V.; Benjakul, S.; Kantachote, D.; Shahidi, F. (2007),**Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type**, Food Chemistry, Vol. 102, Capítulo 4: 1317-1327.

Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. (2000). **Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) 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.

Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. (2005),**Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases**,Marine Biotechnology, Vol.15: 70-76.

Mackie, I. M. (1982),**Fish protein hydrolysate**,Process Biochemistry, Vol. 20 (1982): 26–30.

Mbatia, B., Adlercreutz, P., Mulaa, F. and Mattiasson, B. (2010), **Enzymatic enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids in Nile perch (*Lates niloticus*) viscera oil**,European Journal of Lipid Science and Technology, 112:977-984.

Mutilangi, W. A. M.; Panyam, D.; Kilara, A. (1996), **Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate**, *Journal of Food Science*, 61: 270–274.

Rahali, V.; Chobert, J. M.; Haertle, T.; Gueguen, J. (2000), **Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface**, *Nahrung*, 44: 89–95.

Ratola, D. (2012), **Recursos piscatórios: análise das condicionantes do consumo e das percepções da sustentabilidade dos recursos**, Tese de mestrado em Gestão e conservação dos recursos naturais, Universidade de Évora.

Rebeca, D.; Pena-vera, M. T.; Diaz-Castaneda, M. (1991), **Production of fish protein hydrolysates with bacteria proteases; yield and nutritional value**, *Journal of Food Science*, 56: 309–314.

Sathivel, S.; Bechtel, P. J.; Babbitt, J.; Smiley, S.; Crapo, C.; Reppond, K. D.; Prinyawiwatkul, W. (2003), **Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates**, *Food Chemistry and Toxicology, Journal of Food Science*, 68, N° 7.

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

Shamloo, M.; Bakar, J.; Mat Hashim, D.; Khatib, A. (2012), **Biochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates**, *International Food Research Journal*, 19(1): 183-188.

Shan, H., Franco, C. Zhang, W, (2013). **Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP)**, *Food Research International* Volume 50, Issue 1: 289–297.

Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I. and Rustad., T. (2005), **Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products**, *Process Biochemistry*, 40: 2021-2033.

Ting, C. Y.; Montgomery, M.; Anglemier, A. F. (1968), **Partial purification of salmon muscle cathepsins**, Journal of Food Science, 33: 617–621.

Turgeon, S. L.; Gauthier, S. F. (1990), **Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: production and characterization**, Journal of Food Science, 55: 106–110.

Young, V.R. (2001), **Protein and amino acids. In: Present Knowledge in Nutrition. 8th Edition. Bowman BA and Russel RM (eds)**, International Life Sciences Institute, Washington DC. Capítulo 5: 43-58.

Zar, J. (2009), **Biostatistical Analysis**, 5.^a Edição. Prentice Hall.