



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUO DE PIRARUCU**  
**(*Arapaima gigas*)**

**FLÁVIA DE CARVALHO PAIVA**

**MANAUS**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**FLÁVIA DE CARVALHO PAIVA**

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUO DE PIRARUCU**  
**(*Arapaima gigas*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus**

**Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Larissa de Souza Kirsch**

**MANAUS**

**2014**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Paiva, Flávia de Carvalho.

P149p      Produção de hidrolisado proteico de resíduo de pirarucu (*arapaima gigas*) /  
Flávia de Carvalho Paiva. - 2014.

53 f. : il. color..

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Federal  
do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa de Souza Kirsch.



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós – Graduação em Ciência de Alimentos



Ata da Defesa Fechada da Dissertação de Mestrado da aluna **FLÁVIA DE CARVALHO PAIVA**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, área de concentração em Ciência de Alimentos, realizada no dia vinte e oito de maio de dois de dois mil e catorze.

Aos dias vinte e oito de maio de dois mil e catorze, às 15:00 horas, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Flávia de Carvalho Paiva, realizou-se a defesa fechada de sua Dissertação de Mestrado intitulada: “**Produção de hidrolisado protéico de resíduo de pirarucu (*Arapaima gigas*)**”. Compuseram a banca examinadora os seguintes Professores Doutores: Rogério Souza de Jesus (Orientador – INPA), Maria Francisca Simas Teixeira (UFAM), Pedro Roberto de Oliveira (UFAM) e Rosana Antunes Palheta (UFAM). A apresentação foi seguida de arguição da candidata. Tendo respondido satisfatoriamente às questões formuladas pela comissão examinadora, a Dissertação foi considerada “APROVADA”, sendo-lhe concedido o título de MESTRE em Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos. Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, aos dias vinte e oito de maio de dois mil e catorze.

Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus – (Orientador - INPA).....  
Prof. Dr. Maria Francisca Simas Teixeira (UFAM).....  
Prof. Dr. Pedro Roberto de Oliveira (UFAM).....  
Prof. Dr. Rosana Antunes Palheta (UFAM).....

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por sempre me guiar e amparar.

A minha querida família, meus amores, Lúcio, Suely, Lucely, Lúcia, Sandro e Eunice, pelo afeto e por fornecer todos os elementos necessários ao meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu amor, Carlos Dias de Almeida Júnior, sempre tão paciente, pelo amor, dedicação, carinho e companheirismo em todos os momentos, tornando os dias tensos do mestrado bem mais agradáveis. Sem você, meu amor, teria sido muito mais difícil.

Ao Dr. Rogério Souza de Jesus, meu orientador, por assumir a minha orientação duas semanas antes da qualificação, por ser solícito nos momentos que precisei, colaborando com o que podia e sem dificultar quando a colaboração fugia do seu alcance.

A Professora Dra. Larissa de Souza Kirsch, minha co-orientadora, por assumir junto comigo o desafio do projeto no final do prazo para a realização desta pesquisa, pela dedicação, ensinamentos oferecidos e ombro amigo.

Agradeço em especial a Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira, que abriu as portas do Laboratório de Micologia da UFAM para mim e “abraçou a minha causa”, disponibilizando toda a estrutura do laboratório, junto com os seus conhecimentos e experiência, tornando possível a execução e finalização desta pesquisa.

Aos meus amigos do PPGCAL, pelo milagre da amizade, pelo trabalho em grupo e por tornar este período do mestrado mais saboroso.

Ao grupo do Laboratório de Micologia (UFAM) por me acolher, ajudar e pelo dia-a-dia agradável durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Tecnologia do Pescado (UFAM) e em especial ao Professor Antônio Fábio Lopes de Souza pela contribuição nas análises da composição química do pescado.

A equipe do Laboratório de Tecnologia de Pescado, da Coordenação de Tecnologia e Inovação, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

A todos os meus professores, e assim como disse Path Adams, principalmente aqueles que não morreram da cintura para cima. Que sabem ser um verdadeiro mestre, transferindo o conhecimento com a única intenção de formar bons profissionais.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade e por toda a estrutura oferecida para a realização deste estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a CAPES por tornar possível o desenvolvimento desta pesquisa através do financiamento direcionado.

## RESUMO

O beneficiamento do pirarucu gera uma grande quantidade de resíduos que pode ser aproveitado para elaboração de novos produtos alimentícios de interesse industrial. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de hidrolisado proteico a partir de resíduo de pirarucu utilizando pancreatina e proteases de *Aspergillus flavo-furcatis*. A matéria-prima utilizada foi carne mecanicamente separada de carcaças de pirarucu (CMSP) proveniente da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas. O processo foi conduzido sob agitação, tempo e temperatura controlados. A CMSP e os hidrolisados foram submetidos à análise de composição química e qualidade microbiológica. Desses experimentos foram desenvolvidos dois produtos, o hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima comercial (HPPEC) e outro preparado com a enzima microbiana (HPPEM). Os hidrolisados foram caracterizados quanto ao grau de hidrólise, digestibilidade e perfil de aminoácidos. Os resultados mostraram que no HPPEC o teor proteico foi de 71,30%, significativamente superior ao do HPPEM (57,26%). Todavia nos dois produtos foram observados altos valores de digestibilidade, ausência de contaminantes microbianos, redução no conteúdo de lipídios e aumento no teor de cinzas. O aminograma demonstrou nos dois produtos a presença de todos os aminoácidos essenciais. Entre as enzimas utilizadas, a pancreatina teve maior eficiência hidrolítica, porém aos maiores níveis de digestibilidade, teor de hidroxiprolina e taurina foram determinados no produto final desenvolvido com as enzimas de *A. flavo-furcatis*.

**Palavras-chave:** pescado, proteína hidrolisada, alimento proteico.

## ABSTRACT

The processing of arapaima (*Arapaima gigas*) generates a lot of waste that can be reused for development of new products of industrial interest. The aim of this study was to evaluate the production of protein hydrolyzate from pirarucu waste using pancreatin and *Aspergillus flavo-furcatis* proteases. The raw material was minced fish of arapaima originated from Mamirauá Sustainable Development Reserve, State of Amazon. The process was conducted under constant agitation and controlled time and temperature. The minced fish and the hydrolysates were analyzed for chemical composition and microbiological quality. From these experiments two products were developed: an pirarucu protein hydrolyzate obtained of commercial enzyme (HPPEC) and another one prepared with microbial enzyme (HPPEM). The hydrolysates were analyzed for degree of hydrolysis, digestibility and amino acids profile. The results showed that the protein content in HPPEC (71.30 %) was significantly higher than HPPEM (57.26 %), however, in both products, were observed high values of digestibility, absence of microbial contaminants and reduction of lipid content. The aminogram showed the presence of all essential amino acids in both products. Among the enzymes used, pancreatin had higher hydrolytic efficiency, but the higher levels of digestibility, hydroxyproline content and taurine were determined in the final product developed with *A. flavo-furcatis* enzymes.

**Keywords:** fish, hydrolyzed protein, protein food.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Pirarucu ( <i>Arapaima gigas</i> ).....                                                           | 15 |
| Figura 2 – Resíduo de pirarucu utilizado para produção de CMS.....                                           | 16 |
| Figura 3 – Características macro e micro-morfológica de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA<br>1493. .... | 21 |
| Figura 4 – Fluxograma de elaboração do hidrolisado proteico de pirarucu. ....                                | 25 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Espécies de peixes utilizadas como matéria-prima para produção de HPP.....            | 18 |
| Tabela 2 – Outras espécies íctias utilizadas para elaboração de HPP. ....                        | 19 |
| Tabela 3 – Condições de atuação das enzimas. ....                                                | 26 |
| Tabela 4 – Padrões microbiológicos para pescado <i>in natura</i> e subproduto de pescado seco. . | 28 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                   | 11 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                                                                                                        | 13 |
| 2.1. O pescado, a nutrição e a produção de alimentos .....                                                                                                           | 13 |
| 2.2. O pirarucu.....                                                                                                                                                 | 14 |
| 2.3. Hidrolisado proteico de pescado .....                                                                                                                           | 16 |
| 2.4. Proteases.....                                                                                                                                                  | 19 |
| 2.5. <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> .....                                                                                                                         | 21 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                                                                                                    | 23 |
| 3.1. Objetivo geral .....                                                                                                                                            | 23 |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                                                                                                                      | 23 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                           | 24 |
| 4.1. Obtenção da carne mecanicamente separada .....                                                                                                                  | 24 |
| 4.2. Enzimas .....                                                                                                                                                   | 24 |
| 4.3. Caracterização parcial das proteases de <i>A. flavo-furcatis</i> .....                                                                                          | 24 |
| 4.4. Elaboração do hidrolisado proteico.....                                                                                                                         | 25 |
| 4.5. Grau de hidrólise .....                                                                                                                                         | 26 |
| 4.6. Composição físico-química.....                                                                                                                                  | 26 |
| 4.7. Composição de aminoácidos.....                                                                                                                                  | 26 |
| 4.8. Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i> .....                                                                                                           | 27 |
| 4.9. Avaliação microbiológica .....                                                                                                                                  | 27 |
| 4.9.1. Diluição da amostra .....                                                                                                                                     | 28 |
| 4.9.2. Contagem de Coliformes totais, termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                | 28 |
| 4.9.3. Contagem direta de <i>Salmonella</i> sp. ....                                                                                                                 | 28 |
| 4.9.4. Contagem direta de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva.....                                                                                       | 29 |
| 4.9.5. Contagem de Bolores e Leveduras .....                                                                                                                         | 29 |
| 4.10. Análise estatística.....                                                                                                                                       | 29 |
| CAPÍTULO 1 .....                                                                                                                                                     | 30 |
| Produção de hidrolisado proteico de pirarucu ( <i>Arapaima gigas</i> Schinz, 1822) com uma<br>nova protease de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> e pancreatina ..... | 30 |
| CAPÍTULO 2 .....                                                                                                                                                     | 49 |
| Hidrolisado proteico de subproduto de pirarucu ( <i>Arapaima gigas</i> ) preparado com<br>protease de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1493 .....              | 49 |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| CONCLUSÃO.....                                                       | 51 |
| REFERÊNCIAS .....                                                    | 52 |
| ANEXOS.....                                                          | 60 |
| Normas para submissão da Revista Pesquisa Agropecuária Tropical..... | 60 |

## 1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da Ciência, sabe-se que há uma grande relação entre saúde e nutrição. Pesquisas comprovam a importância de uma alimentação saudável na prevenção e no tratamento de doenças crônicas e na manutenção de uma boa qualidade de vida. A busca por fontes alimentícias saudáveis transforma o pescado em um importante alimento para a nutrição humana e também animal. Segundo Burger (2008), a composição nutricional do pescado e a divulgação de estudos que associam o seu consumo com melhorias à saúde têm causado maior interesse por esse alimento.

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal (BRASIL, 1981), denominam-se pescado os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada usados na alimentação. Os peixes são considerados alimentos bastante nutritivos, rico em vitaminas, minerais, lipídios e proteínas de alto valor biológico, além de conter todos os aminoácidos essenciais.

A busca e o incentivo ao maior consumo de peixes têm se tornado uma tendência, e neste contexto, a Tecnologia do pescado contribui para o fornecimento de produtos e subprodutos de pescado, porém em contrapartida a indústria de processamento de pescado produz mais de 60% de resíduos sólidos (GONÇALVES, 2011; MENEGASSI, 2011).

Na região Amazônica a pesca é uma das atividades extrativistas mais tradicionais e importantes do ponto de vista socioeconômico, ecológico e cultural, em função da grande diversidade de espécies, da quantidade de pescado capturado e da dependência das comunidades tradicionais em relação à pesca (GANDRA, 2010).

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é uma espécie íctia amazônica que possui uma carne muito apreciada e, portanto com elevada importância econômica na Região Amazônica, devido ao seu tradicional consumo e ao crescente potencial de comercialização, pois apesar de ser um peixe com exploração controlada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) desde 1975, no Amazonas o uso racional de recursos naturais desta espécie através do seu manejo sustentável tem gerado bons resultados, proporcionando o repovoamento de lagos e permitindo o aumento da comercialização deste peixe gerando maior renda aos pescadores amazonenses.

O pirarucu é comercializado na forma de manta fresca, congelada, seco-salgada e defumada. Por ser um peixe grande e pela sua crescente comercialização, o beneficiamento do pirarucu gera muitos resíduos, como por exemplo, cabeça, vísceras, nadadeiras, escamas e couro, os quais podem ser reaproveitados como subprodutos a fim de agregar valor à

produção e proporcionar novos produtos provenientes de pescado (CROSSA & OVIEDO, 2011; FREITAS-JÚNIOR *et al.*, 2012). No entanto, um resíduo pouco aproveitado é a carcaça do pirarucu após a retirada das mantas (filés), a qual contém uma quantidade de carne inadequada para ser fileteada, mas que pode ser utilizada na produção de carne mecanicamente separada (CMS) de pescado para ser utilizada como matéria-prima para a elaboração de produtos derivados de pescado.

A hidrólise enzimática do pescado é um método eficiente utilizado para recuperar a proteína, o qual resulta na produção de hidrolisados proteicos de pescado (HPP), que pode apresentar alto conteúdo proteico, elevada digestibilidade, melhores propriedades funcionais e nutricionais, além de aumentar a liberação de peptídeos biologicamente ativos das proteínas do pescado (SGARBIERI, 1996; FURLAN & OETTERER 2002; NGUYEN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Tais produtos são adicionados em alimentos dietéticos, como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos, podendo enriquecer a alimentação humana e animal, além de ser fonte de nutrientes em cultivo de microrganismos (VENUGOPAL, 1994; MARTONE, *et al.*, 2003).

Na obtenção de HPP as enzimas de origem animal e vegetal podem ser utilizadas, porém as enzimas microbianas oferecem vantagens, como por exemplo, diversidade microbiológica, produção através de tecnologias baratas e possibilidade de otimização das condições de cultivo para um maior rendimento. Sendo assim, este estudo foi conduzido a fim de utilizar o resíduo do beneficiamento de pirarucu (*Arapaima gigas*) como substrato para produção de hidrolisado proteico, utilizando protease microbiana e a enzima comercial pancreatina.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O pescado, a nutrição e a produção de alimentos

O pescado é um importante alimento na nutrição humana, como fonte de proteínas, lipídios, vitaminas, minerais e componentes bioativos. A composição química do pescado varia entre as espécies, sendo composta principalmente por água, lipídios e proteínas. A água constitui cerca de 60 a 80% da porção comestível (GONÇALVES, 2011; SARTORI & AMANCIO, 2012).

Em comparação com alimentos de origem animal, os peixes contêm grandes quantidades de vitaminas, principalmente das lipossolúveis, em especial as vitaminas A e D, além de ser fonte de vitaminas do complexo B (vitamina hidrossolúvel). O pescado também é considerado uma excelente fonte de minerais, incluindo cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo (KIM, 2010; SARTORI & AMANCIO, 2012).

O teor de proteínas é praticamente o mesmo ao de outras carnes, como a de gado e frango, no entanto, a composição de aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, treonina, triptofano e valina) é balanceada e completa, com maior quantidade de lisina e metionina. A carne de peixe possui alta digestibilidade, devido à maior quantidade de proteínas miofibrilares do que aquelas do tecido conjuntivo (FOOD INGREDIENTS BRAZIL, 2009; MENEGASSI, 2011). Além disso, as proteínas do pescado apresentam propriedades funcionais como capacidade de retenção de água, gelificação, emulsificação, alta solubilidade e propriedades texturais (RUSTAD, 2010).

O perfil lipídico apresenta quantidades reduzidas de gorduras saturadas e elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), do tipo ômega-3, capazes de reduzir o risco de doenças crônicas. Os três ácidos graxos ômega-3 mais importantes para a dieta humana são: o eicosapentaenoico (EPA), docosaexaenoico (DHA) e o alfa-linolênico (ALA). Diversos fatores influenciam o conteúdo de lipídios no pescado, incluindo espécie, dieta, época do ano, temperatura da água e até a parte do corpo analisada, portanto os peixes podem ser classificados quanto ao teor de gordura, podendo ser magros quando apresentar teor de gordura menor que 2%, semigordos (2 a 4% de lipídios) e gordos (acima de 8%) (ACKMAN, 1989; GONÇALVES, 2011; MENEGASSI, 2011; SARTORI & AMANCIO, 2012).

A grande diversidade de peixes encontrada na Amazônia faz com que o peixe seja uma importante fonte de proteína animal nesta região, particularmente para as populações que habitam as margens dos rios e lagos, portanto o pescado além de ser importante na alimentação, também é uma fonte de emprego e renda. No Brasil, a produção de pesca

extrativa continental em 2011 foi de 249.600,2 t, onde a produção pesqueira no Estado do Amazonas é a mais expressiva da Região Norte, com 63.743,3 t, representando 40,3% do total capturado (GANDRA, 2010; CAMARGO & CAMARGO, 2012; MPA, 2013).

Em função da crescente busca por alimentos de maior qualidade nutricional, assim a indústria do pescado contribui para o fornecimento de uma grande variedade de produtos e subprodutos de pescado, os quais vão desde peixes inteiros, em postas, filetados, resfriados, congelados, enlatados, produtos secos e curados, óleos de peixe, até produtos prontos para o consumo (MENEGASSI, 2011; DEKKERS *et al.*, 2011).

No entanto, o processamento do pescado fornece mais do que alimentos nutritivos, gera também uma grande quantidade de resíduo, quase totalmente desperdiçado. Na matéria-prima descartada estão incluídos os peixes pouco comuns e de baixa aceitabilidade no mercado e as partes não utilizadas, representadas principalmente por cabeça, vísceras, escamas, espinhas e caudas. A cadeia produtiva do pescado produz mais de 60% de resíduos, os quais possuem elevado valor nutricional (MINOZZO *et al.*, 2008; DEKKERS *et al.*, 2011).

Esses resíduos sólidos podem gerar sérios problemas ambientais, além de proporcionar altos custos com o seu descarte. Portanto, o setor pesqueiro necessita de alternativas para gerenciar tais resíduos, a fim de evitar a poluição do meio ambiente, e como consequência, diversificar a linha de produtos com qualidade nutricional e agregar valor aos subprodutos do beneficiamento do pescado (FELTES *et al.*, 2010).

## 2.2. O pirarucu

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é um peixe amazônico com potencial de comercialização bastante valorizado nos mercados do norte do Brasil, sendo considerado o bacalhau da Amazônia devido a sua carne clara, magra, tenra, de alta qualidade nutricional e livre de espinhas intramusculares. Esta espécie íctia é a maior de água doce do mundo, podendo atingir 3,5 metros de comprimento e 250 quilos, tem ampla distribuição na Bacia Amazônica (Figura 1), com ocorrência registrada no Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia, Equador e Guiana, sendo o seu consumo um hábito tradicional e apresentando recente expansão para outras regiões (VERISSÍMO, 1895; UNCTAD, 2006; FAO, 2010; ITUASSÚ *et al.*, 2005; SEBRAE, 2013).

Desde 1975 o pirarucu esta na lista do anexo 2 do CITIES (Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestre Ameaçadas de Extinção), portanto a sua exploração deve ser estritamente regulamentada e controlada (CROSSA & OVIEDO, 2011). No Amazonas, o IBAMA autoriza a pesca do pirarucu, fora do período de defeso, por meio de

manejo sustentável para nove áreas (RESEX Baixo Juruá, RESEX do Rio Jutai, RDS Mamirauá, RDS Amanã, RESEX Auati Parana, RDS Mamirauá, Terra Indígena Acapuri, Rio Arari, Camaçari – Lago Preto) em distintos municípios do Estado (BESSA & LIMA, 2010).



**Figura 1** – Pirarucu (*Arapaima gigas*).  
Fonte: Crossa & Oviedo (2011).

A espécie também tem atraído a atenção dos criadores de peixe da região Amazônica, pois apresenta grande potencial para a piscicultura, devido as suas características zootécnicas positivas para a criação intensiva, como por exemplo: o rápido crescimento; a capacidade de realizar a respiração aérea, sem depender do oxigênio dissolvido na água; a fácil adaptação ao consumo de rações comerciais; a carne de alta qualidade; e alto rendimento de carcaça (OSTRENSKY *et al.*, 2008; FREITAS-JÚNIOR *et al.*, 2012; SEBRAE, 2013).

Em 2011, a produção brasileira de pirarucu na pesca extrativa continental foi de 1.262,4 t e da aquicultura continental de 1.137,1 t. No Amazonas, em 2013, o manejo do pirarucu rendeu a captura de 693,4 t, dividido entre a comercialização e subsistência de comunidades no interior do Amazonas. Do peixe normalmente é comercializado o filé fresco, congelado, seco-salgado e defumado. O beneficiamento do pirarucu gera uma grande quantidade de resíduos, por exemplo, cabeça, vísceras, nadadeiras, escamas, couro e carcaça. As escamas podem ser utilizadas para a produção de bijuterias, o couro apresenta potencial de uso na fabricação de bolsas, sapatos e acessórios, a língua pode ser utilizada como lima para ralar o guaraná, do fígado pode se extrair o óleo, o coração pode ser transformado em patê e a cabeça em ensilado para ração animal (CROSSA & OVIEDO, 2011; MPA, 2013; SDS, 2013).

A carcaça do pirarucu após a retirada das mantas é um resíduo pouco aproveitado (Figura 2), o qual contém carne com alto teor de proteína e outros nutrientes, inadequada para ser fileteada, mas que pode ser utilizada na produção de novos produtos alimentícios de interesse industrial. No entanto, há poucos relatos na literatura sobre o beneficiamento do pirarucu e aproveitamento dos resíduos na elaboração de derivados de subprodutos a fim de

diversificar a linha de produtos para agregar valor e evitar danos ao meio ambiente através do correto gerenciamento de resíduos sólidos.

Uma das alternativas é o aproveitamento das vísceras para o isolamento de enzimas. Freitas-Júnior *et al.* (2012) isolaram tripsina do cecos pilóricos do pirarucu, a enzima mostrou alta atividade e estabilidade em longa faixa de pH alcalino, termoestabilidade e atividade em concentrações elevadas de sal, tornando as vísceras do pirarucu fonte de tripsina digestiva com potencial para aplicações industriais.

Oliveira (2007) avaliou a qualidade do pirarucu proveniente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de seus produtos derivados, onde elaborou filés defumados a quente, filés salgado-secos, panceta e carpaccio de pirarucu. Carvalho (2001) produziu filé de pirarucu defumado a frio. No mais, a maioria dos estudos trata da genética, biologia, conservação e cultivo desta espécie.



**Figura 2** – Resíduo de pirarucu utilizado para produção de CMS.  
FONTE: PAIVA (2013).

### 2.3. Hidrolisado proteico de pescado

Hidrolisados proteicos são produtos constituídos por aminoácidos livres e peptídeos com diferentes massas moleculares resultantes do maior ou menor grau de hidrólise das proteínas que podem apresentar propriedades funcionais úteis para a indústria alimentícia assim como solubilidade, capacidade de retenção de água, emulsificação, formação de espuma e absorção de gordura (BATISTA, 2011).

Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por hidrólise química (ácida ou alcalina), por hidrólise enzimática ou pela combinação de dois ou mais destes métodos. A hidrólise enzimática possui algumas vantagens em relação aos outros métodos, como a especificidade da enzima com o substrato, o controle do grau de hidrólise, as condições

moderadas de ação e proporciona o aumento da liberação de peptídeos biologicamente ativos das proteínas (SPELLMAN *et al.*, 2003; ZAVAREZE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A escolha do substrato, a enzima proteolítica utilizada, o controle das condições como pH, temperatura, proporção enzima/substrato, tempo do processo e o grau de hidrólise afetam as propriedades físico-químicas do produto final (BENÍTEZ *et al.*, 2008; AMIZA *et al.*, 2013). Várias proteases são utilizadas para hidrolisar proteínas incluindo Alcalase, papaína, pepsina, tripsina, quimotripsina, pancreatina, flavourzyme, pronase, neutrase, protamex e bromelina (GALLA *et al.*, 2012).

O substrato utilizado pode ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Os vegetais mais utilizados são soja, trigo e arroz. As matérias-primas de origem animal podem ser resíduo de pescado, colágeno bovino, produtos cárneos e o soro do leite, também tem se aproveitado micro-organismos, tais como algas e *Saccharomyces cerevisiae* (PÉREZ *et al.*, 2001; AFONSO *et al.*, 2008; BENÍTEZ *et al.*, 2008; PINTO E SILVA & ATINZINGEN, 2010; ZIEGLER & SGARBIERI, 2009).

A produção de hidrolisado proteico de pescado (HPP) destaca-se como alternativa de aproveitamento de resíduos sólidos provenientes da indústria pesqueira, uma matéria-prima de alta qualidade biológica, gerando produtos que podem atingir um conteúdo proteico de até 90% com propriedades funcionais das proteínas do pescado intensificadas (BATISTA, 2011).

Os HPP possuem diversas aplicações na indústria farmacêutica e na alimentação humana e animal. Estes produtos podem ser empregados como ingredientes alimentares em suplementos de cereais, produtos de panificação, sopas e alimentos para crianças. Além disso, são utilizados na fabricação de alimentos especiais, para pessoas com alergia a proteínas, na suplementação dietética de idosos, na nutrição de esportistas e crianças prematuras, com gastroenterite, má-absorção e fenilcetonúria (AFONSO *et al.*, 2008; CARREIRA *et al.*, 2011). Na alimentação animal os HPP são utilizados principalmente em rações para peixes. Os HPP também têm sido aproveitados em meios de cultura para micro-organismos como alternativa às peptonas comerciais (BATISTA, 2011).

De acordo com Chalamaiah *et al.* (2012), hidrolisados proteicos foram elaborados a partir da carne de diferentes espécies (Tabela 1).

**Tabela 1** – Espécies de peixes utilizadas como matéria-prima para produção de HPP.

| <b>Espécie</b>                                                                                                     | <b>Referência</b>                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Salmo salar</i>                                                                                                 | Kristinsson & Rasco (2000)           |
| <i>Merluccius productus</i>                                                                                        | Pacheco-Aguilar <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Decapters maruadsi</i>                                                                                          | Thiansilakul <i>et al.</i> (2007)    |
| <i>Selaroides leptolepis</i>                                                                                       | Klompong <i>et al.</i> (2007)        |
| <i>Ctenopharyngodon idellus</i>                                                                                    | Ren <i>et al.</i> (2008)             |
| <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>                                                                                 | Dong <i>et al.</i> (2008)            |
| <i>Oreochromis niloticus</i>                                                                                       | Raghavan & Kristinsson (2008)        |
| <i>Pollachius virens</i>                                                                                           | Chabeaud, <i>et al.</i> (2009)       |
| <i>Salmo salar</i> ; <i>Onchorhynchus kisutch</i> ; <i>Theragra chalcogramma</i> ; <i>Micromesistius australis</i> | Nakajima <i>et al.</i> (2009)        |
| <i>Thunnus tonggol</i>                                                                                             | Hsu (2010)                           |
| <i>Mustelus mustelus</i>                                                                                           | Bougatef <i>et al.</i> (2009)        |
| <i>Channa striatus</i>                                                                                             | Ghassem <i>et al.</i> (2011)         |
| <i>Lepturacanthus savala</i> e <i>Sphyraena barracuda</i>                                                          | Rajaram & Nazeer (2010)              |
| <i>Nemipterus hexodon</i>                                                                                          | Nalinanon <i>et al.</i> (2011)       |
| <i>Nemipterus japonicus</i>                                                                                        | Naqash & Nazeer (2011)               |

Fonte: Chalamaiah *et al.* (2012)

A literatura relata diversas outras espécies de peixes, que a carne foi utilizada como substrato para a produção de hidrolisados proteicos de pescado (Tabela 2). No entanto, a elaboração de HPP de peixes amazônicos foi descrito apenas por Ferreira (2009) para as espécies *Potamorhina latior* (branquinha) e *Liposarcus pardalis* (acari-bodó), e por Moroni (2005) também para *L. pardalis*. Não há evidências de hidrolisado proteico produzido de carne de *Arapaima gigas* (pirarucu).

Na hidrólise das proteínas ocorre a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos, o número de ligações clivadas pode ser em maior ou menor número, levando à formação de peptídeos com diferentes massas moleculares (BATISTA, 2011). A quantidade de ligações peptídicas rompidas pode ser determinada através do Grau de hidrólise (%GH). Segundo Nielsen *et al.* (2001), o grau de hidrólise é a porcentagem de ligações peptídicas clivadas, determinada pela proporção da quantidade de ligações peptídicas hidrolisadas com o número total de ligações peptídicas existentes no substrato.

Juntamente com a escolha do substrato e da protease utilizada, o controle do grau de hidrólise pode afetar as propriedades físico-químicas do produto final, sendo possível produzir hidrolisados proteicos com diferentes graus de hidrólise e diferentes propriedades funcionais (KRISTINSSON, 2000; AMIZA *et al.*, 2013). Portanto, o %GH pode ser utilizado para comparar hidrolisados entre si, e quanto maior o seu valor, maior o rendimento de peptídeos de baixo peso molecular. De acordo com os estudos de Silva *et al.* (2009) e Schmidt & Salas Mellado (2009), o tipo da enzima, a proporção enzima/substrato e o tempo de hidrólise influenciam diretamente o grau de hidrólise das proteínas.

**Tabela 2** – Outras espécies íctias utilizadas para elaboração de HPP.

| <b>Espécie</b>                                     | <b>Referência</b>              |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Channa striatus</i> e <i>Labeo rohita</i>       | Galla <i>et al.</i> (2012)     |
| <i>Pangasius</i> sp.                               | Amiza <i>et al.</i> (2013)     |
| <i>Micromesistius poutassou</i>                    | Cudennec <i>et al.</i> (2012)  |
| <i>Collichthys niveatus</i>                        | Shen <i>et al.</i> (2012)      |
| <i>Otolithes ruber</i>                             | Nazeer <i>et al.</i> (2012)    |
| <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>                 | Nasri <i>et al.</i> (2012)     |
| <i>Gazza minuta</i>                                | Klomkao <i>et al.</i> (2012)   |
| <i>Mytilus edulis</i>                              | Wang <i>et al.</i> (2013)      |
| <i>Decapterus maruadsi</i> e <i>Loligo pealeii</i> | Srichanun <i>et al.</i> (2014) |
| <i>Engraulis japonicus</i>                         | Wu <i>et al.</i> (2012)        |
| <i>Sphyrna lewini</i>                              | Wang <i>et al.</i> (2012)      |
| <i>Salaria basilica</i>                            | Ktari <i>et al.</i> (2012)     |
| <i>Sardinella aurita</i>                           | Khaled <i>et al.</i> (2012)    |
| <i>Caranx ignobilis</i>                            | Nazeer & Kulandai (2012)       |
| <i>Sillago sihana</i>                              | Venkatesan e Nazeer (2014)     |
| <i>Mustelus griseus</i>                            | Li <i>et al.</i> (2013)        |
| <i>Paralichthys olivaceus</i>                      | Ko <i>et al.</i> (2013)        |
| <i>Barbus callensis</i>                            | Sila <i>et al.</i> (2014)      |
| <i>Lophius litulon</i>                             | Chi <i>et al.</i> (2014)       |
| <i>Decapterus maruadsi</i>                         | Jiang <i>et al.</i> (2014)     |

Existem vários métodos para determinar o %GH, incluindo, a técnica do pH-stat, osmometria, solubilidade em ácido tricloroacético (TCA), determinação de nitrogênioamino pelo método que utiliza ácido trinitobenzenosulfúrico (TNBS) e por titulação com formol (SCHMIDT, 2008). Para Wang & Wang (2001), a avaliação do %GH depende de três princípios: do teor de nitrogênio liberado pela hidrólise da proteína, na presença de um agente precipitante; da determinação de grupos amino livres e da titulação de prótons liberados.

#### 2.4. Proteases

As proteases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases, catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas, são conhecidas também como peptidases ou proteinases. Biologicamente a sua principal função é a hidrólise de proteínas, mas estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e no transporte de proteínas através da membrana (KOBBLITZ, 2008). As proteases são as enzimas mais utilizadas em todo o mundo, respondendo por 60% da produção mundial de enzimas (GUPTA *et al.*, 2002).

Proteínas são compostos poliméricos complexos, formados por moléculas orgânicas, e estão presentes em toda matéria viva. Quimicamente, as proteínas são compostos constituídos por aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas. O número e a sequência de aminoácidos, o tamanho da cadeia e a conformação molecular tridimensional são responsáveis pela diversidade de proteínas encontradas na natureza (IGUTI, 2007).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Internacional da União de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são classificadas no subgrupo 4 do grupo 3 das hidrolases. As proteases são grosseiramente subdivididas em dois grupos principais, isto é, exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu local de ação. Endopeptidases são proteases que iniciam a degradação das proteínas pela clivagem das ligações peptídicas internas, enquanto as exopeptidases degradam as cadeias de peptídios nas suas extremidades. As proteases são classificadas, com base no grupo funcional presente no sítio ativo, em quatro grupos: serino proteases, proteases aspárticas, cisteíno proteases e metalo proteases (HARTLEY, 1960; WARD, 1983; RAO *et al.*, 1998).

As proteases também são classificadas em relação à faixa de pH apresentando atividades ótimas em pH ácido, neutro ou alcalino (SANDHYA *et al.*, 2005). Proteases ácidas são as proteases aspárticas, oferecem uma variedade de aplicações nas indústrias de bebidas e alimentos (VISHWANATHA *et al.*, 2009). As proteases neutras são ativas em uma faixa estreita de pH, entre 7,0 e 8,0, e possuem baixa termotolerância (SEONG *et al.*, 2004). As proteases alcalinas são definidas como as proteases que são ativas em uma faixa de pH básico (GUPTA *et al.*, 2002).

Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, fatos que tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As proteases têm também uma variedade de aplicações, principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos (RAO *et al.*, 1998). Na tecnologia de alimentos, estas enzimas possuem uma ampla aplicação, por exemplo: clarificação da cerveja, amaciamento da carne, coagulação do leite, maturação acelerada de queijos, panificação, modificação de proteínas, síntese de aspartame (IGUTI, 2007).

Ainda de acordo com Iguti (2007), as proteases são produzidas por todos os seres vivos: animais, vegetais e micro-organismos. Entre as vegetais a papaína, a bromelina e a ficina estão entre as mais importantes. As de origem animal estão entre as enzimas mais estudadas devido ao seu interesse na área de saúde, as mais importantes comercialmente são as enzimas gástricas (renina e pepsina) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina).

No entanto, as enzimas microbianas oferecem vantagens, como por exemplo, ampla variedade de atividades catalíticas disponíveis, grande estabilidade para pH e temperatura,

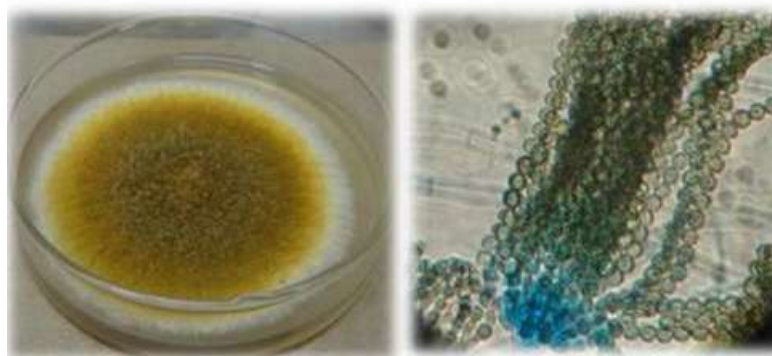
produção independente de variações sazonais; utilização de substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais; diversidade bioquímica; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo e através da manipulação genética das linhagens (RAO *et al.*, 1998; SCHIMID *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2009; CHALAMAIAH *et al.*, 2012).

Como as proteases são enzimas essenciais na fabricação de hidrolisados, pesquisas estão constantemente sendo realizadas objetivando a descoberta de novas fontes proteolíticas de maior eficiência. Uma alternativa para essa busca pode ser a diversidade microbiana, embora esses catalisadores biológicos sejam produzidos por animais e vegetais. Entre os micro-organismos, bactérias e fungos predominam na produção dessas enzimas. E entre os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. como fonte de proteases para uso na elaboração de hidrolisados já foram citados por Agrawal *et al.* (2004) e Silvestre *et al.*, (2012), respectivamente.

## 2.5. *Aspergillus flavo-furcatis*

*Aspergillus flavo-furcatis* Batista & Maia (Figura 3) trata-se de uma espécie anamórfica descrita como colonizador de intestino de morcego, fezes de aves, solo e associado a vegetais (ULOA *et al.*, 2006; YOUSSEF, 2009). É uma espécie classificada no grupo *flavus*, porém de acordo com a análise filogenética este fungo constitui o grupo *A. awamori* devido a sua similaridade genética com as espécies deste grupo (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Morfologicamente, quando observado sob microscópio óptico tem as seguintes características nos cultivos em ágar Czapek, apresenta vesícula na forma de frasco a globosa, medindo 20 a 40 µm de diâmetro ou de 15 a 50 µm, onde estão inseridas esterigmas dispostas em duas séries. As culturas, no mesmo meio de crescimento têm coloração amarelo amarronzado, conforme citado por Raper & Fennell (1977).



**Figura 3** – Características macro e micro-morfológica de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1493.

Fonte: Coleção DPUA (2012).

Linhagens de *A. flavo-furcatis* foram investigadas quanto a capacidade de produção de enzimas proteolíticas e todas as cepas demonstraram viabilidade de crescimento e produção de proteases, sendo considerada como fonte proteolítica microbiana, assim como descrito por Teixeira *et al.* (2012). No atual estudo esta espécie está sendo citada como produtora de protease e de forma inédita na produção de hidrolisado proteico de pescado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Utilizar o resíduo do beneficiamento de pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz 1822) como matéria-prima para a produção de hidrolisado proteico com protease do fungo *Apergillus flavo-furcatis* (DPUA 1493) e a enzima pancreatina.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar parcialmente o extrato enzimático bruto do fungo *Apergillus flavo-furcatis*;
- Obter carne mecanicamente separada (CMS) do resíduo do beneficiamento de pirarucu;
- Determinar a composição físico-química da CMS e dos hidrolisados proteicos de pirarucu;
- Avaliar o valor nutritivo dos hidrolisados proteicos de pirarucu pela determinação do perfil de aminoácidos e da digestibilidade *in vitro*.
- Analisar a qualidade microbiológica da CMS e dos hidrolisados proteicos de pirarucu;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção da carne mecanicamente separada

A matéria-prima utilizada nesta pesquisa foi o resíduo do beneficiamento do pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz, 1822), proveniente da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, município de Maraã, Amazonas, Brasil. A carcaça proveniente do abate do pirarucu foi considerada resíduo, a qual mesmo após o fileteamento ainda contém uma quantidade de carne, que não pode mais ser aproveitada para a elaboração de filés. As carcaças foram transportadas em caixas de isopor, entre camadas de gelo até o laboratório de Tecnologia de Pescado, da Coordenação de Tecnologia e Inovação, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

Em laboratório procedeu-se a preparação da matéria-prima pela retirada dos restos de vísceras e lavagem em água corrente. Em seguida, as carcaças foram cortadas em partes menores e processadas em máquina separadora de espinhas (BAADER 694, Lübeck, Alemanha), para obtenção de carne mecanicamente separada de pirarucu (CMSP). As amostras foram armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### 4.2. Enzimas

A hidrólise enzimática foi realizada com duas proteases, uma pancreatina comercial (LabMaster Ltda, Pinhais, Brasil) de origem animal, com atividade enzimática de  $186,36 \pm 0,20$  U/mL, e um complexo de proteases de origem microbiana, produzido por uma linhagem de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1493, da DPUA, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

As proteases da espécie de *Aspergillus* foram cedidas do Projeto de Pesquisa “Linhagens amazônicas de *Aspergillus flavo-furcatis*: produção de protease com atividade coagulante em matriz sólida”. Desse extrato bruto foi retirado volume equivalente a 80 mL para liofilização (Liofilizador, marca Terroni, modelo Enterprise II) por 20 horas, conforme especificações do fabricante. Para determinação da atividade proteolítica foram preparadas soluções aquosas a 1% (p/v) das enzimas.

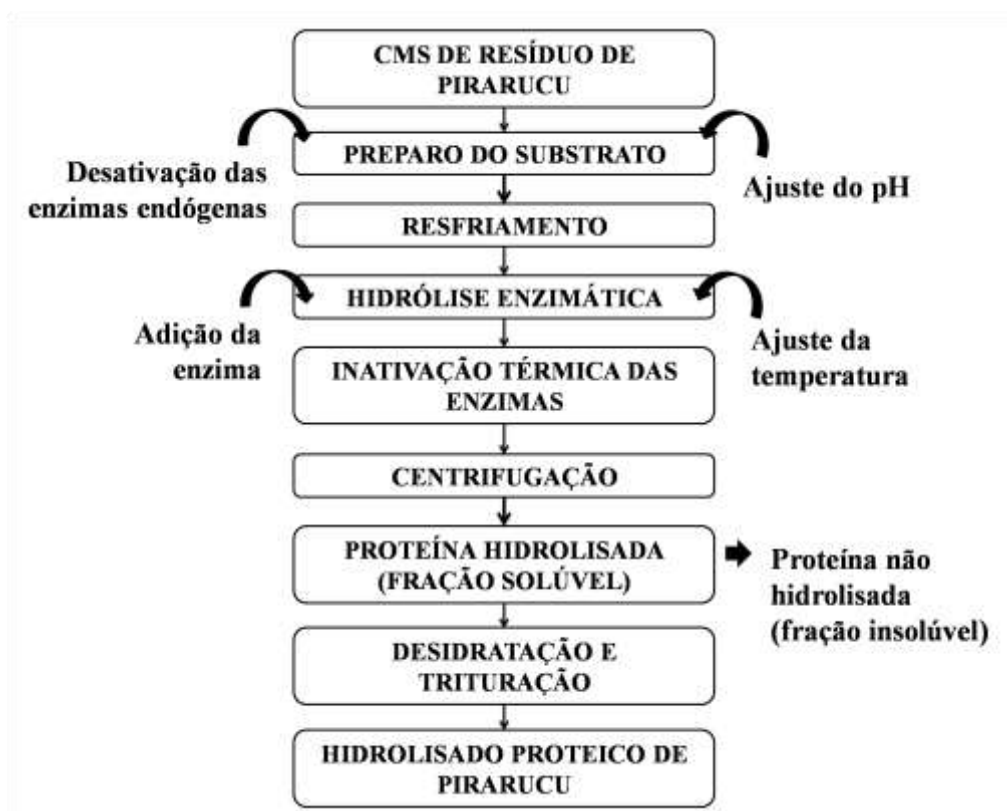
### 4.3. Caracterização parcial das proteases de *A. flavo-furcatis*

A atividade proteolítica foi determinada, em triplicata, a  $25^{\circ}\text{C}$ , utilizando como substrato azocaseína (Sigma, St. Luis, MO USA) a 1,0% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de

produzir um aumento na absorbância de 0,1 em uma hora (KIRSCH *et al.*, 2012). O efeito do pH na atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 3,0 a 10,0 em tampão Citrato-Fosfato 0,1 M, a 25 °C, e o efeito da temperatura foi determinado na faixa de 25 a 70° C no pH ótimo de atividade (FONSECA *et al.*, 2014).

#### 4.4. Elaboração do hidrolisado proteico

A elaboração do hidrolisado proteico de pirarucu foi realizada de acordo com Moroni (2005) Figura 4.



**Figura 4** – Fluxograma de elaboração do hidrolisado proteico de pirarucu.

Para a obtenção do hidrolisado proteico, a CMSP foi pesada, adicionada em frascos de vidro e homogeneizada com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na proporção 5:1 (tampão/substrato). Para desativar as enzimas endógenas, a amostra foi submetida a 90°C durante 15 minutos, em seguida, resfriada em banho de gelo. As enzimas foram adicionadas, separadamente, na proporção enzima/substrato de 1:100 e a hidrólise enzimática foi realizada em incubadora de bancada, shaker com agitação orbital (CT712 Nova Técnica) sob agitação constante de 110 rpm durante 4 horas, mantendo-se a temperatura controlada (Tabela 3). Após esse período, a hidrólise foi paralisada por aquecimento, a 90°C, durante 15 minutos. A proteína solúvel foi separada da proteína insolúvel por centrifugação (8.000 x g), em

centrífuga refrigerada (Nova técnica) durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desidratado a 60 °C em estufa com circulação de ar forçada (Desidratador PE14 Junior PARDAL), durante 12 horas.

**Tabela 3** – Condições de atuação das enzimas.

| Enzimas                                        | Condições        |         |                        |     |
|------------------------------------------------|------------------|---------|------------------------|-----|
|                                                | Temperatura (°C) | [E]:[S] | Tempo de hidrólise (h) | pH  |
| Pancreatina comercial                          | 40 °C            | 1:100   | 4                      | 7,0 |
| Proteases de <i>Aspergillus flavo-furcatis</i> | 50 °C            | 1:100   | 4                      | 7,0 |

[E]:[S] = Relação enzima:substrato (m/m).

#### 4.5. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado segundo método descrito por Amiza *et al.* (2013) adaptado. A hidrólise foi paralisada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10%, a amostra foi mantida em repouso durante 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 8.000 x g, 4°C, em centrífuga refrigerada (Nova técnica), e do sobrenadante obtido, as proteínas foram quantificadas pelo método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 2000). O grau de hidrólise foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\%GH = \frac{(CP_i - CP_f)}{P_t} \times 100$$

Onde:  $CP_f$  = Concentração de proteínas solúveis em TCA 10% após a hidrólise, em g/100g;  $CP_i$  = Concentração de proteínas solúveis em TCA 10% do controle, antes da hidrólise, em g/100g;  $P_t$  = Proteína total do substrato determinada por micro Kjeldhal (N x 6,25), em g/100g.

#### 4.6. Composição físico-química

A matéria-prima (CMSP) e os hidrolisados proteicos do resíduo de pirarucu foram caracterizados quanto sua composição química centesimal, através da determinação dos teores de: proteínas pelo método de micro-Kjeldahl (N x 6,25), lipídios por extração direta em Soxhlet, cinzas por meio da obtenção de resíduo por incineração a 550 °C e umidade através de perda por dessecação a 105 °C. O pH da CMSP foi medido com pHmetro de bancada (QUIMIS). Todas as análises foram realizadas de acordo com a AOAC (2000).

#### 4.7. Composição de aminoácidos

A matéria-prima e os hidrolisados proteicos de pirarucu foram submetidos a análise cromatográfica para a determinação do perfil de aminoácidos, realizada segundo metodologia

proposta por White *et al* (1986). O triptofano foi quantificado segundo Spies (1967) por digestão alcalina com NaOH 5N.

#### 4.8. Determinação da digestibilidade *in vitro*

A avaliação nutricional dos hidrolisados foi realizada por digestibilidade *in vitro*, de acordo com o método proposto por Sgarbieri (1996) modificado. Inicialmente foi pesada uma quantidade de amostra que contivesse o equivalente de 0,5 g de proteína, adicionou-se 15 mL de uma solução de HCl 0,1M contendo 22,5 mg de pepsina, em seguida foi adicionado 2,0 mL de solução de merthiolate incolor e mantido em shaker com agitação orbital (CT712 Nova Técnica) sob agitação constante de 110 rpm por 3 horas a 37°C. Decorrido este tempo os frascos contendo as amostras foram resfriados e o pH da solução ajustado para 8,0 com uma solução de NaOH 0,2N, utilizando um pHmetro de bancada (QUIMIS).

Ao produto hidrolisado pela pepsina adicionou-se 10 mL de tampão fosfato pH 8,0 contendo 5 mg de pancreatina e manteve-se novamente sob agitação constante de 110 rpm a 37 °C durante 24 horas. Após o tempo de hidrólise foi adicionado 5mL de uma solução de TCA 10% e o sobrenadante foi recolhido após centrifugação por 15 minutos a 8.000 x *g*, para posterior determinação do nitrogênio digerido pelo método de micro-Kjeldhal de acordo com a AOAC (2000). A digestibilidade *in vitro* foi expressa como porcentagem de nitrogênio digerido do hidrolisado proteico de pirarucu em relação ao nitrogênio total do hidrolisado proteico de pirarucu, conforme a Equação 2:

$$Digestibilidade(\%) = \frac{Nd}{Nt} \times 100$$

Onde: *Nd* = nitrogênio digerido do hidrolisado proteico de pirarucu, em g/100g; *Nt* = nitrogênio total do hidrolisado proteico de pirarucu, em g/100g.

#### 4.9. Avaliação microbiológica

Para verificar o nível de contaminação da matéria-prima, a CMS de pirarucu foi submetida à avaliação microbiológica, através da análise de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., coliformes a 45 °C, bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, conforme a Instrução Normativa 62/2003 (BRASIL, 2003). A fim de verificar se o processo de produção contribui para a redução da carga microbiana da matéria-prima, as mesmas análises foram feitas para os hidrolisados proteicos de pirarucu. Todas as análises foram

realizadas em triplicata e os resultados comparados com os padrões microbiológicos descritos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Padrões microbiológicos para pescado *in natura* e subproduto de pescado seco.

| Micro-organismos avaliados                                           | Padrões permitidos       |                            |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                                                                      | Pescado <i>in natura</i> | Subproduto de pescado seco |
| <i>Salmonella</i> sp./25g <sup>1</sup>                               | Ausente                  | Ausente                    |
| Coliformes termotolerantes 45°C <sup>1</sup> (NMP/g)                 | 10 <sup>2</sup>          | 10 <sup>2</sup>            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva <sup>1</sup> (UFC/g) | 10 <sup>3</sup>          | 5x10 <sup>2</sup>          |
| Bactérias aeróbias mesófilas <sup>2</sup> (UFC/g)                    | 10 <sup>6</sup>          | 10 <sup>6</sup>            |
| Bolores e leveduras <sup>3</sup> (UFC/g)                             | 10 <sup>6</sup>          | 10 <sup>6</sup>            |

<sup>1</sup>Padrões estabelecidos pela RDC n° 12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001); <sup>2</sup>Padrões estabelecidos pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMS, 1983); <sup>3</sup>Valores descritos por Manske *et al.* (2011).

#### 4.9.1. Diluição da amostra

Para as análises microbiológicas 25 g das amostras foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada durante 2 minutos e desta solução foram preparadas diluições seriadas até 10<sup>-3</sup> em tubos de ensaio contendo água peptonada estéril.

#### 4.9.2. Contagem de Coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*

De cada diluição preparada (item 4.9.1) foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas em séries de três tubos, contendo 9 mL de caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) e um tubo de Duhran invertido para determinação presuntiva de coliformes totais. Os tubos foram incubados a 35°C durante 24-48 h e a partir da observação de crescimento e produção de gás foram realizados testes confirmativos para coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) a 35 °C por 24-48 horas e coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia®, Mumbai-India) a 45°C por 24 horas. Os valores de NMP.g<sup>-1</sup> foram calculados.

A partir da observação da produção de gás foi realizada a confirmação de *E. coli*. Para tanto, uma alíquota deste meio de cultivo foi retirada com auxílio de uma alça de platina e semeada em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas.

#### 4.9.3. Contagem direta de *Salmonella* sp.

Para detecção de *Salmonella* sp. foi utilizado o procedimento descrito no item 4.9.1 e 4.10.2. A partir da confirmação de coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) da leitura positiva uma alíquota deste meio de cultivo foi retirada com auxílio

de uma alça de platina e semeada em ágar Verde Brilhante – VB (Himedia®, Mumbai-India). As placas foram mantidas a 35 °C por 24 horas e as colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos.

#### **4.9.4. Contagem direta de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva**

De cada diluição preparada (conforme item 4.9.1) foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e transferidas para placas de Petri contendo ágar Manitol Salgado fundido, as placas foram incubadas a 37 °C por 24/48 hora e em seguida, as colônias fermentadoras de manitol foram contadas. Para a confirmação de *S. aureus* coagulase positiva foram selecionadas 3 colônias típicas e outras 3 atípicas e transferidas para tubos contendo 2 mL caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI). Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas e em seguida alíquotas de 0,3 mL deste meio de cultivo foram retirados e adicionados a 0,3 mL de plasma de coelho em tubos de ensaio. O resultado foi considerado positivo quando após 6 horas de incubação a 37 °C houve formação de coágulos.

#### **4.9.5. Contagem de Bolores e Leveduras**

De cada diluição preparada (conforme item 4.9.1) foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e transferidas para placas de Petri contendo ágar batata glicose 2% acidificado a pH 3,5. Com o auxílio de alça de Drigalski o inóculo foi espalhado cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas, sem inverter, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 5 a 7 dias, em incubadora tipo B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio). O número de microrganismos presentes foi expresso em UFC/g de produto.

#### **4.10. Análise estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico Minitab, versão 16.0. Todos os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), para comparação entre as médias.

## CAPÍTULO 1

**Produção de hidrolisado proteico de pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz, 1822) com uma nova protease de *Aspergillus flavo furcatis* e pancreatina**

Artigo científico submetido para publicação à Revista Pesquisa Agropecuário Tropical (PAT), seguindo as normas da mesma.



PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE PIRARUCU (*Arapaima gigas* SCHINZ 1822) COM UMA NOVA PROTEASE DE *Aspergillus flavo-furcatis* E PANCREATINA

RESUMO

O beneficiamento do pirarucu (*Arapaima gigas*) gera uma grande quantidade de resíduos que pode ser aproveitada para elaboração de novos produtos de interesse industrial. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de hidrolisado proteico a partir de resíduo de pirarucu, utilizando proteases comercial e de *Aspergillus flavo-furcatis*. A matéria-prima utilizada foi carne mecanicamente separada de carcaças de pirarucu (CMSP). O processo foi conduzido sob agitação, tempo e temperatura controlados. A CMSP e os hidrolisados foram submetidos à análise de composição química e qualidade microbiológica. Desses experimentos foram desenvolvidos dois produtos, o hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima comercial (HPPEC) e outro preparado com a enzima microbiana (HPPEM), os quais foram caracterizados quanto ao grau de hidrólise, digestibilidade e perfil de aminoácidos. Os resultados mostraram que no HPPEC o teor proteico foi de 73,47%, significativamente superior ao do HPPEM (58,03%), todavia nos dois produtos foram observados altos valores de digestibilidade, ausência de contaminantes microbianos e redução no conteúdo de lipídios. O aminograma demonstrou nos dois produtos a presença de todos os aminoácidos essenciais. Entre as enzimas utilizadas, a pancreatina teve maior eficiência hidrolítica, porém aos maiores níveis de digestibilidade, teor de hidroxiprolina e taurina foram determinados no produto final desenvolvido com as enzimas de *A. flavo-furcatis*.

Palavras-chave: hidrolisado proteico de pescado; *Arapaima gigas*; proteases; *Aspergillus* sp.

PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYZATE OF PIRARUCU (*Arapaima gigas* SCHINZ 1822) WITH A NEW *Aspergillus flavo-furcatis* PROTEASE AND PANCREATIN

## ABSTRACT

The processing of pirarucu (*Arapaima gigas*) generates a lot of waste that can be reused for development of new products of industrial interest. The aim of this study was to evaluate the production of protein hydrolyzate from pirarucu waste using pancreatin and *Aspergillus flavo-furcatis* proteases. The raw material was minced fish of pirarucu originated from Mamirauá Sustainable Development Reserve, State of Amazon. The process was conducted under constant agitation and controlled time and temperature. The minced fish and the hydrolysates were analyzed for chemical composition and microbiological quality. From these experiments two products were developed: an pirarucu protein hydrolyzate obtained of commercial enzyme (HPPEC) and another one prepared with microbial enzyme (HPPEM). The hydrolysates were analyzed for degree of hydrolysis, digestibility and amino acids profile. The results showed that the protein content in HPPEC (73.47 %) was significantly higher than HPPEM (58.03 %), however, in both products, were observed high values of digestibility, absence of microbial contaminants and reduction of lipid content. The aminogram showed the presence of all essential amino acids in both products. Among the enzymes used, pancreatin had higher hydrolytic efficiency, but the higher levels of digestibility, hydroxyproline content and taurine were determined in the final product developed with *A. flavo-furcatis* enzymes.

Keywords: fish protein hydrolyzate; *Arapaima gigas*; proteases; *Aspergillus* sp.

## INTRODUÇÃO

O pirarucu (*A. gigas*), conhecido popularmente como o Gigante da Amazônia, tem vasta distribuição na Bacia Amazônica, sendo o maior peixe de escama de água doce do mundo. Nessa região seu consumo é um hábito tradicional e tem-se expandido para outras regiões, devido o sabor de sua carne, valor nutritivo e comercial (FAO 2010; UNCTAD 2006).

Desde 1975 o pirarucu entrou na lista dos animais silvestres ameaçados de extinção, portanto a sua exploração deve ser estritamente regulamentada e controlada (Crossa & Oviedo 2011). No Amazonas, o IBAMA autoriza a pesca de pirarucu por meio de manejo sustentável para nove áreas (RESEX Baixo Juruá, RESEX do Rio Jutai, RDS Mamirauá, RDS Amanã, RESEX Auati Parana, RDS Mamirauá, Terra Indígena Acapuri, Rio Arari, Camaçari – Lago Preto) em distintos municípios do Estado (Bessa & Lima 2010).

Em 2013, o manejo do pirarucu rendeu a captura de 693,4 toneladas, dividido entre a comercialização e subsistência de comunidades no interior do Amazonas (SDS 2013). O peixe é comercializado na forma de manta fresca, congelada, seco-salgada e defumada. Por ser um peixe de grande porte e pela sua crescente comercialização, o beneficiamento do pirarucu gera uma quantidade considerável de resíduo, incluindo cabeça, vísceras, nadadeiras, escamas, carcaça e couro, os quais são considerados subprodutos e podem agregar valor à produção (Crossa & Oviedo 2011; Freitas-Júnior *et al.* 2012).

Uma forma de aproveitar o resíduo do processamento industrial e evitar a poluição ambiental é a hidrólise enzimática, pois proporciona a recuperação da proteína e resulta na produção de hidrolisado proteico de pescado (HPP), que pode apresentar elevada digestibilidade, melhores propriedades físico-químicas, funcionais e nutricionais, além de aumentar a liberação de peptídeos biologicamente ativos (Nguyen *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2014). Os hidrolisados proteicos são utilizados como fonte de pequenos peptídios e aminoácidos, podendo enriquecer a alimentação humana e animal, além de ser fonte de nutrientes em cultivo de micro-organismos.

As enzimas de origem fúngica têm sido muito utilizadas, devido às suas propriedades bioquímicas, fáceis condições de cultivo e possibilidade de manipulação genética das linhagens. Várias espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas seguras e potentes produtores de proteases com atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura (Rodart *et al.*

2011; Sandhya *et al.* 2005; Upadhyay *et al.* 2010). O objetivo deste estudo foi utilizar o resíduo do beneficiamento de pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz 1822) como fonte proteica para produção enzimática de hidrolisado proteico, utilizando proteases do fungo *Aspergillus flavo-furcatis* e a enzima pancreatina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-prima

Dez carcaças de pirarucu (*A. gigas*) provenientes da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, município de Maraã, Amazonas, Brasil, foram lavadas, cortadas em partes menores e processadas em máquina separadora de espinhas (BAADER 694, Lübeck, Alemanha) para obtenção da carne mecanicamente separada de pirarucu (CMSP).

### Enzimas

A hidrólise enzimática foi realizada com pancreatina (LabMaster Ltda, Pinhais, Brasil) e com proteases produzidas por uma linhagem de *Aspergillus flavo-furcatis*, da Micoteca DPUA, da Universidade Federal do Amazonas. Para determinação da atividade proteolítica foi preparada solução aquosa a 1% (p/v) do extrato bruto liofilizado.

### Caracterização parcial das proteases de *Aspergillus flavo-furcatis*

A atividade proteolítica foi determinada, em triplicata, a 25 °C, utilizando como substrato azocaseína (Sigma, St. Luis, MO USA) a 1,0% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 em uma hora (Kirsch *et al.* 2012). O efeito do pH foi avaliado na faixa de 3,0 a 10,0 em tampão Citrato-Fosfato 0,1 M, a 25 °C, e o efeito da temperatura na faixa de 25 a 70 °C no pH ótimo de atividade (Fonseca *et al.* 2014).

### Produção dos hidrolisados proteicos

O hidrolisado proteico de pirarucu foi preparado de acordo com o método descrito por Moroni (2005) adaptado, utilizando a CMSP como substrato e as enzimas pancreatina comercial e as proteases de *A. flavo-furcatis* separadamente.

### Caracterização dos hidrolisados proteicos de pirarucu

O grau de hidrólise (%GH) foi determinado segundo método descrito por Amiza *et al.* (2013) adaptado, e calculado de acordo com a Equação 1:

$$\%GH = \frac{(Proteínas\ solúveis\ depois\ da\ Hidrólise - Proteínas\ solúveis\ antes\ da\ Hidrólise)}{Proteína\ bruta\ do\ substrato} \times 100 \quad (1)$$

A CMSP e os hidrolisados proteicos foram caracterizados quanto à composição de proteínas, lipídios, cinzas e umidade, todas as análises foram realizadas de acordo com a AOAC (2000). O pH da CMSP foi medido com pHmetro de bancada (QUIMIS). A CMSP e os hidrolisados foram submetidos à avaliação microbiológica, através da análise de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., coliformes a 45 °C, bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, conforme a Instrução Normativa 62/2003 (Brasil 2003).

A qualidade nutricional dos hidrolisados foi avaliada através da determinação da digestibilidade *in vitro* e do perfil de aminoácidos. Para determinar a composição de aminoácidos totais foi realizada análise cromatográfica segundo metodologia proposta por White *et al.* (1986). O triptofano foi quantificado segundo Spies (1967) por digestão alcalina. A digestibilidade *in vitro* foi apurada de acordo com Sgarbieri (1996) adaptado, utilizando pepsina (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.) e pancreatina (LabMaster Ltda, Pinhais, Brasil), em seguida, foi expressa como porcentagem conforme a Equação 2.

$$Digestibilidade(\%) = \frac{N\ digerido\ do\ HPP}{N\ total\ do\ HPP} \times 100 \quad (2)$$

### Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), para comparação entre as médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização parcial das proteases de *Aspergillus flavo-furcatis*

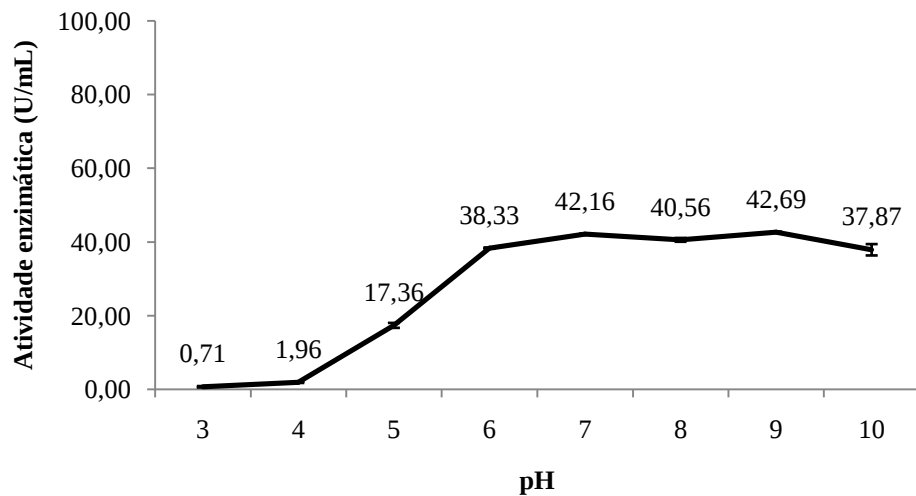
Uma variedade de micro-organismos é conhecida como fonte de proteases, entre esses, muitas espécies de *Aspergillus* são considerados como seguros e potentes produtores dessas enzimas. Proteases, representam cerca de 65% do mercado global, frequentemente utilizadas como aditivo de detergente, melhoramento de couro e fabricação de produtos farmacêuticos. Na indústria de alimentos são usadas na produção de hidrolisado de proteínas, molho de soja, ou em panificação e fabricação de produtos lácteos (Radha *et al.* 2011; Yin *et al.* 2013).

No extrato bruto liofilizado de *A. flavo-furcatis* (Figura 1), a atividade proteolítica foi  $31,20 \pm 0,13$  U/mL, utilizando azocaseína como substrato. Quando foi avaliado o efeito do pH na atividade, as proteases foram ativas na faixa de pH testada (pH 3,0 a 10,0), resultado que revela a presença de proteases ácidas, neutras e alcalinas, sendo que as fortemente ácidas representadas em valor reduzido, com exceção das levemente ácidas (pH 6,0) que demonstraram 38,36 U/mL.

Yin *et al.* (2013) cita que as enzimas ácidas são frequentemente usadas na produção de hidrolisado proteico. As neutras reduzem o amargor das proteínas hidrolisadas nos alimentos devido a ação de hidrólise em aminoácidos hidrofóbicos restritos ao pH neutro (Sandhya *et al.* 2005), característica que proporciona a viabilidade do uso das proteases de *A. flavo-furcatis* na produção de hidrolisados proteicos.

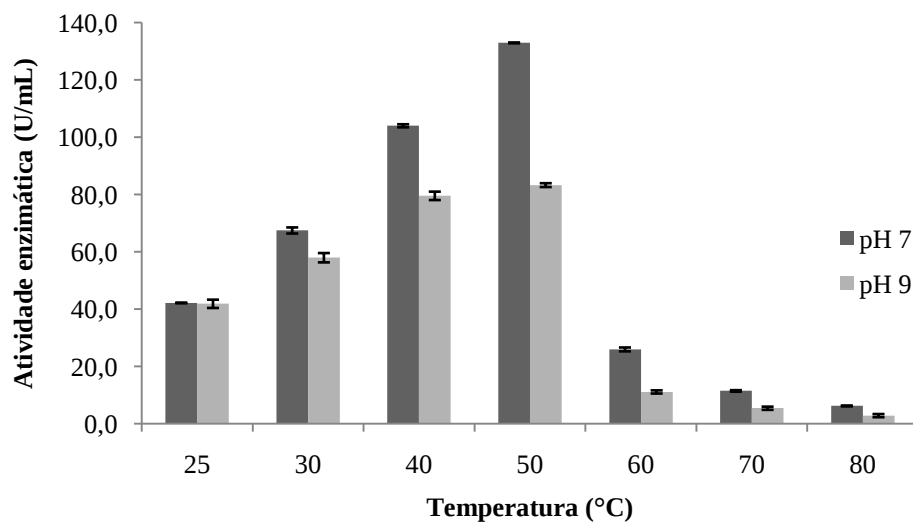
Na condição de análise, o pH de atividade ótima das proteases de *A. flavo-furcatis* foi determinado em pH 7,0 e 9,0, com atividade de  $42,16 \pm 0,04$  U/mL e  $42,69 \pm 0,10$  U/mL, respectivamente. Estudos com outras espécies de *Aspergillus*, relataram resultados similares aos determinados neste estudo, cujo pH ótimo variou entre 7 e 9 (Choulhary 2012; Kranthi *et al.* 2012).

Figura 1 – Efeito do pH sobre a atividade das proteases de *A. flavo-furcatis*.



A temperatura de atividade ótima foi determinada em pH 7,0 e 9,0, na faixa de 25 a 80 °C (Figura 2). Nessas condições de análise, a atividade das proteases foi observada em todas as temperaturas avaliadas, todavia a máxima atividade foi determinada a 50°C ( $132,93 \pm 0,13$ ) em pH 7,0. Resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram encontrados por Anitha & Palanivelu (2013) para *A. parasiticus*.

Figura 2 – Efeito da temperatura sobre a atividade das proteases de *A. flavo-furcatis*.



#### Composição físico-química da matéria-prima

O pH da CMSP foi 6,80, próximo aos valores encontrados por Jesus *et al.* (2003) para CMS de outros peixes amazônicos. Este resultado indica que a matéria-prima encontra-se na

faixa normal de qualidade para esse parâmetro, demonstrando bom estado de conservação, visto que a legislação vigente no Brasil estabelece uma faixa de pH que varia de 6,5 a 6,8 para o pescado fresco (Brasil 1952).

A Tabela 1 revela os valores inéditos para a composição química centesimal da CMSP na base úmida (BU), visto que não há relatos na literatura científica sobre CMS de pirarucu. O teor de umidade encontrado para a CMSP foi de 73,79%, dentro do intervalo de valores relatados por Souza *et al.* (2013) para CMS das espécies dos peixes amazônicos aracu, jaraqui e mapará.

Tabela 1 – Composição centesimal da carne mecanicamente separada de pirarucu (Bu).

| Parâmetro (%) | CMSP <sup>1</sup> |
|---------------|-------------------|
| Umidade       | 73,79 ± 1,64      |
| Proteínas     | 15,63 ± 0,16      |
| Lipídios      | 8,96 ± 0,03       |
| Cinzas        | 0,84 ± 0,04       |

Cada valor representa a média da triplicata e o desvio padrão;

<sup>1</sup>CMSP=carne mecanicamente separada de pirarucu.

O conteúdo de proteína bruta determinado para a matéria-prima foi 15,63%. Bordignon *et al.* (2010), em seu estudo registrou para CMS de tilápia um quantitativo de proteínas equivalente 14,63%. O teor de cinzas da CMSP foi 0,84%. Resultados similares foram encontrados por Cabral *et al.* (2012) para CMS de tilápia com diferentes tratamentos, os quais variaram de 0,44 a 1,00% de cinzas. A quantidade de lipídios na CMSP foi elevada (8,96%), o alto conteúdo lipídico pode ser devido a CMSP ter sido produzida do músculo encontrado próximo a carcaça, onde há maior quantidade de lipídios (Bordignon *et al.* 2010).

#### Composição química dos hidrolisados proteicos de pirarucu

Ao término do processamento da CMSP como matéria-prima, foram obtidos dois hidrolisados proteicos, um proveniente da hidrólise com as proteases de *Aspergillus flavo-furcatis* (HPPEM) e outro obtido com a pancreatina comercial (HPPEC). A Tabela 2 mostra a composição química dos hidrolisados proteicos de pirarucu e CMSP na base seca (BS).

O teor proteico variou entre os hidrolisados, o HPPEC apresentou 71,30% de proteínas, valor significativamente superior em relação ao HPPEM (57,25%). Os resultados deste estudo se assemelham aos de outras pesquisas, que mostraram variação de 37,7 a 97,57% de proteínas em hidrolisados proteico de pescado (Chalamaiah *et al.* 2012).

A hidrólise com a pancreatina favoreceu o aumento do conteúdo de proteínas e redução do teor de lipídios quando comparado à CMSP, com o uso da protease de *A. flavo-furcatis* observou-se redução do teor proteico e também lipídico, em relação à CMSP (Tabela 2). No entanto, Neves *et al.* (2004) ao utilizar pepsina, bromelina e quimotripsina obtiveram hidrolisados com teores proteicos inferiores ao da matéria-prima, devido a proteína não hidrolisada (proteína insolúvel).

Tabela 2 – Composição química dos hidrolisados proteico de pirarucu e da CMSP (BS).

| Parâmetro (%) | CMSP <sup>1</sup>         | HPPEM <sup>2</sup>        | HPPEC <sup>3</sup>        |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Proteínas     | 59,38 <sup>b</sup> ± 0,52 | 57,25 <sup>b</sup> ± 2,02 | 71,30 <sup>a</sup> ± 3,66 |
| Lipídios      | 34,21 <sup>a</sup> ± 0,12 | 0,57 <sup>b</sup> ± 0,04  | 0,34 <sup>c</sup> ± 0,03  |
| Cinzas        | 3,20 <sup>c</sup> ± 0,14  | 33,55 <sup>a</sup> ± 0,95 | 19,16 <sup>b</sup> ± 0,00 |

Cada valor representa a média da triplicata com desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>CMSP = carne mecanicamente separada de pirarucu; <sup>2</sup>HPPEM = hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima microbiana; <sup>3</sup>HPPEC = hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima comercial;

A redução do teor de lipídios nos hidrolisados pode ser observado devido à maior parte dos lipídios ser descartada juntamente com as proteínas não hidrolisadas no processo de centrifugação para obtenção das proteínas solúveis (Nilsang *et al.* 2005). O baixo teor de lipídios encontrado nos hidrolisados é favorável em relação à oxidação lipídica e à estabilidade do produto durante o armazenamento (Zavareze *et al.* 2009).

Neste estudo o teor de cinzas sofreu elevação de 3,20% (BS) na CMSP para 33,55% no HPPEM, e 19,16% no HPPEC. De acordo com Zavareze *et al.* (2009), o aumento no conteúdo de cinzas em hidrolisados proteicos é normal, em decorrência dos sais presentes nos tampões utilizados para manter o pH durante a hidrólise enzimática.

#### Análise microbiológica

Na legislação brasileira vigente (Brasil, 2001) não há padrões microbiológicos estabelecidos para carne mecanicamente separada (CMS) e nem para hidrolisados proteicos de pescado, no entanto os resultados obtidos foram inferiores aos exigidos para pescado *in natura* e para subprodutos de pescado secos (Tabela 3).

Na CMSP não foi encontrado a presença de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, bolores e leveduras. Foram encontradas bactérias aeróbias mesófilas e coliformes termotolerantes, porém os valores ficaram abaixo dos limites utilizados como padrão. Apesar da baixa quantidade, a presença desses microrganismos pode revelar a ocorrência de deficiências no processamento da CMSP. No entanto, após o preparo dos hidrolisados houve ausência na carga microbiana em comparação à matéria prima, isto pode ser atribuído ao tratamento térmico empregado durante a obtenção dos hidrolisados, seguido de resfriamento, o que pode ter funcionado como uma pasteurização, eliminando de maneira eficaz os microrganismos existentes na CMSP (Veit *et al.* 2013). Portanto, HPPEM e HPPEC foram considerados alimentos seguros para o consumo humano e animal.

Tabela 3 – Qualidade microbiológica da CMS e dos hidrolisados proteicos de pirarucu.

| Micro-organismo avaliados                                            | Padrões permitidos       |                            | Substrato e produtos |                    |                    |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
|                                                                      | Pescado <i>in natura</i> | Subproduto de pescado seco | CMSP <sup>1</sup>    | HPPEM <sup>2</sup> | HPPEC <sup>3</sup> |
| <i>Salmonella</i> sp./25g <sup>4</sup>                               | Ausente                  | Ausente                    | Ausente              | Ausente            | Ausente            |
| Coliformes termotolerantes 45°C (NMP/g) <sup>4</sup>                 | 10 <sup>2</sup>          | 10 <sup>2</sup>            | <10 <sup>2</sup>     | Ausente            | Ausente            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva (UFC/g) <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup>          | 5x10 <sup>2</sup>          | Ausente              | Ausente            | Ausente            |
| Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g) <sup>5</sup>                    | 10 <sup>6</sup>          | 10 <sup>6</sup>            | 2,4x10 <sup>5</sup>  | Ausente            | Ausente            |
| Bolores e leveduras (UFC/g) <sup>6</sup>                             | 10 <sup>6</sup>          | 10 <sup>6</sup>            | Ausente              | Ausente            | Ausente            |

<sup>1</sup>CMSP = carne mecanicamente separada de pirarucu; <sup>2</sup>HPPEM = hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima microbiana; <sup>3</sup>HPPEC = hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima comercial; <sup>4</sup>Padrões estabelecidos pela RDC n° 12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil 2001); <sup>5</sup>Padrões estabelecidos pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMS 1983); <sup>6</sup>Padrões utilizados por Manske *et al.* (2011).

#### Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (%GH) indica a quantidade de ligações peptídicas clivadas, nos hidrolisados proteicos foram observados diferentes %GH. Nas mesmas condições de

hidrólise, o HPPEC apresentou maior %GH, no valor de  $40,49\% \pm 0,47$ , significativamente superior ao %GH obtido para o HPPEM de  $20,67\% \pm 0,87$ .

O %GH é influenciado por diversos fatores, porém neste estudo a especificidade da enzima e a atividade enzimática tiveram efeito pronunciado, assim como descrito por Neves *et al.* (2004). A especificidade do complexo proteolítico do fungo ainda não é bem conhecida, já a pancreatina é uma combinação de endoproteases (tripsina, quimotripsina) e exoproteases (carboxipeptidases), por isso obtém um alto grau de hidrólise (Li *et al.* 2010). Além disso, a pancreatina apresentou maior atividade enzimática (186,36 U/mL) do que as proteases de *A. flavo-furcatis* (132,93 U/mL). Silva (2010) ao produzir hidrolisado proteico de tilápia por autólise enzimática e com alcalase observou uma relação entre as atividades das enzimas e o %GH, onde as maiores atividades enzimáticas proporcionaram elevada quebra das proteínas em peptídeos menores. O grau de hidrólise elevado aumenta a solubilidade do hidrolisado, porém pode gerar efeitos negativos nas suas demais propriedades funcionais, portanto, para melhorar a funcionalidade das proteínas, valores baixos para o grau de hidrólise são preferidos (Schmidt 2008).

#### Qualidade nutricional dos hidrolisados proteicos de pirarucu

A CMSP e os hidrolisados analisados apresentaram todos os aminoácidos essenciais (Tabela 4). O conteúdo de aminoácidos dos produtos finais estão de acordo com os valores relatados para hidrolisados proteicos de pescado citados por Chalamaiah *et al.* (2012).

Com exceção da taurina, hidroxiprolina e triptofano, o teor de aminoácidos da CMSP foi superior em relação ao dos hidrolisados proteicos, provavelmente houve essa diferença devido a proteína da matéria-prima que não foi hidrolisada (Neves *et al.* 2004).

Com exceção da lisina, o HPPEC apresentou maior teor de aminoácidos essenciais do que o HPPEM. O elevado quantitativo de aminoácidos essenciais no HPPEC pode ter relação

com a enzima utilizada na hidrólise, a pancreatina, que por conter endo e exoproteases, gera no hidrolisado uma concentração mais elevada de aminoácidos livres (Pacheco *et al.* 2005).

Nos dois hidrolisados proteicos a composição de aminoácidos não essenciais foi balanceada, visto que o HPPEC apresentou maior quantidade de aspartato, serina, arginina e prolina. Já no HPPEM foi detectado maior quantitativo de glutamato, hidroxiprolina, glicina, taurina e alanina. Os aminoácidos não essenciais, aspartato e glutamato foram encontrados em grande quantidade na CMSP e nos hidrolisados, assim como relatado para hidrolisados proteicos de outras espécies de peixes (Chalamaiah *et al.* 2012).

Tabela 4 – Composição de aminoácidos da CMS e dos hidrolisados proteicos de pirarucu.

| Composição de Aminoácidos  | CMSP <sup>1</sup><br>(mg/g de proteína) | HPPEC <sup>2</sup><br>(mg/g de proteína) | HPPEM <sup>3</sup><br>(mg/g de proteína) |
|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Aminoácidos essenciais     |                                         |                                          |                                          |
| Isoleucina                 | 50,01                                   | 38,15                                    | 28,29                                    |
| Leucina                    | 88,41                                   | 74,62                                    | 66,37                                    |
| Lisina                     | 78,81                                   | 71,95                                    | 72,66                                    |
| Metionina                  | 44,12                                   | 36,19                                    | 27,94                                    |
| Cisteína                   | 5,89                                    | 3,65                                     | 1,92                                     |
| Fenilalanina               | 44,46                                   | 34,64                                    | 23,75                                    |
| Tirosina                   | 40,41                                   | 32,54                                    | 18,69                                    |
| Treonina                   | 52,20                                   | 44,04                                    | 33,53                                    |
| Valina                     | 54,05                                   | 45,16                                    | 33,18                                    |
| Histidina                  | 24,59                                   | 20,34                                    | 14,67                                    |
| Triptofano                 | 5,22                                    | 9,72                                     | 3,67                                     |
| Aminoácidos não essenciais |                                         |                                          |                                          |
| Aspartato                  | 109,62                                  | 98,32                                    | 86,28                                    |
| Glutamato                  | 175,63                                  | 154,56                                   | 163,83                                   |
| Hidroxiprolina             | 16,17                                   | 11,92                                    | 22,18                                    |
| Serina                     | 48,50                                   | 41,94                                    | 35,28                                    |
| Glicina                    | 61,80                                   | 49,65                                    | 53,79                                    |
| Taurina                    | 14,65                                   | 15,29                                    | 30,39                                    |
| Arginina                   | 72,91                                   | 58,77                                    | 55,19                                    |
| Alanina                    | 72,24                                   | 61,43                                    | 64,97                                    |
| Prolina                    | 46,14                                   | 37,87                                    | 32,14                                    |

<sup>1</sup>CMSP = carne mecanicamente separada de pirarucu; <sup>2</sup>HPPEC = hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima comercial; <sup>3</sup>HPPEM = hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima microbiana.

Ainda foi constatada a presença de dois aminoácidos não essenciais, taurina e hidroxiprolina, que normalmente não são relatados em hidrolisados proteicos de carne de

pescado, sendo que ambos foram encontrados em maior quantidade no HPPEM. A taurina, um aminoácido livre envolvido em importantes funções fisiológicas no organismo animal, também pode agir como estimulador alimentar em peixes e crustáceos (Nogueira *et al.* 2007). Portanto, o HPPEM poderia ser testado como suplemento na dieta de organismos aquáticos. A hidroxiprolina é um aminoácido formado pela oxidação da prolina durante a degradação do colágeno, proteína do tecido conjuntivo de todos os organismos multicelulares (Prestes 2013). A maior quantidade de hidroxiprolina no HPPEM pode estar relacionada à especificidade das proteases do *A. flavo furcatis* na hidrólise do colágeno.

A diferença entre o perfil de aminoácidos da CMSP, HPPEM e HPPEC não comprometeu a qualidade nutricional dos hidrolisados proteicos, pois estes apresentaram um bom perfil de aminoácidos, contendo todos os aminoácidos essenciais, podendo ser incorporados como suplementos de alto valor nutricional em dietas para humanos e animais.

Os hidrolisados proteicos apresentaram percentuais de digestibilidade significativamente maiores em relação à CMSP ( $62,84\% \pm 0,54$ ) com  $89,32\% \pm 0,76$  para HPPEC e  $92,41\% \pm 0,94$  para HPPEM, demonstrando que a transformação da carne de pirarucu melhorou a digestibilidade da proteína, assim como relatado por Foh *et al.* (2011) para hidrolisado proteico de tilápia.

É comum que hidrolisados proteicos tenham melhor absorção do que proteínas inteiras. Isso ocorre, pois, devido à hidrólise enzimática esses produtos são constituídos de uma mistura de peptídeos menores e aminoácidos livres, o que aumenta a solubilidade e, consequentemente, a digestibilidade das proteínas (Sinha *et al.* 2007).

## CONCLUSÃO

Foram obtidos hidrolisados com diferentes características e qualidade nutricional. O HPPEC preparado com a pancreatina apresentou conteúdo proteico mais elevado em relação

ao HPPEM, proveniente da ação das proteases de *A. flavo-furcatis*, no entanto, este último é produto de novas proteases com uso inédito na fabricação de um hidrolisado proteico de pescado e demonstrou melhor digestibilidade. Apesar das diferenças entre os produtos gerados, ambos apresentaram um bom perfil de aminoácidos essenciais e digestibilidade elevada, livres de contaminação microbiológica, podendo ser utilizados na alimentação humana e animal como suplementos nutricionais para produtos alimentícios.

## REFERÊNCIAS

AMIZA, M.A.; OW, Y.W.; FAAZAZ, A.L. Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius* sp.) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.1255-1262, 2013.

ANITHA, T.S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification*, Madurai, v. 88, p. 214–220, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official methods of analysis*. 18th ed. Washington, DC, 2000.

BESSA, J.D.O.; Lima, A.C. *Manejo de Pesca do Pirarucu (Arapaima Gigas) no Estado do Amazonas: Erros, Acertos e Perspectivas Futuras*. In: Seminário Internacional de Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia. UFAM, Manaus, 2010.

BORDIGNON, A.C.; SOUZA, B.E.; BOHNENBERGER, L.I.; HILBIG, C.C.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W.R. Elaboração de croquete de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a partir de CMS e aparas do corte em ‘V’ do filé e sua avaliação físico-química, microbiológica e sensorial. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18/09/2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacaovisualizar&id=2851>>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 10/01/2001. Seção 1, p.

45-53. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. *Diário Oficial da União*, Brasília/DF, 07/07/1952.

CABRAL, I.S.R.; ANGELINI, M.F.C.; SHIRAHIGUE, L.D.; SUCASAS, L.F.A.; OETTERER, M. Estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em função do uso de diferentes aditivos químicos. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, Campo Mourão, v. 3, n. 1, p. 44-49, 2012.

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

CHOULHARY, V. Production, isolation and characterization of alkaline protease from *Aspergillus versicolor* PF/F/107. *Journal of Academia and Industrial Research*, Sagar, v.1, n.5, p.272-277, 2012.

CROSSA, M.; OVIEDO, A. *Manejo do Pirarucu: Sustentabilidade nos lagos do Acre*. WWF-Brasil, Brasília, DF, 67 p., 2011.

FAO. *Peces natives de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo*. Série Acuicultura Latinoamérica, Lima, 2010.

FOH, M.B.K.; KAMARA, M.T.; AMADO, I.; FOH, B.M.; WENSHUI, X. Chemical and Physicochemical Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fish Protein Hidrolysate and Concentrate. *International Journal of Biological Chemistry*, Jiangsu, v.5, n.1, p.21-36, 2011.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Manaus, v.8, p.1227-1236, 2014.

FREITAS-JUNIOR, A.V.C.; COSTA, H.M.S.; ICIMOTO, M.Y.; HIRATA, I.Y.; MARCONDES, M.; CARVALHO JR., L.B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*. Recife, v.133, p.1596-1602, 2012.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMS). *Microrganismos de los alimentos: Técnicas de análisis microbiológicos*. Zaragoza: Ed. Acribia, v. 1, p. 533, 1983.

JESUS, R. S.; LESSI, E.; TENUTA FILHO, A. Estabilidade Química e Microbiológica de Minced Fish de Peixes Amazônicos durante o Congelamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21, n.2, p.144-148, 2001.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the Peg/Phosphate Aqueous Two-Phase System. *Química Nova*, Manaus, v. 35, n. 10, p. 1912-915, 2012.

KRANTHI, V.S.; MURALIDHAR RAO, D.; JAGANMOHAN, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *International Journal of Microbiological Research*, Nandyal, v.3, n.1, p.12-15, 2012.

LI, Z.Y.; YOURAVONG, W.; KITTIKUN, A.H. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases. *Food Science and Technology*, Hat Yai, Songkhla, v.43, p.166–172, 2010.

MANSKE, C.; Maluf, M.L.F.; Souza, B.E.; Signor, A.A.; Boscolo, W.R.; Feiden, A. Composição centesimal, microbiológica e sensorial do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido ao processo de defumação. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.32, n.1, 2011.

MORONI, F. T. *Alterações post-mortem do músculo de acari-bodó, Liposarcus pardalis (Castelnau, 1855) conservado em gelo ou congelado e seu aproveitamento tecnológico*. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus, 2005.

NEVES, R.A.M.; DE MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

NGUYEN, H.T.M.; SYLLA, K.S.B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L.T.; BERGÉ, J.P. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. *Food Technology Biotechnology*, Nantes, v.49, n.1, p.48–55, 2011.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Proteases. *Journal of Food Engineering*, Bangkok, v. 70, n. 4, p. 571-578, 2005.

NOGUEIRA, A.C.; SIMAO, R.; CARVALHO, M.C.G.A.; VALE, R.G.S.; DANTAS, P.M.S. Concentração de hidroxiprolina como marcador bioquímico do dano músculo esquelético após

treinamento de resistência de força. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, Rio de Janeiro, n.15, v.2, p.33-38, 2007.

OLIVEIRA, M.S.R.; FRANZEN, F.L.; TERRA, N.N. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.35, n.1, p.291-302, 2014.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C; SGARBIERI, V. C. Propriedade funcionais de hidrolisados proteicos obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, n.25, v.2, p.333-338, 2005.

PRESTES, R. S. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. *Revista Unopar Científica Ciência Biológicas e da Saúde*, Santa Maria, n.15, v.1, p.65-74, 2013.

RADHA, S.; NITHYA<sup>1</sup>, V. J.; BABU<sup>1</sup>, R. H.; SRIDEVI<sup>2</sup>, A.; PRASAD, N.B.L.; NARASIMHA, G. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. *Archives of Applied Science Research*, Tirupati, v.3, n.2, p.155-163, 2011.

RODARTE, M.P.; DIAS, D.R.; VILELA, D.M.; SCWAN, R.F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, Minas Gerais, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, Budapeste, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SCHMIDT, C.G. *Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

SECRETARIA DO ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (SDS), Manaus/AM, dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.sds.am.gov.br/2011-09-27-04-55-44/noticias/ultimas-noticias>. Acesso em: 4 de abril de 2014.

SGARBIERI, V.C. *Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações*. Livraria Varela. São Paulo, SP, 1996.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, Mysore, v.101, p.1484–1491, 2007.

SILVA, J.F.X. *Produção e caracterização de hidrolisado protéico provenientes de resíduos de tilápia (Oreochromis niloticus)*. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiro e Aqüicultura). Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SOUZA, F.C.A.; JESUS, R.S.; DUNCAN, W.L.P.; AGUIAR, J.M.L. Efeito do congelamento na composição química e perfil de aminoácidos da carne mecanicamente separada de peixes amazônicos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Manaus, v. 4, n. 1, p. 57-61, 2013.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, Washington, v.39, n.12, p.1412-1416, 1967.

UNCTAD. *Arapaima gigas*. Market Study: Current status of *Arapaima* global trade and perspective on the Swiss, French and UK markets, 2006.

UPADHYAY, M.K.; KUMAR, R.; KUMAR, A.; GUPTA, S.; KUMARI, M.; SINGH, A.; JAIN, D.; VERMA, H.N. Optimization and characterization of an extracellular proteases from *Aspergillus flavus* "MTCC 277". *African Journal of Agricultural Research*, Jaipur, v.5, n.14, p.1845-1850, 2010.

VEIT, J.C.; FEIDEN, A, MALUF, M.LF.; BOSCOLO, W. R. Desenvolvimento e Caracterização centesimal e microbiológica de hidrolisados proteicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, Campo Mourão, v.4, n.1, p. 27-34, 2013.

WHITE J.A., HART R.J., KRY J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, Leatherhead, v.8, p.170-177, 1986.

YIN, L.J.; CHOU, Y.H.; JIANG, S.T. Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. *Journal of Marine Science and Technology*, Keelung, v.21, n.1, p.105-110, 2013.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de Hidrolisados Proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Química Nova*, Rio Grande do Sul, v. 32, n.7, p.1739-1743, 2009.

## CAPÍTULO 2

**Hidrolisado proteico de subproduto de pirarucu (*Arapaima gigas*) preparado com  
protease de *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1493**

Pedido de Registro de Patente





Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica



## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que a Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (Mestrado) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF da Universidade Federal do Amazonas, **Flávia de Carvalho Paiva**, deu entrada nesta Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica-PROTEC, o pedido de patente, datado de 28/04/2014, para apreciação, análise e futura elaboração de relatório descritivo, para cumprimento do pedido de Patente, a pesquisa tem como título inicial: "HIDROLISADO PROTEICO DE SUBPRODUTO DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*) PREPARADO COM PROTEASE DE *Aspergillus flavo-furcatilis* DPUA 1493".

Manaus, 28 abril de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica  
*[Assinatura]*  
M<sup>te</sup> do P. Socorro de Lima Verde Coelho  
Diretora Dept. de Geração de Propriedade Intelectual

## CONCLUSÃO

Neste estudo foram desenvolvidos dois produtos, o hidrolisado proteico de pirarucu obtido com enzima comercial (HPPEC) e outro preparado com a enzima microbiana (HPPEM). Os hidrolisados apresentaram diferentes valores para grau de hidrólise, composição química e qualidade nutricional. Entre as enzimas utilizadas, a pancreatina teve maior potencial de hidrólise, gerando um HPP com elevado teor proteico, porém o produto final desenvolvido com as enzimas de *A. flavo-furcatis* demonstrou maior digestibilidade.

Os dois produtos são inéditos, pois utilizam pela primeira vez CMS de pirarucu, elaborada de um resíduo subutilizado do beneficiamento do pirarucu, para obtenção de hidrolisado proteico, no entanto o HPPEM mostra o diferencial inovador por ter sido desenvolvido com enzimas proteolíticas de uma espécie de *Aspergillus* sp., que nunca foi estudada para esse fim.

Apesar das diferenças entre os produtos gerados, ambos apresentaram todos os aminoácidos essenciais e digestibilidade elevada, livres de contaminação microbiológica, podendo ser utilizados na alimentação humana e animal.

## REFERÊNCIAS

- ACKMAN, R.G. **Nutritional composition of fats in seafood**. Progress in Food Nutrition Science, Halifax, v.13, p.161-241, 1989.
- AFONSO, W.O.; BIASUTTI, E.A.R.; CASTRO, V.M.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. **Utilização do soro de leite visando reduzir a poluição ambiental: hidrólise pela pancreatina**. Tecn-ológica, Santa Cruz do Sul, v 12, n 2, p 7-16, 2008.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. **Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis**. Process Biochemistry, Indore, v.39, p.977–981, 2004.
- AMIZA, M.A.; OW, Y.W.; FAAZAZ, A.L. **Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius* sp.) frame hydrolysate**. International Food Research Journal, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.1255-1262, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington, DC, 2000.
- BATISTA, I. **Hidrolisados Proteicos de Pescado**. In GONÇALVES, A.A. (Ed). Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, p. 386-398
- BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Popayán, v.42, n.2, p.227-36, 2008.
- BESSA, J.D.O.; Lima, A.C. **Manejo de Pesca do Pirarucu (*Arapaima Gigas*) no Estado do Amazonas: Erros, Acertos e Perspectivas Futuras**. In: Seminário Internacional de Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia. UFAM, Manaus, 2010.
- BRASIL. Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18/09/2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacaovisualizar&id=2851>>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10/01/2001. Seção 1, p. 45-53. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10/01/2001. Seção 1, p. 45-53. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2014.

BURGER, J. **Fishing, fish consumption and awareness about warnings in a university community in central New Jersey in 2007, and comparisons with 2004**. Environ Research. Nova Jersey, v.108, n.1, p.107-16, 2008.

CAMARGO, S.A.F.; CAMARGO, T.R.L. **Direito, política e manejo pesqueiro na Bacia Amazônica**. São Carlos: Rima Editora, 132 p., 2012.

CARREIRA, R.L.; SILVA, V.D.M.; LIMA, L.G.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. **Perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo**. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 481-489, 2011.

CARVALHO, M.A.F. **Produção de defumado a frio de filé de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), em forno mecânico Fischer**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 2001.

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

CROSSA, M.; OVIEDO, A. **Manejo do Pirarucu: Sustentabilidade nos lagos do Acre**. WWF-Brasil, Brasília, DF, 67 p., 2011.

DEKKERS, E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; MARSHALL, M. R. **Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates**. Food Chemistry, Gainesville, v. 124, p. 640–645, 2011.

FAO. **Peces natives de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo**. Série Acuicultura Latinoamérica, Lima, 2010.

FELTES, M. C. M.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. **Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental, Campina Grande, v.14, n.6, p.669–677, 2010.

FERREIRA, M.G.A.B. Caracterização microbiológica, físico-química e sensorial de hidrolisado biológico em peixes da Amazônia. Tese (Doutorado em Tecnologia de Recursos Pesqueiros) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2009.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; TEIXEIRA, M. F. S. **Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica.** Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, Manaus, v.8, p.1227-1236, 2014.

FOOD INGREDIENTS BRAZIL. **Proteínas do Peixe.** Revista Food Ingredients, São Paulo, n.8, 2009.

FREITAS-JUNIOR, A.V.C.; COSTA, H.M.S.; ICIMOTO, M.Y.; HIRATA, I.Y.; MARCONDES, M.; CARVALHO JR., L.B., OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. **Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin.** Food Chemistry. Recife, v.133, p.1596-1602, 2012.

FURLAN, E.F.; OETTERER, M. **Hidrolisado proteico de pescado.** Revista de Ciência & Tecnologia, Piracicaba, v.10, n.19, p.79-89, 2002.

GALLA, N.R.; PAMIDIGHANTAM, P.R.; AKULA, S.; KARAKALA, B. **Functional properties and *in vitro* antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*.** Food Chemistry, Hyderabad, v.135, p.1479–1484, 2012.

GANDRA, A.L. **O Mercado do Pescado da região Metropolitana de Manaus.** Série: O mercado do pescado nas grandes cidades latino-americanas. Infopesca, Montevideo, 2010.

GONÇALVES, A.A. **Aspectos gerais do Pescado.** In GONÇALVES, A.A. (Ed). Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, p. 2-9.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, Zwingenberg, n.59, p.15–32, 2002.

HARTLEY, B. S. **Proteolytic enzymes.** Annual Review of Biochemistry, Washington, n.29, p.45–72, 1960.

IGUTI, A. M. . **Proteínas.** In: RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. (Org.). Química de Alimentos. 2ªed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007, p. 85-110.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMS). **Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos.** Zaragoza: Ed. Acribia, v. 1, p. 533, 1983.

ITUASSÚ, D.R.; PEREIRA FILHO, M. ROUBACH, R.; CRESCÊNCIO, R.; CAVERO, B.A.S.; GANDRA, A.L. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Uberaba, v.40, n.3, p.255-259, 2005

KIM, Y.N. **Vitamins.** In: NOLLET, L.M.L.; TOLDRA, F. (Eds). Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, p.327-350.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. **Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the Peg/Phosphate Aqueous Two-Phase System.** Química Nova, Manaus, v. 35, n. 10, p. 1912-915, 2012.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: Teoria e aplicações práticas**, 1 ed., Guanabara Koogan, v. 1, Rio de Janeiro, 2008, 242 p.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B. **Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Seattle, v.40, p.43-81, 2000.

MANSKE, C.; Maluf, M.L.F.; Souza, B.E.; Signor, A.A.; Boscolo, W.R.; Feiden, A. **Composição centesimal, microbiológica e sensorial do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido ao processo de defumação.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.32, n.1, 2011.

MARTONE, C.B.; PETRUZZELO, M.; CÁSSIA, R.O.; PERES BORLA, O.; BUSCON, L.; FOLCO, E.J.E.; SÁNCHEZ, J.J. *Obtenção e usos de hidrolisados protéicos de resíduos de pescado.* I workshop Brasileiro em Aproveitamento de Sub-produtos do Pescado, Itajaí, 2003.

MENEGASSI, M. **Aspectos Nutricionais do Pescado.** In GONÇALVES, A.A. (Ed). Tecnologia do Pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, p.43-60

MORONI, F. T. **Alterações post-mortem do músculo de acari-bodó, *Liposarcus pardalis* (Castelnau, 1855) conservado em gelo ou congelado e seu aproveitamento tecnológico.** Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPTA/Inpa), Manaus, 2005.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim estatístico da pesca e aqüicultura 2011**. Governo Federal: Brasília, setembro 2013. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2140-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-esca-e-aquicultura-2011>. Acesso em: 4 de abril de 2014.

MINOZZO, M. G.; WASZCZYNSKYJ, N.; BOSCOLO, W. R. **Utilização de carne mecanicamente separada de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) para a produção de patês cremoso e pastoso**. Alimentos e Nutrição (UNESP), Araraquara, v.19, p.115-119, 2008.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMAN, C. **Improved method for determining Food Protein Degree of Hydrolysis**. Food Chemistry and Toxicology, Bagsvaerd, v.66, n.5, p.642-646, 2001.

NGUYEN, H.T.M.; SYLLA, K.S.B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L.T.; BERGÉ, J.P. **Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease**. Food Technology Biotechnology, Nantes, v.49, n.1, p.48-55, 2011.

OLIVEIRA, M.S.R.; FRANZEN, F.L.; TERRA, N.N. **Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.35, n.1, p.291-302, 2014.

OLIVEIRA, P.R. **Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz 1822) procedente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de seus produtos derivados**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), INPA/UFAM, Manaus, AM, 2007.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008, 276 p.

PÉREZ, M.; SÁNCHEZ, L.; PIAD, R.; COCOURT, D.; MILIÁN, G.; AFONSO, G. ORMAZA, M.J.; TAMBARA, J. **Caracterización Físico Química de um hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* y su comparación com diferentes tipos de hidrolizados**. Revista Salud Animal, Matanzas, v.23, n.3, p.153-159, 2001.

PINTO E SILVA, M.E.M.; ATZINGEN, M.C.V. **Sensory analysis of hydrolysed meat preparations**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.30, n.2, p.349-353, 2010.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Pune, v.62, p.597-635, 1998.

Raper, K. B.; Fennell, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Robert E. Krieger Co., New York, 686 p. 1977.

RUSTAD, T. **Peptides and Proteins**. In: NOLLET, L.M.L.; TOLDRÁ, F. (Eds). Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis. Boca Raton, FL: CRC Press – Taylor & Francis Group; 2010, p.11-20.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation**. *Process Biochemistry*, Budapeste, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANTOS, S.D.A.; MARTINS, V.G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. **Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial**. *Química Nova*, Rio Grande do Sul, v.32, n. 1, p.72-77, 2009

SARTORI, A.G.O.; AMANCIO, R.D. **Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil**. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, v.19, n.2, p.83-93, 2012

SEBRAE, **Manual de Boas Práticas de Produção do Pirarucu em Cativeiro**, Brasília, 2013.

SEONG, C.; JO, J. S.; KIM, S. W.; LEE, O.; HEE, J.; YOO, J. C. **Production, purification and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae***. *Biotechnology letters*, Jeonnam, v.26, p.907-909, 2004.

SCHMIDT, C.G. **Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Química, Rio Grande do Sul, 2008.

SCHMIDT, C.G.; SALAS-MELLADO, M. **Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango**. *Química Nova*, Rio Grande do Sul, v.32, n.5, p.1144-1150, 2009

SECRETARIA DO ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (SDS), Manaus/AM, dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.sds.am.gov.br/2011-09-27-04-55-44/noticias/ultimas-noticias>. Acesso em: 4 de abril de 2014.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**. Propriedades - Degradações - Modificações. Livraria Varela. São Paulo, SP, 1996.

SILVA, M.C.; SILVA, V.D.M.; LANA, A.M.Q.; SILVESTRE, M.P.C. **Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado proteico de leite.** Alimentação e Nutrição, Araraquara, v.20, n.3, p. 395-402, 2009

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** Livraria Varela, 2ª edição, São Paulo, 2001.

SILVESTRE, M.P.C.; HARRIMAN ALEY MORAIS, H.A.; SILVA, M.R.; SILVA, V.D.M.; SOUZA, M.W.S. **Ação da protease do *Aspergillus sojae* e da pancreatina na hidrólise do concentrado proteico de soro de leite.** Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão, v.3, n.1, p.19-27, 2012.

SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. **Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of tnbs, opa and phstat methods for quantification of degree of hydrolysis.** International Dairy Journal, Limerick, v. 13, n. 6, p.447- 453, 2003.

SPIES, J.R. **Determination of tryptophan in proteins.** Analytical Chemistry, Washington, v.39, n.12, p.1412-1416, 1967.

TEIXEIRA, M.F.S.; ALECRIM, M.M.; PALHETA, R.A.; SILVA, T.A.; PORTO, A.L.F. **Enzimas de linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis*: Novas fontes proteolíticas da biodiversidade Amazônica.** In: Biodiversidade Amazônica: Caracterização, Ecologia e Conservação. Manaus: Edua, p.47-58, 2012.

ULLOA, M.; LAPPE, P.; AGUILAR, S.; PARK, H.; PÉREZ-MEJÍA, A.; TORIELLO, C.; TAYLOR, M. L. **Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico.** Revista Mexicana de Biodiversidad, México, D.F., v. 77, p. 153-168. 2006.

UNCTAD. ***Arapaima gigas*.** Market Study: Current status of *Arapaima* global trade and perspective on the Swiss, French and UK markets, 2006.

VERÍSSIMO, J. **A Pesca no Amazônia.** Rio de Janeiro: Livraria Clássica Alves e Cia. (Monographias Brasileiras III), 206 p. 1895.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A.; SINGH, S.A. **Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341.** Food Chemistry, Karnataka, v.114, p.402-407, 2009.

WANG, L.; WANG, Y.-J. **Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation.** Cereal Chemistry, Fayetteville, v.78, n.6, p.690-692, 2001.

WARD, O. P. **Proteinases.** In: Fogarty W. M. (editores), Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers, p. 251–377. Londres e Nova York, 1983.

WHITE J.A., HART R.J., KRY J.C. **An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials.** Journal of Automatic Chemistry, Leatherhead, v.8, p.170-177, 1986.

YOUSSEF, M.S. **Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi on Lybian corn with special reference to mycotoxin control.** Research Journal of Toxins, Zawiya, v.1, n.1, p.8-22. 2009.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. **Funcionalidade de Hidrolisados Proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas.** Química Nova, Rio Grande do Sul, v. 32, n.7, p.1739-1743, 2009.

ZIEGLER, F.L.F.; SGARBIERI, V.C. **Caracterização químico-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos.** Revista de Nutrição, Campinas, v.22, n.1, p.61-70, 2009.

## ANEXOS

### **Normas para submissão da Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**

*Pesquisa Agropecuária Tropical* (PAT) é o periódico científico trimestral editado pela Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, em versão eletrônica (e-ISSN 1983-4063). Destina-se à publicação de Artigos Científicos relacionados ao desenvolvimento da atividade agropecuária. Notas Técnicas, Comunicações Científicas e Artigos de Revisão somente são publicados a convite do Conselho Editorial.

A submissão de trabalhos deve ser feita exclusivamente via sistema eletrônico, acessível através do endereço [www.agro.ufg.br/pat](http://www.agro.ufg.br/pat) ou [www.revistas.ufg.br/index.php/pat](http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat). Os autores devem cadastrar-se no sistema e manifestar, por meio de documento assinado por todos, escaneado e inserido no sistema como documento suplementar, anuência acerca da submissão e do conhecimento da política editorial e diretrizes para publicação na revista PAT (caso os autores morem em cidades diferentes, mais de um documento suplementar pode ser inserido no sistema, pelo autor correspondente).

A revista PAT recomenda a submissão de artigos com, no máximo, 5 (cinco) autores. A partir deste número, uma descrição detalhada da contribuição de cada autor deve ser encaminhada ao Conselho Editorial (lembre-se de que, às vezes, a seção “Agradecimentos” é mais apropriada que a autoria).

Durante a submissão *on-line*, o autor correspondente deve atestar, ainda, em nome de todos os autores, a originalidade e ineditismo do trabalho (trabalhos já disponibilizados em anais de congresso ou repositórios institucionais não são considerados inéditos, por tratarem-se de uma forma de publicação e ampla divulgação dos resultados), a sua não submissão a outro periódico, a conformidade com as características de formatação requeridas para os arquivos de dados, bem como a concordância com os termos da Declaração de Direito Autoral, que se aplicará em caso de publicação do trabalho. Se o trabalho envolveu diretamente animais ou seres humanos como sujeitos da pesquisa, deve-se comprovar a sua aprovação prévia por um comitê de ética em pesquisa. Por fim, deve-se incluir os chamados metadados (informações sobre os autores e sobre o trabalho, tais como título, resumo, palavras-chave – em Português e Inglês) e transferir os arquivos com o manuscrito e documento suplementar (anuência dos autores).

Os trabalhos devem ser escritos em Português ou Inglês. A possibilidade de submissão e publicação de trabalhos em outros idiomas deve ser submetida à análise do Conselho Editorial.

Os manuscritos devem ser apresentados em até 18 páginas, com linhas numeradas. O texto deve ser editado em *Word for Windows* (tamanho máximo de 2MB, versão .doc) e digitado em página tamanho A-4 (210 mm x 297 mm), com margens de 2,5 cm, em coluna única e espaçamento duplo entre linhas. A fonte tipográfica deve ser *Times New Roman*, corpo 12. O uso de destaques como negrito e sublinhado deve ser evitado. Todas as páginas devem ser numeradas. Os manuscritos submetidos à revista PAT devem, ainda, obedecer às seguintes especificações:

1. Os Artigos Científicos devem ser estruturados na ordem: *título* (máximo de 20 palavras); *resumo* (máximo de 250 palavras); *palavras-chave* (no mínimo, três palavras, e, no máximo, cinco, separadas por ponto-e-vírgula); *título em Inglês*; *abstract*; *key-words*; *Introdução*; *Material e Métodos*; *Resultados e Discussão*; *Conclusões*; *Agradecimentos* (se necessário, em parágrafo único); *Referências*; e *Apêndice* (se estritamente necessário). Chamadas relativas ao título do trabalho e os nomes dos autores, com suas afiliações e endereços (incluindo *e-mail*) em notas de rodapé, bem como agradecimentos, somente devem ser inseridos na versão final corrigida do manuscrito, após sua aceitação definitiva para publicação.
2. As citações devem ser feitas no sistema “autor-data”. Apenas a inicial do sobrenome do autor deve ser maiúscula e a separação entre autor e ano é feita somente com um espaço em branco. Ex.: (Gravena 1984, Zucchi 1985). O símbolo “&” deve ser usado no caso de dois autores e, em casos de três ou mais, “et al.”. Ex.: (Gravena & Zucchi 1987, Zucchi et al. 1988). Caso o(s) autor(es) seja(m) mencionado(s) diretamente na frase do texto, utiliza-se somente o ano entre parênteses. Citações de citação (citações secundárias) devem ser evitadas, assim como as seguintes fontes de informação: artigo em versão preliminar (no prelo ou *preprint*) ou de publicação seriada sem sistema de arbitragem; resumo de trabalho ou painel apresentado em evento científico; comunicação oral; informações pessoais; comunicação particular de documentos não publicados, de correios eletrônicos, ou de *sites* particulares na Internet.

3. As referências devem ser organizadas em ordem alfabética, pelos sobrenomes dos autores, de acordo com a norma NBR 6023:2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Os destaques para títulos devem ser apresentados em itálico e os títulos de periódicos não devem ser abreviados.
4. As tabelas e figuras devem ser identificadas numericamente, com algarismos arábicos, e receber chamadas no texto. As tabelas devem ser editadas em preto e branco, com traços simples e de espessura 0,5 ponto (padrão *Word for Windows*), e suas notas de rodapé exigem chamadas numéricas. Expressões como “a tabela acima” ou “a figura abaixo” não devem ser utilizadas. Quando aplicável, os títulos de tabelas e figuras devem conter local e data. As figuras devem ser apresentadas com resolução mínima de 300 dpi.
5. A consulta a trabalhos recentemente publicados na revista PAT ([www.agro.ufg.br/pat](http://www.agro.ufg.br/pat)) é uma recomendação do corpo de editores, para dirimir dúvidas sobre estas instruções e, conseqüentemente, agilizar a publicação.
6. Os autores não serão remunerados pela publicação de trabalhos na revista PAT, pois devem abrir mão de seus direitos autorais em favor deste periódico. Os conteúdos publicados, contudo, são de inteira e exclusiva responsabilidade de seus autores, ainda que reservado aos editores o direito de proceder a ajustes textuais e de adequação às normas da publicação. Por outro lado, os autores ficam autorizados a publicar seus artigos, simultaneamente, em repositórios da instituição de sua origem, desde que citada a fonte da publicação original na revista PAT.
7. Homepage: <http://www.agro.ufg.br/pat>