



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE
HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA
SURUBIM

Fabiana Dieterich
Engenheira de Pesca

Jaboticabal – São Paulo
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE
HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA
SURUBIM

Fabiana Dieterich

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rose Meire Vidotti

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo
2014

Dieterich , Fabiana

D565h Desenvolvimento, avaliação físico-química e biológica de
hidrolisado proteico de resíduos agroindustriais para surubim /
Fabiana Dieterich. – – Jaboticabal, 2014

vi, 74 p. ; il.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2014

Orientadora: Rose Meire Vidotti

Co-orientador: Wilson Rogério Boscolo

Banca examinadora: Juliana Antunes Galvão, Maria Tereza
Bertoldo Pacheco, Altevir Signor, Caroline Pelegrina Teixeira

Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Sistema enzimático. 3. Nutrição animal. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Desenvolvimento, avaliação físico-química e biológica de hidrolisado proteico de resíduos agroindustriais para surubim.

AUTORA: FABIANA DIETERICH

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSE MEIRE VIDOTTI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. WILSON ROGÉRIO BOSCOLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSE MEIRE VIDOTTI

Polo APTA Centro Norte, São José do Rio Preto-SP

Profa. Dra. JULIANA ANTUNES GALVÃO

Depto de Agroindústria Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Usp

Profa. Dra. MARIA TERESA BERTOLDO PACHECO

Instituto Tecnológico de Alimentos, ITAL, Campinas-SP

Prof. Dr. ALTEVIR SIGNOR

/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profa. Dra. CAROLINE PELEGRINA TEIXEIRA

Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, FMVZ/UNESP, Botucatu-SP

Data da realização: 30 de janeiro de 2014.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	I
Agradecimentos	II
Apoio financeiro.....	IV
Lista de abreviaturas	V
1. RESUMO GERAL	1
2. INTRODUÇÃO GERAL	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Enzimas.....	6
3.2. Controle da ação das enzimas.....	7
3.2.1. Temperatura.....	7
3.2.2. Conteúdo de água e atividade de água	8
3.2.3. Efeitos do pH sobre as enzimas.....	8
3.3. Proteases	9
3.3.1. Características gerais e modo de ação	10
3.4. Principais fontes	11
3.4.1. Proteases vegetais.....	12
3.4.1.1. Papaína (EC. 3.4.22.2).....	12
3.4.2. Proteases animais.....	13
3.4.3. Proteases microbianas.....	13
3.4.3.1. Subtilisinas – Alcalase.....	14
3.5. Modificação de proteínas – hidrólise enzimática	15
3.6. Hidrolisados e suas diferentes aplicações	17
3.7. Espécie em estudo	20
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo Geral:	22
4.2. Objetivos Específicos:.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
6. ARTIGO I – SERÁ ENVIADO A FOOD CHEMISTRY	32
6.1. Desenvolvimento e Caracterização de Hidrolisados Proteicos de Coprodutos Agroindustriais de Origem Animal.....	32
6.2. Introdução.....	33

6.3. Materiais e Métodos	34
6.3.1. Material	34
6.3.2. Planejamento do processo industrial	34
6.3.3. Processamento dos hidrolisados	35
6.3.4. Composição centesimal	35
6.3.5. Perfil de aminoácidos e aminoácidos livres	35
6.3.7. Perfil de ácidos graxos	36
6.3.8. Análise estatística	37
6.4. Resultados e Discussão	37
6.5. Conclusão	42
6.6. Agradecimentos	42
6.7. Referências Bibliográficas	42
7. ARTIGO II: SERÁ ENVIADO PARA ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY	54
7.1. Hidrolisados proteicos de coprodutos agroindustriais de origem animal em dietas para surubim (<i>Pseudoplatystoma sp</i>)	54
7.2. Introdução	55
7.3. Material e métodos	56
7.4. Resultados e discussão	62
7.5. Conclusão	68
7.6. Agradecimentos	68
7.7. Referências Bibliográficas	69
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de produção de hidrolisado proteico (Adaptado de Batista, 2011).....	16
Figura 2. Pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>). Foto: ARQUIVO SEMATUR - Cáceres-MT. Disponível em http://www.gopantanal.com.br (acessado em 08/08/2013).....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a Enzyme Commission (EC).	6
Tabela 2. Composição centesimal de hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).	46
Tabela 3. Composição em aminoácidos essenciais dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).	47
Tabela 4. Composição em aminoácidos não essenciais dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).	48
Tabela 5. Escore químico proteico dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®) e comparação com as exigências mínimas para adultos, FAO/WHO (2007).	49
Tabela 6. Composição em aminoácidos totais e livres (g 100g de proteína ⁻¹) do fígado suíno e do coproduto de tilápia.	50
Tabela 7. Composição em aminoácidos essenciais livres dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).	51
Tabela 8. Composição em aminoácidos não essenciais livres dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).	52
Tabela 9. Composição em ácidos graxos dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).	53
Tabela 10. Composição aminoacídica de hidrolisados produzidos com os sistemas enzimáticos Alcalase® (FA e TA) e Brauzyn® (TB e FB), para as matérias-primas: fígado suíno e coproduto de tilápia.	58
Tabela 11. Formulação e composição estimada das rações experimentais para juvenis de Pintado Real® (<i>Pseudoplatystoma sp</i>).	59
Tabela 12. Parâmetros zootécnicos dos juvenis de pintado Real® alimentados com diferentes hidrolisados proteicos, após 50 dias experimentais ¹	63
Tabela 13. Parâmetros plasmáticos em juvenis de pintado Real® alimentados com diferentes hidrolisados, após 50 dias experimentais ¹	65
Tabela 14. Parâmetros plasmáticos avaliados em fígado de juvenis de pintado Real® alimentados com diferentes hidrolisados, após 50 dias experimentais ¹	66
Tabela 15. Composição centesimal do peixe inteiro, deposição de proteína e gordura nos peixes alimentados com diferentes hidrolisados proteicos, após 50 dias experimentais ¹	67

Dedicatória

A meus pais, Carlos Arlindo Dieterich e Aida Maria Dieterich,
Exemplos de coragem, amor e persistência.

A meu irmão, cunhada, sobrinhos, irmã e cunhado, Fabio, Priscylla, João Pedro,
Pedro Eduardo, Talita e Jonatas, pela amizade e incentivo.

A meu noivo, Leandro Daniel de Paris,
mesmo distante,
por seu amor e companheirismo.

DEDICO

Agradecimentos

Ao longo de quatro anos de trabalho e aprendizado, tive a felicidade de contar com a ajuda de muitas pessoas, que muitas vezes deixaram de lado seus afazeres para me ajudar. Muitos são os agradecimentos a realizar, seja por um simples gesto ou pela participação mais imprescindível.

Tenho muito a agradecer:

A Professora Rose Meire Vidotti, por aceitar me orientar a distância e acreditar que dessa forma seria possível trabalharmos. Por todas as contribuições ao longo desse caminho.

Ao Professor Wilson Rogério Boscolo, por sua co-orientação, pelo incentivo e amizade antes mesmo de realizar a seleção de doutorado.

Aos funcionários do CAUNESP, em especial, aos secretários de pós-graduação Veralice Capatto e David Lorente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

A empresa Falbom Agroindustrial Ltda, pelo auxílio na produção industrial de hidrolisados proteicos, disponibilizando equipamentos, matérias-primas insumos.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, em especial a Dr^a Maria Teresa Bertoldo Pacheco pela parceria na realização de análises, correções e conselhos.

Ao GEMAg, Grupo de Estudos e Manejo em Aquicultura, representado pelos pesquisadores Wilson Rogério Boscolo, Aldi Feiden, Márcia Luzia Ferrarezi Maluf, Altevir Signor e Fábio Bittencourt, por disponibilizar estruturas de laboratórios, material didático e recursos humanos.

A todos os técnicos e estagiários do GEMaQ, pelo companheirismo e amizade. De maneira especial agradeço ao Dacley Hertes Neu, pela paciência e disponibilidade para realizar as análises estatísticas. César Sary, Marlon Casarini Moreno, Carlos Eduardo Boscolo, Dihego Fernandes, Patricia Simioni, Evandro Moro, Jhonis Pessini pelo auxílio nos experimentos no Laboratório de Aquicultura. Sidnei Klein, Micheli Zaminhan, Márcia Maluf e Marlon, análises hematológicas são até divertidas com vocês! Letícia Higuchi e Joana Finkler pelas ajudas a distância em tudo que precisei em Jaboticabal.

Ao Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), representado pela Professora Leila Picolli da Silva e doutoranda Naglezi de Menezes de Lovatto, pelo auxílio nas análises de metabolismo hepático.

A Thálita Stefann, Cynthia Ikefuti, Thais Heloisa Vaz Farias e João de Paula Cortez Neto, pela amizade durante e depois da minha estada em Jaboticabal.

A Juliana Lösch, Arcangelo e Flávia Signor, grandes amigos, pela agradável convivência, momentos felizes e tristes compartilhados e apoio para todas as horas.

A Talita Gabriela Dieterich, irmã, sem você, formatação de arquivos e referências bibliográficas seriam impossíveis!!!! Sem contar todo o resto... Conversas e discussões intermináveis que ajudaram muito ("santo" Skype e TIM...rs!!!).

A minha grande família, noivo, pais, irmãos, tios, primos, sempre torcendo para os peixes não morrerem...rs....

A TODOS, MUITO OBRIGADA!

Apoio financeiro

Bolsa de doutorado no país com reserva técnica: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico – CNPq. Processo: 143523/2010-4.

Auxílio na compra de reagentes: Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP.

Auxílio na realização de análises: Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL; Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMaQ); Laboratório de Piscicultura (UFSC).

Auxílio na produção industrial de hidrolisados proteicos: Falbom Agroindustrial Ltda.

Lista de abreviaturas

AA: aminoácidos

ALB: albumina

ANEEL: Agência Nacional de Energia Elétrica

BHT: Butil Hidroxi Tolueno

CAA: Conversão Alimentar Aparente

CAUNESP: Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CLAE: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO: Controle

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação

CV: Coeficiente de Variação

Da: Dalton

DGC: Deposição de Gordura Corporal

DPC: Deposição de Proteína Corporal

EA: Eficiência Alimentar

EC: Enzyme Commission

EE: Extrato Etéreo

FAO: Food and Agricultural Organization

FA: Hidrolisado de Fígado Suíno com Alcalase®

FB: Hidrolisado de Fígado Suíno com Brauzyn®

FC: Fator de Condição

FPH: Hidrolisado Proteico de Peixe

FS: Fígado Suíno

g: grama

GCf: Gordura Corporal final

GCI: Gordura Corporal inicial

GEMaQ: Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura

GLOB: Globulina

GPd: Ganho em Peso Médio Diário

GPR: Ganho de Peso Relativo

IGF-I: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
IGC: Índice de Gordura Celomática
IHS: Índice Hepatosomático
ITAL: Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas
kg: quilograma
L: litro
Ln: logaritmo neperiano
mg: miligrama
MM: Matéria Mineral
MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura
TA: Hidrolisado de Coproduto de Tilápia com Alcalase®
TB: Hidrolisado de Coproduto de Tilápia com Brauzyn®
TEP: Taxa de Eficiência Proteica
RT: Resíduos do Processamento de Tilápia
PB: Proteína Bruta
PBCf: Proteína Bruta Corporal final
PBCi: Proteína Bruta Corporal inicial
Pf: Peso final
Pi: Peso inicial
TCE: Taxa de Crescimento Específico
UFSM: Universidade Federal de Santa Maria
UM: Umidade
USDA: United States Department of Agriculture

1. RESUMO GERAL

Estudando a utilização de coprodutos agroindustriais para aplicação na aquicultura utilizou-se fígado suíno (FS) e resíduo do processamento da tilápia (RT) (*Oreochromis niloticus*) na produção de diferentes hidrolisados enzimáticos para aplicação na nutrição animal. As matérias primas FS e RT foram hidrolisadas com complexos enzimáticos Alcalase® (A) e Brauzyn® (B), resultando em quatro hidrolisados: FA (FS com A), FB (FS com B), TA (RT com A) e TB (RT com B). Foi utilizado delineamento experimental fatorial 2x2 inteiramente casualizado, sendo o primeiro fator as matérias-primas, RT e FS, o segundo as enzimas, Alcalase® e Brauzyn® e três repetições em escala industrial. A hidrólise ocorreu em reator encamisado com controle de temperatura, contendo a relação enzima/substrato de 1:200 (p/p), durante 60 minutos. Após o processamento dos hidrolisados foram avaliados sua composição centesimal, perfil de aminoácidos totais e livres e perfil de ácidos graxos e sua aplicação em dietas para peixes. Para avaliar o uso de diferentes hidrolisados proteicos sobre o desempenho zootécnico, parâmetros metabólicos, hepáticos e composição centesimal de juvenis de pintado Real® (*Pseudoplatystoma sp*), foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado 200 peixes ($7,23 \pm 0,12$ g) em 20 tanques (500 L) com cinco dietas: controle, sem inclusão de hidrolisado (CO); e com inclusão de 20% de hidrolisados: Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase® (FA); Hidrolisado de fígado suíno com Brauzin® (FB); Resíduo de tilápia com Alcalase® (TA); Resíduo de tilápia com Brauzin® (TB), totalizando cinco tratamentos e quatro repetições. Durante o período experimental a média de temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram equivalentes a $28,5 \pm 0,4$ °C, $7,40 \pm 0,26$ e $6,21 \pm 0,32$ mg L⁻¹, respectivamente. Produtos hidrolisados com Alcalase® apresentaram maior quantidade de aminoácidos livres em comparação aos demais hidrolisados, independente da matéria-prima utilizada. Os hidrolisados de RT apresentaram maiores conteúdos médios de lipídeos com destaque para os ácidos graxos monoinsaturados. Dentre os poli-insaturados, os ácidos graxos da série n-6 foram predominantes. Não observou-se diferença significativa ($P>0.05$) para comprimento total (CT); peso final (PF), índice hepatossomático (IH); gordura celomática (GC); ganho de peso diário (GPD); fator de condição (FC); taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (SO). Entretanto, os peixes

alimentados com FA, FB, TA e TB apresentaram melhor conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência proteica (TEP). Os parâmetros metabólicos e a composição centesimal de juvenis de pintado Real[®] não apresentaram variação significativa ($P>0.05$). Os resultados indicam que a inclusão de 20% dos diferentes hidrolisados melhora a CAA e a TEP sem proporcionar alterações nos parâmetros metabólicos e na composição centesimal de juvenis de pintado Real[®]. O processamento de FS e RT utilizando as enzimas Alcalase[®] e Brauzyn[®] resultaram em produtos com características favoráveis a obtenção de novos ingredientes com potencial para o uso em rações animais como fonte de nutrientes essenciais. A inclusão de 20% de hidrolisado melhora a CAA e a TEP sem provocar alterações nos parâmetros metabólicos e na composição centesimal de juvenis de pintado Real[®].

Palavras-chave: biotecnologia, sistema enzimático, nutrição animal, surubim

ABSTRACT

This study evaluates the use of agro-industrial byproducts in aquaculture. To this end, pig liver (PL) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing byproduct (TR) were used to produce different hydrolysates for use in animal nutrition. The raw materials PL and TR were hydrolyzed with Alcalase® (A) and Brauzyn® (B) enzyme complexes, resulting in four hydrolysates: PA (PL with A), PB (PL with B), TA (TR with A) and TB (TR with B). The experimental design was completely randomized, 2x2 factorial, where the first factor was the raw materials, PL and TR; and the second, the enzyme complexes, Alcalase® and Brauzyn®, with three replications in industrial scale. The hydrolysis reactor, containing the enzyme/substrate material at 1:200 ratio (w/w), was jacketed for temperature control, and the reaction lasted 60 minutes. After processing, the hydrolysate was analyzed to determine the proximate composition; total and free amino acids and fatty acids profile; and, its use in fish diets. The use of different protein hydrolysates in fish diet was evaluated by the growth performance parameters; metabolic and liver parameters; proximate composition of juvenile pintado real® (*Pseudoplatystoma* sp). Following a completely randomized design with five treatments and four replications, 200 fish (7.23 ± 0.12 g) were distributed in 20 tanks (500 L) and fed the control diet, without hydrolyzed (CO); two diets added 20% of Alcalase® hydrolysates, PA and TA; and two diets with 20% Brauzin® hydrolysate, PB and TB. During the experimental period the average temperature, pH and dissolved oxygen values were $28.5^{\circ}\text{C} \pm 0.4$; 7.40 ± 0.26 ; and 6.21 ± 0.32 U mg L⁻¹, respectively. The Alcalase® hydrolysates had a higher amount of free amino acids compared to the other hydrolysates, regardless of the byproduct used. The tilapia residue hydrolysates had higher mean lipid contents, especially monounsaturated fatty acids. Among the polyunsaturated, the n-6 fatty acids were predominant. No significant difference was observed ($P>0.05$) for total length (TL), final weight (FW), hepatosomatic index (HI), average daily gain (ADG), condition factor (CF), specific growth rate (SGR) and survival (S). However, fish fed PA, PB, TA and TB had better feed conversion rate (FCR) and protein efficiency rate (PER). Metabolic parameters and proximate composition of juvenile pintado real® did not vary significantly ($P>0.05$). The results indicate that 20% inclusion of either hydrolysate improved fish FCR and PER, without changing either the metabolic parameters or the chemical composition. Therefore, the processing of PL and TR using Alcalase® and Brauzyn® enzymes resulted in new ingredients with favorable characteristics with potential use in animal feed as a source of essential nutrients.

Keywords: biotechnology, enzyme system, nutrition, surubim

2. INTRODUÇÃO GERAL

Hidrolisados proteicos são produtos obtidos por meio da ação de enzimas proteolíticas ou por agentes químicos, sendo constituídos por fragmentos de proteínas: peptídeos de diferentes tamanhos (poli, tri e dipeptídeos) e aminoácidos livres, os quais exercem grande influência no sabor dos alimentos (Kristinsson & Rasco, 2000), bem como possuem características nutricionais. O processo hidrolítico das proteínas por via enzimática apresenta vantagens, relacionadas às características intrínsecas das enzimas, tais como: seletividade aos substratos, processos realizados em condições térmicas mais amenas e controláveis, garantindo a manutenção do valor nutritivo do produto (Guadix et al., 2000).

Em geral, os hidrolisados proteicos de pescado possuem conteúdo de aminoácidos essenciais similares ou superiores ao da proteína de referência da FAO (2007). Adicionalmente ao conteúdo aminoacídico, fornecem ácidos graxos de cadeia longa (C20 e C22), que dificilmente são encontrados em tecidos de organismos terrestres (Abowei & Ekubo, 2011).

Pesquisas sobre a utilização de hidrolisado proteico de peixes na nutrição de organismos aquáticos, com níveis de inclusão de 0 a 60% em dietas, demonstraram que os níveis de 19 e 24% de hidrolisado em substituição à farinha de peixe proporcionaram melhores resultados. Contudo, valores elevados de inclusão podem interferir negativamente no crescimento e na utilização de nutrientes (Cahu et al., 1999; Hevrøy et al., 2005).

A inclusão de hidrolisado líquido de peixes (sardinha ou tilápia) e fígado suíno melhoram significativamente o ganho de peso e a conversão alimentar aparente do jundiá (*Rhandia voulezi*) durante a fase inicial de desenvolvimento (Decarli, 2013).

Estudando os efeitos de hidrolisado proteico de peixe (FPH) sobre o desempenho e resposta imune de yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.), Tang et al. (2008) concluíram que a inclusão de 10% de FPH proporcionou os melhores índices. Foi constatado maior ganho de peso e melhor taxa de crescimento específico, bem como melhora de parâmetros imunológicos humorais: atividade de lisozima, imunoglobulina M, componentes C3 e C4 do sistema complemento.

Conhecidos como “surubins”, os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* fazem parte da família Pimelodidae, da ordem dos Siluriformes, podendo ser encontrados nos maiores rios das bacias hidrográficas da América do Sul: rios Paraná, Amazonas, Orinoco, São Francisco, entre outros (Romagosa et al., 2003, Arslan et al., 2008). Considerados nobres por apresentar carne de alta qualidade, com coloração clara, textura firme e ausência de espinhas intramusculares, características valorizadas pelo mercado consumidor, bem como apreciados por praticantes de pesca esportiva (Tavares, 1997; Godinho & Godinho, 2003).

Neste contexto, o hidrolisado proteico é uma tecnologia apropriada para converter coprodutos de origem animal em ingredientes proteicos destinados à indústria de rações para aquicultura devido a sua qualidade nutricional, sendo fonte de pequenos peptídeos com adequado balanço de aminoácidos essenciais de alta digestibilidade, sem alterar os demais nutrientes da matéria-prima.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enzimas

As enzimas compõem uma classe de moléculas sintetizadas pelas células, capazes de realizar as biotransformações que ocorrem nos organismos vivos. São responsáveis pelo metabolismo, ou seja, pelas reações bioquímicas que propiciam o crescimento e desenvolvimento da célula (Law, 2002). Possuem enorme poder catalítico, alto grau de especificidade para os seus substratos, aceleram as reações químicas de maneira bastante eficiente e atuam em soluções aquosas sob condições moderadas de temperatura e pH possibilitando as biotransformações. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem ser até 10^{17} vezes maiores do que as não catalisadas (Nelson & Cox, 2006).

A classificação das enzimas é realizada pela Enzyme Commission (EC), segundo o tipo de reação que catalisam (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a Enzyme Commission (EC).

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

Fonte: Lehninger, 2004.

A velocidade de uma reação catalisada por enzimas pode ser influenciada por fatores como temperatura, pH, concentração da enzima e do substrato ou a presença de inibidores ou ativadores (Lehninger, 2004). As enzimas podem ser utilizadas no processamento de alimentos para recuperar subprodutos, facilitando a fabricação, obtendo-se velocidade e graus de extração mais altos, melhorar o aroma e promover propriedades funcionais e nutricionais (Nielsen & Olsen, 2002).

Entre as vantagens de utilizar enzimas no processamento de alimentos cabe citar: (a) são substâncias naturais e atóxicas; (b) catalisam, em geral, uma reação determinada sem provocar outras reações paralelas indesejáveis; (c) são ativas em condições de temperatura e pH moderadas e a baixas concentrações; (d) é possível controlar a velocidade da reação ajustando a temperatura, o pH e a quantidade de enzima utilizada; e (e) podem ser inativadas uma vez que a reação alcance a extensão desejada (Guadix et al., 2000, Koblitz, 2010).

3.2. Controle da ação das enzimas

Em muitos casos, deseja-se retardar/evitar a atividade enzimática (reações de escurecimento) ou acelerar a ação das enzimas (reações de transformação). Temperatura, pH e atividade de água estão entre os mais importantes fatores ambientais que influenciam a atividade enzimática, sendo que alterações desses parâmetros compreendem o principal modo físico de controle da ação de enzimas em matrizes alimentares (Damodaran, 2010).

3.2.1. Temperatura

A temperatura tem efeitos previsíveis e opostos, ativação e desativação, sobre a atividade das enzimas. Normalmente, a velocidade de uma reação enzimática aumenta com o aumento da temperatura, até o ponto que atinge a estabilidade térmica do biocatalisador (Nelson & Cox, 2006).

Em geral, a elevação da temperatura aumenta a energia livre no sistema, sendo o resultado líquido a diminuição da barreira de energia para a ocorrência das reações, que são aceleradas. A temperatura ótima para a atividade de uma enzima resulta dos efeitos líquidos da temperatura sobre ativação e inativação. Portanto, a temperatura ótima é aquela em que a velocidade de reação da enzima é maior (ação catalítica). Essa condição tem uma duração limitada e, com o passar do tempo, a desnaturação progressiva logo predomina e muito da atividade original é perdida (Damodaran, 2010).

3.2.2. Conteúdo de água e atividade de água

A quantidade de água disponível tanto para a enzima e como seu substrato desempenha um importante papel na regulação da atividade enzimática. De modo geral, em baixas concentrações de água as enzimas tem sua ação severamente restringida, podendo alterar seus padrões de atividade (Fennema, 1993). A água é necessária para a manutenção da estrutura da enzima, como meio de difusão para que os sítios ativos das enzimas encontrem os substratos e os produtos formados sejam difundidos para o meio (Price & Stevens, 1991).

3.2.3. Efeitos do pH sobre as enzimas

Com relação ao pH, existe um valor ótimo para que a enzima catalise as reações desejadas. Quando há uma grande variação deste valor, pode ocorrer a ionização de grupos funcionais da estrutura da proteína, causando a desnaturação da enzima ou ausência de reatividade (Nelson & Cox, 2006).

Valores extremos de pH geralmente inativam as enzimas. De modo geral, as enzimas apresentam atividade máxima em determinado valor de pH, ao que se denomina “pH ótimo”. A maior parte das enzimas apresentam atividade máxima em pH entre 4,5 – 8,0. Contudo, existem enzimas com pH ótimo extremo, como é o caso da pepsina (pH = 1,8) ou a arginase, cujo ótimo é pH 10,0 (Fennema, 1993).

Em condições extremas de pH, a atividade enzimática geralmente declina irreversivelmente devido a processos de desnaturação proteica. Entretanto, as enzimas apresentam uma faixa de inativação reversível dos grupos funcionais do centro ativo ou de áreas que controlam a conformação da enzima (Koblitz, 2010).

O pH ótimo de uma enzima pode ser consequência de um verdadeiro efeito reversível do pH sobre 1) velocidade máxima da reação; 2) afinidade do substrato pela enzima e 3) estabilidade da enzima (Fennema, 1993).

É importante lembrar que os fatores tempo, concentração de substrato, concentração de enzima, pH e temperatura estão mutuamente relacionados. Desta forma, alteração em um desses fatores, geralmente afeta a resposta enzimática aos demais fatores.

3.3. Proteases

As proteases (EC 3.4) são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases, catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas

podendo ainda apresentar atividade sobre ligações éster e amida. São também conhecidas como peptidases ou proteinases. Sua principal função biológica é a hidrólise de proteínas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e no transporte de proteínas através de membranas (Fennema, 1993). Todas as proteases apresentam certo grau de especificidade de substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a eles. A posição da ligação na cadeia polipeptídica e o tamanho da cadeia podem influenciar a atividade das proteases (Nelson & Cox, 2006).

3.3.1. Características gerais e modo de ação

As proteases são classificadas basicamente de acordo com o seu modo de ação e a natureza química do sítio catalítico, conforme descrito abaixo:

De acordo com seu modo de ação, as proteases são divididas em exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica e endopeptidases, que agem nas ligações no interior da cadeia proteica.

As exopeptidases dividem-se em:

Aminopeptidases: proteases que agem na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica, liberando aminoácidos livres, dipeptídeos ou tripeptídeos.

Carboxipeptidases: proteases que agem na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica, liberando aminoácidos livres ou dipeptídeos.

As endopeptidases normalmente são classificadas pela natureza química de seu sítio ativo e por seu mecanismo de ação em quatro grupos distintos:

Serina-proteases (EC 3.4.21): caracterizadas pela presença do aminoácido serina no sítio ativo. Em geral, são ativas em pH de 7,0 a 11,0 e

podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida. O principal grupo desse tipo de proteases é formado pelas serinas-proteases alcalinas como tripsina, quimotripsina e subtilisina, que apresentam baixa especificidade do substrato. Dentre as serina-proteases, as de maior importância comercial são as subtilisinas, em especial a subtilisina Carlsberg.

Cisteína-proteases (EC 3.4.22): apresentam em seu sítio ativo cisteína conjugada com histidina. São, normalmente, mais ativas em meios de pH neutro, podendo apresentar atividade em valores de pH ácidos. As proteases vegetais, como papaína, bromelina e ficina, são as principais cisteína-proteases.

Proteases aspárticas (EC 3.4.23): contêm ácido em seu sítio ativo, em geral apresentam maior atividade em valores de pH ácido e tem maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos. Entre as principais proteases ácidas estão a pepsina e renina, assim como diversas proteases microbianas, sobretudo fúngicas (gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Endothia* e *Rhizomucor*).

Metalo-proteases (EC 3.4.24): são enzimas que dependem de íons metálicos divalentes para sua atividade, podem ser neutras ou alcalinas (Koblitz, 2010).

3.4. Principais fontes

Por ser indispensável à vida, proteases são produzidas por todos os seres vivos: animais, vegetais e microrganismos. As enzimas produzidas para a indústria alimentícia são complexos enzimáticos que possuem uma enzima predominante e várias outras secundárias. Procedem de plantas comestíveis e atóxicas, animais e microrganismos não toxigênicos (Koblitz, 2010).

3.4.1. Proteases vegetais

As proteases vegetais estão entre as mais empregadas na indústria de alimentos por serem consideradas seguras para consumo humano e por serem tradicionalmente empregadas no preparo de diversos alimentos. Em geral, a atividade dessas proteases é maior nos vegetais verdes, em comparação com as mesmas espécies em estado mais avançado de maturação. A papaína, a bromelina e a ficina estão entre as mais importantes cisteína-proteases (Koblitz, 2010).

3.4.1.1. Papaína (EC. 3.4.22.2)

É uma cisteína-protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*). Geralmente é comercializada na forma de extrato bruto que contém diferentes proteases, entre as quais as mais importantes são a papaína e a quimopapaína, com características bastante semelhantes e que variam ligeiramente com a variedade plantada, o clima e o manejo, além do processo de extração/concentração utilizado (Koblitz, 2010, Kraut, 1971). Normalmente a papaína apresenta atividade proteolítica em valores de pH entre 5,0 a 9,0. Demonstra alta estabilidade térmica próximo a pH neutro, sendo que em pH ácido ($< 4,0$), a papaína é rapidamente inativada de forma irreversível sob temperaturas elevadas. Sob pH extremamente ácido ($< 2,0$) essa inativação irreversível é extremamente rápida, mesmo a temperaturas de 25°C, isso está associado a alterações estruturais, causadas pelo desdobramento da molécula (Fennema, 1993). A papaína apresenta ainda atividade sobre ligações éster e amida e tem

boa atuação na síntese de peptídeos. Apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisam preferencialmente ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina (Koblitz, 2010).

3.4.2. Proteases animais

As proteases animais estão entre as enzimas mais estudadas por seu interesse para área de saúde. As mais importantes, comercialmente, são as proteases gástricas (renina e pepsina) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina) (Koblitz, 2010).

3.4.3. Proteases microbianas

Os microrganismos são excelentes fontes de enzimas em razão da grande diversidade e relativa facilidade de produção em larga escala. A obtenção de enzimas a partir de microrganismos apresenta numerosas vantagens: (a) os microrganismos são muito versáteis, sendo possível, pelo menos teoricamente, encontrar microrganismos para produzir qualquer enzima; (b) os microrganismos podem ser modificados mediante mutação ou por engenharia genética para produzir uma maior quantidade de enzima ou diferentes enzimas; (c) a recuperação das enzimas geralmente é fácil, uma vez que a maioria das enzimas microbianas é extracelular; (d) para a produção de enzimas microbianas são utilizadas matérias-primas de fácil obtenção e (e) os microrganismos possuem altas taxas de crescimento e produção de enzimas (Koblitz, 2010).

Origem microbiana: a maior parte das proteases comerciais é produzida por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus*. As proteases bacterianas

neutras são ativas em valores de pH entre 5,0 a 8,0 e apresentam baixa estabilidade térmica. Embora tenham preferência por ligações entre aminoácidos hidrofóbicos, o grau de hidrólise pode ser controlado por alterações no pH e na temperatura da reação proteolítica. As proteases bacterianas alcalinas apresentam maior atividade em pH entre 8,0 a 11,0 e a temperaturas entre 50 a 60°C. Em geral, tem baixa especificidade de substrato e são mais utilizadas na indústria de detergentes (Koblitz, 2010).

Origem fúngica: uma única espécie de fungo pode produzir diferentes proteases (alcalinas, neutras e ácidas).

3.4.3.1. Subtilisinas – Alcalase

As subtilisinas são serinas proteases, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*. A Alcalase (subtilisina Carlsberg) é produzida por *Bacillus licheniformis* muito utilizada na indústria de detergentes desde a década de 60, bem como muito utilizada na produção de hidrolisados enzimáticos de variadas fontes proteicas de grau alimentício (Adler-Nissen, 1976).

Clivam muitos tipos de ligações peptídicas, preferencialmente aquelas com cadeia lateral hidrofóbica na porção C – terminal. Apresenta grande atividade enzimática em pH máximo na faixa de 8 – 9 e temperatura ótima entre 55 – 60°C. Em valores de pH inferiores a 5 a alcalase perde estabilidade térmica; em pH próximo de 4 a enzima pode ser prontamente inativada sob temperaturas moderadas (Kraut, 1971).

3.5. Modificação de proteínas – hidrólise enzimática

Os hidrolisados proteicos podem ser definidos como produtos constituídos por aminoácidos livres e peptídeos que apresentam grande variação de massas moleculares resultantes do maior ou menor grau de hidrólise das proteínas. A hidrólise enzimática das proteínas de pescado pode ser realizada com enzimas endógenas, proteases existentes no tecido, ou com enzimas exógenas, adicionadas intencionalmente para promover o processo hidrolítico (Batista, 2011).

A produção dos hidrolisados proteicos é realizada em condições suaves e não promovem à formação de produtos secundários de degradação. Inicialmente o processo produtivo envolve uma etapa de moagem da matéria-prima a ser hidrolisada (Figura 1), seguida da adição e homogeneização com igual volume de água até obtenção de uma massa viscosa (Batista, 2011). A suspensão em água e a adequada homogeneização são importantes para permitir fácil acesso das enzimas às proteínas (Santos et al., 2011). Por vezes têm sido utilizadas soluções tampão em vez de água, mas a presença dos sais do tampão pode afetar negativamente as propriedades dos hidrolisados obtidos.

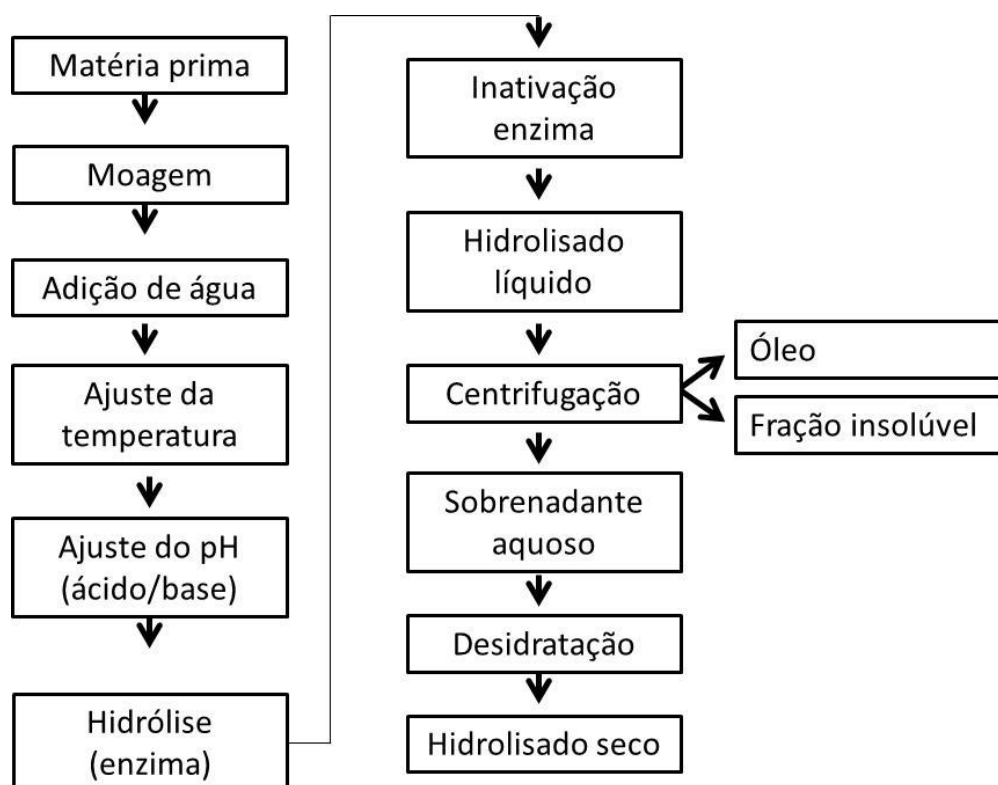


Figura 1. Fluxograma de produção de hidrolisado proteico (Adaptado de Batista, 2011).

A suspensão água/matéria-prima moída é aquecida até à temperatura adequada para que ocorra a reação enzimática. Posteriormente o pH é ajustado ao valor pretendido, sendo a enzima adicionada no final. A reação de hidrólise depende da concentração de substrato, da relação enzima/substrato, do pH, da temperatura e do tempo, segundo o grau de hidrólise pretendido, ou seja, o número de ligações peptídicas quebradas (Batista, 2011).

Ao atingir o grau de hidrólise pretendido, a reação enzimática precisa ser inativada para que a enzima não continue a hidrolisar as proteínas e peptídeos. Essa inativação pode ser realizada por meios térmicos ou químicos. Na inativação térmica a mistura reacional é aquecida a temperaturas entre 75 e 100°C durante 5 a 30 minutos, dependendo da enzima utilizada. A inativação química é obtida por

meio de aumento ou diminuição do pH do meio reacional para valores nos quais a enzima é inativada (Batista 2011).

O processo de inativação térmica das proteases pode provocar desnaturação nas proteínas ocasionando perda de solubilidade e propriedades funcionais. De maneira semelhante, valores extremos de pH podem provocar alterações na conformação das cadeias proteicas ou dos oligopeptídeos que afetam as respectivas propriedades funcionais.

O material hidrolisado pode ser recuperado por meio de centrifugação, a qual permite obter várias frações: uma mais densa constituída por proteínas não hidrolisadas, uma fase aquosa contendo o material proteico hidrolisado. A fração solúvel pode ter duas fases diferentes densidades, sendo uma camada de óleo sobrenadante, dependendo da quantidade de lipídios presente na matéria-prima (Batista, 2011). Para a obtenção de hidrolisados secos, é usual recorrer à secagem da fração aquosa onde os peptídeos se encontram solubilizados. Podendo para tal recorrer a secagem por *spray dryer*, originando o produto em pó, que tem como vantagens a facilidade de manuseio e estabilidade oxidativa (Abdul-Hamid, 2002).

3.6. Hidrolisados e suas diferentes aplicações

Os hidrolisados proteicos são utilizados como ingredientes de vários alimentos, com o objetivo de conferir sabor característico, alterar a textura, emulsificar, produzir espuma ou aumentar o valor nutricional (Nielsen-Nissen, 1976).

Hidrolisados de carne bovina e peixe são usados como flavorizantes na produção de temperos, caldos, sopas e molhos. Vários alimentos orientais, como

missô e shoyo, devem seu sabor característico à hidrólise de proteínas insolúveis de soja, ou de misturas de soja e trigo, arroz, aveia ou centeio, em polipeptídios solúveis.

A indústria farmacêutica e de alimentos vêm mostrando interesse em peptídeos obtidos por hidrólise enzimática para uso como alimentos funcionais. As funções biológicas mais estudadas desses peptídeos são as atividades antioxidante (Dong et al., 2008; Theodore, 2008; Dong et al., 2010), antibacteriana, anti-inflamatória e estimulante do sistema imunológico (Kotzamanis et al., 2007, Zheng et al., 2012).

Os hidrolisados proteicos de pescado têm demonstrado resultados positivos na formulação de substitutos parciais de leite e produtos lácteos, como importante suplemento na formulação de produtos a base de cereais e sopas desidratadas (Kristinsson & Rasco, 2000). No cultivo de microrganismos tem se mostrado como meios de cultivo promissores (Aspmo, 2005), sendo utilizado como fonte de nitrogênio e carbono (Triki-Ellouz et al., 2003).

Estudos realizados com ratos demonstraram que o consumo de uma dieta alimentar contendo hidrolisado proteico de peixe (saithe), rica em taurina e glicina, aumentou as concentrações plasmáticas de ácidos biliares. Ocorreu concomitante redução de lipídios no fígado, indução dos genes envolvidos no gasto de energia de gordura abdominal, quando comparados a dietas alimentares a base de isolado proteico de soja ou caseína de sódio (Liaset et al., 2009). Os autores destacam a necessidade de mais estudos para elucidar como o hidrolisado proteico de peixe (saithe) pode influenciar no metabolismo energético, impedindo o desenvolvimento de obesidade induzida pela dieta.

Por apresentarem adequado equilíbrio de aminoácidos essenciais os hidrolisados podem ser direcionados como produtos alternativos de elevada qualidade nutricional com potencial aplicação na indústria de alimentação de animais de estimação e aquicultura (Folador et al., 2006).

Na nutrição animal, destacadamente na aquicultura, existem vários estudos que avaliam o uso, em sua maior parte, de hidrolisados de peixe sobre o desempenho dos animais, que relatam resultados positivos quanto ao uso dos mesmos.

O uso de hidrolisado de peixe tem efeito positivo sobre o crescimento de larvas de salmão do Atlântico em dietas de larvas de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Berge & Storebakken, 1996). Valores significativos nas taxas de crescimento bem como a alta aceitabilidade das dietas contendo proteína hidrolisada de camarão pode caracterizá-lo como estimulante alimentar natural em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Plascencia-Jatomea et al., 2002).

De maneira semelhante, a substituição de farinha de peixe por níveis crescentes de hidrolisado proteico de arenque (*Clupea harengus*), em dietas para salmão (*S. salar*) com peso inicial de 174g durante 68 dias demonstraram que os peixes alimentados com as dietas contendo níveis médios de inclusão (180, 240 g kg⁻¹), apresentaram maior taxa de crescimento específico. Entretanto, não houve diferença para os parâmetros de composição centesimal e análises hematológicas (Hevrøy et al., 2005).

Em estudo com larvas de robalo (*Dicentrarchus labrax*), houve maior crescimento, sobrevivência e desenvolvimento intestinal nas larvas alimentadas com dieta contendo 10% de hidrolisado de peixe com peptídeos solúveis de peso

molecular entre 500 a 2500 Da (Kotzamanis et al., 2007). Segundo os pesquisadores, diferentes frações de pesos moleculares, bem como as concentrações de peptídeos solúveis em alimentos podem afetar o crescimento e o estado imunológico de larvas de robalo.

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) é um grupo de hormônios produzidos principalmente no fígado e fundamentalmente envolvidos na regulação do crescimento. A inclusão de 37 g kg⁻¹ de hidrolisado de resíduos de abadejo (*Theragra chalcogramma*) aumenta os níveis plasmáticos de IGF-I em juvenis de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), além de exercer efeitos sobre o crescimento e eficiência alimentar (Zheng et al., 2012).

Com relação ao hidrolisado de fígado suíno, não foi encontrado estudo sobre sua aplicação na nutrição de peixes. Entretanto, em ratos, a administração oral de 1 g de hidrolisado de fígado suíno resulta em diminuição da pressão arterial, indicando atividade antioxidante e inibição da atividade de enzima conversora da angiotensina (ECA), enzima que atua na conversão de angiotensina I em angiotensina II, representando um papel importante na homeostase da pressão arterial (Inoue et al., 2013).

3.7. Espécie em estudo

O pintado, (*Pseudoplatystoma corruscans*), também conhecido como surubim (Figura 2), é uma das espécies de peixe de água doce mais importante do Brasil em função da qualidade da carne, porte avantajado e importância histórica na produção da pesca das regiões de ocorrência: bacias do Rio Paraná e São Francisco (Romagoza et al., 2003). Outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* como, por exemplo, *P. reticulatum*, *P. tigrinum*, *P. punctifer*,

entre outros, estão presentes em todas as principais bacias hidrográficas da América do Sul (Araújo-Lima & Ruffino, 2003).

Os peixes pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma*, bem como todos os Siluriformes, são peixes sem escama apresentam o corpo roliço e alongado e a cabeça achatada; três pares de barbilhões próximos a boca e o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais se constitui de um acúleo forte e pungente (Britski et al., 1988).



Figura 2. Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Foto: ARQUIVO SEMATUR - Cáceres-MT. Disponível em <http://www.gopantanal.com.br> (acessado em 08/08/2013).

A dificuldade na produção de juvenis de pintado, etapa que exige estruturas adequadas, grande quantidade de água, conhecimento da tecnologia e uma dedicação intensa, restringe a oferta de juvenis dessa espécie e encarece o seu preço. Na tentativa de melhorar estes requisitos é possível fazer cruzamentos artificiais entre as espécies do gênero *Pseudoplatystoma*, como o cruzamento cachapinta (cruzamento de fêmea de cachara com macho de pintado) e o pintachara (cruzamento de fêmea de pintado com macho de cachara), ou entre gêneros como no caso de cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) com pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*), originando a cachapira, bem como o jundiá-da-

amazônia ou peixe onça (*Leiarus marmoratus*). Os híbridos são produzidos pelos vários produtores de juvenis que trabalham com essas espécies, raramente vendendo peixes puros (Carvalho et al., 2008, Campos 2010).

A produção de híbridos busca aproveitar as características favoráveis das espécies parentais, bem como melhorar o seu desempenho para a exploração em cativeiro. Ou seja, a hibridação como técnica praticada em explorações aquícolas, busca melhorar a produtividade, de forma que o sistema torne-se mais competitivo (Botero et al., 2004).

No presente trabalho utilizamos juvenis de pintado Real[®], um híbrido produzido pelo Projeto Pacu Aquicultura Ltda. Segundo informações do fornecedor, trata-se de um peixe dócil, resistente e precoce, capaz de crescer 1,8 a 2 quilos em sete meses, com conversão alimentar abaixo de 1,8:1.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral:

Utilizar coprodutos agroindustriais de origem animal para obtenção de hidrolisado proteico e avaliar seu valor biológico em juvenis de surubins (*Pseudoplatystoma sp*).

4.2. Objetivos Específicos:

Produzir hidrolisados proteicos a partir de dois resíduos agroindustriais, a saber: resíduos do processamento de tilápia (RT) e fígado suíno (FS).

Utilizar e avaliar duas enzimas, Alcalase® (A) e Brauzin® (B) no processo de hidrólise enzimática de FS e RT.

Avaliar os produtos desenvolvidos quanto sua composição centesimal, composição aminoacídica, aminoácidos livres e ácidos graxos.

Avaliar o crescimento e o desempenho de juvenis de surubins (*Pseudoplatystoma sp*), quando alimentados com rações contendo os diferentes hidrolisados proteicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**. v.78, p. 69-74, 2002.

ABOWEI, J.F.N. & EKUBO, A.T. British Journal of Pharmacology and Toxicology. v. 2, p. 179-191, 2011.

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic Hidrolysis of Proteins for Increased Solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 24, p. 1090–1093, 1976.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; RUFFINO, M.L. Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: CAROLSFELD, J., HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). Migratory fishes of South America. Victoria, BC, Canada: World Fisheries Trust, p 232-302, 2003.

ARSLAN, M.; RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; PORTELLA, M.C. Effects of Different Dietary Lipid Sources on the Survival, Growth, and Fatty Acid composition of South American Catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum*, Surubim, Juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 39, p. 51-61, 2008.

- ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3714-3722, 2005.
- BATISTA, I. Hidrolisado proteico de pescado. In GONÇALVES, A.A. Tecnologia do pescado – Ciência, tecnologia, inovação e legislação. Atheneu, p. 386-398, 2011. 624p.
- BERGE, G.M.; STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**. v. 145, p. 205-212, 1996.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. 3ª Ed. Brasília: CODEVASF, 115p, 1988.
- BOTERO, M.; FRESNEDA, A.; MONTOYA, A.; OLIVERA-ÁNGEL, M. Descripción del desarrollo embrionario de zigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). Revista Colombiana Ciencia Pecuaria, v. 17 p. 38-45, 2004.
- CARVALHO D.C.; SEERING, A.; MELO, D.C.; SOUSA, A.B.; PIMENTA, D.; OLIVEIRA, D.A.A. Identificação molecular de peixes: o caso do surubim (*Pseudoplatystoma* ssp.). **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v. 32, p. 215-219, 2008.

- CAHU, C.L.; ZAMBONINO INFANTE, J.L.; QUAZUGUEL, P.; LE GALL, M.M.
Protein hydrolysate vs. Fish meal in compound diets for 10-day old sea bass
dicentrarchus labrax larvae. **Aquaculture**. v. 171, p. 109-119, 1999.
- CAMPOS, J.L. (2010) O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix;
Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus
híbridos. In: Baldisserotto, B., Gomes, L. C. 2ª Ed. Editora UFSM. 335-358.
- DECARLI, J.A. Hidrolisados proteicos na alimentação do jundiá (*Rhamdia voulezi*)
em tanques rede. Marechal Cândido Rondon, 30p. Dissertação (Mestrado
em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia – PPZ,
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2013.
- DAMODARAN, S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: Damodaran, S., Parkin,
K., Fennema, O. Química de Alimentos de Fennema. 4ª Ed. Artmed, 2010.
180-260.
- DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and
biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp
(*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**. v. 107, p. 1485-1493, 2008.
- DONG, X.-P.; ZHU, B.-W.; ZHAO, H.-X.; ZHOU, D.-Y.; WU, H.-T.; YANG, J.-F.
Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from
oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. **International Journal of Food
Science and Technology**. v. 45, p. 978-984, 2010.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization and World Health Organization.

Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint
FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO Technical Report Series, n. 935,
Geneva, 2007

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza
(España). 1993. 1258p.

FOLADOR, J.F.; KARR-LILIENTHAL, L.K.; PARSONS, C.M.; BAUER, L.L.;
UTTERBACK, P.L.; SCHASTEEN, C.S.; BECHTEL, P.J.; FAJEY, GC JR.
Fish meals, fish components, and fish protein hydrolysates as potential
ingredients in pet foods. **Journal of Animal Science**. v. 84, p. 2752-2765,
2006.

GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.;
CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de controle la hidrólisis de
proteínas. **Ars Pharmaceutica**. v. 41, p. 79–89, 2000.

GODINHO A.L. & GODINHO H.P. Breve visão do São Francisco. In Godinho H.P.
& Godinho A.L. (ed.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das
Minas Gerais. PUC Minas, Belo Horizonte, p. 15–24, 2003.

HEVROY, E.M.; ESPE, M.; WAAGBO, R. Nutrient utilization in Atlantic salmon
(*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a
period of fast growth. **Aquaculture Nutrition**. v. 11, p. 301-313, 2005.

INOUE, N.; HAMASAKI, A.; HIDAKA, S.; MIHURA, N.; FUKAHORI, M.; MARUYAMA, M.; KAWAHARA, S.; OHTA, K.; MUGURUMA, M. Analysis of the components of porcine liver and examination of the antioxidant activity and angiotensin converting enzyme (ACE)- inhibiting activity. **Yakugaku Zasshi**. v. 133, p. 107–115, 2013.

KOBLITZ, M.G.B. Bioquímica de alimentos – Teoria e aplicações práticas. GEN. p. 77-105, 2010.

KOTZAMANIS, Y.P.; GISBERT, E.; GATESOUBE, F.J.; ZAMBONINO INFANTE, J.; CAHU, C. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 147, p. 205-214, 2007.

KRAUT, J. Subtilisin: X-Ray Struture. IN: BOYER, P.D. The enzymes, Vol II. Academic Press, New York, 1971.

KRISTINSSON, H.G.; & RASCO, B.A. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p. 657–666, 2000.

- LAW, B.A. The nature of enzymes and their action in foods. In: WHITEHURST, R.J. & LAW, B.A. Enzymes in food technology. **CRC Press**. p. 1-18, 2002.
- LIASET, B.; MADSEN, L.; HAO, Q.; CRIALES, G.; MELLGREN, G.; MARSCHALL, H.U.; HALLENBORG, P.; ESPE, M.; FRØYLAND, L.; KRISTIANSEN, K. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 179, p. 254-262, 2009.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Principles of Biochemistry. Fourth Ed. W. H. Freeman, New York. 2004.
- NELSON, D.L., COX, M.M. LEHNINGER. **Princípios de Bioquímica**. 4ª edição. Sarvier, São Paulo, Brasil, Cap. 4, 2006.
- NIELSEN, P.M. & OLSEN, H.S. Enzymic modification of food protein. In: WHITEHURST, R.J. & LAW, B.A. Enzymes in food technology. **CRC Press**, p. 109-143, 2002.
- PLASCENCIA-JATOMEA, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; ARREDONDO-FIGUEROA, J.L.; HALL, G.M.; SHIRAI, K. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 82, p. 753-759, 2002.

PRICE N.C. & STEVENS, L. Enzymes: Structure and Function. In: FOX, P.F. **Food Enzymology**, Vol I. Elsevier Applied Science, New York, 1991.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; GODINHO, H.M. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (teleostei, siluriformes, pimelodidae), mantidas em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 29, p. 151-159, 2003.

SANTOS, S. D'A. DOS.; MARTINS, V.G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. **Food Bioprocess Technology**. v. 4, p. 1399–1406, 2011.

SEMATUR. Cáceres-MT. Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). Disponível em <http://www.gopantanal.com.br> (acessado em 08/08/2013).

TANG, H.G.; WU, T.X.; ZHAO, Z.; PAN, X. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). **Journal of Zhejiang University Science B**. v. 9, p. 684-690, 2008.

TAVARES, M.P. O surubim. In: Miranda, M.O.T. (Org.), Surubim. IBAMA, Belo Horizonte, p. 9-25, 1997.

- THEODORE, A.E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 7459-7466, 2008.
- TRIKI-ELLOUZ, Y.; GHORBEL, B.; SOUISSI, N.; KAMMOUND, S.; NASRI, M. Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 19, p. 41-45, 2003.
- ZHENG, K.; LIANG, M.; YAO, H.; WANG, J.; CHANG, Q. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Nutrition**. v. 18, p. 297–303, 2012.

6. ARTIGO I – SERÁ ENVIADO A FOOD CHEMISTRY

6.1. Desenvolvimento e Caracterização de Hidrolisados Proteicos de Coprodutos Agroindustriais de Origem Animal

Resumo: Objetivou-se desenvolver diferentes hidrolisados proteicos enzimáticos a partir dos coprodutos fígado suíno (FS) e coproduto do processamento da tilápia (CT) (*Oreochromis niloticus*) para uso em ração animal. Foi utilizado delineamento experimental fatorial 2x2 inteiramente casualizado, sendo o primeiro fator as matérias-primas, CT e FS, o segundo as enzimas, Alcalase® e Brauzyn® com três repetições. A hidrólise ocorreu com controle da temperatura, usando relação enzima:substrato (1:200 p/p). Produtos hidrolisados com Alcalase® apresentaram maior quantidade de aminoácidos livres em comparação aos demais hidrolisados, independente da matéria-prima utilizada. Os hidrolisados de RT apresentaram maiores conteúdos médios de lipídeos com destaque para os ácidos graxos monoinsaturados. Dentre os poli-insaturados, os ácidos graxos da série n-6 foram predominantes. O processamento de FS e RT utilizando Alcalase® e Brauzyn® resultou em produtos com potencial para o uso em rações animais como flavorizante e/ou fonte de nutrientes essenciais.

Palavras chave: biotecnologia, complexo enzimático, industrialização, nutrição animal.

6.2. Introdução

A produção de grandes volumes de resíduos agroindustriais tem resultado na procura de alternativas tecnológicas para seu aproveitamento. Possibilitando agregar novas fontes de receita aos subprodutos industriais e dar destino sustentável aos resíduos.

Hidrolisados proteicos são produtos obtidos por meio da ação de enzimas proteolíticas ou por agentes químicos, sendo constituídos por fragmentos de proteínas: peptídeos de diferentes tamanhos; poli, tri e dipeptídeos e aminoácidos livres, os quais exercem grande influência no sabor dos alimentos (Kristinsson e Rasco, 2000). O processo hidrolítico das proteínas, por meio de via enzimática, apresenta vantagens relacionadas às características intrínsecas das enzimas, tais como: seletividade aos substratos e processos realizados em condições térmicas mais amenas e controláveis. Estas condições minimizam o desenvolvimento de reações secundárias indesejáveis, como a formação de compostos tóxicos, garantindo a manutenção do valor nutritivo do produto (Guádix, Guádix, Pérez-Dueñas, González-Tello e Camacho, 2000).

A qualidade nutricional dos substratos é preservada quando se utiliza uma hidrólise enzimática em condições controladas. Em geral, os hidrolisados proteicos de pescado possuem conteúdo de aminoácidos essenciais, similar ou superior, ao da proteína de referência da FAO/WHO. Adicionalmente ao conteúdo aminoácídico, estes subprodutos fornecem ácidos graxos de cadeia longa (C20 e C22), que dificilmente são encontrados em tecidos de organismos terrestres (Abowei & Ekubo, 2011).

Dentre as proteases, a alcalase (subtilisina Carlsberg), uma serina protease muito utilizada na produção de hidrolisados enzimáticos de variadas fontes proteicas de grau alimentício (Adler-Nissen, 1976), que cliva muitos tipos de ligações peptídicas, preferencialmente aquelas com cadeia lateral hidrofóbica na porção C – teminal (Kraut, 1971). A papaína, uma cisteína protease, apresenta atividade sobre ligações éster e amida

e hidrolisam preferencialmente ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina (Koblitz, 2010).

Para utilização alternativa de resíduos agroindustriais de origem animal este trabalho teve por objetivo, desenvolver em escala industrial hidrolisados de fígado de suíno (FS) e coprodutos do processamento da tilápia (CT) (*Oreochromis niloticus*), utilizando Alcalase® (A) e Brauzin® (B).

6.3. Materiais e Métodos

6.3.1. Material

Fígado suíno (FS) e coprodutos da indústria de filetagem de tilápias (RT), constituídos de cabeças e carcaças foram adquiridos na forma resfriada de agroindústrias localizadas no município de Toledo – PR, Brasil. As matérias-primas foram coletadas ao final do dia de abate, transportadas para a planta de processamento e mantidas sob refrigeração até o início do processo.

As enzimas utilizadas no processo foram a Alcalase 2.4L® da Novozymes Latino Americana Ltda, Paraná, Brasil e a Brauzyn®100 (papaína), da Prozyn BioSolutions, São Paulo, Brasil.

6.3.2. Planejamento do processo industrial

O planejamento consistiu em produzir quatro hidrolisados em escala industrial a partir dos coprodutos, FS e CT, submetidos a hidrólise com as enzimas Alcalase® e Brauzyn®. Para tal, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x2, sendo o primeiro fator as matérias primas (CT e FS), o

segundo fator as enzimas (Alcalase® e Brauzyn®) e três repetições, perfazendo o total de 12 parcelas, sendo fixada a relação enzima substrato e temperatura do processo.

6.3.3. Processamento dos hidrolisados

As matérias-primas depois de trituradas (5.0 mm) e homogeneizadas foram encaminhadas para reator industrial de aço inox encamisado com capacidade total para duas toneladas e aquecimento elétrico. No reator foi adicionada água 100:15 (p/v) e enzima, com agitação constante. A relação enzima/substrato utilizada foi equivalente a 1:200 (p/p) e temperatura de 60 e 65°C para Alcalase® e Brauzyn®, respectivamente. O pH foi de 6.5 e as temperaturas foram mantidas por 60 minutos. Todas as condições de processamento foram estabelecidas com base em estudos e testes anteriores.

Ao término da hidrólise as enzimas foram inativadas termicamente a 85°C durante 15 minutos (Adler-Nissen, 1976) e a seguir receberam a adição de ácido fosfórico para ajustar os produtos em pH 3.0, com objetivo de conservação dos produtos. Os hidrolisados de CT passaram por processo de filtração em peneira de aço inox (1.0 mm) para a retirada dos ossos e espinhas.

6.3.4. Composição centesimal

As análises de umidade, proteína bruta (Nx6,25), extrato etéreo e matéria mineral foram realizadas de acordo com AOAC (Horwitz, 2010).

6.3.5. Perfil de aminoácidos e aminoácidos livres

Aminoácidos totais e livres foram determinados por cromatografia líquida de fase reversa (RP – HPLC) usando um sistema de HPLC (Shimadzu Corporation, Tokio, Japan)

equipado com detector UV (254 nm) e uma coluna C18 Luna – Phenomene Y (250 mm x 4.6 mm, 5µ - Phenomenex Inc. Torrence, CA, USA) A quantificação dos aminoácidos foi realizada seguindo o método descrito por White, Hard e Fry (1986) e Hagen, Fost e Augustin (1989). O triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com pronase a 40⁰C, seguido de reação colorimétrica com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21.1 N e leitura em espectrofotômetro a 590 nm (Spies, 1967).

6.3.6. Escore químico

Para avaliar a ordem dos aminoácidos limitantes nos diferentes hidrolisados foi calculado o escore químico (EQ) segundo Sgarbieri (1996):

$$EQ = \frac{\text{mg de aminoácido/g proteína teste}}{\text{mg de aminoácido/g proteína referencia}}$$

Como referencia, foram considerados os aminoácidos essenciais da proteína padrão, segundo FAO/WHO (2007) para adultos: histidina 1.50, isoleucina 3.0, leucina 5.90, metionina + cistina 2.20, fenilalanina + tirosina 3.80, treonina 2.30, triptofano 0.60, lisina 4.50 e valina 3.90 (g 100g de proteína⁻¹).

6.3.7. Perfil de ácidos graxos

Após extração dos lipídeos com éter de petróleo no extrator de Butt (Horwitz, 2010), as amostras foram esterificadas de acordo com Hartmann e Lago (1973) e Horwitz (2010). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados por cromatografia a gás (VARIAN Mod. 3900), coluna capilar CP-SIL 88, detector por ionização de chama (FID) e workstation com software STAR. Os picos foram identificados por comparação a padrões da SUPELCO IM 37 Component FAME MIX (Sigma Aldrich).

6.3.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de ANOVA fatorial (2x2) e quando observado diferença estatística foi aplicado o teste Tukey ($P < 0.05$). O programa computacional utilizado foi o Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

6.4. Resultados e Discussão

No processo de hidrólise observou-se que após 40 minutos as matérias-primas tornam-se líquidas, sendo necessária a filtragem para retirada de resíduos ósseos no CT. A aparência dos hidrolisados reflete as características das diferentes matérias-primas utilizadas (Tabela 2). Estas características também foram mantidas, quando avaliadas a composição centesimal dos hidrolisados, diferindo significativamente entre os hidrolisados para proteína bruta e extrato etéreo ($P < 0.05$). Os hidrolisados produzidos com FS apresentam maiores valores de proteína bruta aproximadamente 1.5 vezes maior quando comparados com os de CT (Tabela 2).

A Tabela 2 mostra que a relação da proteína bruta e extrato etéreo é inversamente proporcional entre hidrolisados das diferentes matérias-primas. Hidrolisados produzidos utilizando-se RT apresentaram maiores valores de extrato etéreo.

As enzimas não influenciaram na composição centesimal dos hidrolisados, não ocorrendo a interação dos fatores (MP x E) ($P > 0.05$) (Tabela 2). Apesar de o CT constituir uma fonte de elevado conteúdo de matéria mineral (MM), o equilíbrio apresentado entre os hidrolisados, quanto ao teor de minerais, pode ser atribuído à remoção dos ossos triturados do CT, por meio de filtragem após a hidrólise, e a adição de ácido fosfórico.

A composição centesimal dos hidrolisados é dependente do substrato utilizado como matéria-prima. Corroborando com os resultados encontrados por Folador et al. (2006) em

que a matéria-prima utilizada influenciou a composição centesimal de hidrolisados produzidos com diferentes resíduos de Alaska pollock. Estudos realizados com hidrolisados de yellow stripe trevally por Klompong, Benjakul, Kantachote and Shahidi (2009) também relataram tais influências.

De modo geral, a composição em aminoácidos essenciais (Tabela 3) e não essenciais (Tabela 4) dos diferentes hidrolisados mantiveram as características das matérias-primas utilizadas (g 100g de proteína⁻¹).

As matérias-primas utilizadas refletiram diferenças na composição de aminoácidos essenciais em não essenciais ($P < 0.05$). Hidrolisados a base de fígado suíno (FA e FB) apresentaram maiores quantidades (g 100g de proteína⁻¹) de histidina, fenilalanina, isoleucina, leucina e valina, quando comparados a TA e TB, os quais apresentam conteúdo mais elevado de arginina ($P < 0.05$). Entretanto, cistina, prolina e ácido glutâmico apresentaram maiores valores nos produtos de CT (Tabela 4).

Nos diferentes produtos não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0.05$) na quantidade de metionina, treonina, triptofano e lisina (Tabela 3), provavelmente por se tratar de proteína de origem animal. As enzimas utilizadas não exerceram influência nos resultados de composição em aminoácidos essenciais e não essenciais dos diferentes hidrolisados desenvolvidos, bem como não houve interação entre os fatores ($P > 0.05$) (Tabelas 3 e 4).

A avaliação da ordem dos aminoácidos limitantes nos diferentes hidrolisados por meio do escore químico (Tabela 5), tendo como referência as exigências de aminoácidos essenciais da proteína padrão segundo FAO/WHO, (2007) para indivíduos adultos indicou que todos os hidrolisados superaram as exigências de aminoácidos essenciais da proteína padrão. Esses valores estão de acordo com publicações anteriores (Usydus, Szlinder-

Richert and Adamczyk, 2009; Foh, Amadou, Kamara, Foh and Xia, 2011) e refletem a elevada qualidade biológica da proteína presente nos hidrolisados.

Por apresentarem adequado equilíbrio de aminoácidos essenciais os hidrolisados de FS e CT podem ser direcionados como produtos alternativos de elevada qualidade nutricional com potencial aplicação na indústria de alimentação de animais de estimação e aquicultura (Folador et al., 2006, Kechaou et al. 2009).

Levando em consideração a quantidade de aminoácidos essenciais e não essenciais livres (Tabela 6) no FS ($7.62 \text{ g } 100\text{g de proteína}^{-1}$) e no CT ($2.52 \text{ g } 100\text{g de proteína}^{-1}$) antes do processo de hidrólise é possível verificar que o processamento enzimático proporcionou a liberação de aminoácidos livres. A catálise enzimática realizada com Alcalase® proporcionou 3.40 vezes mais aminoácidos livres em FA do que em FB. Comportamento semelhante também observado em CT em que TA apresentou 1.90 vezes mais aminoácidos livres que TB.

A composição em aminoácidos essenciais e não essenciais livres foi influenciada pelas matérias-primas e enzimas utilizadas ($P < 0.05$), porém não houve interação entre os fatores ($P > 0.05$) (Tabelas 7 e 8).

Comparando os resultados de composição em aminoácidos essenciais livres para a proteína de FS hidrolisada com Alcalase® ($\text{g } 100\text{g PB}^{-1}$) verificou-se uma predominância em ordem decrescente dos seguintes aminoácidos: leucina, histidina, valina, fenilalanina, lisina, treonina, isoleucina e metionina, quando comparado a FB, TA e TB. Por outro lado, as menores médias para os mesmos aminoácidos essenciais livres foram observadas em TB, que revelou um conteúdo mais elevado de arginina (Tabela 7).

A composição em aminoácidos não essenciais livres apresentou maiores médias ($\text{g } 100\text{g PB}^{-1}$) para tirosina, prolina, serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina e alanina em FA (Tabela 8).

Compostos nitrogenados, tais como os aminoácidos, são considerados altamente palatáveis para animais de companhia como cães e gatos. As unidades quimiorreceptoras dos gânglios sensoriais de gatos são estimuladas por aminoácidos descritos como “doce” por humanos. Este grupo inclui prolina, cisteína, lisina, histidina e alanina. Em contrapartida, são inibidas por aminoácidos “amargos”, que incluem triptofano, isoleucina, arginina e fenilalanina, os quais têm cadeias laterais hidrofóbicas e anéis aromáticos (Bradshaw Goodwin, Legrand-Defréтин and Nott, 1996).

Os produtos formados podem apresentar características sensoriais distintas, sendo que em geral, a qualidade sensorial varia de acordo com as concentrações de aminoácidos presentes (Solms, 1969). Dentre os hidrolisados obtidos, FA e FB apresentaram o dobro de aminoácidos doces, enquanto que em TA a relação permaneceu equilibrada e TB com uma maior proporção de aminoácidos “amargos”. Os resultados desta análise pode indicar um maior potencial palatabilizante para FA e FB, em comparação a TA e TB em dietas para gatos.

O processo de hidrólise envolve uma série de variáveis: especificidade e atividade da enzima, relação enzima substrato, pH do meio, temperatura, tempo e interação entre os nutrientes presentes na matéria-prima durante a hidrólise. Características específicas dos diferentes hidrolisados podem estar associadas ao tipo de ligação clivada pelas diferentes proteases utilizadas. A Alcalase[®] atua preferencialmente sobre ligações peptídicas com cadeia lateral hidrofóbica na porção C – terminal (Kraut, 1971) enquanto a Brauzin[®] apresenta atividade sobre ligações éster e amida, preferencialmente ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina (Koblitz, 2010).

Com relação aos ácidos graxos, o seu conteúdo nos hidrolisados (g 100g de lipídeo⁻¹) não foi afetado pela utilização das diferentes enzimas testadas, refletindo, como era esperado, a composição das matérias-primas utilizadas (Tabela 9).

Os hidrolisados de RT apresentaram maiores médias para os ácidos graxos monoinsaturados, enquanto que em FA e FB os ácidos graxos saturados predominaram como é característica de gordura de origem suína. Dentre os ácidos graxos poli-insaturados os hidrolisados apresentaram maiores teores de ácidos graxos da série n-6, com destaque para os hidrolisados de FS, sendo este resultado atribuído à composição da matéria-prima.

Os ácidos graxos podem ter sua origem a partir de lipídios da dieta ou por biossíntese de fontes não lipídicas. Os ácidos graxos monoinsaturados podem ser sintetizados a partir de um ácido graxo saturado, por meio de ação enzimática (Henderson & Tocher, 1987). Considerados essenciais, os ácidos graxos poli-insaturados das séries n-3 e n-6, não são sintetizados por vertebrados, sendo necessária a suplementação na dieta destes animais, de forma a permitir o normal desenvolvimento, crescimento e reprodução (NRC, 2011).

Peixes de regiões frias são boas fontes de ácidos graxos poli-insaturados da série n-3, enquanto peixes de regiões tropicais apresentam maiores teores de ácidos graxos da série n-6. Esta característica foi observada por Santos, et al. (2007), em filés de tilápias do Nilo os quais relataram a ocorrência de 20.44 g de n-6 100g⁻¹ e apenas 3.99 g 100g⁻¹ de n-3 nas amostras de óleo.

Segundo NRC (2011), as exigências de n-6 em tilápia, carpa, truta e salmão variam entre 0.5 a 1.0%, enquadrando-se nos valores apresentados nos diferentes hidrolisados desenvolvidos. Portanto, cabe destacar o potencial uso dos hidrolisados de FS e CT como fontes de n-6 em dietas para peixe.

O processamento dos resíduos agroindustriais FS e CT por meio de hidrólise enzimática utilizando Alcalase® e Brauzyn® resultaram em produtos com características distintas quanto à composição centesimal. Hidrolisados de FS apresentaram maior conteúdo proteico e menor conteúdo lipídico, no entanto todos os hidrolisados apresentaram adequado balanço de aminoácidos essenciais. Contudo, a ação dos diferentes

biocatalisadores refletiu em composição diferenciada de aminoácidos livres nos diferentes produtos. Nos processos que utilizaram Alcalase[®] ocorreu maior formação de aminoácidos livres, provavelmente devido à exopeptidases presentes no sistema enzimático.

6.5. Conclusão

A hidrólise é um processo altamente indicado para aproveitamento de resíduos agroindustriais de conteúdo proteico elevado, ocasionando a liberação de aminoácidos livres e fragmentos proteicos.

As características dos diferentes hidrolisados torna-os favoráveis a obtenção de novos ingredientes com potencial para o uso em rações animais tanto como fonte de nutrientes essenciais devido a composição desejável de aminoácidos e ácidos graxos essenciais, bem como flavorizante devido a presença de aminoácidos livres.

6.6. Agradecimentos

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Pós Graduação em Aquicultura (CAUNESP), Falbom Agroindustrial Ltda: concessão de recursos financeiros e estruturais.
2. Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMAQ), Laboratório de Tecnologia de Alimentos (FURG): Realização de análises.

6.7. Referências Bibliográficas

Abowei, J.F.N. & Ekubo, A.T. (2011). British Journal of Pharmacology and Toxicology 2, 179-191.

- Adler-Nissen, J. (1976). Enzymatic Hidrolysis of Proteins for Increased Solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24, 1090–1093.
- Bradshaw, J.W.S., Goodwin, D., Legrand-Defréтин, V. and Nott, H.M.R. (1996). Food Selection by the Domestic Cat, an Obligate Carnivore. *Comparative Biochemistry and Physiology – A Physiology*. 3, 205–209.
- FAO/WHO. (2007). Food and Agriculture Organization and World Health Organization. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO Technical Report Series, n. 935. Geneva.
- Foh, M.B. K., I. Amadou, M. T. Kamara, B. M. Foh and W. Xia. (2011). Effect of enzymatic hydrolysis on the nutricional and functional properties of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) proteins. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 1, 54–67.
- Folador, J.F., L.K. Karr-Lilienthal, C.M. Parsons, L.L. Bauer, P.L. Utterback, C.S. Schasteen, P.J. Bechtel and G.C. Fahey Jr. (2006). Fish meals, fish components, and fish protein hydrolysates as potential ingredients in pet foods. *Journal of Animal Science*. 84, 2752–2765.
- Guádix, A., E.M. Guádix, M.P. Páez-Dueñas, P. González-Tello, and F. Camacho. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de controle la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. 41, 79–89.
- Hagen, S.R., B. Frost, and J. Augustin. (1989). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 72,912–916.
- Hartmann, L. and R.C.A. Lago. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory practice*. 22, 475–481.

- Henderson, R.J. and D. R. Tocher. (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*. 26, 281–347.
- Horwitz, W. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th Ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010 Gaithersburg, Maryland, AOAC, 2010.
- Kechaou, E.S., J. Dumay, C. Donnay-Moreno, P. Jaouen, J.P. Gouygou, J.P. Bergé and R.B. Amar. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107, 158–164.
- Klompong, V., S. Benjakul, D. Kantachote and F. Shahidi. (2009). Characteristics and use of yellow stripe trevally hydrolysate as culture media. *Journal of Food Science*. 74, 219–225.
- Koblitz, M.G.B. *Bioquímica de alimentos – Teoria e aplicações práticas*. GEN. p. 77-105, 2010.
- Kraut, J. Subtilisin: X-Ray Structure. IN: BOYER, P.D. *The enzymes*, Vol II. Academic Press, New York, 1971.
- Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. (2000). Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 657–666.
- NRC. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academy Press, Washington, D. C, USA. 360 p.
- Santos, L.D.; Furuya, W.M.; Matsushita, M.; Silva, L.C.R.; Silva, T.S.C and Botaro D. (2007). Ácido linoléico conjugado (CLA) em dietas para tilápia-do-nilo:

- desempenho produtivo, composição química e perfil de ácidos graxos. Revista Brasileira de Zootecnia, 5, 1481-1488.
- Santos, S.D'A. dos, V.G. Martins, M. Salas-Mellado and C. Prentice. (2011). Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. Food Bioprocess Technology. 4, 1399–1406.
- Sgarbieri, V.C. (1996). Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades – Degradações – Modificações. Varela, São Paulo. 517p.
- Solms, J. (1969). The Taste of Amino Acids, Peptides, and Proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 17, 686 – 688.
- Spies, J.R. 1967. Determination of tryptophan in proteins. Analytical Chemistry. 39, 1412–1415.
- StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Usydus, Z., J. Szlinder-Richert and M. Adamczyk. (2009). Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. Food Chemistry. 112, 139–145.

Tabela 2. Composição centesimal de hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).

	Parâmetros (g 100g de proteína ⁻¹)			
	MS (%)	PB (%)	EE (%)	MM (%)
Matérias-primas	Médias			
FS	28.98	69.36 ^a	12.06 ^b	14.31
CT	27.92	42.35 ^b	40.04 ^a	15.93
Enzimas				
A	27.98	56.54	25,25	15.22
B	28.93	55.16	26.85	15.03
Hidrolisados				
FA	28.42	71.64	13.73	14.95
FB	29.55	67.11	10.39	13.67
TA	27.53	41.45	36.80	15.47
TB	28.31	43.20	43.27	16.39
Estatísticas	Valores de F para as variáveis			
Matéria-prima (MP)	0,66 ^{NS}	77,28**	9.63**	0.65 ^{NS}
Enzima (E)	1,47 ^{NS}	1,66 ^{NS}	0.04 ^{NS}	0.15 ^{NS}
Interação (MP x E)	2,82 ^{NS}	0,99 ^{NS}	3,04 ^{NS}	2.67 ^{NS}
CV (%)	1,71	8,87	7,16	10,04

FS =Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia; A=Alcalase®; B=Brauzin®; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado coproduto de tilápia com Brauzyn®; (N= 3).

^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0.05).

** (P<0.01). *(P<0.05). ^{NS} Não significativo.

Tabela 3. Composição em aminoácidos essenciais dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).

	Aminoácidos Essenciais (g 100g de proteína ⁻¹)									
	His	Ile	Leu	Met	Fen	Thr	Trp	Lis	Val	Arg
Matérias-primas	Médias									
FS	2.97 ^a	4.76 ^a	9.52 ^a	1.70	5.11 ^a	4.44	1.16 ^a	7.53	6.24 ^a	4.77 ^b
CT	2.32 ^b	3.82 ^b	6.85 ^b	1.62	3.73 ^b	4.29	0.87 ^b	7.66	4.44 ^b	7.03 ^a
Enzimas										
A	2.65	4.38	8.34	1.62	4.39	4.33	0.99	7.55	5.55	6.02
B	2.63	4.20	8.03	1.71	4.46	4.41	1.04	7.63	5.09	5.79
Hidrolisados										
FA	2.99	4.98	9.86	1.64	5.09	4.37	1.13	7.38	6.45	4.65
FB	2.94	4.54	9.18	1.76	5.13	4.52	1.18	7.67	6.02	4.89
TA	2.31	3.77	6.82	1.59	3.69	4.28	0.85	7.72	4.64	7.38
TB	2.32	3.86	6.88	1.66	3.78	4.30	0.89	7.60	4.16	6.69
Estatísticas	Valores de F para as variáveis									
Matéria-prima (MP)	208.20**	31.15**	65.09**	0.89 ^{NS}	47.01**	1.11 ^{NS}	20.72**	1.09 ^{NS}	95.62**	51.03**
Enzima (E)	1.47 ^{NS}	1.64 ^{NS}	0.13 ^{NS}	2.06 ^{NS}	0.02 ^{NS}	0.49 ^{NS}	1.32 ^{NS}	3.67 ^{NS}	2.47 ^{NS}	3.32 ^{NS}
Interação MP x E	2.69 ^{NS}	2.88 ^{NS}	0.99 ^{NS}	1.01 ^{NS}	0.87 ^{NS}	0.15 ^{NS}	2.79 ^{NS}	1.99 ^{NS}	0.57 ^{NS}	2.02 ^{NS}
CV (%)	7.60	7.87	5.64	3.98	6.11	8.35	7.52	7.40	5.36	6.00

FS =Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia; A=Alcalase®; B=Brauzin®; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de

fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Brauzyn®.

(N= 3).

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0.05).

** (P<0.01). ^{NS} Não significativo.

Tabela 4. Composição em aminoácidos não essenciais dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).

	Aminoácidos não essenciais (g 100g de proteína ⁻¹)							
	Cis	Tir	Pro	Ser	Asp	Glu	Gli	Ala
Matérias-primas	Médias							
FS	1.37 ^b	5.24 ^a	4.73 ^b	4.10 ^a	9.18 ^a	12.58 ^b	6.03 ^a	1.12 ^a
CT	2.18 ^a	3.03 ^b	5.96 ^a	3.71 ^b	8.95 ^b	13.76 ^a	1.06 ^b	0.76 ^b
Enzimas								
A	1.87	4.07	5.34	3.82	9.10	13.23	3.59	0.95
B	1.68	4.20	5.35	3.99	9.03	13.11	3.50	0.93
Hidrolisados								
FA	1.36	5.13	4.71	3.94	9.23	12.71	6.10	1.13
FB	1.37	5.35	4.74	4.26	9.12	12.44	5.98	1.11
TA	2.37	3.01	5.97	3.69	8.96	13.74	1.08	0.77
TB	1.99	3.05	5.96	3.72	8.93	13.78	1.03	0.75
Estatísticas	Valores de F para as variáveis							
Matéria-prima (MP)	52.71 ^{**}	247.12 ^{**}	98.28 ^{**}	29.07 ^{**}	55.98 ^{**}	27.05 ^{**}	163.06 ^{**}	49.61 ^{**}
Enzima (E)	1.74 ^{NS}	0.05 ^{NS}	0.008 ^{NS}	0.41 ^{NS}	3.03 ^{NS}	2.26 ^{NS}	0.005 ^{NS}	0.71 ^{NS}
Interação MP x E	0.49 ^{NS}	0.35 ^{NS}	1.04 ^{NS}	1.57 ^{NS}	1.42 ^{NS}	1.48 ^{NS}	1.77 ^{NS}	1.39 ^{NS}
CV (%)	3.81	3.51	8.16	10.16	14.74	13.49	4.01	10.58

FS =Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia; A=Alcalase®; B=Brauzin®; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Brauzyn®. (N= 3).

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0.05).

^{**} (P<0.01). ^{NS} Não significativo.

Tabela 5. Escore químico proteico dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®) e comparação com as exigências mínimas para adultos, FAO/WHO (2007).

Aminoácidos	Hidrolisados				FAO/WHO
	FA	FB	TA	TB	
Histidina	1.99	1.96	1.54	1.55	1.50
Isoleucina	1.66	1.51	1.26	1.29	3.00
Leucina	1.67	1.56	1.16	1.17	5.90
Metionina + cistina	1.36	1.42	1.80	1.66	2.20
Fenilalanina + tirosina	2.24	2.76	1.76	1.80	3.80
Treonina	1.90	1.97	1.86	1.87	2.30
Triptofano	1.88	1.97	1.42	1.48	0.60
Lisina	1.64	1.70	1.72	1.69	4.50
Valina	1.65	1.54	1.19	1.07	3.90

FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Brauzyn®

Tabela 6. Composição em aminoácidos totais e livres (g 100g de proteína⁻¹) do fígado suíno e do coproduto de tilápia.

	Aminoácidos totais*		Aminoácidos livres*	
	FS	CT	FS	CT
Histidina	2.93	2.35	0.86	0.01
Isoleucina	4.94	4.69	0.30	0.16
Leucina	10.07	7.96	0.61	0.26
Metionina	1.91	2.01	0.13	0.13
Fenilalanina	5.23	4.69	0.56	0.14
Treonina	4.25	3.94	0.45	0.01
Triptofano	1.22	0.92	0.00	0.23
Lisina	7.78	10.39	0.69	0.11
Valina	6.41	5.03	0.20	0.20
Arginina	4.74	6.71	0.21	0.04
Cistina	1.32	2.51	0.00	0.01
Tirosina	5.13	3.43	0.20	0.00
Prolina	4.69	4.61	0.16	0.11
Serina	3.77	3.52	0.31	0.33
Ácido aspártico	10.66	9.05	0.17	0.02
Ácido glutâmico	12.86	14.02	1.68	0.31
Glicina	5.57	7.37	0.32	0.01
Alanina	1.33	0.82	0.76	0.42

* média de resultados em triplicata; FS= Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia;

Tabela 7. Composição em aminoácidos essenciais livres dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).

	Aminoácidos essenciais livres (g 100g de proteína ⁻¹)									
	His	Ile	Leu	Met	Fen	Thr	Trp	Lis	Val	Arg
Matérias primas	Médias									
FS	1.94 ^a	0.84 ^a	2.79 ^a	0.54 ^a	1.53 ^a	0.96 ^a	0.17	1.60 ^a	1.65 ^a	0.27 ^b
CT	0.48 ^b	0.19 ^b	0.87 ^b	0.22 ^b	0.45 ^b	0.13 ^b	0.10	0.51 ^b	0.19 ^b	2.10 ^a
Enzimas										
A	1.65 ^a	0.83 ^a	2.94 ^a	0.56 ^a	1.42 ^a	0.83 ^a	0.15	1.40 ^a	1.35 ^a	1.18
B	0.77 ^b	0.20 ^b	0.72 ^b	0.20 ^b	1.07 ^b	0.25 ^b	0.13	0.71 ^b	0.49 ^b	1.19
Hidrolisados										
FA	2.51	1.31	4.34	0.73	2.04	1.49	0.19	1.99	2.36	0.30 ^b
FB	1.37	0.36	1.24	0.35	1.02	0.42	0.15	1.20	0.94	0.24 ^b
TA	0.79	0.34	1.53	0.38	0.79	0.17	0.10	0.80	0.33	2.06 ^a
TB	0.17	0.03	0.20	0.05	0.10	0.08	0.10	0.21	0.04	2.14 ^a
Estatística	Valores de F para as variáveis									
Matéria-prima (MP)	33.60**	49.21**	99.32**	52.19**	82.48**	79.77*	0.91 ^{NS}	33.57**	77,25**	63.48**
Enzima (E)	88.30**	71.45**	69.07**	80.66**	57.77**	62,69*	3.02 ^{NS}	20.14**	47.88*	2.34 ^{NS}
Interação MP x E	0.99 ^{NS}	2.04 ^{NS}	1.76 ^{NS}	3.40 ^{NS}	0.19 ^{NS}	2.53 ^{NS}	2.01 ^{NS}	1.29 ^{NS}	0.71 ^{NS}	3.81 ^{NS}
CV (%)	0.47	0.61	0.50	0.43	0.48	0.65	0.30	0.39	0.72	0.98

FS =Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia; A=Alcalase®; B=Brauzin®; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Brauzyn®.

(N= 3).

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0.05).

** (P<0.01). *(P<0.05). ^{NS} Não significativo.

Tabela 8. Composição em aminoácidos não essenciais livres dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®).

	Aminoácidos não essenciais livres (g 100g de proteína ⁻¹)							
	Cis	Tir	Pro	Ser	Asp	Glu	Gli	Ala
Matérias primas	Médias							
FS	0.55	1.23 ^a	0.75 ^a	0.70 ^a	0.75 ^a	3.70	0.71 ^a	1.90 ^a
CT	0.40	0.36 ^b	0.36 ^b	0.09 ^b	0.10 ^b	3.78	0.28 ^b	0.45 ^b
Enzimas								
A	0.51	1.09 ^a	0.81 ^a	0.53 ^a	0.69 ^a	4.15 ^a	0.55	1.74 ^a
B	0.39	0.49 ^b	0.30 ^b	0.27 ^b	0.15 ^b	3.33 ^b	0.44	0.61 ^b
Hidrolisados								
FA	0.34	1.58	1.04	0.94	1.26	4.43	0.90	2.89
FB	0.66	0.87	0.46	0.46	0.23	2.97	0.51	0.91
TA	0.68	0.60	0.57	0.11	0.12	3.87	0.19	0.59
TB	0.11	0.11	0.14	0.07	0.07	3.68	0.36	0.31
Estatística	Valores de F para as variáveis							
Matéria-prima (MP)	3.09 ^{NS}	66.17**	43.61**	99.16**	103.14**	0.84 ^{NS}	78.26**	93.07**
Enzima (E)	1.14 ^{NS}	28.63**	82.17**	50.02**	65.78**	81.36**	1.96 ^{NS}	49.44**
Interação MP x E	1.87 ^{NS}	1.11 ^{NS}	2.99 ^{NS}	2.41 ^{NS}	3.07 ^{NS}	2.27 ^{NS}	1.48 ^{NS}	2.21 ^{NS}
CV (%)	0.64	0.45	0.61	0.60	0.77	0.43	0.49	0.41

FS =Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia; A=Alcalase®; B=Brauzin®; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; FS =Fígado suíno; RT= Resíduo de tilápia; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Brauzyn®. (N= 3).

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0.05).

** (P<0.01). ^{NS} Não significativo.

Tabela 9. Composição em ácidos graxos dos hidrolisados obtidos a partir de fígado suíno e coproduto de tilápia com diferentes sistemas enzimáticos (Alcalase® e Brauzin®)..

	Parâmetros (g 100g de lipídeo ⁻¹)					
	Saturados	Monoinsaturados	Poli-insaturados	Ômega 6	Ômega 3	Trans
Matéria-prima	Médias					
FS	42.41 ^a	18.72 ^b	31.48 ^a	29.45 ^a	0.81 ^b	0.33 ^b
CT	32.40 ^b	41.57 ^a	16.53 ^b	14.70 ^b	1.83 ^a	1.06 ^a
Enzimas						
A	36.63	30.43	24.41	22.41	1.32	0.69
B	38.17	29.86	23.59	21.74	1.32	0.69
Hidrolisados						
FA	40.88	19.34	32.29	30.07	0.80	0.34
FB	43.93	18.11	30.67	28.82	0.82	0.33
TA	32.39	41.52	16.54	14.74	1.84	1.05
TB	32.40	41.61	16.51	14.66	1.82	1.06
Estatística	Valores de F para as variáveis					
Matéria-prima (MP)	33.29**	163.81**	255.14**	338.25*	146.71*	367.94*
Enzima (E)	2,47 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.24 ^{NS}	0.09 ^{NS}	0.0001 ^{NS}	0.0004 ^{NS}
Interação MP x E	0.87 ^{NS}	1.77 ^{NS}	1.21 ^{NS}	1.02 ^{NS}	0.27 ^{NS}	0.41 ^{NS}
CV (%)	0.15	0.40	0.33	0.10	0.34	0.56

FS =Fígado suíno; CT= Coproduto de tilápia; A=Alcalase®; B=Brauzin®; FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de coproduto de tilápia com Brauzyn®. (N= 3).

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem pelo teste Tukey (P<0.05).

** (P<0.01). * (P<0.05). ^{NS} Não significativo.

7. ARTIGO II: SERÁ ENVIADO PARA ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY

7.1. Hidrolisados proteicos de coprodutos agroindustriais de origem animal em dietas para surubim (*Pseudoplatystoma sp*)

Resumo: Com objetivo de avaliar o uso de diferentes hidrolisados proteicos sobre o desempenho produtivo, parâmetros metabólicos, hepáticos e composição centesimal de juvenis de pintado Real[®] (*Pseudoplatystoma sp*), 200 peixes ($7,23 \pm 0,12$ g) foram distribuídos em 20 aquários (500 L) em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco dietas: controle, sem inclusão de hidrolisado (CO); e com inclusão de 20% de hidrolisados: Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase[®] (FA); Hidrolisado de fígado suíno com Brauzin[®] (FB); Resíduo de tilápia com Alcalase[®] (TA); Resíduo de tilápia com Brauzin[®] (TB), em quatro repetições. Durante o período experimental a média de temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram equivalentes a $28,5 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, $7,40 \pm 0,26$ e $6,21 \pm 0,32 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Não observou-se diferença significativa ($P > 0.05$) para comprimento total (CT); peso final (PF), índice hepatossomático (IH); gordura celomática (GC); ganho de peso diário (GPD); fator de condição (FC); taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (SO). Entretanto FA, FB, TA e TB apresentaram melhor conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência proteica (TEP). Os parâmetros metabólicos e a composição centesimal de juvenis de pintado Real[®] não apresentaram diferença significativa ($P > 0.05$). Os resultados indicam que a inclusão de 20% dos diferentes hidrolisados melhora a CAA e a TEP sem proporcionar alterações nos parâmetros metabólicos e na composição centesimal de juvenis de pintado Real[®].

Palavras-chave: **biotecnologia, nutrição, suíno, tilápia.**

7.2. Introdução

Conhecidos como “surubins” os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* pertencem à família Pimelodidae, da ordem dos Siluriformes possuem hábito noturno e piscívoro. Estes peixes podem ser encontrados nos maiores rios das bacias hidrográficas da América do Sul: rios Paraná, Amazonas, Orinoco, São Francisco, entre outros (Arslan et al., 2008; Romagosa et al., 2003). São nobres por apresentar carne de alta qualidade, com coloração clara, textura firme e ausência de espinhos intramusculares. Essas características são valorizadas pelo mercado consumidor, bem como apreciados por praticantes de pesca esportiva (Godinho e Godinho, 2003; Tavares, 1997).

Apesar do grande potencial para aquicultura, a criação do surubim apresenta limitações relacionadas à reprodução e nutrição, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento. Destaca-se ainda, a substituição da alimentação natural por uma dieta artificial, que conta com a inclusão de ingredientes proteicos de origem animal e vegetal, sendo as farinhas de peixes consideradas importantes fontes proteicas. Neste contexto, hidrolisados proteicos representam tecnologia apropriada para converter coprodutos de origem animal em ingredientes proteicos destinados à indústria de rações, como para aquicultura e *pet food* devido a sua qualidade nutricional, pois é fonte de pequenos peptídeos e possui balanço de aminoácidos essenciais com elevada digestibilidade (Santos et al., 2011, Suresh et al., 2011; Zinn et al., 2009, FAO, 2012).

Pesquisas com hidrolisado proteico de peixes para organismos aquáticos, com níveis de inclusão entre 0 a 60% em dietas, demonstraram que os níveis de 19 e 24% de hidrolisado em substituição à farinha de peixe proporcionam melhores resultados. Contudo valores elevados de inclusão podem interferir negativamente no crescimento e na utilização de nutrientes (Cahu et al., 1999; Hevrøy et al., 2005). Segundo De Carli (2013) a inclusão de hidrolisado líquido de peixes (sardinha ou tilápia) e fígado suíno melhorou o

ganho de peso e a conversão alimentar aparente do jundiá (*Rhandia voulezi*) durante a fase inicial de desenvolvimento, que é a etapa mais crítica na criação de peixes carnívoros.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes hidrolisados na dieta sobre o desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos e hepáticos e composição centesimal de juvenis de pintado Real[®].

7.3. Material e métodos

O experimento foi conduzido durante 50 dias (fevereiro a março de 2013) no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura - GEMAQ da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Foram utilizados 20 aquários (500 L) com sistema de recirculação de água contendo filtro biológico e termostato digital. A temperatura da água foi monitorada diariamente às 16h, antes de realizar a sifonagem. O pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram monitorados semanalmente.

Para a realização do experimento foram utilizados 200 juvenis de pintado Real[®] oriundos do Projeto Pacu Aquicultura Ltda (Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil). Para a biometria inicial selecionou-se deste lote 50 juvenis com peso médio inicial de 7.23 ± 0.12 g, os quais foram previamente submetidos a jejum de 12 h, para esvaziamento gástrico e anestesiados com Eugenol, 20 mg L^{-1} de água (Cunha et al., 2010).

Durante o período experimental a média de temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram equivalentes a $28.5 \pm 0.4^\circ\text{C}$, 7.40 ± 0.26 e $6.21 \pm 0.32 \text{ mg L}^{-1}$, condições consideradas adequadas para o desenvolvimento de peixes de clima tropical (Boyd, 1990).

Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco dietas: controle, sem inclusão de hidrolisado (CO); hidrolisado de fígado suíno com Alcalase[®] (FA);

hidrolisado de fígado suíno com Brauzin® (FB); coproduto de tilápia com Alcalase® (TA); coproduto de tilápia com Brauzin® (TB); em quatro repetições.

Para a produção dos hidrolisados foi realizada a moagem das matérias-primas (5.0 mm), fígado suíno e coproduto de tilápia, que foram encaminhadas para reator industrial de aço inox (encamisado, com aquecimento elétrico). As matérias-primas foram misturadas com água 100:15 (p/v) e enzima (Alcalase®, Brauzin®) com agitação constante. A relação enzima/substrato foi equivalente a 1:200 (p/p) e temperatura de 60 e 65°C para Alcalase® e Brauzyn®, respectivamente. As condições foram mantidas por 60 minutos, resultando em produtos com diferentes composições em aminoácidos (Tabela 10).

Para a confecção das dietas, os ingredientes foram misturados manualmente e posteriormente, foram incluídos os diferentes hidrolisados na proporção de 20% até a homogeneização da mistura (Tabela 11). A extrusão das rações foi realizada na fábrica de ração do GEMAq, secas em estufa à 50°C por 24 horas e armazenadas em congelador (-18°C).

Os animais foram arraçoados cinco vezes ao dia (7, 9, 13, 15 e 17 horas), na taxa de 4% da biomassa/dia, calculada a partir do peso médio inicial e ajustada a cada 15 dias, por meio de biometria. Às 16 horas realizava-se a limpeza dos tanques e dos biofiltros por meio de sifonagem.

Tabela 10. Composição aminoacídica de hidrolisados produzidos com os sistemas enzimáticos Alcalase® (FA e TA) e Brauzyn® (TB e FB), para as matérias-primas: fígado suíno e coproduto de tilápia.

(g 100g de proteína ⁻¹)	Hidrolisados			
	FA	FB	TA	TB
Histidina	2.99	2.94	2.31	2.32
Isoleucina	4.98	4.54	3.77	3.86
Leucina	9.86	9.18	6.82	6.88
Metionina	1.64	1.76	1.59	1.66
Fenilalanina	5.09	5.13	3.69	3.78
Treonina	4.37	4.52	4.28	4.30
Triptofano	1.13	1.18	0.85	0.89
Lisina	7.38	7.67	7.72	7.60
Valina	6.45	6.02	4.64	4.16
Arginina	4.65	4.89	7.38	6.69
Cistina	1.36	1.37	2.37	1.99
Tirosina	5.13	5.35	3.01	3.05
Prolina	4.71	4.74	5.97	5.96
Serina	3.94	4.26	3.69	3.72
Ácido aspártico	9.23	9.12	8.96	8.93
Ácido glutâmico	12.71	12.44	13.74	13.78
Glicina	6.10	5.98	1.08	1.03
Alanina	1.13	1.11	0.77	0.75

FA=Hidrolisado de fígado suíno com Alcalase®; FB= Hidrolisado de fígado suíno com Brauzyn®; TA= Hidrolisado de resíduo de tilápia com Alcalase®; TB= Hidrolisado de resíduo de tilápia com Brauzyn®

Tabela 11. Formulação e composição estimada das rações experimentais para juvenis de Pintado Real® (*Pseudoplatystoma sp*).

INGREDIENTES (g kg ⁻¹)	CO	FA	FB	TA	TB
Farinha de Peixe 55%	276.70	276.70	276.70	276.70	276.70
Concentrado proteico de soja	260.00	260.00	260.00	260.00	260.00
Milho	136.60	136.60	136.60	136.60	136.60
Farelo de trigo	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Farinha de penas	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Óleo de soja	86.60	86.60	86.60	86.60	86.60
L-lisina	21.30	21.30	21.30	21.30	21.30
Premix vitamínico e mineral	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
DL- Metionina	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40
Sal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Antifúngico	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
BHT ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Hidrolisado fígado suíno Alcalase®	0.00	200.00	0.00	0.00	0.00
Hidrolisado fígado suíno Brauzin®	0.00	0.00	200.00	0.00	0.00
Hidrolisado coproduto de tilápia Alcalase®	0.00	0.00	0.00	200.00	0.00
Hidrolisado coproduto de tilápia Brauzin®	0.00	0.00	0.00	0.00	200.00
Composição estimada					
PB (g kg ⁻¹)	450	480	480	465	465
EB (kcal kg ⁻¹)	4690	5527	5539	5556	5569
EE (g kg ⁻¹)	120	120	120	125	125
FB (g kg ⁻¹)	195	195	195	195	195
Amido (g kg ⁻¹)	115	115	115	115	115
Cálcio (g kg ⁻¹)	18	-	-	-	-
Fósforo (g kg ⁻¹)	14	-	-	-	-

* CO = ração controle. ¹Níveis de garantia por kg do produto - Premix (DSM-Roche®): Vitamina A, 24.000

UI; Vit. D3, 6.000 UI; Vitamina E, 300 mg; Vitamina K3, 30 mg; Vitamina B1, 40 mg; Vitamina B2, 40 mg; Vitamina B6, 35 mg; Vitamina B12, 80 mg; Ácido fólico, 12 mg; Pantotenato Ca, 100 mg; Vitamina C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg. ²Butil hidroxi tolueno.

Para a determinação da composição química inicial dos peixes foram utilizados 30 juvenis de pintado Real[®], os quais foram anestesiados em Eugenol, 20 mg L⁻¹ de água, eutanasiados e triturados para compor seis amostras. O mesmo procedimento foi realizado no final do período experimental, porém foram amostrados quatro peixes por tratamento. Todas as amostras foram congeladas para posterior análise da composição centesimal do peixe inteiro, onde foram determinados os teores de: extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), umidade (UM), e matéria mineral (MM), conforme AOAC (2010). Com os resultados obtidos, calculou-se a deposição de proteína corporal: $DPC(g) = [Pf * (\%PBCf/100)] - [Pi * (\%PBCi/100)]$, e deposição de gordura corporal: $DGC(g) = [Pf * (\%GCf/100)] - [Pi * (\%GCI/100)]$, sendo: Pi e Pf= pesos iniciais e finais dos peixes, PBCi e PBCf= proteína corporal inicial e final, GCI e GCf= gordura corporal inicial e final.

Após 50 dias experimentais, os animais permaneceram em jejum por 12 horas para esvaziamento gástrico e posteriormente, foram anestesiados em Eugenol, (20 mg L⁻¹ de água). Foram coletadas amostras de sangue (quatro peixes por repetição) por punção na veia caudal utilizando-se seringa. O plasma foi armazenado em tubos Eppendorf e congelado a -18°C para realização das análises séricas. No plasma sanguíneo foram determinados os níveis de proteínas totais (g L⁻¹), albumina (g L⁻¹), triglicerídeos (mM⁻¹), colesterol total (mM⁻¹) e glicose (mM⁻¹) foram determinados com o emprego de Kits colorimétricos, de acordo com metodologias descritas por Trinder (1969), e Allain et al. (1974) para colesterol, triglicerídeos de acordo com Bucolo & David (1973) e Trinder (1969), glicose de acordo com Bergmeyer (1986) e Trinder (1969) e de proteína de acordo com Weichselbaum (1946).

Também aos 50 dias experimentais, os animais foram pesados e medidos individualmente, para o cálculo dos parâmetros de desempenho produtivo: fator de condição (FC) = $\text{peso}/(\text{comprimento total})^3 \times 100$; taxa de crescimento específico [TCE

(%/dia)] = $[(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{dias}] \times 100$, sendo: $\ln$ = logaritmo neperiano; ganho em peso médio diário [GPD (g/dia)] = $(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{dias}$; ganho de peso relativo [GPR(%)] = $[(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}] \times 100$; conversão alimentar aparente (CAA) = $\text{alimento consumido} / \text{ganho em peso}$; taxa de eficiência protéica (TEP) = $\text{ganho em peso (g)} / \text{proteína ingerida (g)}$ e eficiência alimentar (EA) = $\text{ganho em peso} / \text{consumo de matéria seca}$.

Os peixes utilizados para a coleta de sangue foram pesados e medidos e posteriormente, eutanasiados por secção na medula para retirada do fígado e da gordura celomática. Com estes dados foi possível calcular: índice hepatossomático [IHS (%)] = $(\text{peso fígado} / \text{peso do peixe inteiro}) \times 100$; índice de gordura celomática [IGC(%)] = $\text{peso da gordura celomática} / \text{peso inteiro} \times 100$.

Após a pesagem destes tecidos, o fígado foi congelado para posterior análises metabólicas. A quantidade de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976), glicogênio e glicose de acordo com Park; Johnson (1949) e aminoácidos livres conforme Spies (1957). O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme protocolo número 023955/12.

As análises estatísticas foram realizadas no Statistic 7.1 (Statsoft, 2005), onde primeiramente os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

7.4. Resultados e discussão

Respostas positivas foram observadas neste estudo uma vez que os animais submetidos às dietas FA, FB, TA e TB expressaram melhor conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência proteica (TEP) (Tabela 12). Tais resultados indicam o uso dos diferentes hidrolisados como potencial na melhora da CAA e TEP em juvenis de pintado Real[®]. Entretanto os diferentes hidrolisados não proporcionaram diferença ($P>0.05$) quanto a comprimento total (CT); peso final (PF), índice hepatossômático (IH); gordura visceral (GV); ganho de peso diário (GPD); fator de condição (FC); taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (SO).

Estudos anteriores descrevem que o emprego de dietas suplementadas com hidrolisados proteicos de peixe (FPH) e camarão podem melhorar o crescimento em peixes e lagostas (Arredondo-Figueroa et al. 2013; Cahu et al., 1999, Hevrøy et al., 2005; Refstie et al., 2004; Zheng et al., 2012).

A melhoria na palatabilidade é um parâmetro responsável pelo o aumento de consumo de ração e melhor desempenho quanto a crescimento em estudos que substituem a farinha de peixe por hidrolisado de peixe (Cahu et al., 1999; Hevroy et al., 2005). Em dietas para juvenis de yellow perch (*Perca flavescens*) e lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) o uso dieta comercial revestida com 5% de hidrolisado de krill demonstrou melhora significativa nas taxas de ingestão de alimentos e maior crescimento comparada com a dieta ausente de revestimento e dieta a base de alimento vivo (*Artemia*) (Kolkovski et al., 2000). Os autores consideram a atratividade da dieta determinante para o sucesso na adaptação de larvas de peixes a dietas inertes. Entretanto, neste estudo não foram observadas diferenças relacionadas ao crescimento dos animais.

Tabela 12. Parâmetros zootécnicos dos juvenis de pintado Real® alimentados com diferentes hidrolisados proteicos, após 50 dias experimentais¹.

Parâmetros ²	Tratamentos ³					CV ⁴ (%)
	CO	FA	FB	TA	TB	
CT (cm)	28.25	28.18	28.52	28.36	28.48	1.68
PF (g)	208.00	212.82	209.37	214.80	214.72	5.69
IHS (%)	2.51	2.48	2.78	2.55	2.66	6.66
IGC (%)	1.29	1.52	1.25	1.44	1.29	18.90
GP (g)	200.77	205.59	202.14	207.57	207.49	5.89
GPD (g dia ⁻¹)	4.02	4.11	4.04	4.15	4.15	5.89
FC	0.92	0.95	0.90	0.94	0.93	3.65
TCE (% dia ⁻¹)	6.72	6.76	6.73	6.78	6.78	1.68
CAA	1.73 ^b	1.26 ^a	1.33 ^a	1.29 ^a	1.36 ^a	14.99
TEP	1.19 ^b	1.45 ^a	1.56 ^a	1.64 ^a	1.65 ^a	14.76
EA	0.58 ^b	0.80 ^a	0.76 ^a	0.79 ^a	0.74 ^a	14.18
SO (%)	100.00	100.00	97.50	100.00	97.50	3.11

¹Médias com letras diferentes, na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0.05).

²Parâmetros: CT: comprimento total; PF: peso final; IHS: índice hepatossomático; IGC: índice de gordura celomática; GP: ganho de peso; GPD: ganho de peso diário; FC: fator de condição; TCE: taxa de crescimento específico; CAA (MS): conversão alimentar aparente expressa com o consumo de alimento na matéria seca; EA: eficiência alimentar com o consumo de alimento na matéria seca; TEP (MS): taxa de eficiência proteica com o consumo de alimento na matéria seca e SO: sobrevivência.

³Tratamentos: CO: controle, FA: fígado suíno Alcalase®; FB: fígado suíno Brauzin®; TA: resíduo de tilápia Alcalase®; TB: resíduo de tilápia Brauzin®.

⁴CV: coeficiente de variação (%).

Melhores resultados na TEP evidenciam a qualidade proteica das diferentes proteínas hidrolisadas utilizadas e reflete-se em melhor CAA. Estes resultados podem estar associados a maior biodisponibilidade dos aminoácidos resultantes do processamento hidrolítico das matérias-primas (coproduto de tilápia e fígado suíno). A hidrólise proteica pode ter favorecido melhor ajuste ao metabolismo dos animais proporcionando aumento na conversão alimentar e aproveitamento dos diferentes hidrolisados (Aksnes et al., 2006a, b; Zheng et al, 2012).

Em estudo realizado em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), o uso de hidrolisado de peixe, com 15% de inclusão aumentou a ingestão de alimento e a taxa de crescimento específico, destacando-se ainda a maior disponibilidade de aminoácidos quando comparado com a dieta controle a base de farinha de peixe, com maiores retenções dos aminoácidos histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina e treonina (Refstie et al., 2004).

Os parâmetros plasmáticos de juvenis de pintado Real[®] não apresentaram variação significativa ($P>0.05$) (Tabela 13), o que demonstra que os níveis séricos de juvenis de pintado Real[®] não foram alterados em função do uso de diferentes hidrolisados proteicos.

Embora os parâmetros avaliados no presente estudo não indiquem diferença entre os tratamentos, Tang et al. (2008) investigaram os efeitos de hidrolisado proteico de peixe (HPP) sobre o desempenho e resposta imune de yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Concluíram que a inclusão de 10% de FPH proporcionou maior ganho de peso e melhor taxa de crescimento específico, bem como melhora de parâmetros imunológicos humorais (atividade de lisozima, imunoglobulina M, componentes C3 e C4 do sistema complemento). Peptídeos biologicamente ativos imunoestimulantes e com propriedades antibacterianas podem ser produzidos durante o processo de hidrólise (Kotzamanis et al., 2007). Os resultados de parâmetros séricos obtidos neste trabalho assemelham-se a valores

relatados por Kenari et al. (2013) em estudos com Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) alimentados com dietas contendo nucleotídeos.

Tabela 13. Parâmetros plasmáticos em juvenis de pintado Real® alimentados com diferentes hidrolisados, após 50 dias experimentais¹.

Parâmetros	Tratamentos ²					CV ³
	CO	FA	FB	TA	TB	(%)
Colesterol total (mM L ⁻¹)	2.42	2.46	2.49	2.81	2.67	9.19
Triglicerídeos (mM L ⁻¹)	3.83	3.89	3.85	4.45	4.38	6.14
Glicose (mM L ⁻¹)	3.95	4.44	4.02	4.17	4,82	7.20
Proteínas totais (g L ⁻¹)	30.3	35.5	32.6	30.9	32.5	9.91
Albumina (g L ⁻¹)	7,40	7.40	7.30	7.20	6.90	5.97
Globulinas (g L ⁻¹)	22.9	28.1	25.2	23.7	25.6	8.45
ALB/GLOB	0.33	0.27	0.29	0.31	0,27	4.67

¹Médias com letras diferentes, na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

²Tratamentos: CO: controle, FA: fígado suíno Alcalase®, FB: Fígado suíno Brauzin®, TA: resíduo de tilápia Alcalase®, TB: resíduo de tilápia Brauzin®.

³CV: coeficiente de variação (%).

A determinação dos níveis de proteínas totais circulantes indica o tipo de catabolismo proteico nos indivíduos em teste. Os resultados das dosagens apontam como a proteína presente na dieta está sendo utilizada e metabolizada (Marks et al., 2007). A albumina sérica pode ser utilizada como indicador da qualidade proteica da dieta (Lehninger et al., 2004) e os resultados obtidos sugerem que as dietas forneceram os aminoácidos necessários ao desenvolvimento dos animais.

A maior produção de proteína hepática foi verificada nos peixes alimentados com a dieta TB ($p<0.05$), e a menor produção nos animais que receberam a dieta TA, não havendo diferença entre TB, CO, FA e FB (Tabela 14). Não foi verificada diferença ($p>0.05$) no teor de aminoácidos livres e glicose hepática entre os diferentes tratamentos.

Tabela 14. Parâmetros plasmáticos avaliados em fígado de juvenis de pintado Real® alimentados com diferentes hidrolisados, após 50 dias experimentais¹.

Parâmetros	Tratamentos ²					CV ³ (%)
	CO	FA	FB	TA	TB	
Proteínas totais (mg g ⁻¹)	0.23 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.19 ^b	0.28 ^a	16.03
Aminoácidos livres (μmol g ⁻¹)	292.13	294.56	378.16	268.31	335.39	32.56
Glicose (μmol g ⁻¹)	33.03	28.45	28.78	33.08	32.38	3.15
Glicogênio (%)	16.98 ^b	20.70 ^a	19.97 ^a	21.22 ^a	20.05 ^a	10.89

¹Médias com letras diferentes na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0.05$).

²Tratamentos: CO: controle, FA: fígado suíno Alcalase®; FB: fígado suíno Brauzin®; TA: resíduo de tilápia Alcalase®; TB: resíduo de tilápia Brauzin®.

³CV: coeficiente de variação (%).

Os maiores estoques de glicogênio hepático ($p<0.05$) foram apresentados nos tratamentos contendo os diferentes hidrolisados (FA, FB, TA, TB) em comparação com CO, que apresentou o menor percentual de glicogênio hepático. De acordo com Bombardelli et al. (2003), em situação de jejum os peixes mobilizam inicialmente o estoque proteico e “pool” de aminoácidos circulantes antes da mobilização do glicogênio hepático, indicando que a demanda do estoque de glicogênio ocorre quando os animais são subalimentados ou as proteínas da dieta não estão sendo catabolizadas adequadamente.

Os resultados das avaliações de composição centesimal, deposição de proteína e gordura na carcaça, não indicaram diferença estatística ($P>0.05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Composição centesimal do peixe inteiro, deposição de proteína e gordura nos peixes alimentados com diferentes hidrolisados proteicos, após 50 dias experimentais¹.

Parâmetros ²	Tratamentos ³					CV ⁴ (%)
	CO	FA	FP	TA	TB	
Umidade (%)	75.27	75.50	76.15	75.42	75.20	15.74
Proteína bruta (%)	14.89	14.84	14.72	14.38	15.01	9.42
Extrato etéreo (%)	7.44	7.81	7.07	7.73	8.04	4.03
Matéria Mineral (%)	3.13	3.16	3.21	3.17	3.26	2.61
DPC (%)	29.92	30.61	29.81	29.84	30.24	12.51
DGC (%)	14.95	16.14	14.33	16.17	17.28	6.25

¹Médias com letras diferentes, na linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0.05).

²Parâmetros: DPC: deposição de proteína corporal; DGC: Deposição de gordura corporal.

³Tratamentos: CO: controle, FA: fígado suíno Alcalase®; FB: fígado suíno Brauzin®; TA: resíduo de tilápia Alcalase®; TB: resíduo de tilápia Brauzin®.

⁴CV: coeficiente de variação.

Os valores médios de proteína bruta (13.62%) e lipídeos (4.07%) descritas por Arslan et al. (2008) para alevinos de pintado alimentados com dietas semi purificadas contendo diferentes fontes de ácidos graxos são inferiores aos observados neste trabalho (14.77 e 7.61%, respectivamente). Entretanto, assemelham-se aos valores relatados por Martino et al. (2002) em juvenis de pintado alimentados com dietas com lipídeos de origem animal e vegetal, devendo-se ressaltar que os resultados de composição centesimal variam de acordo com a espécie do peixe, fase de cultivo e parte corporal do peixe a ser analisada. Neste trabalho, foi utilizado o peixe inteiro, sem vísceras.

7.5. Conclusão

O enriquecimento de dietas com os diferentes hidrolisados como fontes proteicas de alto valor biológico mostraram que a adição aumenta a absorção de proteína e a eficiência na conversão do alimento consumido, demonstrado pelos índices de CAA e a TEP, resultando no desenvolvimento normal dos indivíduos.

7.6. Agradecimentos

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Programa de Pós Graduação em Aquicultura (CAUNESP) e Falbom Agroindustrial Ltda: concessão de recursos financeiros e estruturais.
2. Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMAQ), Laboratório de Piscicultura (UFMS): realização de análises.

7.7. Referências Bibliográficas

- Aksnes, A., Hope, B., Høstmark, Ø., Albrektsen, S. (2006a). Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquac.*, 261, 1102–1110.
- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B., Albrektsen, S. (2006b). Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: growth, growth regulation and feed utilization. *Aquac.*, 261, 305–317.
- Allain, C.C.; Poon, L.S.; Chan, C.S.; Richmond, W.; Fu, P.C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*. 20, 470 – 475.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis. 13. ed. Arlington, AOAC International. 1995.
- Arredondo-Figueroa, J.L., Ponce-Palafox, J.T., Shirai-Matsumoto, K., Pérez-Zavaleta, Á., Barriga-Sosa, I. de Los Á., Luna, A.R. 2013. Effects of including shrimp protein hydrolysate in practical diets on the growth and survival of redclaw crayfish hatchlings *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868). *Aquac. Res.*, 44, 966–973.
- Arslan, M., Rinchar, J., Dabrowski, K., Portella, M. C. 2008. Effects of Different Dietary Lipid Sources on the Survival, Growth, and Fatty Acid Composition of South American Catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum*, Surubim, Juveniles. *J. World Aquac. Soc.* 39, 51-61.
- Bergmeyer, H.U. (1986). *Methods of Enzymatic Analysis*, 3a. ed., Vol VI, Deerfield Beach:VCH, 178-184.
- Bombardelli, R.A, Meurer, F. Syperreck, M.A. 2003. Metabolismo proteico em peixes. *Arq. Ciênc. Vet. Zoo.* 7, 69–79.

- Boyd, C.E (1990). Water quality in ponds for aquaculture. Birmingham Publishing Co., Alabama, p.482.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
- Bucolo, G. & David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*. 19, 476–482.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M.1999. Protein hydrolysate vs. Fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *dicentrarchus labrax* larvae. *Aquac*. 171, 109-119.
- Cunha, M.A., Zeppenfeld, C.C., Garcia, L.O., Loro, V.L., Fonseca, M.B., Emanuelli, T., Veeck, A.P.L., Copatti, C.E., Baldisserotto, B. (2010). Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*. 40, 2107–2114.
- Decarli, J.A. Utilização de diferentes hidrolisados protéicos na alimentação do jundiá (*Rhamdia voulezi*) em tanques rede. Marechal Cândido Rondon, 2013. 30p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia – PPZ, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2013.
- enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol*. 147, 205-214.
- FAO. Food and Agricultural Organization (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Food and Agricultural Organization, Rome, 2012.

- Godinho A.L. & Godinho H.P. 2003. Breve visão do São Francisco. In Godinho H.P. & Godinho A.L. (ed.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. PUC Minas, Belo Horizonte, pp. 15–24.
- Havrøy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquac. Nutr.* 11, 301–313.
- Kenari, A.A., Mahmoudi, N., Soltani, M., Abediankenari, S. 2013. Dietary nucleotide supplements influence the growth, haemato-immunological parameters and stress responses in endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Aquac. Nutr.* 19, 54–63.
- Kolkovski, S., Czesny, S., Dabrowski, K. 2000. Use of krill hydrolysate as a feed attractant for fish larvae and juveniles. *J. of the World Aquac. Soc.* 31, 81–88.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C., 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2004. Principles of Biochemistry. Fourth Ed. W. H. Freeman, New York.
- Marks, A.D., Smith, C., Lieberman, M. 2007. Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Second ed. Colleen.
- Martino, R.C.; Cyrino, J.E.P.; Portz, L.; Trugo, L.C. (2002). Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*.209, 233-246.
- Park, T.J. & Johnson, M.J. (1949). A submicro determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 181, 149–151.

- Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H., 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquac.* 239, 331-349.
- Romagosa, E., Paiva, P., Andrade-Talmelli, E.F., Godinho, H.M. 2003. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (teleostei, siluriformes, pimelodidae), mantidas em cativeiro. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo.* 29, 151 – 159.
- Santos, S.D'A. dos, V.G. Martins, M. Salas-Mellado, C. Prentice. 2011. Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food Bioprocess Tech.* 4, 1399–1406.
- Spies, J.R. (1957). Colorimetric procedures for amino acids. *Methanol Enzymol.* 3, 467–477.
- StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Suresh, A.V., Vasagam K.P.K., Nates, S. 2011. Attractability and palatability of protein ingredients of aquatic and terrestrial animal origin, and their practical value for blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* fed diets formulated with high levels of poultry byproduct meal. *Aquac.* 319, 132–140.
- Tang, H.G, Wu, T.X., Zhao, Z., Pan, X. 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *J Zhejiang Univ Sci B.* 9, 684-690.
- Tavares, M.P. 1997. O surubim. In: Miranda, M.O.T. (Org.), *Surubim*. IBAMA, Belo Horizonte, pp. 9-25.

- Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*. 6, 24.
- Weichselbaum, T.E. (1946). An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *The American Journal of Pathology*, 16, 40.
- Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J., Chang, Q. 2012. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquac. Nutr.* 18, 297–303.
- Zinn, K.E., Hernot, D.C., Fastinger, N.D., Karr-Lilienthal, L.K., Bechtel, P.J., Swanson, K.S. Fahey Jr, G.C. 2009. Fish protein substrates can substitute effectively for poultry by-product meal when incorporated in high-quality senior dog diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93, 447–455.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processamento de resíduos proteicos oriundo de agroindústrias por meio de hidrólise enzimática é uma alternativa tecnológica que proporciona melhor aproveitamento dessas matérias-primas, que se tornam uma no

Os produtos gerados possuem conteúdo proteico elevado, refletindo características da matéria-prima de origem, disponíveis na forma de aminoácidos livres e pequenos fragmentos proteicos, os quais provavelmente contribuem com a absorção dos nutrientes.

As condições de processo: temperatura, tempo de hidrólise, pH, relação enzima/substrato, etc.; exercem grande influencia no processamento, e variações em qualquer parâmetro pode levar a alterações das características finais do produto obtido. Sob as mesmas condições de processo, mas alterando a protease, têm-se também a formação de produtos com características distintas quanto ao perfil de aminoácidos livres.

O emprego de hidrolisados proteicos na aquicultura apresenta-se como potencial, possibilitando a utilização de fontes proteicas de alta qualidade. É necessária a realização de estudos mais aprofundados relacionados à utilização de hidrolisados proteicos na nutrição de pintado Real[®], levando em consideração aspectos relacionados à forma e níveis de inclusão dos hidrolisados proteicos, bem como nas diferentes fases de desenvolvimento da espécie.

Trabalhos futuros empregando o processo de hidrólise enzimática buscando identificar peptídeos com potencial antioxidante, características palatabilizantes podem gerar produtos de alto valor agregado.