



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA

**RECUPERAÇÃO INTEGRAL E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DO  
RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA TILÁPIA *Oreochromis niloticus* E SUAS  
APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS**

Recife

2018

ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA

**RECUPERAÇÃO INTEGRAL E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DO  
RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA TILÁPIA *Oreochromis niloticus* E SUAS  
APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

**Coorientador:** Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

**Coorientadora:** Profa. Dra. Juliana Ferreira Dos Santos

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ferreira, Andreia Cybelle Marques

Recuperação integral e caracterização de biomoléculas do resíduo do processamento da tilápia *Oreochromis niloticus* e suas aplicações na produção de micropartículas / Andreia Cybelle Marques Ferreira - 2019.

113 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Coorientadores: Ranilson de Souza Bezerra

Juliana Ferreira dos Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Tilápia 2. Proteína 3. Microencapsulação  
I. Carvalho Junior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Bezerra, Ranilson de Souza (coorient.) III. Santos, Juliana Ferreira dos (coorient.) IV. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-091

**ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA**

**RECUPERAÇÃO INTEGRAL E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DO  
RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA TILÁPIA *Oreochromis niloticus* E SUAS  
APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/02/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Thiago Barbosa Cahú (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Juliett de Fátima Xavier da Silva (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Alagoas

---

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Alagoas

Dedico esse trabalho a minha mãe Inalva Marques.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me fornece saúde e inteligência e aos anjos que me acompanham.

A minha mãe, Inalva e meus irmãos Anderson e Dayvson que sempre me auxiliam e são a base para minha força.

Ao Professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior pela oportunidade, orientação e sapiência concedidas, sobretudo na confiança depositada no desempenho deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra pelas oportunidades concedidas, paciência, ensinamentos, orientação e apoio durante os 8 anos de jornada científica no labenz.

Ao Professor Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior pela disponibilidade de parceria no desenvolvimento do trabalho, mostrando-se sempre muito disposto e acessível a colaborar e orientar na técnica de domínio e no que fosse necessário para desenvolver a pesquisa.

À Professora Dra Juliana Ferreira Dos Santos pela disponibilidade e coorientação.

À Professora Dra Juliett de Fátima Xavier da Silva pela coorientação constante e amizade.

Ao Dr. Thiago Barbosa Cahú pela coorientação integral e amizade. Sem sua atenção, envolvimento e intercessão não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas Luciano e Valdemir pois foram essenciais no desenvolvimento da pesquisa. Em especial as pessoas que trabalharam efetivamente neste estudo: Raquel e Renata Nascimento.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia (LABENZ): Ana Cláudia, Amália, Caio, Carol, Kelma, Janilson, Marina, Milena, Lidiane, Renata, Robson, Ramires.

Aos técnicos e funcionários da UFPE. Com certo destaque a Seu João, Vivaldo e Rafael.

A FACEPE pela concessão da bolsa.

## RESUMO

A aquicultura tem apresentado significativo crescimento no Brasil nas últimas décadas e coloca o país como o segundo maior produtor no continente americano, sendo os principais aumentos concentrados nas espécies de água doce. A tilápia é a principal espécie aquícola cultivada no Brasil e a segunda de cultivo mais difundida no mundo. O filé é o principal produto para comercialização e os resíduos do processamento (restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras), gerados a partir do processamento, representam entre 60 e 70% da matéria-prima. Os resíduos de tilápia *Oreochromis niloticus* são considerados fontes de biomoléculas que podem ser utilizadas na produção de novos produtos e aplicados em processos biotecnológicos. O uso de carcaça na produção de novos produtos é uma alternativa viável e promissora para a aplicação desses resíduos como fontes potenciais de bioativos. O hidrolisado proteico de peixe (HPP), concentrado proteico de peixe (CPP), gelatina e óleo de peixe são produtos obtidos a partir da carcaça de tilápia. O objetivo deste estudo foi extrair biomoléculas de resíduos de tilápia *Oreochromis niloticus* e produzir micropartículas para elaboração de novos produtos. A secagem por pulverização foi utilizada para obtenção do hidrolisado proteico de peixe seco (HPPs) e concentrado proteico de peixe seco (CPPs). Estes produtos foram caracterizados através de cálculos de rendimento, análises físico-químicas, microbiológicas e caracterização morfológica através de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas. HPPs e CPPs revelaram conter, respectivamente, 48% e 71% de proteína e 26,1% e 3,2% de extrato etéreo. A gelatina revelou elevado grau de glicina (17%), seguido de prolina (9,4%). Enquanto que os principais ácidos graxos presentes no óleo e gordura foram, respectivamente: ácido oleico – 36,7% e 12,43% e linoleico – 15,4% e 4,2%. HPPs e CPPs não apresentaram contaminação microbiológica durante 60 dias de armazenamento sob temperatura ambiente (c.a 30 °C). A oxidação lipídica não foi verificada no presente estudo durante 56 dias de armazenamento. Os valores máximos de TBARS obtidos nos HPPs e CPPs foram respectivamente: (0,53 mgMDA/kg) e (0,21 mgMDA/kg). Os aminoácidos essenciais encontrados no HPPs e CPPs foram, respectivamente: leucina – 3,14% e 4,56%; lisina – 3,40% e 5,63%; valina 1,82% e 2,66%. Quando a cor foi analisada, um aumento nos valores de (b \*21.19) para HPPs e (b \*17.46) para CPPs foi observado após período de estocagem. As micropartículas de CPPs e HPPs apresentam uma superfície contínua, lisas, arredondadas e regulares com variados tamanhos (7-40 µm). Estes resultados demonstram que os processos elaborados recuperam dos resíduos da carcaça

da tilápia importantes macromoléculas nutricionais (proteína e lipídeos). Os produtos (gelatina, óleo, CPPs, HPPs) apresentaram excelente qualidade sob o ponto de vista químico e microbiológico e alta estabilidade oxidativa. Além disso, mantiveram elevado valor nutritivo com alto teor de proteína, aminoácidos e ácidos graxos polinsaturados.

Palavras chaves: Carcaça de tilápia. Proteína. Lipídeos. Microencapsulação.

## ABSTRACT

Aquaculture showed growth in Brazil in the recent decades and places the country as the second highest producer in the American continent, where the main increases are concentrated in freshwater species. Tilapia is main aquaculture species cultivated in Brazil and the most widespread type of farmed in the world. Fillet is the main product for commercialization and residues (meat, head, skin, bones, scales and viscera) generated from the processing represent between 60 and 70% of the raw material. Due to progress of fish farming develops, increase the amount of waste from the fish processing industries. Tilapia *Oreochromis niloticus* waste are considered a source of biomolecules, which can be recovered and applied in biotechnology processes. The use of carcass to production of new products is a viable and promising alternative to the application of these residues as sources of bioactives. Fish protein hydrolysate (FPH), fish protein concentrate (FPC), gelatin and fish oil are products obtained from carcass of tilapia. The aim this study was extracted biomolecules from *Oreochromis niloticus* tilapia waste and produced microparticules to elaboration of new products. Spray drying was utilized to obtain of fish protein hydrolysate dry (FPHd) and fish protein concentrate dry (FPCd). These products were characterized by yield calculations, physicochemical, microbiological analyzes and morphological characteristics by scanning electron microscopy of the microparticules. FPHd and FPCd showed to contain, respectively: 48% and 71% of protein and 26.1% and 3.2% of ether extract. Gelatin revealed a high degree of glycine (17%), followed by proline (9.4%). While the main fatty acids present in the oil and fat were respectively: oleic acid - 36.7% and 12.43% and linoleic - 15.4% and 4.2%. FPHd and FPCd not showed microbiological contamination during 60 days storage at room temperature (*c.a.* 30 °C). The lipid oxidation by fatty acids was not verified in the present study during 56 days of storage. The maximum TBARS values obtained in FPHd and FPCd were respectively: (0.53 mgMDA / kg) and (0.21 mgMDA / kg). The essential amino acids content in FPHd and FPCd were, respectively: leucine - 3.14% and 4.56%; lysine - 3.40% and 5.63%; valine - 1.82% and 2.66%. When the colour was analysed, a increase in the values of (b \* 21,19) to FPHd and (b \* 17,46) to FPCd was observed after period of storage. The microparticules of FPCd and FPHd presented a spherical morphology and continuous smooth surface in variety sizes (7-40 µm). These results demonstrate wich the processes applied recover important nutritional macromolecules (protein and lipids) from tilapia waste. The products (gelatin, oil, FPCd, FPHd) presented excellent chemical

and microbiological quality and high oxidative stability. Moreover, maintained high nutritional value with content high protein, amino acids and polyunsaturated fatty acids.

Keywords: Tilapia carcass. Protein. Lipid. Microencapsulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

Figura 1 –	Quantidade produzida e valor da produção de peixes, segundo a espécie ou grupo de peixes – Brasil.....	21
Figura 2 –	Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	22
Figura 3 –	Resíduos da filetagem de tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	24
Figura 4 –	Produto em pó obtido através de técnica de spray drying.....	33

### Artigo 1

Figura 1 –	Processo para a utilização de resíduos de carcaça de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> .....	42
------------	---	----

### Artigo 2

Figura 1 –	Gráficos de coloração das gelatinas. G3 à esquerda; G10 à direita.....	66
Figura 2 –	Padrões de proteína de gelatina de osso de tilápia; Marcador Molecular.....	68
Figura 3 –	Fotomicrografias MEV das micropartículas de concentrado proteico com gelatina de tilápia.....	69
Figura 4 –	Tbars (mgMDA/kg) do CPGT durante 56 dias de estocagem.....	74

### Artigo 3

Figura 1 –	pH do hidrolisado proteico de peixe (HPP), concentrado proteico de peixe (CPP), hidrolisado proteico de peixe seco (HPP pó) e concentrado proteico de peixe seco (CPP pó).....	94
Figura 2 –	Luminosidade (L *), componente verde-vermelho (a*) e componente azul-amarelo do HPPs e CPPs.....	96
Figura 3 –	Parâmetros luminodidade (L*), verde-vermelho (a *) azul-amarelo (b*) do HPPs e CPPs .....	97
Figura 4 –	Medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do hidrolisado proteico de peixe seco (HPPs) e concentrado proteico de peixe seco (CPPs) .....	99
Figura 5 –	Fotomicrografias MEV das micropartículas de concentrado proteico de peixe seco .....	101

Figura 6 –	Fotomicrografias MEV das micropartículas de hidrolisado proteico	
	de peixe seco .....	101

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Tabela 1 –	Rendimento de biomoléculas isoladas a partir de 1,0kg (MS <sup>ab</sup> n = 3) de resíduo de tilapia.....	43
Tabela 2 –	Composição dos aminoácidos da gelatina extraída dos ossos de tilápia .....	45
Tabela 3 –	Composição de ácidos graxos do óleo e gordura extraídos dos resíduos de tilápia.....	48
Tabela 4 –	Composição centesimal (g/100g).....	50

### Artigo 2

Tabela 1 –	Composição centesimal das gelatinas (g/100g de peso seco).....	62
Tabela 2 –	Composição dos aminoácidos da gelatina óssea de tilápia (g/100g de peso seco) .....	64
Tabela 3 –	Coloração da gelatina de ossos de tilápia.....	65
Tabela 4 –	Composição centesimal e de aminoácidos do concentrado proteico de gelatina de tilápia seco (g/100g de peso seco) .....	71

### Artigo 3

Tabela 1 –	Determinação microbiológica dos CPP, HPP, HPPs e CPPs .....	87
Tabela 2 –	Composição centesimal do HPPs e CPPs (DM basis): 15 e 60 dias .....	90
Tabela 3 –	Composição de ácidos graxos do concentrado proteico de peixe seco (%) .....	91
Tabela 4 –	Composição de ácidos graxos do hidrolisado proteico de peixe seco (%) .....	92
Tabela 5 –	Composição dos aminoácidos do hidrolisado proteico de peixe seco e concentrado proteico de peixe seco (DM basis) .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ARA	Ácido araquidônico
BSE	Bovine spongiform encephalopathy
C12	Ácido Láurico
C14:0	Ácido Mirístico
C15:0	Ácido Pentadecanóico
C16:0	Ácido Palmítico
C17:0	Ácido Heptadecanóico
C18:0	Ácido Esteárico
C20:0	Ácido Araquídico
C22:0	Ácido Behênico
C14:1	Ácido Miristoleico
C16:1	Ácido Palmitoleico
C18:1n9c	Ácido Oléico
C20:1	Ácido cis-Eicosenóico
C22:1n9	Ácido Erucico
C24:1	Ácido Nervonico
C18:2n6c	Ácido Linoléico
C18:3n6	Ácido Gama Linolênico
C18:3n3	Ácido Linolênico
C20:2	Ácido Cis-Eicosadienóico
C20-3n3	Ácido cis- Eicosatrienóico
C20:3n6	Ácido Cis-Eicosatrienóico
C20:4n6	Ácido Araquidônico
C20:5n3	Ácido cis-Eicosapentaenóico
C22:6n3	Ácido cis-Docosahexaenóico
C18:1n9t	Ácido Elaidico
CPGT	Concentrado proteico com gelatina de tilápia
CPP	Concentrado Proteico de Peixe

CFU	Colony forming units
DHA	Docosahexaenoic acid
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Eicosapentaenoic acid
FAO	Food and Agriculture Organization
FPH	Fish protein hydrolysate
FPC	Fish protein concentrate
HCL	ácido clorídico
HPP	Hidrolisado proteico de peixe
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMSF	International commission on microbiological specifications for foods
kDa	Kilodaltons
mM	milimolar
NMP	Número mais provável
MDA	malonaldeído
PCA	Plate Count Agar
FPHd,	Fish protein hydrolysate dry,
FPCd	Fish protein concentrate dry
PCGT	Protein Concentrate with Gelatin Tilapia
PUFAs	Polyunsaturated Fatty Acids
SDS-PAGE	Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(Dodecil sulfato eletroforese em gel de poliacrilamida)
TCA	Trichloroacetic acid (Ácido tricloroacético)
TBA	Ácido tiobabitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substance (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
UFC	Unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1 AQUICULTURA MUNDIAL E TILAPICULTURA .....	20
2.2 APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DO PESCADO.....	23
2.2.1 Hidrolisado Proteico de Peixe.....	24
2.2.2 Gelatina .....	26
2.2.3 Óleo de peixe .....	27
2.3 DETERIORAÇÃO DO PESCADO.....	29
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO .....	30
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA ( <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> ).....	34
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E FUNCIONAL DE MICROPARTÍCULAS DE GELATINA INCORPORADA COM CONCENTRADO PROTEICO DE PEIXE OBTIDAS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> .....	54
3.3 EFEITOS DA MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY DRYING NAS ESTABILIDADES FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO HIDROLISADO E CONCENTRADO PROTEICO DE TILÁPIA ( <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> ).....	80
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção aquícola mundial tem aumentado continuamente devido à alta demanda de produtos pesqueiros para o consumo humano. De acordo com dados da FAO (2016), a produção mundial (pesca e aquicultura) atingiu 167,2 milhões de toneladas em 2014. Estima-se que as espécies de água doce como a tilápia, carpa e peixe-gato serão responsáveis pela maior parte desse aumento com aproximadamente 60% da produção da aquicultura total em 2025 (FAO, 2016).

A tilápia é a principal espécie aquícola cultivada no Brasil, e sua produção em 2014 chegou a atingir aproximadamente 199.000 t, correspondendo a cerca de 41,9% do total da piscicultura do país, apresentando um crescimento anual entre 20-25% (IBGE, 2014). Em 2015, a tilápia segue como a espécie mais cultivada no país, com 219,33 mil toneladas despescadas, representando 45,4% do total da despesca nacional. O consumo mundial da espécie tem crescido devido à utilização de espécies selvagens na aquicultura, o que causou uma redução dos preços, ocasionando um aumento expressivo na sua comercialização (FAO, 2016). Com isto, a expansão da tilapicultura tem sido estimulada pela grande aceitação do mercado consumidor, onde o principal produto para comercialização beneficiamento é o filé. Todo o restante é considerado resíduo do processamento da indústria pesqueira, sendo um problema quando descartados inadequadamente pois provocam sérios impactos ambientais.

Como mencionado acima, no beneficiamento deste peixe, o filé é o principal produto para comercialização e os resíduos (restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras) do processamento industrial descartados constituem cerca de 70% da matéria-prima original (SILVA et al., 2014; CHALAMAIAH et al., 2012). Uma alternativa ao descarte desses resíduos, com propriedades interessantes para fins biotecnológicos, é a produção de hidrolisado proteico de peixe (HPP). O HPP é um produto obtido do resultado da quebra das proteínas do pescado, convertendo-as em peptídeos. Este produto é composto por proteínas solúveis, lipídeos e aminoácidos e possui propriedades físico-químicas como formação de espuma, capacidade de emulsificação, capacidade de ligação a óleos e alta solubilidade, importantes para formulações alimentares, produtos nutricionais e farmacêuticos (HE et al., 2013). O HPP é um produto com boa qualidade nutricional e passível de substituição às farinhas de peixe em rações para organismos aquáticos, assim como base de suplementação na alimentação humana. Sendo comumente utilizado na forma líquida, a

secagem por atomização (spray drying) é uma alternativa para conversão deste produto líquido em pó (ABDUL-HAMID et al.,2002).

Uma segunda alternativa de aproveitamento de subprodutos dos processamentos realizados em resíduos é a gelatina, uma proteína derivada da hidrólise do colágeno que pode ser obtida de partes não comestíveis como peles, ossos, nadadeiras e tecidos cartilagosos de animais. É um biopolímero amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, alimentar e de suplemento nutricional, como na fabricação de cápsulas e material de revestimento formador de micropartículas, além de ingrediente emulsificante e estabilizante em formulações alimentares. Devido as suas propriedades funcionais e tecnológicas, como por exemplo, formação e estabilização de espumas, formação de gel, capacidade de ligação à água e gorduras, estabilização de emulsões, formação de filme, a gelatina é aplicada na indústria alimentícia a produção de geleia, confeitaria e panificação em geral. A gelatina de peixe pode ser aplicada como filme para proteger os alimentos, servindo como barreira contra a secagem e exposição à luz e ao oxigênio (ARVANITOYANNIS, 2002). A produção de gelatina de peixe é uma alternativa à aplicação para os subprodutos da pesca e das indústrias de beneficiamento de peixe, além de ser potencial substituta da gelatina de mamífero e promover várias vantagens na técnica de microencapsulação (PIACENTINI et al., 2013).

O óleo de peixe continua a ser a principal fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), benéficos à saúde humana. O consumo diário do óleo de peixe tem aumentado juntamente com o crescimento do mercado de alimentos funcionais e suplementos nutricionais, sendo consumido na forma líquida, sólida ou microencapsulada (KOLANOWSKI e LAUFENBERG, 2006). A microencapsulação consiste no revestimento de um material, formando uma barreira que evite perdas ou reações indesejáveis como a oxidação de lipídeos. Esta técnica é utilizada no encapsulamento do óleo de peixe. Os ácidos graxos ômega-3 mais importantes são o ácido alfa-linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA, C20: 5) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6) e ácido araquidônico (ARA), presentes em óleos e relacionados a inteligência, memória e desenvolvimento do cérebro e da visão, bem como no tratamento de doença cardiovascular. A elaboração de pó com ômega 3 através da microencapsulação permite o desenvolvimeto de nutracêuticos e alimentos funcionais com EPA e DHA, além de inibir a oxidação dos ácidos graxos.

A microencapsulação por técnica de spray drying é utilizada no encapsulamento de óleo de peixe, EPA, DHA, óleo de linhaça e óleo de tomilho (GRATTARD et al. 2002, BARROW et al.

(2009) GALLARDO et al 2013, MARTINS et al, 2014, MORALES-MEDINA, 2016). A secagem, por spray drying é uma operação única, que transforma uma emulsão líquida em produto seco e consiste não somente na remoção de água, como também, na formação de partículas. Além disto, serve para evitar perdas ou reações indesejáveis do núcleo com ambiente externo, luz, oxigênio e água, como também diminuir a perda de água para o ambiente e melhorar manipulação do material através da forma sólida, tornando o produto mais uniforme. A microencapsulação apresenta como vantagens a liberação controlada, além de mascarar o sabor ou odor e promover alta estabilidade a ácidos graxos com a redução da oxidação dos produtos. Na indústria de alimentos, a secagem por pulverização serve para garantir a estabilidade microbiológica dos produtos e evitar as degradações bioquímicas, além de reduzir os custos de armazenamento e transporte.

Os organismos marinhos representam uma rica fonte quase ilimitada de substâncias ativas aplicáveis ao desenvolvimento de novos produtos bioativos. Com a ascensão da aquicultura brasileira e o conseqüente aumento na disponibilidade de subprodutos, torna-se viável e necessária a utilização de resíduos do processamento de tilápia para aplicações biotecnológicas. No entanto, são necessárias pesquisas mais detalhadas sobre a extração de biomoléculas (proteínas e lipídeos), obtidas a partir dos resíduos (carcaça, pele, cabeças, restos de músculos) de *Oreochromis niloticus* e suas possíveis aplicações nutracêuticas (ácidos graxos do grupo ômega e aminoácidos). O potencial destes bioativos como fonte de suplementos nutricionais (concentrado proteico e óleo rico em PUFAs), a partir da produção de micropartículas, com o uso de polímeros naturais (gelatina) são estudos promissores que devem ser investigados, bem como técnicas que possam estabilizar esses produtos de forma a conferir maior longevidade. O aproveitamento desses subprodutos oriundos do processamento do pescado minimiza a produção de resíduos a ser lançada no meio ambiente, além de promover o desenvolvimento de novos produtos como potenciais substitutos aos existentes no mercado, passíveis de aplicação à indústria alimentícia e farmacêutica.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Promover a recuperação de biomoléculas dos resíduos do processamento de tilápia através da produção de micropartículas e desenvolvimento de novos produtos de valor agregado com aplicações biotecnológicas.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver metodologia para obtenção de hidrolisado proteico de peixe (HPP) e concentrado proteico de peixe (CPP);
- b) Extrair óleo e gordura do HPP;
- c) Caracterizar quimicamente o perfil lipídico;
- d) Extrair gelatina dos ossos de tilápia;
- e) Caracterizar a gelatina;
- f) Produzir hidrolisado proteico de peixe seco (HPPs), concentrado proteico de peixe seco (CPPs) e concentrado proteico com gelatina de tilápia (CPGT);
- g) Realizar caracterização físico-química e microbiológica do HPPs, CPPs e CPGT;
- h) Caracterizar morfologicamente micropartículas do HPPs, CPPs, CPGT.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AQUICULTURA MUNDIAL E TILAPICULTURA

A aquicultura, atividade de cultivo de organismos aquáticos, é praticada a milhares de anos pela humanidade, representando atualmente uma importante fonte de alimento, trabalho e renda para o homem e a indústria. A produção aquícola mundial tem crescido principalmente devido à compensação pela aquicultura, já que os estoques de captura se aproximam ao limite de exploração, bem como à alta demanda no mercado de pescado para consumo humano. De acordo com dados da FAO (2016), a produção mundial (pesca e aquicultura) atingiu 167,2 milhões de toneladas em 2014. A aquicultura tem sido significativa no Brasil, com uma taxa média de crescimento de cerca de 9% ao ano na última década, o que coloca o país como o segundo maior produtor de aquicultura no continente americano, onde os principais aumentos estão ocorrendo nas espécies de água doce (FAO, 2014). Espera-se um aumento na produção mundial de pescado (pesca e aquicultura), crescimento este que deverá chegar a 196 milhões de toneladas em 2025, sendo a aquicultura representada por um percentual que atingirá 52%. Estima-se que maior parte de tal aumento na produção terá sua origem em países em desenvolvimento (FAO, 2016).

A aquicultura brasileira teve crescimento estável e chegou a atingir um valor de produção de R\$ 4,39 bilhões, dos quais a maior parte (69,9%) foi proveniente da criação de peixes e a tilápia segue como a espécie mais cultivada no país com um aumento de 9,7% da produção em 2014 (IBGE, 2015). Além disso, outros grandes aumentos são esperados no Brasil de aproximadamente 104% a mais, devido a investimentos na área. As espécies de água doce como a tilápia, carpa e peixe-gato deverão ser responsáveis por maior parte desse aumento com aproximadamente 60% da produção da aquicultura total em 2025 (FAO, 2016). A produção de tilápia está se expandindo na Ásia, América do Sul e África, com um volume crescente de insumos entrando em mercados domésticos nos principais países produtores (FAO, 2016).

A tilápia é a principal espécie aquícola cultivada no Brasil, e sua produção em 2015 chegou a atingir aproximadamente 199.000 t. o que corresponde a cerca de 41,9% do total da piscicultura do país, apresentando um crescimento anual entre 20-25% (IBGE, 2015) (Figura 1). Em 2015, a tilápia segue como a espécie mais cultivada no país, com 219,33 mil toneladas despescadas, representando 45,4% do total da despesca nacional (IBGE, 2015) e classificada em 2011 como

segundo grupo de peixes de cultivo mais importante mundialmente atrás, apenas das carpas (FAO, 2012). O consumo mundial da espécie tem crescido devido à passagem de espécies selvagens para a aquicultura, somado a uma redução dos preços e um aumento expressivo na sua comercialização (FAO, 2016). Este sucesso como principal produto da aquicultura brasileira é atribuído a um pacote tecnológico desenvolvido exclusivamente para esta espécie, e ainda, excelente performance em ganho de peso, facilidade de manejo em seu cultivo, boa adaptação às condições climáticas e aos diferentes sistemas de cultivo em regiões do País, principalmente aqueles que utilizam altas densidades permitindo a produção em grande escala (BARROSO et al, 2015, NOGUEIRA, 2007; FIGUEIREDO e VALENTE, 2008).

Figura 1 - Quantidade produzida e valor da produção de peixes, segundo a espécie ou grupo de peixes - Brasil – 2015

Espécie ou grupo de peixes, em ordem decrescente de quantidade produzida	Quantidade produzida		Valor da produção	
	Total (kg)	Percentual (%)	Total (1 000 R\$)	Percentual (%)
<b>Total</b>	<b>483 241 273</b>	<b>100,0</b>	<b>3 064 693</b>	<b>100,0</b>
Tilápia	219 329 206	45,4	1 177 643	38,4
Tambaqui	135 857 980	28,1	871 393	28,4
Tambacu e tambatinga	37 443 358	7,7	263 391	8,6
Carpa	20 693 189	4,3	131 971	4,3
Pintado, cachara, cachapira, pintachara, surubim	18 354 578	3,8	196 905	6,4
Pacu e patinga	13 276 299	2,7	100 848	3,3
Matrinxã	9 366 203	1,9	73 336	2,4
Pirarucu	8 386 708	1,7	85 768	2,8
Jatuarana, piabanha e piracanjuba	5 320 567	1,1	38 949	1,3
Pirapitinga	3 480 185	0,7	25 283	0,8
Piau, piapara, piauçu e piava	3 173 105	0,7	24 546	0,8
Outros peixes	2 942 110	0,6	20 612	0,7
Curimatã, curimbatã	2 554 052	0,5	19 860	0,6
Truta	1 590 010	0,3	23 235	0,8
Traíra, trairão	1 129 168	0,2	8 365	0,3
Lambari	244 730	0,1	1 639	0,1
Tucunaré	67 965	0,0	529	0,0
Dourado	31 860	0,0	420	0,0

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Pesquisa da Pecuária Municipal 2015.

Fonte: IBGE (2015)

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é um peixe onívoro, pertencente à família Cichlidae, originário da África, Bacia do Nilo e da Ásia, em rios costeiros de Israel, Bacia do Nilo, sendo uma espécie de crescimento rápido, rusticidade e versatilidade na aquicultura, pois é de fácil adaptação tanto no cultivo extensivo, quanto ao sistema de tanques-rede de alta tecnologia de produção (HAYASHI et al., 1999; MEURER et al. 2002). Além disto, a espécie tem boa aceitação no mercado consumidor, devidos às características organolépticas, além de possuir carne de qualidade excelente, e por não apresentar espinhos em “Y” em seu filé (HILDSORF, 1995; MEURER et al. 2002).

Nas décadas de 40 e 50, em todo o mundo houve uma distribuição significativa de tilápias, com objetivo de promover sustentabilidade ao cultivo em países subdesenvolvidos (BARROSO et al, 2015). A espécie foi escolhida, principalmente, devido à rusticidade e alimentação à base de alimento natural. No entanto, a sua maior difusão, ocorreu entre os anos 60 e 80, com a espécie *Oreochromis niloticus* (Figura 2), em razão de qualidades zootécnicas, como maior crescimento em sistemas confinados, alta prolificidade e reprodução mais tardia, em comparação às outras espécies de tilápia (KUBITZA, 2000).

Figura 2 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Fonte: Disponível em <<https://pisciculturamaravilhosaesp.wordpress.com/1-tilapia-do-nilo/>>. Acesso em 03/09/2017.

## 2.2 APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DO PESCADO

Os subprodutos do processamento de filés de tilápia *Oreochromis niloticus* incluem pele, ossos, carcaça, cabeças e caudas que podem ser transformados em produtos de alto valor nutricional e percentual de proteínas (ROSLAN et al. 2014), No beneficiamento do peixe, o filé é o principal produto para comercialização e os resíduos (restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras) do processamento industrial constituem de 60 a 70% da matéria-prima descartada, sendo essencial o seu processamento para diminuir os impactos causados ao ambiente (CHALAMAIAH et al., 2012, BOSCOLO et al., 2005) (Figura 3).

Em tempos anteriores, os subprodutos de peixe, incluindo os resíduos, eram considerados de baixo valor e utilizados na alimentação de animais de criação ou descartados. Contudo, nas últimas duas décadas, a utilização desses subprodutos, têm recebido destaque, pois podem representar uma fonte suplementar de nutrição, sendo a utilização destes uma importante indústria em vários países, com atenção na manipulação de forma controlada, segura e higiênica (FAO, 2016).

Dentre as alternativas a que se destinam os resíduos de peixes podem ser aproveitados, como fertilizantes, produtos para consumo humano, são utilizados principalmente como parte integrante para compor a ração animal (BEZERRA et al., 2001; STEVANATO et al, 2007). As cabeças e carcaças do pescado podem transformadas em outros produtos para consumo humano (salsichas de peixe, bolos, gelatina e molhos), assim como outros subprodutos na produção de alimentos, biodiesel, biogás, produtos dietéticos (quitosana), produtos farmacêuticos (óleos), cosméticos (colágeno), sendo o colágeno utilizado na indústria de processamento de alimentos na forma de gelatina (FAO, 2016). As vísceras e as carcaças de peixe são uma fonte promissora na produção de hidrolisado proteicos, que vem sendo alvo de interesse crescente, como uma fonte potencial de peptídeos bioativos (FAO, 2016; SILVA et al. 2014). Os resíduos pesqueiros são descartados em grande quantidade e, sob o ponto de vista ambiental e econômico, é proposto um melhor aproveitamento dos resíduos pesqueiros como fonte de biomoléculas (FAO, 2016; BOUGATEF et al., 2012, CAHÚ et al., 2012; CHALAMAIAH et al., 2012; KIM e WIJESEKARA, 2010).

Figura 3 - Resíduos da filetagem de tilápia (*Oreochromis niloticus*)



Fonte: Ferreira, A.C.M. (2018)

### 2.2.1 Hidrolisado Proteico de Peixe

Uma alternativa ao descarte desses resíduos, com propriedades interessantes para fins biotecnológicos é a produção de hidrolisado proteico de peixe (HPP). O HPP é um produto obtido do resultado da quebra das proteínas do pescado, convertendo-as em peptídeos. Este produto é composto por proteínas solúveis, lipídeos e aminoácidos e pode ser utilizado como parte integrante para compor rações para alimentação de organismos aquáticos (SILVA et al. 2014; BEZERRA et al., 2005). Os hidrolisados proteicos de peixe obtidos a partir de vísceras de peixe estão sendo utilizados na alimentação animal em geral e na indústria de alimentos para peixes, além de representar uma excelente alternativa para o incremento da oferta de proteína animal (FAO, 2010).

As proteínas e peptídeos do HPP podem ser obtidos da solubilização das proteínas do pescado a partir da utilização de ácidos e solventes orgânicos, ou ainda, ser liberados dos tecidos por enzimas proteolíticas endógenas, ou seja, presentes no próprio peixe e/ou por enzimas de origem vegetal, animal ou microbianas adicionadas à matéria-prima (KRISTINSSON e RASCO, 2000; MARTONE et al., 2005). O processo de catálise de enzimas proteolíticas endógenas consiste

na quebra de longas cadeias de proteínas que resulta em frações solúveis e insolúveis. As frações insolúveis contêm fragmentos proteicos e proteínas não hidrolisadas, já a fração solúvel é rica em proteínas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres. Este produto pode atingir um percentual de 90% de proteína, além de apresentar propriedades funcionais úteis para a indústria alimentícia (FURLAN e OETTERER, 2002).

O hidrolisado proteico de peixe possui propriedades físico-químicas como formação de espuma, capacidade de emulsificação, capacidade de ligação a óleo e solubilidade, importantes para formulações alimentares, produtos nutricionais e farmacêuticos (HE et al., 2013), além de alta solubilidade em água (KRISTINSSON e RASCO, 2000). Recentemente, os hidrolisados proteicos de peixe atraíram muita atenção dos processos biotecnológicos alimentares devido à grande volume de matéria-prima e à presença de alto teor de proteínas com bom balanceamento de aminoácidos e peptídeos bioativos (CHALAMAIAH et al., 2012). As atividades biológicas das proteínas e peptídeos funcionais dos hidrolisados proteicos de peixe têm sido investigados na prevenção e tratamento do câncer (PICOT et al., 2006) e para promover a saúde humana por meio da prevenção de doenças (KIM e WIJESEKARA, 2010). Além disso, possuem outras bioatividades interessantes tais como, antioxidante (JEMIL et al, 2014; DEKKERS et al., 2011; YOU et al, 2010; DONG et al., 2008; WU, CHEN e CHIAU, 2003), anti-hipertensiva (RAGHAVAN e KRISTINSON, 2009), antimicrobiana (SALAMPESY et.al.,2010), anticâncer (PICOT et al., 2006).

Dentre as proteases comerciais utilizadas para solubilizar proteínas de pescado, a Alcalase®, produzida pela fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis*, tem sido intensivamente utilizada pela indústria por ser considerada uma das melhores enzimas para o preparo de hidrolisados, pois o produto hidrolisado final apresenta gosto suave mesmo quando tem elevado grau de hidrólise (BENJAKUL e MORRISSEY, 1997; KRISTINSSON e RASCO, 2000; CENTENARO et al. 2009).

Além disso, estudos evidenciam que os hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos (anti-hipertensivos, antioxidantes, anticoagulantes e antimicrobianos) obtidos de organismos marinhos e seus subprodutos podem promover a saúde humana por meio da prevenção de doenças e como ingredientes de alimentos funcionais ou nutracêuticos e farmacêuticos (KIM e MENDIS, 2006; KIM e WIJESEKARA, 2010). Juntamente com isto, estudos têm demonstrado que hidrolisados proteicos de peixe, obtidos por hidrólise enzimática, podem ser utilizados como potenciais antioxidantes naturais (YOU et al., 2010; LEE, JEON e BYUN, 2011). Os subprodutos do

processamento de tilápia podem ser transformados em produtos de alto valor nutricional e elevada concentração de proteína, como o concentrado proteico de peixe (CPP) que é obtido a partir da remoção de água e óleo do peixe (IBRAHIM, M. S., 2009).

### 2.2.2 Gelatina

Uma segunda alternativa de aproveitamento de subprodutos dos processamentos feitos em resíduos é a gelatina, uma proteína fibrosa desnaturada derivada do colágeno que pode ser obtida de partes não comestíveis como peles, ossos, nadadeiras e tecidos cartilagosos, amplamente utilizada em diversos produtos comerciais (AHMAD e BENJAKUL, 2011; OETTERER, 2006, SENARATNE et al., 2006)). É um biopolímero amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, alimentar e de suplemento nutricional, por causa de suas propriedades funcionais e tecnológicas, como formação e estabilização de espumas, formação de gel, capacidade de ligação de água e gordura (capacidade anfifílica), formação e estabilização de emulsões, formação de filme, além de vantagens como biodegradabilidade e biocompatibilidade (SCHRIEBER e GAREIS, 2007; ARVANITTOYANNIS, 2002; KARIM e BHAT, 2009). A gelatina de peixe é útil como filme para proteger os alimentos, servindo como barreira contra a secagem e exposição à luz e ao oxigênio (ARVANITTOYANNIS, 2002). Na indústria alimentícia a gelatina pode ser utilizada para a produção de geleia, artigos de confeitaria, filmes comestíveis, processamento dos laticínios, produtos de panificação, clarificação de sucos naturais e na área farmacêutica é empregada na fabricação de cápsulas, expansores de plasma e tratamento de feridas e filmes incorporados com óleo (TONGNUANCHAN et al. 2014; KARIM e BHAT, 2009, SHAKILA *et al.*, 2012;). Por possuir níveis de calorias baixos a gelatina é empregada para o uso em gêneros alimentícios, especialmente alimentos destinados a suplementos para quem pratica musculação (KARIM e BHAT, 2009).

Peles, ossos, extraídas de peixes são tecidos formados principalmente por colágeno. A transformação de ossos de peixe em gelatina é alternativa ao problema da eliminação de resíduos, doenças como encefalopatia espongiforme bovina (BSE). A demanda por alimentos tipo kosher e halal que seguem as leis religiosas, além da produção de produto de valor agregado despertaram o uso de gelatina de peixe em formulações alimentares (MUYONGA et al., 2004). O colágeno é o

principal constituinte da pele de animais, ossos e tecido conjuntivo. Estruturalmente o colágeno é composto por três cadeias alfa entrelaçadas, na denominada tripla hélice de colágeno que é estabilizada pelas pontes de hidrogênio (KARIM e BHAT, 2009). Para a extração do colágeno realiza-se tratamento ácido ou básico, sem alteração da estrutura de tripla hélice. No entanto, é o tratamento térmico que cliva as pontes de hidrogênio que estabiliza a estrutura da tripla hélice, e que converte a sua conformação helicoidal em espiralada resultando em gelatina (DJABOUROV et al., 1993).

A produção de gelatina a partir de peixe é uma alternativa à aplicação para os subprodutos da pesca e das indústrias de beneficiamento de peixe e à gelatina de mamífero, além de contribuir para diminuir o impacto ambiental e aumentar o lucro das empresas (SILVA et al., 2011; BOUGATEF et al., 2012). Devido a religião, exigências vegetarianas e o risco associado à encefalopatia espongiforme bovina por colágenos e gelatinas bovinas, a gelatina de peixe tornou-se uma alternativa viável à gelatina de mamífero. Com isto, a gelatina obtida de fontes marinhas tem conquistado crescimento nos últimos anos (PIACENTINI et al., 2013). A produção de gelatina de peixe pode reduzir o processamento de resíduos e gerar produtos de valor agregado (KOLI et al., 2002).

A gelatina é amplamente utilizada como material de revestimento e filmes para encapsular óleos ômega 3 de peixe, óleos essenciais aplicados a indústria farmacêutica e cosmética, administrar por via oral peptídeos, proteínas, insulina, fucoxantina (PIACENTINI et al., 2013, MARTINS et al, 2014, BARROW et al, 2007; BARROW et al, 2009, BUENO, C. M. et al 2011, SILVA et al., 2003, QUAN et al. 2013), além de promover alta estabilidade a ácidos graxos e retardar a oxidação dos produtos (BARROW et al, 2009) e ser a proteína mais utilizada na indústria de alimentos na microencapsulação (WANG et al 2014).

### **2.2.3 Óleo de peixe**

O óleo de peixe continua a ser a principal fonte de ácidos graxos poliinsaturados, trazendo benefícios à saúde humana. O consumo diário do óleo de peixe tem aumentado juntamente com o crescimento do mercado de alimentos funcionais e suplementos nutricionais, sendo consumido na forma líquida, sólida ou microencapsulada (KOLANOWSKI e LAUFENBERG, 2006). A

necessidade de alimentos funcionais suplementados com ômega-3 de qualidade é destacada pela alta demanda crescente aliada à ingestão e recomendações atuais. Óleos de peixe contendo ácidos graxos poli-insaturados, principalmente EPA e DHA, estão implementados como ingredientes alimentares em alimentos fortificados. Devido à sua instabilidade oxidativa, a maioria dos produtos alimentares que incorporam óleos EPA e DHA são estabilizados através da microencapsulação para evitar características organolépticas negativas inerentes à oxidação desses ácidos graxos (BARROW et al., 2007). Com isto, é necessário promover valor agregado às espécies descartadas avaliadas como uma boa fonte para produção de óleo de peixe contendo alto teor de ácidos graxos poliinsaturados do grupo ômega 3 (GALLARDO et al., 2013).

A microencapsulação para óleo de peixe é realizada principalmente com a aplicação de gelatina e pode ocorrer por interações eletrostáticas entre dois polímeros com cargas opostas em solução, sendo eficiente na encapsulação de compostos hidrofóbicos (DE KRUIF et al., 2004). O óleo de peixe, contendo ômega-3, pode ser estabilizado contra a oxidação usando uma variedade de tecnologias de microencapsulação e é útil para suplementar alimentos e bebidas (BARROW et al., 2009). Os benefícios à saúde associados ao consumo de ácidos graxos ômega-3, têm sido amplamente demonstrados e o desenvolvimento de nutracêuticos e alimentos funcionais nos últimos anos, que contém ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) atribuídos como primordiais na permeabilidade celular e metabolismo eicosanóide (RUXTON, REED, SIMPSON e MILINGTON, 2004, BELTRÁN, 2010). Esta técnica é utilizada no encapsulamento de óleo como suplementação de ômega-3 (DRUSCH e BERG, 2008; BARROW et al. 2007; DRUSCH e SCHWARZ, 2006; GALLARDO et al.; 2013). Os ácidos graxos ômega-3 mais importantes são o ácido alfa-linolênico (ALA, C18: 3), ácido eicosapentaenóico (EPA, C20: 5) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6), presentes em óleos (MENEZZO et al 2014; GALLARDO et al.; 2013).

Os PUFAs ômega 3 e 6 são essências no desenvolvimento do cérebro e memória infantil, sendo o ácido araquidônico (ARA), DHA e EPA importantes para funções cognitivas, visuais, bem como sua suplementação pode ajudar no controle de distúrbios psíquicos e outras afecções em crianças (Ryan et al., 2010). Os benefícios à saúde associados ao grupo ômega 3 são relacionados à prevenção de doença cardiovascular (BELTRÁN, 2010) e ao desenvolvimento da função cerebral e sistemas vasculares (CRAWFORD et al., 2003). A suplementação de crianças com DHA e ARA é demonstrada com significativa importância na inteligência infantil (DROVER et al., 2012). Esses

ácidos graxos são constituintes estruturais e funcionais de membranas celulares, sendo que o DHA pode ser encontrado em altas concentrações no cérebro ativando receptores da retina em tecidos neurais (CRAWFORD et al., 2003).

### 2.3 DETERIORAÇÃO DO PESCADO

Todo alimento é passível de deterioração, desde a colheita, fabricação, processamento, armazenamento até chegar ao consumidor. A conservação sob o aspecto microbiológico consiste no processo de retardar a proliferação dos microrganismos com o controle de variáveis como a temperatura, o pH e a umidade (GOULD, 1996). O pescado é um alimento de origem animal com maior probabilidade de deterioração, devido à elevada atividade de água. Segundo Favaro-Trindade et al. (2010), valores de atividade de água menor que 0,6 são recomendados para garantir estabilidade microbiológica dos produtos atomizados. Mofos e leveduras apresentam maior resistência à baixas atividades de água e pHs ácidos quando comparados a bactérias (FORSYTHE, 2002). Segundo a FAO, a indústria e as autoridades oficiais devem recorrer a testes microbiológicos em peixe e produtos pesqueiros a fim de detectar bactérias patogênicas e confirmar se o estado microbiológico desses produtos é satisfatório (FAO, 1997). Os microrganismos comumente utilizados como indicadores de segurança dos alimentos são coliformes, *E.coli*, Enterobactérias e *Streptococos* fecais e a qualidade alimentícia pode ser avaliada através da presença do grupo coliforme que indicam a existência de material fecal (FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Os lipídios da carne do peixe são mais factíveis à oxidação devido ao maior teor de ácidos graxos insaturados contidos na carne de mamíferos e aves. A rancificação e a contaminação por microrganismos, durante a fabricação e estocagem do pescado e seus subprodutos reduzem a vida de prateleira do produto e podem causar efeitos desagradáveis ao alimento. (FORSYTHE, 2002; SETEVANATO et al, 2007). O frescor dos peixes é outro fator importante para produção de hidrolisado proteicos de peixe que afeta a oxidação lipídica (YARNPAKDEE et al., 2012). A formação de produtos secundários à oxidação lipídica é uma das principais causas do desenvolvimento de odores indesejáveis no músculo do peixe, e conseqüentemente o odor de peixe (THIANSILAKUL et al., 2010).

Na degradação e putrefação do pescado dentre as bactérias que se encontram inseridas, estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, além de outras bactérias que podem ser

identificadas como coliformes, *Salmonella*, *Staphylococcus* (OETTERER, 2002). Segundo Jay (2005), a biota bacteriana da deterioração do peixe consiste de bastonetes gram-negativos não-esporulados tipo *Pseudomonas e Acinetobacter-Moraxella* e se o pescado não for eviscerado imediatamente, as bactérias do intestino vão logo para as paredes e cavidades intestinais com auxílio de enzimas proteolíticas endogênas.

A legislação estabelece limites microbiológicos, estabelecendo contagem máxima para pescado de 102 NMP/g para contagem de coliformes fecais e ausência de *Salmonella*, sendo esta última classificada como perigo de severidade moderada (APPCC, 1998; SILVA e FILHO, 1999). Microbiologistas de alimentos definem como microrganismos psicrotóxicos, aqueles que podem crescer em temperaturas entre 0 °C e 7 °C e produzir colônias visualizadas dentro de 7 a 10 dias com capacidade para degradar o pescado resfriado nessas temperaturas (JAY, 2005).

## 2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

As técnicas utilizadas para prevenir a deterioração microbiológica e para a preservação de alimentos incluem refrigeração e congelamento, secagem, acidificação, fermentação, adição de conservantes, esterilização, pasteurização e irradiação (GOULD, 1996). A secagem por pulverização é uma prática comum na indústria alimentícia, que visa assegurar a estabilidade microbiológica, prevenir reações de degradação, além de reduzir o custo de armazenamento e transporte e por fim obter um produto com propriedades específicas como solubilidade instantânea (CALISKAN e DIRIM, 2013; COUTO et al., 2012; GHARSALLAOUI et al., 2007). Na indústria de alimentos, a técnica mais utilizada para microencapsulação é secagem por pulverização (spray drying), um processo rentável, flexível e que produz partículas de boa qualidade (FRASCARELI et al., 2012). A eficácia de diferentes sistemas de encapsulamento na proteção contra a oxidação depende das características do material de revestimento e do processo de encapsulação (WANG et al., 2014).

A secagem, através de técnica spray drying (aspersão, atomização ou pulverização), é uma operação única, que transforma um fluido líquido em produto seco. É um processo especial de secagem, que consiste não somente na remoção de água, como também, na formação de partículas (ABDUL-HAMID et al., 2002, DUMOULIN; BIMBENET, 1998). Segundo Ghosh (2006) as micropartículas possuem várias vantagens como: proteção de materiais instáveis e sensíveis a

ambientes externos antes da utilização; melhor processamento; solubilidade; dispersibilidade; fluidez; extensão da vida útil através da prevenção de reações de oxidação e desidratação; liberação controlada; manipulação segura de materiais tóxicos; mascaramento de odor ou sabor; imobilização de enzimas e microrganismos; administração controlada e dirigida de fármacos e manuseio de líquidos como sólidos. Oliveira e Petrovick (2010) descrevem outras vantagens, como o processo de secagem não necessitar de interrupção, caso ocorra alguma alteração na operação, além da formação de gotículas que facilitam a troca térmica e transferência de massa que aumentam o rendimento e velocidade do processo.

A microencapsulação através de spray drying é uma operação única e processo comercial de baixo custo que é utilizado principalmente para a encapsulação de fragrâncias, óleos, odores e na secagem de produtos, além de evitar a evaporação de compostos voláteis (GHARSALLAOUI et al., 2007; GHOSH, 2006). As partículas são formadas através da dispersão de uma emulsão contendo polímero e núcleo que em contato com uma câmara de ar quente secam. Durante o processo, o solvente evapora e o material de parede solidifica envolto as partículas do núcleo. A interação de alguns polímeros confere efeito positivo na proteção de compostos lábeis, compondo uma rede de materiais de parede como polissacarídeos, gomas e proteínas (GHOSH, 2006; DULMOLIN e BIMBENET, 1998). Segundo alguns autores (Martins et al., 2014, Benita, 2005; Silva et al., 2003, Shahidi e Han, 1993) a microencapsulação serve para formar barreiras e evitar perdas, além de proteger o conteúdo da degradação proteolítica e atribuir propriedades singulares sob o aspecto de liberação controlada, solubilidade e resistência à umidade nas micropartículas.

A microencapsulação tem como objetivo principal aprisionar um material de núcleo desejado numa matriz envoltória (GHOSH, 2006). A gelatina está dentre as proteínas mais utilizadas como material de revestimento, juntamente com a caseína e proteínas de soja (MARTINS et al., 2014). A maltodextrina, goma arábica e gelatina, são substâncias encapsulantes e transportadoras adequadas para microencapsulação por auxiliar e facilitar a secagem, além de possuírem a propriedade de proteção da substância ativa contra oxidação e deterioração (KHA et al., 2010, GHARSALLAOUI et al., 2007)

A secagem por pulverização tem sido utilizada para manter uma maior estabilidade em hidrolisados de tilápia preta (Abdul-Hamid et al. 2002) e hidrolisados de subprodutos de camarão (Bueno-Solano et al., 2009), porém a temperatura empregada pode causar alguns efeitos na qualidade do produto final (Abdul-Hamid et al. 2002), bem como o superaquecimento durante a

secagem, produzem fracas propriedades funcionais (Córdoba-Murueta, Navarrete-del-Toro e García-Carreño, 2007). O HPP é comumente utilizado na forma líquida, porém, a secagem por atomização (spray drying) é um dos métodos alternativos para conversão deste produto líquido em pó (ABDUL-HAMID et al., 2002).

A maior parte dos alimentos incorporados com óleo de peixe necessitam de estabilização através da tecnologia de microencapsulação, a qual protege o óleo da exposição à luz e ao oxigênio e inibi de forma concreta a fotooxidação e a autooxidação de radicais livres de EPA e DHA (BARROW et al., 2007). A microencapsulação por técnica de spray drying é utilizada no encapsulamento de óleo de peixe, EPA, DHA, óleo de linhaça e óleos de tomilho (GRATTARD et al., 2002, BARROW et al., 2009; GALLARDO et al., 2013, MARTINS et al., 2014, MORALES-MEDINA et al., 2016). A microencapsulação com goma e maltodextrina protegem o óleo do oxigênio, oxidação e temperaturas elevadas. O nível de proteção pode ser explicado a uma maior permeabilidade da combinação de biopolímeros utilizados como revestimento (GRATTARD et al.; 2002, GALLARDO et al., 2013). Existem vários métodos de microencapsulação de óleo de peixe e compreendem a produção de emulsões secas por pulverização ou coacervados complexos secos por pulverização (MARTINS et al., 2014), sendo que a técnica de spray drying confere estabilidade oxidativa aos óleos (FRASCARELI et al 2012).

A produção de partículas através de secagem por pulverização envolve a formação de uma emulsão contendo material de revestimento e um conteúdo, em seguida é realizada a atomização desta emulsão num compartimento de secagem com circulação de ar quente. O processo de secagem constitui a dispersão de fluído contínuo ou de pulsos sob forma de gotículas, que em contato com uma corrente de ar aquecido, proporciona a transferência de calor e a evaporação do solvente, e subsequente formação da partícula sólida. A eficiência de encapsulação pode ser otimizada pela escolha correta dos parâmetros de secagem por pulverização como as temperaturas de entrada e de saída do ar, temperatura da emulsão, condições de atomização e umidade, sendo desta forma a emulsão suficientemente estável com excelentes condições de viscosidade e tamanho da gotícula (FRASCARELI et al 2012, JAFARI et al., 2008, DE SOUZA et al., 2015).

Devido a sua versatilidade, o spray drying é uma técnica aplicada tanto para a obtenção de pó quanto na microencapsulação de substâncias como, óleos de peixe, óleo essencial de tomilho com intuito de mascarar odores, como também para transformar aromas alimentares líquidos, tais como o óleo de café em pós estáveis, além de ser a técnica tradicionalmente mais utilizada nas

indústrias alimentícia, química, bioquímica e farmacêutica (MARTINS et al 2014, FRASCARELI et al. 2012, BARROW et al. 2009). Neste processo de operação única, o produto líquido é atomizado através secagem com vapor de ar quente para obter-se instantaneamente o pó (Figura 4) (GHARSALLAOUI et al. 2007).

Além disto, serve para evitar evite perdas ou reações indesejáveis do produto com ambiente externo, luz, oxigênio e água, diminuir a perda de água para o ambiente, melhorar manipulação do material através da forma sólida, tornando o produto mais uniforme, liberação controlada, mascarar sabor (PI0705220-0A2, GHARSALLAOUI et al., 2007; SHAHIDI e HAN, 1993) e promover alta estabilidade a ácidos graxos e retardar a oxidação dos produtos (BARROW et al. 2009). A remoção de água através da secagem por pulverização é uma prática comum na engenharia e indústria alimentícia. Com a redução do teor de água e atividade da água, a secagem garante a estabilidade microbiológica dos produtos, evita o risco de degradações químicas e biológicas, reduz os custos de armazenamento e transporte, além de atribuir solubilidade instantânea ao produto final (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Figura 4 – Produto em pó obtido através de técnica de spray drying



Fonte: Ferreira, A. C.M (2018)

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Ferreira, A. C. M<sup>a</sup>; Silva, J. F. X<sup>b</sup>; Cahú, T.B<sup>a</sup>; Silva, J.F<sup>a</sup>, Souza, K.S<sup>a</sup>., Basílio Junior, I. D<sup>c</sup>; Bezerra, R. B<sup>a</sup>; Carvalho Junior, L.B<sup>a</sup>.

##### Resumo

A carcaça de peixe é um dos principais subprodutos da indústria de processamento de peixe. Este subproduto pode ser fonte importante de moléculas bioativas. O presente estudo propõe o processamento integrado dos resíduos da carcaça de tilápia (*Oreochromis niloticus*), peixe mais produzido pela aquicultura brasileira, com vista à obtenção de proteína e lipídios. Para cada quilo de carcaça foram obtidos aproximadamente 1,6 L de hidrolisado proteico de peixe (HPP); 95 g de peso seco (HPPs); 156 g de peso seco de concentrado proteico de peixe (CPPs); 177 g de ossos; 5,3 g de gelatina; 0,2 L de óleo e 100g de gorduras. HPPs e CPPs revelaram conter, respectivamente, 48% e 71% de proteína; 26,1% e 3,2% de extrato etéreo; 2,8% e 3,6% de cinzas e 23,3% e 23% de carboidratos. A análise de gelatina revelou elevado grau de glicina (*c.a* 17%), seguido de prolina (*c.a* 9,4%). Enquanto que os principais ácidos graxos presentes no óleo e gordura foram, respectivamente: ácido oleico – 36,7% e 12,43%; linoleico – 15,4% e 4,2% e palmítico – 20,58% e 15,53%. Estes resultados demonstram que o processo proposto recupera dos resíduos da carcaça da tilápia importantes macromoléculas nutricionais.

##### 1. Introdução

Os organismos marinhos representam uma extensa fonte de compostos naturais e sua extensa biodiversidade aliada a rica diversidade química oceânica, comportam um vasto recurso de novas substâncias ativas aplicáveis ao desenvolvimento de novos produtos bioativos (Vries e Beart, 1995). A indústria pesqueira produz grande quantidade de resíduos e poucas empresas toleram o desperdício, sendo o descarte representante de um percentual significativo das capturas

marítimas mundiais e geralmente considerado como resíduos ou subutilização dos recursos da pesca (Kelleher, 2005; Davies, Cripps, Nickson e Porter, 2009).

O hidrolisado proteico de peixe é um produto obtido da quebra das proteínas do pescado, convertendo-as em peptídeos através da hidrólise enzimática que possui de 2 a 20 aminoácidos (Chalamaiah et al., 2012) e apresenta-se como alternativa aos resíduos do processamento de tilápia (Roslan et al., 2014), sendo composto por proteínas solúveis, lipídeos e aminoácidos (Oetterer, 2006). O HPP possui propriedades como formação de espuma, capacidade de emulsificação, capacidade de ligação de óleo e solubilidade, importantes para formulações alimentares, produtos nutricionais e farmacêuticos (He et al., 2013), além de alta solubilidade em água (Kristinsson e Rasco, 2000).

A produção de gelatina a partir de peixe é uma alternativa à aplicação para os subprodutos das indústrias de beneficiamento de pescados e à gelatina de mamífero (Bougatef et al., 2012; Piacentini et al., 2013). A gelatina é uma proteína fibrosa desnaturada derivada do colágeno que pode ser obtida de partes não comestíveis como peles, ossos, nadadeiras e tecidos cartilagosos (Ahmad e Benjakul, 2011; Oetterer, 2006). A aplicação deste biopolímero abrange desde indústrias farmacêutica à alimentar e de suplemento nutricional (microcápsulas de óleo de peixe, geleia, artigos de confeitaria, filmes comestíveis, laticínios, panificação, clarificação de sucos naturais). Além disto, compreende propriedades funcionais e tecnológicas como a capacidade de ligação de água e gordura, formação e estabilização de espumas e emulsões, formação de gel e filme como barreiras contra a secagem e exposição à luz e ao oxigênio, além de vantagens como biodegradabilidade e biocompatibilidade (Shakila et al., 2012, Barrow et al, 2009; Arvanitoyannis, 2002; Karim e Bhat, 2009).

O óleo de peixe continua a ser a principal fonte de ácidos graxos poli-insaturados com demonstração de elevado nível de Ômega-3 PUFAs por determinadas espécies, trazendo benefícios à saúde humana. O consumo diário do óleo de peixe tem aumentado juntamente com o crescimento do mercado de alimentos funcionais e suplementos nutricionais, sendo consumido na forma líquida, sólida ou microencapsulada (García Moreno et al, 2013; Kolanowski e Laufenberg, 2006).

A microencapsulação consiste no revestimento de um material de núcleo numa matriz envoltória, formando uma barreira que evite perdas ou reações indesejáveis, além mascarar odores, e atribuir propriedades singulares sob o aspecto de liberação controlada, solubilidade e resistência à umidade das micropartículas (Martins et al, 2014, Shahidi e Han, 1993), sendo a gelatina, uma

das proteínas mais utilizada como material de revestimento (Martins et al, 2014). A microencapsulação por técnica de spray drying é operação única e um processo de secagem comercial de baixo custo, utilizado na encapsulação de fragrâncias, óleos e odores. As partículas são formadas através da dispersão de uma emulsão contendo polímero e núcleo que em contato com uma câmara de ar quente secam. Durante o processo, o solvente evapora e o material de parede solidifica envolto as partículas do núcleo. A interação de alguns polímeros confere efeito positivo na proteção de compostos lábeis, compondo uma rede de materiais de parede como polissacarídeos, gomas e proteínas (Ghosh, 2006; Dulmolin e Bimbenet, 1998). A secagem por spray drying tem sido relatada como técnica que propicia uma maior estabilidade do produto em hidrolisados proteicos de peixe e camarão (Morales-Medina et al. 2016; Bueno-Solano et al., 2009, Abdul-Hamid et al., 2002).

O reaproveitamento dos resíduos pesqueiros através de um processo pode ser realizado para obter todas as biomoléculas inerentes ao pescado ou adaptado conforme a busca de um biomaterial particular requerido (Cahú et al., 2012).

O presente estudo descreve a recuperação de proteínas e lipídeos dos resíduos do processamento de tilápia através de um único processo integrado no qual promove a elaboração de novos produtos (micropartículas) e caracteriza as proteínas e lipídeos obtidos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Materiais**

Resíduos (cabeças, restos de músculos, pele e ossos) de tilápia foram gentilmente doados pela Noronha Pescados Ltda. (Pernambuco, Brasil). O material foi acondicionado a 4°C e transportado ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ) do Departamento de Bioquímica da UFPE e armazenado -22 °C até o uso. Alcalase® foi adquirida da Sigma Chem. Co. (Massachusetts, Estados Unidos; Prod Code P4860)

## **2.2. Hidrolisado Proteico de Peixe**

O hidrolisado proteico de peixe foi produzido mediante procedimento descrito por Silva et al., (2014), consistindo em: alcalase (Alcalase® Prod Code P4860) a 0,5% (m/v), foi adicionada aos resíduos na proporção de 1/1 e triturados em liquidificador industrial (25lts, LSMB-25 220v, siensem) por 5 minutos. A mistura resultante foi incubada a 45 °C em banho maria (TE 056mag tecnal) por 180 min sob agitação em homogeneizador (IKA RW 20digital) 250 rpm, após os quais a temperatura foi elevada a 100° C por 10 min para interromper a reação enzimática. As frações de sólidos (ossos) e líquidos foram separadas por filtração (malha: 1 mm<sup>2</sup>); o filtrado definido como Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP) e o precipitado utilizado na obtenção da gelatina (item 2.5.).

## **2.3. Concentrado proteico de peixe**

Os lipídeos do HPP foram extraídos por separação mecânica através de uma desnatadeira 9 Gr 50 L/h. O sobrenadante denominado Concentrado Proteico de Peixe (CPP) foi acondicionado em vidros estéreis autoclavados e armazenados em freezer sob temperatura de -26 °C para posterior secagem. Obteve-se uma fração líquida (óleo) e sólida (gordura).

## **2.4 Composição de ácidos graxos do óleo e gordura**

O teor de ácidos graxos (AOAC, 2005, método 996.06) foi realizado através de hidrólise ácida das amostras com HCl em etanol num banho quente (70-80 °C) durante 40 min e depois extraídas com uma solução de éter etílico e éter de petróleo (1: 1). O solvente foi removido e o conteúdo metilado para ser em seguida analisado por GC-FID. Os resultados foram convertidos para base MS (matéria seca).

## 2.5. Obtenção da gelatina

Os ossos (100g) obtidos no item 2.2. foram lavados com água destilada para remoção de impurezas. A obtenção da gelatina foi realizada a partir do colágeno dos ossos com solução de 1:10 (p/v) (G10) e 1:3 (p/v) (G3). Os ossos inicialmente foram tratados com uma solução de 0,2 M EDTA a 22 °C, sob agitação constante, durante 18 h para remoção de minerais e de íons cálcio. Posteriormente, os ossos foram tratados com 0,2 M NaOH a 22 °C, sob agitação constante, durante 3 h com duas trocas de solução (p/v), para remoção das proteínas solúveis e pigmentos. Os ossos então foram lavados com água destilada até obter-se o pH de 7,0. Decorrido este processo, a amostra foi tratada com ácido acético 0,05 M durante 3 horas a 22 °C com duas trocas de solução (p/v) e em seguida lavados com H<sub>2</sub>O destilada até pH 7,0. Para a extração propriamente dita da gelatina, a amostra tratada foi imersa em água destilada sob homogeneização constante à 50 °C durante 24 horas para a obtenção do material gelatinoso final. A gelatina obtida ao fim do processo foi filtrada, congelada a -70 °C e liofilizada.

## 2.6 Composição de aminoácidos da gelatina

Para determinação dos aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais (White et al., 1986, pp. 170-177, Hagen et al., 1989, pp. 912-916), as amostras foram hidrolisadas em solução de HCl 6 M / fenol durante 24 h para obter aminoácidos livres, após derivatização com phenyl isothiocyanate (PITC), separados por HPLC de fase reversa e detectados por UV a 254 nm. Os resultados foram convertidos para base de matéria seca.

## 2.7 Secagem por spray drying do CPP e HPP

O CPP e HPP foram transportados para Universidade Federal de Alagoas, onde foram secos por spray dryer (Buchi Mini spray dryer B-290), para obtenção das micropartículas. Para a microencapsulação do CPP foram preparadas emulsões em diferentes percentuais de material de parede com maltodextrina comercial, goma arábica e gelatina bovina comercial (Gelita) para

subsequente secagem por pulverização. A formulação foi realizada e as emulsões homogeneizadas em agitador magnético (Biomega/H4000-S) a 12.000 rpm durante 15 min. Após secagem, os produtos, concentrado proteico de peixe seco (CPPs) e hidrolisado proteico de peixe seco (HPPs) foram coletados e pesados para determinar o seu rendimento. Uma amostra (1g) foi coletada em triplicata para realização do teor de umidade em analisador de umidade (MOC 63u). Posteriormente o material foi armazenado em vidros estéreis sob temperatura ambiente e ausência de luz para posteriores análises.

## **2.8 Composição química dos CPPs e HPPs**

O teor de umidade (AOAC, 1996, método 926.12) foi realizado através da pesagem de 5 g de amostra preparadas e secas a peso constante em forno a vácuo sob temperatura uniforme 20 - 25 °C acima do ponto de ebulição de H<sub>2</sub>O sob pressão de trabalho e arrefecido em dessecador eficiente por 30 min. O peso constante é atingido após 1 hora de secagem sucessiva. A proteína bruta (AOAC, 1995a, método 991.20) foi medida pelo método de Kjeldhal e 6,25 como fator de conversão da N-proteína. O teor de extrato etéreo (U.K. FEEDING STUFFS, 1982, pp. 9-11), foi obtido a partir da extração da amostra com éter de petróleo e secos durante 3 - 4 horas. O conteúdo foi moído finamente, e o material foi novamente extraído durante mais uma hora. Após evaporação do solvente, o óleo foi seco a 100 °C e pesado. As cinzas (AOAC, 1995b, método 920,39) foram determinadas através de secagem do material num forno de mufla ajustado a 550 ° C durante 24 h.

## **3.Resultados e Discussão**

### **3.1 Obtenção de outros produtos a partir da carcaça de tilápia**

A figura 1 contém um fluxograma que representa o processo utilizado para obter produtos (hidrolisado proteico de peixe, concentrado proteico de peixe, hidrolisado proteico de peixe seco, concentrado proteico de peixe seco, gelatina) e recuperar biomoléculas (lipídeos, proteínas) dos resíduos do processamento de tilápia. O hidrolisado proteico de peixe, uma mistura complexa de proteínas e lipídeos foi produzido a partir da carcaça da tilápia e a fase líquida foi submetida a extração lipídica, produzindo um produto com um elevado teor de proteína (concentrado proteico

de peixe) enquanto que a fase sólida, ossos, foi separada para produção da gelatina. A gelatina foi obtida por extração, após desmineralização dos ossos, desproteínização e cozimento a 50 °C. Os lipídeos (óleo e gordura) foram extraídos através de separação mecânica a partir do HPP produzido. O CPPs e o HPPs foram produzidos a partir da secagem do HPP e CPP através de técnica de spray drying com temperatura de entrada de 200–220 °C. Vários métodos são utilizados na produção de hidrolisados proteicos, concentrados proteico, extração de óleo e colágeno sob a forma de gelatina derivados da tilápia (Menegazzo et al 2014, Silva et al 2014, Foh et al. 2012, Jamilah et al. 2011).

Os rendimentos dos produtos elaborados, além dos ossos encontram-se expressos na tabela 1. No final do processo, os seguintes produtos foram obtidos a partir de 1 kg de resíduos de processamento de carcaça de tilápia (peso úmido) e foram utilizados para produção de novos produtos: ossos (176,71), gelatina G3 (2,12), gelatina G10 (5,31), óleo (0,197), gordura (99,19), um hidrolisado proteico (1,58 L), hidrolisado proteico de peixe seco (94,87), concentrado proteico de peixe seco (156,04). Este processo demonstrou ser adequado e eficiente na recuperação de biomoléculas de resíduos de carcaça de tilápia. Outros autores, Cahú et al. (2012), Silva et al (2014), Silva et al (2017) obtiveram eficiência na recuperação de biomoléculas a partir dos resíduos do processamento da indústria pesqueira e na produção de hidrolisado proteico do pescado.

A recuperação de colágeno sob forma de gelatina, a partir de ossos dos resíduos da tilápia foi realizada com êxito neste trabalho e os aminoácidos estavam presentes que sugere que a composição química do colágeno tipo I foi preservada durante a extração. Jamilah e Harvinder, (2002), encontraram o mesmo padrão de distribuição de aminoácidos nos colágenos isolados da pele de tilápia preta e vermelha. As etapas de extração foram feitas com agitação contínua a 150 rpm e temperatura de 22 °C. Alguns autores relataram a extração desta biomolécula a partir dos ossos de peixes (Akagündüz et al 2014, Shakila et al. 2012, Koli et al. 2012, Muyonga et al. 2004). No entanto, estudos a respeito da produção de gelatina a partir espécie *Oreochromis niloticus* ainda são escassos.

A recuperação dos lipídeos foi realizada por separação mecânica, através do desnate do hidrolisado proteico de peixe. Os produtos (óleo e gordura) obtidos não demandaram de processo de refino e foram classificados através do teor de ácidos graxos. Menegazzo et al (2014) utilizaram métodos físico-químicos e refinamento químico para a obtenção de óleos a partir de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo.

A produção de HPP seco e CPP seco foi realizada através de técnica de spray drying e utilizou de maltodextrina comercial, goma arábica em pó pura e gelatina bovina comercial (Gelita) na formulação das emulsões. Gharsallaoui et al. (2007), relataram maltodextrina, goma arábica e gelatina, são substâncias adequadas para microencapsulação, pelo fato de possuírem a propriedade de proteção da substância ativa contra oxidação e deterioração. A secagem por pulverização foi utilizada para manter uma maior estabilidade química em hidrolisados proteicos de peixe e camarão (Bueno-Solano et al., 2009, Abdul-Hamid et al., 2002). Diferentes temperaturas de entrada e saída são relatadas na secagem de produtos por spray dryer. Abdul-Hamid et al. (2002) observaram diferenças significativas na composição química dos hidrolisados de tilápia secos em diferentes temperaturas.

Figura 1: Processo para a utilização de resíduos de carcaça de tilápia *Oreochromis niloticus*.

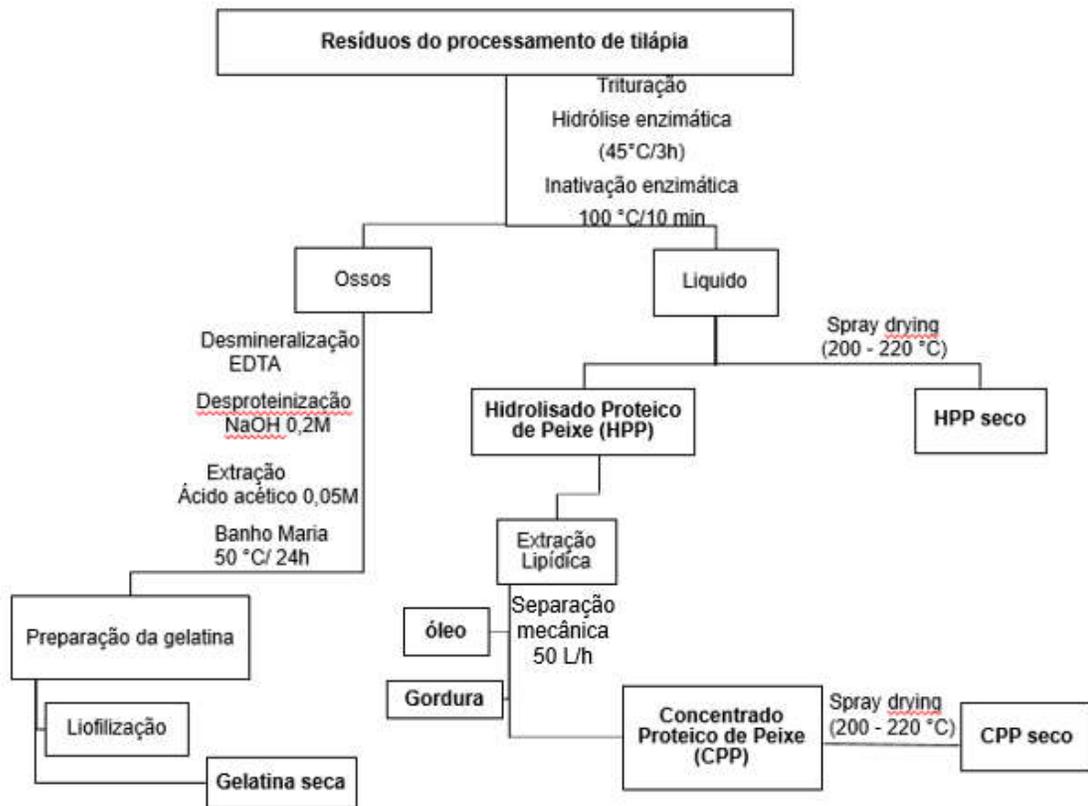


Tabela 1: Rendimento de biomoléculas isoladas a partir de 1,0kg (MS<sup>ab</sup> n = 3) de resíduo de tilápia.

Produtos	Rendimento (g)	Propriedades
Ossos	159.02 ± 4.013	Fonte de colágeno para produção de gelatina (Khiari et al., 2013; Shakila et al., 2012)
Gelatina 3	2.223 ± 0.175	Material de parede para microencapsulação de óleo (Piacentini et al., 2013; Barrow et al., 2009)
Gelatina 10	5.46 ± 0.706	Material de parede para microencapsulação de óleo (Piacentini et al., 2013; Barrow et al., 2009)
Óleo	205.76 ± 3.337	Fonte de ácidos graxos poliinsaturados e ômega 3 (García Moreno et al, 2013, Kolanowski and Laufenberg, 2006)
Gordura	37.54 ± 4.36	Fonte de ácidos graxos poliinsaturados
Hidrolisado Proteico de Peixe seco (HPPs)	115.11 ± 11.19	Alto teor de proteína e ácidos graxos poliinsaturados
Concentrado de Proteico de Peixe seco (CPPs)	162.34 ± 15.22	Alto teor de proteína e ácidos graxos poliinsaturados

<sup>a</sup> Base de peso seco

<sup>b</sup> A partir de 1.0 kg de peso úmido da carcaça de tilápia.

### 3.3 Composição de aminoácidos da gelatina

O percentual de ácido aspártico encontrados por Jamilah e Harvinder, (2002), em seus estudos com gelatina de pele de tilápia vermelha (*Oreochromis nilotica*) e tilápia preta (*Oreochromis mossambicus*) foi inferior (3,8% e 3,9%) aos da gelatina de ossos de tilápia *Oreochromis niloticus* (4,14%) desse trabalho, no entanto os valores de ácido glutâmico foram similares 7,1 e 7,6 % em tilápia vermelha e tilápia preta, respectivamente. O aminoácido mais abundante em gelatinas é a glicina (Khiari *et al.*, 2013). O teor de glicina (17,24%) foi superior aos encontrados por Khiari *et al.*, (2013) que relataram redução de 50% nos teores de glicina de gelatinas de ossos de cavala *S. scombrus* extraídas por pré-tratamento enzimático (Alcalase) (11,4%) e (Flavozyme) (11,6%), comparadas as pré-tratadas quimicamente (NaOH) (21,3%). Por outro lado, Akagündüz et al (2014), obtiveram valores de glicina de aproximadamente 34% em

ossos da espécie dourada (sea breams) submetida a hidrólise com alcalase (0,1%) para remoção dos tecidos musculares. O teor de glicina foi inferior aos descritos em gelatina de pele de *Oreochromis nilotica* e *Oreochromis mossambicus* (30,8 e 33,8%; Jamilah e Harvinder, 2002) e em gelatina de pele de tilápia vermelha (19,7%; Jamilah et al., 2011).

Contudo, para os aminoácidos essenciais foram relatados níveis similares (tabela 2) de metionina (1,4 e 1,7%), valina (1,7 e 2,2%) e lisina (2,1 e 2,8%) em gelatina de pele *Oreochromis nilotica* e *Oreochromis mossambicus* (Jamilah e Harvinder, 2002), respectivamente. Outros autores, Akagündüz et al (2014), encontraram teores de 1,4%(Met); 1,8% (Val) e 2,5%(Lis), semelhantes aos apresentados. Os aminoácidos lisina e valina (0,8 e 1,5%) foram reportados em menor percentual na gelatina de tilápia vermelha (Jamilah et al., 2011). Khiari *et al.* (2013) obtiveram percentuais de metionina (2,6 e 2,5%) e valina (4 e 2,5%) em gelatinas ósseas de cavala *S. scombrus* e verdelho *M. poutassou*, respectivamente. A concentração molar e o tipo de tratamento (químico, enzimático) utilizado, assim como a extração como uso de alcalase pode comprometer o nível de aminoácidos disponíveis na gelatina. Khiari et al. (2013) relata que a presença de aminoácidos hidrofóbicos demonstra efeito benéfico sobre as propriedades funcionais das gelatinas. O aminoácido alanina (6,86%) da gelatina óssea de tilápia foi similar a gelatina de ossos de cavala *S. scombrus* pré-tratadas com alcalase (Khiari *et al.*, 2013).

A matéria-prima e o tratamento utilizados na extração são variáveis importantes que interferem nas propriedades funcionais, composição e no peso molecular das gelatinas (Khiari *et al.*, 2013; Muyonga et al. 2004). A hidrólise do colágeno e obtenção da gelatina a partir da pele requer tratamento térmico mais brando se comparada aos ossos (Muyonga et al. 2004).

A presença de Cistina, derivada da Cisteína, foi detectada na gelatina óssea de tilápia. A presença de cisteína na gelatina pode ocorrer por contaminação de uma pequena porção de outras proteínas presentes nos ossos e nas escamas, além de ser comum nos hidrolisados proteicos de peixe (Akagündüz et al. 2014, Chalamaiah et al., 2012). Os peptídeos possuem função antioxidante e aminoácidos como a histidina, tirosina, leucina, glicina, alanina, arginina, ácido glutâmico (Bougatef et al., 2010) e leucina, alanina, prolina e ácido aspártico (Ngo et al., 2010) foram identificados com alta atividade na eliminação de radicais. Hongsprabhas et al. (2011) relata que os aminoácidos cisteína e metionina podem aumentar a imunidade, através da conversão intracelular para a glutatona. Várias proteínas que possuem funções de transporte de oxigênio,

vitaminas, CO<sub>2</sub>, enzimas e proteínas estruturais são sintetizadas por aminoácidos (Chalamaiah et al., 2012).

Tabela 2. Composição dos aminoácidos da gelatina extraída dos ossos de tilápia

Aminoácidos (%)	Gelatina
<b><i>Não essencial</i></b>	
Ácido Aspártico	4,14
Ácido Glutâmico	7,05
Serina	2,71
Glicina	17,24
Arginina	6,23
Alanina	6,86
Prolina	9,40
Tirosina	0,43
<b><i>Essencial</i></b>	
Valina	1,36
Metionina	1,03
Histidina	0,62
Cistina	0,35
Isoleucina	0,81
Treonina	1,88
Leucina	2,02
Fenilalanina	1,46
Lisina	2,53

### 3.4 Composição de ácidos graxos do óleo e gordura do HPP

A composição de ácidos graxos está apresentada na tabela 1. Os ácidos linoleicos e oleicos representam o maior percentual presentes no óleo e gordura extraídos do HPP. Foram verificados teores de ômega 3, 6 e 9 nas amostras. Gallardo et al (2013) relataram que os ácidos graxos ômega 3 mais importantes são o ácido alfa-linolênico (ALA, C18: 3), ácido eicosapentaenóico (EPA, C20: 5) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6), presentes em óleo de peixes.

Os conteúdos de ácidos graxos saturados do óleo e gordura foram 29,94 e 23,60 g/100g respectivamente, e apresentaram-se predominantemente o ácido mirístico (C14: 0) 20,3 g / kg (óleo), 15,6 g / kg (gordura), ácido esteárico (C18:0), 57,5g/kg (óleo), 55,8 g/kg (óleo) e palmítico (C16: 0), 205,8 g/kg (óleo), 155,3g/kg (gordura). Estes resultados foram superiores aos apresentados por Silva et al (2014) que obtiveram valores 19,0 g/kg (C14: 0), 115,0 g/kg (C16: 0), 24,0 g/kg (C18:0) em HPP de tilápia. No entanto, Menegazzo et al (2014) obtiveram níveis de 26,9 g / kg, 70g/kg, 216g/kg em ácido mirístico, ácido esteárico e palmítico, respectivamente em óleo refinado obtido da carne mecanicamente separada de tilápia, sendo superiores aos encontrados neste trabalho.

Os ácidos graxos monoinsaturados estavam presentes no óleo (481,3 g / kg) e gordura (152,2 g / kg) e eram predominantemente ácidos oleicos (C18: 1n-9c), 396,9 g / kg (óleo) 124,3 g / kg (gordura), e palmitoleicos (C16: 1), 58,8 g / kg (óleo), 174 g / kg (gordura). O ácido erúcico (C22: 1n9) foi identificado com 0,9g/kg e 0,5g/kg no óleo e gordura, respectivamente. Contudo, este ácido graxo não foi encontrado por Silva et al (2014) em hidrolisado de tilápia.

Os conteúdos de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de óleo e gordura foram 214, 7 e 59,5 g / kg, com predominância de ácido linoleico (C18: 2n-6), 154,0 g / kg (óleo), 42,3 g / kg (gordura), e gama-linolênico-GLA (C18: 3n6), 12,1 g / kg (óleo) e 2,7 g / kg (gordura). Além disso, foi encontrado ômega-3 com valores de 18,8g / kg (óleo), 5,0 g / kg (gordura), ômega-6, 186,9 g / kg (óleo), 51,1 g / kg (gordura) e ômega-9, 420,8 g / kg (óleo), 134,5 g / kg (gordura). Os PUFAs ômega 3 e 6 são essências no desenvolvimento do cérebro e memória infantil, sendo o ácido araquidônico (ARA), DHA e EPA importantes para funções cognitivas e visuais na infância (Ryan et al., 2010). Os benefícios à saúde associados ao grupo ômega 3 são relacionados à prevenção de doença cardiovascular (Beltrán, 2010) e ao desenvolvimento da função cerebral e sistemas vasculares (Crawford et al., 2003).

García-Moreno et al (2013) descreveram cinco espécies de peixes de descarte axillary seabream (*Pagellus acarne*), small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*), sardine (*Sardina pilchardus*), horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) e bogue (*Boops boops*) como fonte de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos polinsaturados ômega-3. O óleo de tilápia exibiu níveis elevados (10,4 g / kg) de ácido alfa linolenico LNA (C18:3n3), ácido pertencente ao grupo ômega-3. Resultados inferiores foram relatados na literatura em óleo bruto (0,9 g / kg) e refinado (1,2 g / kg) de tilápia (Menegazzo et al. 2014).

Tabela 3: Composição de ácidos graxos do óleo e gordura extraídos dos resíduos de tilápia.

Ácidos Graxos	Óleo	Gordura
Ácido Butírico (C4:0)	0,09	-
Ácido Capróico (C6: 0)	0,01	-
Ácido caprílico (C8:0)	0,01	-
Ácido Mirístico (C14:0)	2,63	1,56
Ácido Cáprico( C10:0)	0,03	0,01
Ácido Láurico (C12 : 0)	0,06	0,03
Ácido Miristoleico (C14:1)	0,26	0,08
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,15	0,10
Ácido Palmítico (C16:0)	20,58	15,53
Ácido Palmitoleico (C16:1)	5,88	1,74
Ácido Margárico (C17:0)	0,26	0,22
Ácido Esteárico (C18:0)	5,75	5,58
Ácido Elaidico (C18:1n9t)	0,04	0,08
Ácido Oleico (C18:1n9c)	39,69	12,43
Ácido Linoleico (C18:2n6c)	15,40	4,23
Ácido Gama-Linolênico GLA (C18:3n6)	1,21	0,27
Ácido Alfa Linolenico LNA (C18:3n3)	1,04	0,27
Ácido Araquídico (C20:0)	0,25	0,26
Ácido Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	2,21	0,84
Ácido cis-11,14- Eicosadienóico (C20:2)	0,77	0,27
Ácido Heneicosenóico (C 21: 0)	0,04	0,04
Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienóico (C20:3n6)	0,95	0,26
Ácido Araquidônico AA (C20:4n6)	1,13	0,35
Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienóico	0,16	0,05
Ácido Behenico (C22:0)	0,10	0,09
Ácido Erúxico (C22:1n9)	0,09	0,05
Ácido 5,8,11,14,17- EPA (C20:5n3)	0,06	0,02
Ácido Tricosanóico (C23:0)	0,03	0,02
Ácido cis-13,16-Docosadienóico(C22:2)	0,04	0,02
Ácido Lignocérico (C24:0)	0,06	0,05
Ácido Nervonico (C24:1n9)	0,05	0,04
Ácido Docosahexaenóico DHA(C22:6n3)	0,62	0,16
Gordura Monoinsaturada	48,13	15,22
Gordura Poli-insaturada	21,47	5,95
Gorduras Insaturadas	69,59	21,17
Gorduras Saturadas	29,94	23,60
Gorduras trans	0,04	0,08
Extrato etéreo	99,53	44,77
Ômega 3	1,88	0,5
Ômega 6	18,69	5,11
Ômega 9	42,08	13,45

### 3.5 Composição química dos CPPs e HPPs

HPPs e CPPs apresentaram teor de umidade de 0,52% e 3,25%, respectivamente. Resultados similares (3,93 e 1,58%) foram descritos por Abdul-Hamid et al. (2002) em hidrolisado de tilápia preta em pó. O CPPs e HPPs apresentaram elevado teor de proteína (70,22 e 47,8 g/ 100g) e baixo teor de cinzas (3,60 e 2,82 g/ 100g). Silva, J. (2014) reportaram nível intermediário de proteína bruta (58,48 g/ 100g) e similares de cinzas (2,67 g/ 100g) em HPP de tilápia. No entanto, outros autores revelaram teor de proteína inferior (37,7 g/ 100g) e elevado teor de cinzas (8,56 g/100g) (Abdul-Hamid et al., 2002). Valores similares de cinzas foram descritos por outros autores em concentrados proteicos de tilápia (Foh et al. (2012). Conforme Cho et al. (1985), a boa qualidade da dieta para os organismos aquáticos deve conter teor de cinzas inferior a 13%. Os baixos percentuais de matéria mineral exibidos no HPPs e CPPs no presente trabalho sugerem que estes sejam excelentes ingredientes substitutos a farinha de peixe na alimentação de organismos aquáticos.

No que diz respeito ao teor de carboidratos, os valores de 23,28 g/100g (HPPs) e 22,98 g/100g (CPPs) podem ser explicados pela presença do material de parede utilizado na formulação das emulsões preparadas para microencapsulação. Abdul-Hamid et al. (2002) apresentaram níveis de carboidratos (35,0 e 49,6 g/100g) superiores aos CPPs e HPPs. Estes dados diferem daqueles publicados por outros autores (Silva et al. 2014; Morales-Medina et al., 2016) que não encontraram carboidratos na composição química de hidrolisados proteicos de peixe.

O teor lipídico foi apresentado com notável diferença entre o CPPs (3,20 g/ 100g) e HPPs (26,06g / 100g) devido a extração lipídica realizada na produção do concentrado proteico de peixe. Os benefícios a saúde humana, associados ao consumo de ácidos graxos ômega-3, tendo o óleo de peixe como fonte, têm sido reportados por alguns autores (Gallardo et al., 2013; Kolanowski e Laufenberg, 2006). O HPP é fonte de lipídeos ricos em ácidos graxos polinsaturados interessantes a suplementação alimentar. Um alto teor de lipídeos foi observado no HPPs, da mesma forma que os observados na literatura (Silva et al., 2014). No entanto, o nível de extrato etéreo do CPPs foi similar aos obtidos em hidrolisado proteico de tilápia em pó (Abdul-Hamid et al. 2002).

Tabela 4. Composição centesimal (g/100g).

Produtos	Umidade	Proteína	Extrato etéreo	Cinzas	Carboidratos
HPPs	0,52	47,84	26,06	2,82	23,28
CPPs	3,25	70,22	3,20	3,60	22,98

#### 4. Conclusão

A recuperação de biomoléculas ativas dos resíduos do processamento industrial da tilápia pode servir na produção de produtos de alto valor proteico e lipídico. O FPHd apresentou teor de proteína de 70%, enquanto que o FPCd demonstrou elevado percentual proteico e lipídico. As gelatinas ósseas (G1 e G3) apresentaram padrão de aminoácidos relevantes e essenciais à suplementação e formulações alimentares. O óleo exibiu alto teor de PUFA's ômega 3 e 6, assim como ácido oleico e linoleico. Estes produtos são rica fonte de aminoácidos e ácidos graxos poliinsaturados benéficos a saúde humana e podem ser utilizados como potenciais ingredientes na indústria farmacêutica, alimentar e nutracêuticos.

#### 5. Referências

- Abdul-Hamid, A.; Bakar, J.; Bee, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry*, 2002. 78, 69–74.
- Ahmad, M. e Benjakul, S. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25, p. 381-388, 2011.
- Akagündüz, Y.; Mosquera, M.; Giménez, B.; Alemán, A.; Pilar Montero, Gómez-Guillén, M. C. Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides . *LWT - Food Science and Technology*, 2014, v:55 p. 579 -585
- Arvanitoyannis, I. S. Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In: A. Gennadios (Ed.), *Protein-based films and coatings*. p. 275-304, 2002.
- Association of Official Analytical Chemists, 1995a. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 991.20)*, 33. A.O.A.C., Arlington, pp. 10–12.
- Association of Official Analytical Chemists, 1995b. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 920.39, C)*. A.O.A.C., Arlington, pp. 10–12.
- Association of Official Analytical Chemists, 1996. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 926.12)*, 33. A.O.A.C., Arlington, pp. 5.

- Barrow, C. J.; Nolan, C. Holub, B. J. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *Journal of functional foods* I, 2009. 1, 38-43.
- Bougatef, A.; Balti, R.; Sila, A.; Nasri, R.; Graiaa, G.; Nasri, M. Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*Mustelus mustelus*) skin gelatin LWT – Food Science and Technology, 2012, 48, p. 248-254.
- Bueno-Solano, C., Lopez-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O.N., Lauterio-Garcia, R., Adan-Bante, N.P., Sanchez-Machado, D.I. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112, 671–675.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559–565.
- Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho Jr., L. B., Nader, H. B., Bezerra, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47, p. 570–577, 2012.
- Chalamaiah, M.; Dinesh kumar, B.; Hemalatha, R.; Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135, 3020–3038
- Cho, C. Y.; Cowey, C. B.; Watanabe, T. *Finfish nutrition in Asia: Methodological approaches to research and development*. International Development Research Center, p. 154, 1985.
- De Vries D. J., Beart, P. M. (1995). Fishing for drugs from the sea: status and strategies. *Trends Pharmacol Sci.* 16, 275–279.
- Davies, R. W. D., Cripps, S. J., Nickson, A., & Porter, G. Defining and estimating global marine fisheries bycatch. *Marine Policy*, 2009. 33(4), 661–672.
- Dumoulin, E.; Bimbenet, J. J. Spray drying and quality changes. In: REID, D. S. *The Properties of water in foods ISOPOW 6*. Blackie Academic & Professional, London, 1998. p. R209-R232.
- Foh, M.B.K.; Wenshui, X.; Amadou, I.; Jiang, Q. (2012). Influence of pH Shift on Functional Properties of Protein Isolated of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscles and of Soy Protein Isolate. *Food Bioprocess Technol*, 5, 2192–2200.
- Forster, I. P.; Dominy, W. G. Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 37, n. 4, p. 474–480, 2006.
- Gallardo, G.; Guida, L.; Martinez, V.; López, M, C.; Bernhardt, D.; Blasco, R.; Pedroza-Islas, R.; Hermida, L, G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. (2013) *Food Research International* ,52, 473–482
- García Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Morales-Medina, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. Discarded species in the west Mediterranean sea as sources of omega-3 PUFA. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2013. 115(9), 982–989.

- Gharsallaoui, A.; Roudout, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, Barking, v. 40, n 9, p. 1107-1121, nov. 2007.
- Ghosh, S. K. Functional coatings and microencapsulation: A general perspective, in: Swapan Kumar Ghosh (Ed.) *Functional Coatings*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. pp. 1–28.
- Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (6), 912–916.
- He, S., Franco, C., Zhang, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, v. 50, p. 289–297. 2013.
- Hongsprabhas, P., Kerdchouay, P., Sakulsom, P. Lowering the Maillard reaction products (MRPs) in heated whey protein products and their cytotoxicity in human cell models by whey protein hydrolysate. *Food Research International*, 44, 748–754, 2011.
- Jamilah, B.; Tan, K.W.; Umi Hartina, M.R.; Azizah, A. (2011). Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids*, 25, 1256-1260.
- Jamilah, B. e Harvinder, K.G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, v. 77, 81–84.
- Karim, A.; Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, p. 563–576
- Kelleher, K. Discards in the world’s marine fisheries: An update. *FAO Fisheries Technical Paper*, 2005.
- Khiari, Z.; Rico, D.; Martin-Diana, A. B.; Barry-Ryan, C. 2013. Comparison between gelatines extracted from mackerel and blue whiting bones after different pre-treatments. *Food Chemistry* 139, p. 347–354.
- Kolanowski, W. e Laufenberg, G. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222, p. 472–477, 2006.
- Koli, J.M., Basu, S., Nayak, B.B., Patange, S.B., Pagarkar, A.U., Gudipati, V. Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). (2012). *Food and bioproducts processing*, 90, 555–562.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, p. 131-139, 2000.
- Martins, I. M., Barreiro, M.F., Coelho, M., Rodrigues, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191–200, 2014.
- Menegazzo, M, L., Petenuci, M, E., Fonseca, G, G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing *Food Chemistry*. 157 (2014) 100–104

- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., Drusch, S. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, 2016. 194, 1208–1216.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatine. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 581e592.
- Ngo, D-H., Qian, Z-H, Ryu, B., Park, J.W., Kim, S-K. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of functional foods* 2, 107 -117, 2010.
- Oetterer, M., Regitano-D'arce, M.A.B., Spoto, M.H.F. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Manole, 612p, 2006.
- Piacentini, E., Giorno, L., Dragosavac, M.M., Vladisavljević, G.T., Holdich, R, G. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification, *Food Research International*, 2013. 53, p. 362–372.
- Sardar, P., Abid, M., Randhawa, H.S., Prabhakar, S.K. Effect of dietary lysine and methionine supplementation on growth, nutrient utilization, carcass compositions and haemato-biochemical status in Indian Major Carp, Rohu (*Labeo rohita* H.) fed soy protein-based diet. *Aquaculture Nutrition*, v. 15, n. 4, p. 339–346, 2009.
- Shahidi, F., Han, X. Encapsulation of food ingredients. (1993). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 501-547.
- Shakila, R. J., Jeevithan, E., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., Sukumar, D. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT-Food Science and Technology*, 2012. 48 (1), 30-36.
- Silva, C.P., Bezerra, R, S., Santos, A.C. O., Messias, J.B., Castro, C.R.O.B., Carvalho Jr., L. B. (2017). Biological value of shrimp protein hydrolysate by-product produced by autolysis, *LWT - Food Science and Technology*, 80, 456-461.
- Silva, J.F.X.; Ribeiro, K.; Silva, J.F.; Cahú, T.B.; Bezerra, R.S. (2014). Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 96-106.
- White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C., 1986. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *J. Autom. Chem.* 8 (4), 170-177.
- U.K. FEEDING STUFFS (SAMPLE AND ANALYSIS) REGULATIONS, 1982. The Determination of Oil in Feeding Stuffs, 1119, I, 9-11.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E FUNCIONAL DE MICROPARTÍCULAS DE GELATINA INCORPORADA COM CONCENTRADO PROTEICO DE PEIXE OBTIDAS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS*

Ferreira, A. C. M.<sup>a</sup>; Silva, J. F. X.<sup>b</sup>; Cahú, T.B.<sup>a</sup>; Nascimento, R.M.<sup>a</sup>, Silva, V. C.<sup>c</sup>, Silva, R. P. F.<sup>a</sup>, Basílio Junior, I. D.<sup>c</sup>; Bezerra, R.<sup>a</sup>; Carvalho Junior, L.B.<sup>a</sup>.

#### **Resumo**

A gelatina foi extraída a partir dos ossos da carcaça de tilápia *Oreochromis niloticus* após pré-tratamento enzimático e ácido acético. As gelatinas foram produzidas em duas concentrações (G3 e G10). O teor de proteína encontrados nas gelatinas G10 e G3 foram 78,7% e 72,9%, respectivamente. A análise de gelatina revelou elevado grau de glicina (*c.a* 17%), seguido de prolina (*c.a* 9,4%). Dentre os aminoácidos essenciais foram encontrados: metionina (1,03 %), valina (1,36 %), lisina (2,53%) e leucina (2,02%). As gelatinas G10 e G3 apresentaram luminosidade L\* (89,7 e 91,7), respectivamente. Os padrões de cor amarelo (b\*) e verde (a\*) foram evidenciados nas gelatinas. A gelatina foi utilizada na microencapsulação do concentrado proteico de peixe através de técnica de spray drying e obteve-se o produto seco (CPGT). O CPGT não sofreu oxidação lipídica e contaminação microbiológica durante o armazenamento. A microscopia eletrônica de varredura revelou micropartículas esféricas com superfícies lisas e poucos encolhimentos. O tamanho das partículas dos CPGT variou entre entre 10 e 33 µm.

**Palavras chave: ossos, gelatina de peixe, microencapsulação, hidrolisado proteico de peixe, spray drying**

#### **1. Introdução**

O filé é o principal produto para comercialização no processamento industrial da tilápia, e os resíduos (restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras) constituem de cerca de 70% da matéria-prima descartada (Silva et. al., 2014; Boscolo et al., 2005). Dentre os produtos que podem ser obtidos do reaproveitamento dos resíduos de pescado destacam-se os hidrolisados proteicos, produto resultante da conversão de proteínas a peptídeos e a gelatina derivada do

colágeno. O HPP é composto por proteínas solúveis, lipídeos e aminoácidos (Oetterer, 2006) e possui propriedades físico-químicas como formação de espuma, capacidade de emulsificação, capacidade de ligação de óleo e solubilidade, importantes para formulações alimentares, produtos nutricionais e farmacêuticos (He et al., 2013). O colágeno é o principal constituinte da pele de animais, ossos e tecido conjuntivo e contém em sua estrutura três cadeias alfa entrelaçadas, denominada tripla hélice de colágeno que é estabilizada pelas pontes de hidrogênio (Karim e Bhat, 2009). O tratamento térmico cliva as pontes de hidrogênio que estabiliza a estrutura da tripla hélice e converte a conformação helicoidal em espiralada resultando em gelatina (Djabourov et al., 1993).

A gelatina é um biopolímero amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, alimentar e de suplemento nutricional para aumentar os níveis de proteína. A gelatina de peixe possui diversas aplicações e características como formação e estabilização de espumas, formação de gel, capacidade de ligação de água e gordura, formação e estabilização de emulsões, filmes, espessantes, gelificantes, hidrogéis, materiais de embalagem biodegradáveis, agentes microencapsulantes e na indústria farmacêutica na fabricação de cápsulas duras e moles (Shakila et al. 2012; Gómez-Guillén et al. 2011; Karim e Bhat, 2009). Esta proteína é derivada do colágeno, obtida de partes não comestíveis como peles, ossos, nadadeiras, bexiga natatória e barbatanas é uma alternativa de aproveitamento de subprodutos do processamento da indústria pesqueira, amplamente utilizada em diversos produtos comerciais (Sinthusamran et al. 2015; Shakila et al. 2012, Ahmad e Benjakul, 2011; Oetterer, 2006).

Embora as propriedades funcionais da gelatina de peixe tenham sido vastamente pesquisadas, estudos sobre a extração a partir de ossos da tilápia não têm sido aprimorados, assim como as propriedades funcionais da gelatina como agente encapsulante de concentrados proteicos de peixe. Shakila et al. (2012) relatam que aplicações de gelatinas ósseas de peixe como filmes comestíveis, revestimentos, nanofilmes e micro ou nano-encapsulamentos precisam ser investigadas. A gelatina de peixe como uma alternativa a gelatina mamífera foi sugerida por alguns autores (Piacentini et al., 2013; Karim e Bhat, 2009).

A microencapsulação consiste no aprisionamento de conteúdo em uma matriz envoltória com objetivo de formar uma barreira que evite perdas ou reações indesejáveis, além de promover a liberação controlada, proteger o conteúdo da degradação proteolítica e oxidativa causada pelo calor, luz, umidade e ácidos graxos extendendo a vida de prateleira das micropartículas (Gharsallaoui et al., 2007, Ghosh, 2006; Shahidi e Han, 1993). Neste processo de operação única,

o produto líquido é atomizado através secagem com vapor de ar quente para obter-se instantaneamente o pó (Gharsallaoui et al. 2007). A gelatina é uma das proteínas mais utilizada como agente encapsulante (matriz envoltória) e confere solubilidade e resistência à umidade das micropartículas (Martins et al, 2014). Com isto, o presente estudo foi realizado para caracterizar a gelatina extraída dos ossos da carcaça de tilápia *Oreochromis niloticus* e promover a microencapsulação do concentrado proteico de peixe, utilizando a gelatina como material de revestimento das micropartículas.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Material**

A matéria-prima (carcaça) de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi doada pela indústria pesqueira local, Noronha Pescados, localizada na Rua Historiador Luis do Nascimento, 550, Curado - Recife-PE. O material foi acondicionado em gelo e transportado ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ) da UFPE. As carcaças foram lavadas com água destilada, acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em freezer a -22 °C até a sua posterior utilização na produção de gelatina.

### **2.2. Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP)**

No processo de extração de gelatina foi utilizado um pré-tratamento para separação da carne aderida aos ossos. A carcaça (restos de carne, pele e ossos) da tilápia foi submetida a hidrólise, a partir do método descrito por Silva et al. (2014). A carcaça e a alcalase a 0,5% (m/v), foram adicionadas a um liquidificador industrial e submetidas a trituração por 5 minutos. A mistura foi submetida a digestão em banho maria a 45 °C durante 180 minutos a 250 rpm. Após 180 minutos de hidrólise, a temperatura foi elevada para 100 °C durante 10 minutos para interromper a reação enzimática. As frações de sólidos e líquidos foram separadas por filtração (malha: 1 mm<sup>2</sup>) e o filtrado foi definido como HPP. Os ossos remanescentes do processo de hidrólise obtidos após filtração foram utilizados para a extração da gelatina.

### **2.3. Concentrado Proteico de Peixe (CPP)**

O HPP foi submetido a um processo de extração lipídica, através de separação mecânica e o sobrenadante denominado Concentrado Proteico de Peixe (CPP) (Ferreira et al., 2017). O CPP

foi acondicionado em vidros estéreis autoclavados e armazenados em freezer sob temperatura de -26 °C para posterior secagem.

#### **2.4. Obtenção da gelatina**

Os ossos remanescentes (100g) do processo de hidrólise da carcaça para obtenção do hidrolisado proteico de tilápia foram utilizados para obtenção da gelatina (Ferreira et al. 2017). As gelatinas foram preparadas nas proporções de 1:10 (p/v) (G10) e 1:3 (p/v) (G3).

#### **2.5. Rendimento**

O rendimento da gelatina foi calculado através da fórmula descrita por Binsi, Shamasundara, Dileepa, Badiib e Howell (2009) adaptado com base no peso úmido dos ossos da seguinte forma:

Rendimento (g/100g) =  $\frac{\text{Peso da gelatina liofilizada (g)}}{\text{Peso úmido do osso úmido (g)}} \times 100$

Peso úmido do osso úmido (g)

#### **2.6. Caracterização da gelatina**

##### **2.6.1 Composição centesimal e composição de aminoácidos**

A composição bioquímica das gelatinas extraídas dos ossos foi realizada no Laboratório de Análise Experimental e Alimentar do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e no CBO análises. O teor de umidade (AOAC, 1996, método 926.12) foi realizado através da pesagem de 5 g de amostra preparadas e secas a peso constante em forno a vácuo sob temperatura uniforme 20 - 25 °C acima do ponto de ebulição de H<sub>2</sub>O sob pressão de trabalho e arrefecido em dessecador eficiente por 30 min. O peso constante é atingido após 1 hora de secagem sucessiva. A proteína bruta (AOAC, 1995a, método 991.20) foi medida pelo método de Kjeldhal e 6,25 como fator de conversão da N-proteína. O teor de extrato etéreo (U.K. FEEDING STUFFS, 1982, pp. 9-11), foi obtido a partir da extração da amostra com éter de petróleo e secos durante 3 - 4 horas. O conteúdo foi moído finamente, e o material foi novamente extraído durante mais uma hora. Após evaporação do solvente, o óleo foi seco a 100 °C e pesado. As cinzas (AOAC, 1995b, método 920,39) foram determinadas através de secagem do material num forno de mufla ajustado a 550 °C durante 24 h. Para determinação dos aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais

(White et al., 1986, pp. 170-177, Hagen et al., 1989, pp. 912-916), as amostras foram hidrolisadas em solução de HCl 6 M / fenol durante 24 h para obter aminoácidos livres, após derivatização com phenyl isothiocyanate (PITC), separados por HPLC de fase reversa e detectados por UV a 254 nm. Os resultados foram convertidos para base de matéria seca.

### **2.6.2 Coloração**

A determinação da cor das amostras de gelatina foi realizada através do uso de um colorímetro (Konica Minolta, Model Chroma Meter CR – 400) de acordo com sistema de perfil de cor CIE, (L \* luminosidade), mede a variação de luminosidade entre o preto (0) e branco (100), a\*(vermelho/verde), define a cor vermelha para valores positivos e verde para valores negativos e b\* (cor amarela/azul), define a cor amarela para valores positivos e azul para valores negativos. Para cada tratamento, as determinações foram efetuadas em cinco repetições e os resultados expressos como média. Os gráficos foram plotados no python 3.6.0, uma linguagem de programação de alto nível interpretada de tipagem dinâmica. Foram utilizadas as bibliotecas numpy, scipy e matplotlib. Este programa e as bibliotecas estão disponíveis gratuitamente.

### **2.6.3 pH**

As gelatinas G3 e G10 (1,0 g) foram dissolvidas em 100mL de água destilada e o pH foi mensurado através da leitura direta em potenciômetro (Analon PM 608) previamente calibrado (Cheow, Norizah, Kyaw, e Howell, 2007).

### **2.6.4 Eletroforese e dosagem de proteína**

Foi realizada eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), através de método descrito por Laemmli (1970) e a concentração proteica segundo Smith et al. (1985).

## **2.7 Microencapsulação do Concentrado Proteico de Peixe**

### **2.7.1 Preparação das emulsões e secagem por spray drying**

A microencapsulação do CPP foi realizada na Universidade Federal de Alagoas, através de spray dryer (Buchi Mini spray dryer B-290) para obtenção das micropartículas. Para a microencapsulação do CPP foram preparadas emulsões com diferentes formulações contendo maltodextrina comercial, goma arábica e gelatina de tilápia. As emulsões foram homogeneizadas em agitador magnético (Biomega/H4000-S) a 12.000 rpm durante 15 min. A secagem foi realizada

sob 220-200/110-100 °C de temperatura de entrada/saída. Após secagem, o concentrado proteico com gelatina de tilápia (CPGT) foi coletado e pesado para determinar o seu rendimento. Posteriormente o material foi armazenado em vidros estéreis em temperatura ambiente e ausência de luz para posteriores análises.

## **2.7.2 Caracterização das micropartículas de CPGT**

### **2.7.2.1. Tamanho e morfologia**

As amostras (CPGT) foram preparadas e o material foi fixado em stub de alumínio com fita de carbono dupla face e em seguida, metalizadas com ouro. Para a metalização foi utilizado um Q150T Turbo-Pumped Sputter Coater/Carbon Coate, onde as amostras ficaram expostas por 60 segundos a uma corrente de 20 mA. O tamanho e a morfologia das partículas foram realizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) Evo LS15 (Zeiss).

### **2.7.2.2 Composição centesimal e composição de aminoácidos**

A composição bioquímica do CPGT foi realizada no Laboratório de Análise Experimental e Alimentar do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e no CBO análises. O teor de umidade (AOAC, 1996, método 926.12) foi realizado através da pesagem de 5 g de amostra preparadas e secas a peso constante em forno a vácuo sob temperatura uniforme 20 - 25 °C acima do ponto de ebulição de H<sub>2</sub>O sob pressão de trabalho e arrefecido em dessecador eficiente por 30 min. O peso constante é atingido após 1 hora de secagem sucessiva. A proteína bruta (AOAC, 1995a, método 991.20) foi medida pelo método de Kjeldhal e 6,25 como fator de conversão da N-proteína. O teor de extrato etéreo (U.K. FEEDING STUFFS, 1982, pp. 9-11), foi obtido a partir da extração da amostra com éter de petróleo e secos durante 3 - 4 horas. O conteúdo foi moído finamente, e o material foi novamente extraído durante mais uma hora. Após evaporação do solvente, o óleo foi seco a 100 °C e pesado. As cinzas (AOAC, 1995b, método 920,39) foram determinadas através de secagem do material num forno de mufla ajustado a 550 °C durante 24 h. Para determinação dos aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais (White et al., 1986, pp. 170-177, Hagen et al., 1989, pp. 912-916), as amostras foram hidrolisadas em solução de HCl 6 M / fenol durante 24 h para obter aminoácidos livres, após derivatização com phenyl isothiocyanate (PITC), separados por HPLC de fase reversa e detectados por UV a 254 nm. Os resultados foram convertidos para base de matéria seca.

### **2.7.2.3. Mesófilos**

A análise de micro-organismos mesófilos foi realizada de acordo com a metodologia padrão Português NP 4405 (2002) adaptado. O concentrado proteico com gelatina de peixe foi analisado após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. O ensaio foi realizado por diluição em série de amostras 1/10 (0,1% água de peptona a 0,9% p / v de solução de NaCl) e homogeneizadas sob condições estéreis. Aliquotas de 1 mL de cada amostra diluída foram coletadas e inoculadas em placas de Petri, com adição de 15 ml de plate count agar (PCA) em triplicata. As amostras foram homogeneizadas imediatamente através de rotações das placas de Petri, a fim de obter uma dispersão uniforme das colônias. Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa para avaliação de mesófilos.

### **2.7.2.4 Medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas como descrito por Buege e Aust (1978). Foram misturadas 100µl das amostras diluídas em 500µl de uma solução de TBA contendo ácido tiobarbitúrico a 0,375%, ácido tricloroacético a 15% e 0,25 N de HCl. As misturas foram aquecidas em banho maria durante 10 minutos para desenvolver uma cor rosa e na sequencia centrifugadas a 3600G a 25°C durante 20 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532nm. Uma curva padrão foi preparada com 1,1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP) e TBARS foram expressos em mg de malonodialdeído / kg de amostra.

## **2.8 Gráficos e estatística**

Os dados foram analisados e calculados o desvio padrão. Para isto foi utilizado um programa com linguagem de programação de alto nível interpretada de tipagem dinâmica. Os gráficos foram plotados no python 3.6.0. Foram utilizadas as bibliotecas numphy, scipy e matplotlib. Este programa e as bibliotecas estão disponíveis gratuitamente.

## **3.Resultados e Discussão**

### **3.1 Rendimento**

Os rendimentos de gelatina a partir de ossos de tilápia (G10 e G 3) foram 3,28g/100g e 1,34g/100g respectivamente, sendo inferiores aos rendimentos médios de gelatina de peixe extraídos dos ossos da cioba (*Lutjanus campechanus*) (9,14/100g) e da garoupa (*Epinephelus chlorostigma*) (13,66 g / 100 g) descritos por Shakila et al. (2012).

Rendimentos similares a G10 foram relatados por Koli et al. (2012) na gelatina de ossos da espécie *Nemipterus japonicus* que renderam 3,55g/100g. Muyonga et al. (2004) obtiveram rendimentos de gelatinas ósseas em perca-do-nilo (*Lates niloticus*) em animais jovens e adultos de 1, 3 e 2,4 g/100g, respectivamente.

Outros autores relataram diferentes rendimentos de gelatina de variadas espécies, assim como o material utilizado, sendo alguns rendimentos obtidos a partir da pele dos peixes. Jamilah & Harvinder, (2002) reportaram um rendimento de 7,81/100g e 5,39/100g para gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis nilotica*) e tilápia preta (*Oreochromis mossambicus*), respectivamente. Jamilah et al. (2011) reportaram rendimentos de 12, 92 g/100g em tilápia vermelha *Oreochromis nilótica*. Esses rendimentos superiores podem ser justificados devido a disponibilidade de colágeno contida nos diferentes materiais (osso, pele) e possivelmente aos diferentes processos de extração aplicados nos estudos. Khiari et al. (2013) relataram variação nos rendimentos de gelatinas extraídas por métodos diferentes. Da mesma forma Muyonga et al. (2004) reportaram diferentes rendimentos na extração por variadas temperaturas.

Diferentes concentrações resultaram em diferenças no rendimento da gelatina, à medida que a concentração de solutos (ácido e base) aumentou, o rendimento da proteína. A menor concentração (G3) apresentou rendimento menor com relação ao tratamento de maior (G10). O uso de concentrações excessivas de ácidos pode resultar em perda de proteína, devido a hidrólise de colágeno e as perdas durante as etapas de lavagens (Jamilah & Harvinder, 2002). No entanto, Niu et al. (2013), relataram os rendimentos da proteína extraída, alcançam um pico máximo e em seguida decréscimo mediante ajuste e aumento nas concentrações dos ácidos utilizados, mas que o tipo de ácido não interfere no rendimento da extração.

## **3.2 Análises físico-químicas**

### **3.2.1 Composição centesimal**

A composição centesimal das gelatinas foi realizada e os resultados são expressos em matéria seca na tabela 1. O teor de umidade das gelatinas G3 e G10 foi de 13,84 e 13,89%,

corroboraram com os relatados por Muyonga et al. (2004) em gelatinas ósseas em perca-do-nilo (*Lates niloticus*) (10,3%) e Koli et al. (2012) na gelatina de ossos de corvina *Otolithes ruber* (10,33%) que apresentaram valores similares. Shakila et al. (2012) verificaram umidade em gelatinas ósseas de garoupa (*Epinephelus chlorostigma*) (4.10%) e cioba (*Lutjanus campechanus*) (6.24%), enquanto que Jamilah et al. (2011) relatou em gelatina de pele de tilápia vermelha *Oreochromis nilótica* (8.51%).

Os teores de proteína das gelatinas G10 e G3 foram 78,7% e 72,9%, respectivamente. Khiari et al. (2013) revelaram (56,41% e 54,46%) em gelatina de osso de cavala *S. scombrus* e verdinho *M. poutassou*, respectivamente. Bougatef et al. (2012) descreveram valores de 92,60% em gelatina de pele de tubarão *M. mustelus*. Shakila et al. (2012) reportaram conteúdos proteicos de 82,36% e 78,56% para gelatinas de ossos de garoupa (*Epinephelus chlorostigma*) e cioba (*Lutjanus campechanus*), respectivamente. Estes resultados corroboram com os encontrados neste estudo para gelatina de ossos de tilápia.

Os teores de lipídios foram (6,80%) para G10 e (11,44%) para G3. Shakila et al. (2012) descreveram (5,16%) em cioba e (3,92%) em garoupa. Contudo, foram relatados teor de 2,23% em verdinho *M. poutassou* e 15,66% em cavala *S. scombrus* (Khiari et al., 2013).

As gelatinas G3 e G10 apresentaram teor de cinzas de 12,4% e 13,3%, respectivamente. Isto pode ser explicado principalmente devido ao maior teor de minerais na matéria-prima (ossos). Foram reportados resultados similares por Shakila et al. (2012) nas gelatinas de cioba (*Lutjanus campechanus*) e garoupa (*Epinephelus chlorostigma*) (10,32 e 6,58%), respectivamente. Jamilah et al. (2011) obtiveram 0,18% de matéria mineral em gelatina de pele de tilápia vermelha *Oreochromis nilótica*.

Tabela 1. Composição centesimal das gelatinas (g/100 g)

Composição (g/100g)	G10	G 3
Umidade	13,89	13,84
Proteína	78,7	72,9
Extrato Etéreo	6,80	11,44
Cinzas	12,4	13,3

### 3.2.2 Aminograma

O percentual de ácido aspártico encontrados por Jamilah e Harvinder, (2002), em seus estudos com gelatina de pele de tilápia vermelha (*Oreochromis nilotica*) e tilápia preta (*Oreochromis mossambicus*) foi inferior (3,8% e 3,9%) aos da gelatina de ossos de tilápia *Oreochromis niloticus* (4,14%) desse trabalho, no entanto os valores de ácido glutâmico foram similares 7,1 e 7,6 % em tilápia vermelha e tilápia preta, respectivamente. O teor de glicina foi de 17,24% (tabela 2). O aminoácido mais abundante em gelatinas é a glicina (Khiari *et al.*, 2013). Esses autores (Khiari *et al.*, 2013) apresentaram diferença significativa nos teores de glicina, entre gelatinas de ossos de cavala *S. scombrus* extraídas por pré-tratamento enzimático (Alcalase) (11,4%) (Flavozyme) (11,6%) com redução de 50% em relação as pré-tratadas quimicamente (NaOH) (21,3%). Este estudo utilizou de alcalase na produção do hidrolisado proteico de peixe para obtenção dos ossos, isto pode ser uma das justificativas pelo teor de glicina abaixo dos relatados por Jamilah e Harvinder, (2002) que obtiveram 30,8 e 33,8% para *Oreochromis nilotica* e *Oreochromis mossambicus*, respectivamente. Para os aminoácidos essenciais foram relatados níveis similares (tabela 2) de metionina (1,4 e 1,7%), valina (1,7 e 2,2%) e lisina (2,1 e 2,8%) em *Oreochromis nilotica* e *Oreochromis mossambicus* (Jamilah e Harvinder, 2002), respectivamente. Khiari *et al.* (2013) obtiveram níveis de metionina (2,1 e 2,4%) e valina (2,3 e 2,3%) em gelatinas ósseas de cavala *S. scombrus* e verdinho *M. poutassou*, respectivamente.

Tabela 2. Composição dos aminoácidos da gelatina óssea de tilápia (g/100g de peso seco)

Aminoácidos (%)	Gelatina
<b><i>Não essencial</i></b>	
Ácido Aspártico	4,14
Ácido Glutâmico	7,05
Serina	2,71
Glicina	17,24
Arginina	6,23
Alanina	6,86
Prolina	9,40
Tirosina	0,43
<b><i>Essencial</i></b>	
Valina	1,36
Histina	0,62
Metionina	1,03
Cistina	0,35
Isoleucina	0,81
Treonina	1,88
Leucina	2,02
Fenilalanina	1,46
Lisina	2,53

### 3.2.3 pH

O pH das gelatinas G3 e G10 foram 6,7 e 5,9 respectivamente. Shakila et al. (2012) que apresentaram 4,65 e 4,31 em gelatinas ósseas de anchova (*L. campechanus*) e garoupa pintada (*E. chlorostigma*), respectivamente. Foi observada ligeira variação nos valores de pH entre os tratamentos aplicados. Da mesma forma foram reportados valores baixos nos níveis de pH em carpas *L. rohita* e *C. carpio* (4.08 e 4.05) (Ninan e Abubacker, 2011) e em gelatina de pele de bacalhau (2.7 e 3.9) (Gudmundsson & Hafsteinsson, 1997). Por outro lado, Binsi et al. (2009) e Badii e Howell (2006) apresentaram valores (6.44) em bigeye snapper e (6.0) na espécie carapau *T. trachurus* respectivamente em gelatinas de pele que corroboram com os resultados encontrados neste trabalho. Contudo, Jamilah & Harvinder (2002) reportaram valores de pHs inferiores em gelatina de pele de tilápia preta *Oreochromis mossambicus* de 3,91 e de tilápia vermelha

*Oreochromis nilotica* de 3,05, assim como apresentados por Grossman e Bergman (1992) em gelatina da pele de tilápia (3,77) e Jamilah et al. (2011) em gelatina de pele de tilápia vermelha *Oreochromis nilotica* com 4.2. A diferença no pH pode ser explicada devido aos métodos utilizados, assim como a concentração molar e resistência dos ácidos utilizados na extração.

### 3.2.4 Coloração

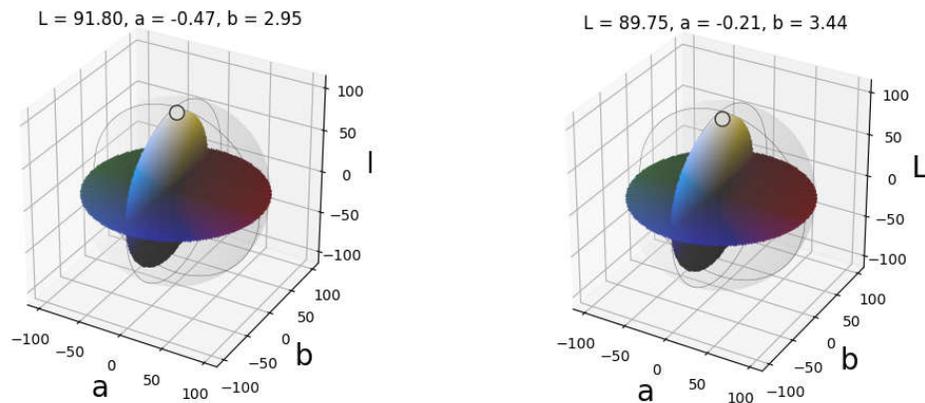
Alguns fatores tais como a luz, o oxigênio, a temperatura e a água podem afetar a estabilidade da cor. Os padrões de coloração das gelatinas foram realizados em triplicata. As gelatinas G10 e G3 apresentaram luminosidade  $L^*$  (89.7 e 91,7), respectivamente (tabela 3). Koli et al. (2012) encontraram valores de ( $L^*$  65.44) na gelatina de ossos de Corvina *Otolithes ruber* e padrão nas cores vermelha e amarela ( $a^*$  1.65,  $b^*$  22.50), respectivamente. No entanto, os valores de  $L^*$  (89.75 e 91.7) para gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis nilotica*) e tilápia preta (*Oreochromis mossambicus*) encontrados por Jamilah e Harvinder (2002), corroboram com os resultados apresentados neste trabalho. A variação de cor vermelha e amarela das gelatinas de ossos de tilápia nilótica (tabela 3) foram similares as apresentadas por Jamilah e Harvinder (2002), nas tilápias nilótica ( $a^*$  -0.47,  $b^*$  2.30) e preta ( $a^*$  -0.56,  $b^*$  3.09). Bougatef et al. (2012) apresentaram luminosidade ( $L^*$  71.13) em gelatina de pele de tubarão *M. mustelus*, vermelhidão ( $a^*$  -0.28) e amarelecimento ( $b^*$  7.45). Mais intensidade de amarelo ( $b^*$ ) nas gelatinas poder ser em parte devido à maior retenção de lipídios contidos nas peles dos peixes. Os resultados expressos nos gráficos indicam que as gelatinas obtidas apresentam coloração branca como representado no círculo na extremidade superior da esfera (Fig.1).

Tabela 3. Coloração da gelatina de ossos de tilápia

Valores de cor	G 10	G 3
$L^*$	89.755 ±1.58	91,7 ±0.139
$a^*$	-0,20 ±0.048	-0,47 ±0.054
$b^*$	3.44 ±0.419	2.95 ±0.206

$L^*$ : luminosidade;  $a^*$ : vermelhidão;  $b^*$ : amarelecimento.

Figura 1: Gráficos de coloração das gelatinas. G3 à esquerda; G10 à direita



### 3.3 Dosagem de proteína e Eletroforese

No ensaio bicinonínico (BCA) para dosagem de proteína pelo método de Smith *et al.* (1985) foi encontrado para a G 10, 2,12 mg/25 $\mu$ L de proteína. Para a G 3 encontrou-se 1,72 mg/25 $\mu$ L de proteína. Após a dosagem, a gelatina foi liofilizada na concentração de 5mg/mL para realização da eletroforese.

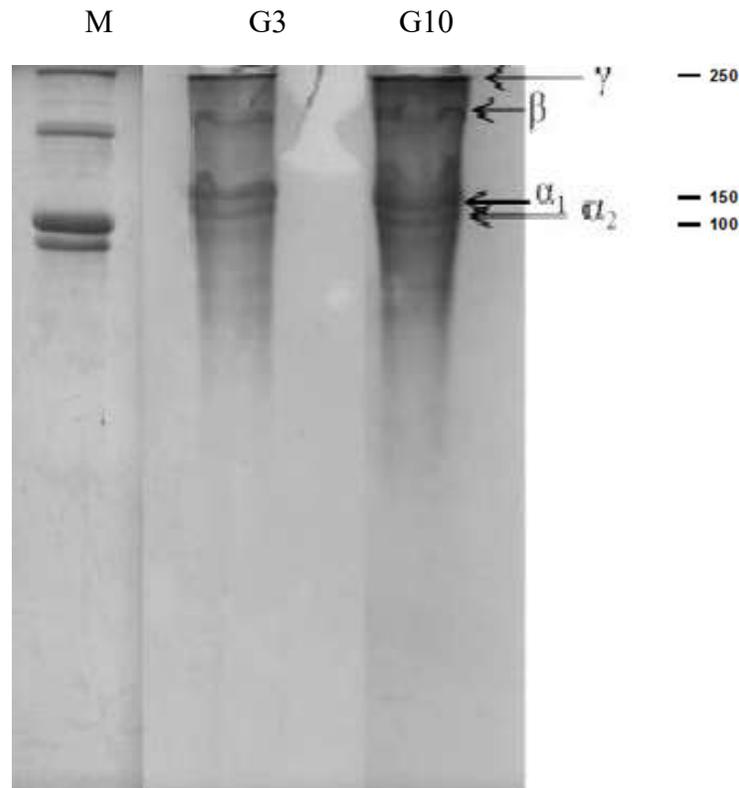
O perfil eletroforético (SDS-PAGE) da gelatina produzida está ilustrado na Fig. 2, onde é possível observar a presença de três bandas (uma cadeia  $\beta$  e duas cadeias  $\alpha$ ). Estas características correspondem são com a gelatina do tipo I (Khiari *et al.*, 2013). Os padrões proteicos (bandas  $\beta$ ) das gelatinas (G3 e G10) demonstraram valores acima de que 200 kDa. Esses resultados corroboram com Shakila *et al.* (2012) que apresentaram em suas cadeias  $\beta$  nas gelatinas ósseas de cioba e garoupa pesos moleculares maiores que 200 kDa. No pré-tratamento e na extração da gelatina propriamente dita, quando são aplicadas etapas muito longas, reagentes muito fortes e/ou ainda temperaturas inadequadas, pode ocorrer a degradação estrutura da proteína, resultando na ausência da cadeia  $\beta$  (Giménez *et al.*, 2005). Khiari *et al.* (2013) observou esse fenômeno em gelatinas extraída de ossos de cavalinha do Atlântico (*Scomber scombrus*) e verdinho (*Micromesistius poutassou*) tratadas com as enzimas Flavourzyme de *Aspergillus oryzae* e Alcalase, produzida por *Bacillus licheniformis* em reação de extração por um período de 18 h a 45°C. A degradação de gelatina causa a formação de diversas frações de pesos moleculares

menores, gerando, conseqüentemente, proteína de baixa viscosidade, baixo ponto de fusão, bem como diminuição força de gel (Shakila et al.,2012).

Segundo Bougatef et al. (2012), a estrutura e composição das subunidades da gelatina, assim como a distribuição de pesos moleculares na estrutura está intimamente relacionado com a composição dos aminoácidos que estarão presentes e a propriedades funcionais na biomolécula em questão.

Os padrões proteicos das cadeias alfa ( $\alpha$ ) apresentaram peso molecular entre 100 e 150 kda, de acordo com os resultados encontrados por Muyonga et al. (2004). Outros autores (Muyonga et al., 2004; Khiari et al., 2013) relatam gelatinas com baixas frações proteicas que somado a perdas de uma banda proteica ocorrem devido a temperatura utilizada na extração. As gelatinas (G10 e G3) de ossos de tilápia não possuíam cadeias proteicas de baixo peso molecular, uma vez que a temperatura (50 °C) utilizada para a extração foi condizente a não desnaturação proteica.

Figura. 2: Padrões de proteína de gelatina de osso de tilápia; Marcador M-Molecular.



### 3.4 Caracterização das micropartículas

#### 3.4.1 Tamanho e morfologia das micropartículas

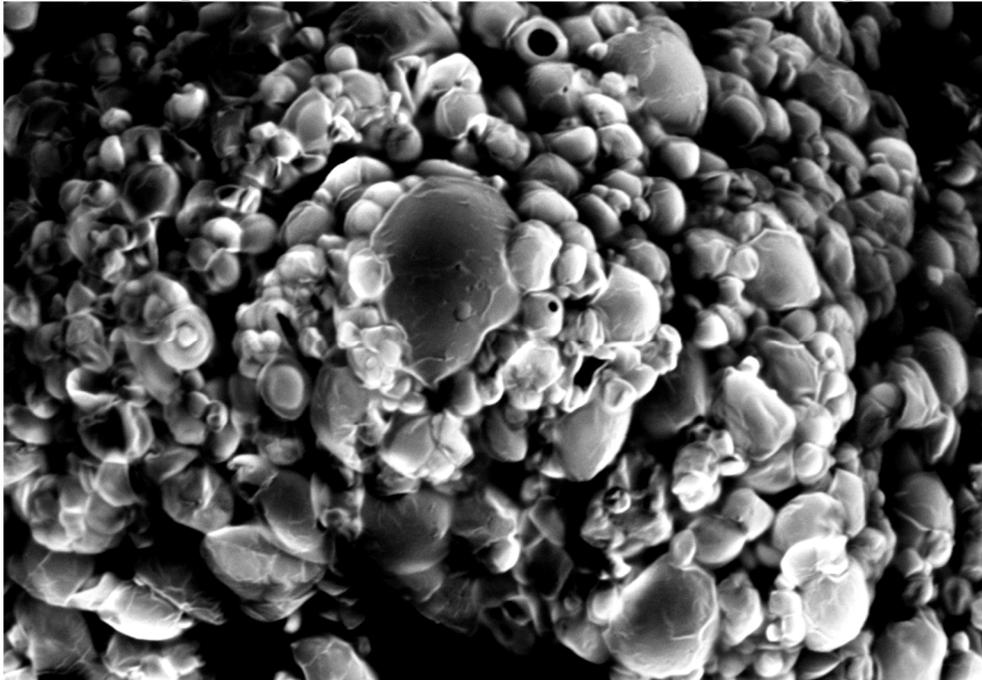
O tamanho e a morfologia das micropartículas do CPGT foram realizados através de MEV. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi visualizado na maioria das vezes aglomerados de micropartículas (Fig. 3). Gallardo et al. (2013) relataram que os aglomerados das micropartículas coincidem com o rendimento e eficiência de encapsulação. A forma e o tamanho das micropartículas variam de acordo com a escolha do método de microencapsulação. Segundo Ghosh (2006), a técnica de spray drying fornece tamanho de microcápsulas que compreendem de 5–5000  $\mu\text{m}$ . No entanto, Gharsallaoui et al (2007) descrevem partículas na ordem de diâmetro 1-100  $\mu\text{m}$  durante o processo inicial de secagem.

Os tamanhos das partículas variaram entre 10 e 33  $\mu\text{m}$ . Gallardo et al. (2013) observaram valores similares aos descritos neste trabalho. As partículas produzidas neste estudo apresentaram dimensões inferiores as reportadas por Finney et al (2002) que apresntaram tamanhos entre 35 e 77  $\mu\text{m}$ . As micropartículas apresentaram suas superfícies lisas e regulares. Caliskan e Dirim (2013),

demonstraram que os extratos de sumac secos por spray-dried são partículas de forma irregularmente esférica, com encolhimentos e mossas em sua superfície. Segundo Gallardo et al. (2013), micropartículas enrugadas e com superfícies côncavas é característico de micropartículas produzidas por secagem através de spray drying. Por outro lado, Finney et al. (2002) apresentaram superfícies mais lisas e menor encolhimento nas partículas obtidas com uso de temperatura de entrada mais elevada quando comparadas as de temperatura inferior.

A encapsulação tem como objetivo principal aprisionar um material desejado (núcleo) numa matriz envoltória, sendo a gelatina um dos principais agentes encapsulantes utilizados neste estudo. Martins et al (2014) relata que a gelatina está dentre as proteínas mais utilizadas como material de revestimento juntamente com a caseína e proteínas de soja. Outros autores (Martins et al. 2014; Shahidi e Han, 1993) relataram que a microencapsulação serve para formar barreiras e evitar perdas, além de proteger o conteúdo da degradação proteolítica e atribuir propriedades singulares sob o aspecto de libertação controlada, solubilidade e resistência à umidade às micropartículas. Segundo Ghosh (2006), para a liberação de conteúdo (núcleo), deve ocorrer o rompimento do invólucro (material de revestimento) através de pressão externa, dissolução em solvente ou degradação pela luz.

Figura. 3: Fotomicrografias MEV das micropartículas de concentrado proteico com gelatina de tilápia



### 3.4.2 Composição centesimal e aminoácidos do CPGT

A composição centesimal e os aminoácidos do concentrado proteico de peixe microencapsulado com gelatina óssea de tilápia estão contidos na tabela 4. O CPGT apresentou um nível maior na quantidade de aminoácidos que a gelatina óssea de tilápia (66,12%), além da presença de taurina, devido a composição química do material microencapsulado (concentrado proteico de peixe) (Tabela 4). O CPGT apresentou elevado teor de proteína (73,3%). Outros autores, (Silva et. al., 2014) descreveram teores de 58,4% em hidrolisados proteicos de tilápia *Oreochromis niloticus* na forma líquida. Abdul-Hamid et al. (2002) relataram (49,60 – 37,7%) em hidrolisados em pó de tilápia preta. O teor de cinzas verificado foi de 4,55%, semelhante aos descritos por Foh eta al. (2012) em isolados proteicos de tilápia, contudo superiores ao relatado por Silva et. al. (2014) (2,67%), devido a origem do material (ossos) utilizados na produção da gelatina que pertencia ao material de parede composto na formulação do microencapsulamento. O CPGT apresentou baixo teor de cinzas (4,5%), que confere qualidade nutricional ao produto. De acordo com Cho et al. (1985), a boa qualidade de uma dieta para os organismos aquáticos deve conter teor de cinzas abaixo de 13%. O teor de carboidratos verificado (20,62%) é justificado, devido a presença do material de parede (maltodextrina) utilizado na formulação das emulsões realizadas para microencapsulação do concentrado proteico de peixe. Abdul-Hamid et al. (2002) relataram teor de carboidratos de 35,0 e 49,6%.

Os aminoácidos são essenciais à diversas funções metabólicas importantes ao organismo. Hongsprabhas et al. (2011) relata que os aminoácidos cisteína e metionina podem aumentar a imunidade, através da conversão intracelular para a glutatona (Hongsprabhas et al. 2011). Várias proteínas que possuem funções de transporte de oxigênio, vitaminas, CO<sub>2</sub>, enzimas e proteínas estruturais são sintetizadas por amonoácidos (Chalamaiah et al., 2012). A presença de histidina e tirosina em peptídeos foi relatada como responsável elevada atividade antioxidante (Bougatef et al., 2010). CPGT apresentou percentuais de histidina (1,56%) e tirosina (1,90%). Outros aminoácidos essenciais como a metionina (1,98%), leucina (5,34%), lisina (5,92%) e valina (2,96%) estão presentes em elevadas proporções (tabela 4). Abdul-Hamid et al., (2002) relataram valores menos expressivos para leucina, metionina, lisina e valina (0,05%, 0,03%, 0,02%, 0,02%), respectivamente em hidrolisado em pó de tilápia preta *Oreochromis mossambicus*, além da ausência de histidina.

O CPGT ainda apresentou altos níveis de ácidos aspárticos e glutâmicos, contudo o nível de glicina (8,16%) apresentado neste estudo mostrou-se mais elevado que o ácido aspártico (tabela 4). Abdul-Hamid et al. (2002) descreveram 0,01% de glicina em hidrolisado de tilápia em pó. Os radicais livres são consumidos através de reações de ligação com as proteínas e promovem ação antioxidante, além de retardar a oxidação de lipídeos (Morales-Medina et al., 2016). Devido a capacidade de doação de prótons do grupo imidazol da histidina, a susceptibilidade à oxidação da metionina em metionina sulfóxido e doação de hidrogênio sulfúrico pela cisteína são importantes na eliminação de radicais (Chalamaiah, 2012). Os radicais eletrófilos podem quebrar a estrutura polipeptídica e os aldeídos reagir com a histidina, lisina e cisteína (Elias et al., 2008).

Tabela 4: Composição centesimal e de aminoácidos do concentrado proteico com gelatina de tilápia.

Aminoácidos e composição química (%)	CPGT
<b><i>Não essencial</i></b>	
Ácido Aspártico	6,61
Ácido Glutâmico	10,58
Serina	3,12
Glicina	8,16
Arginina	5,20
Alanina	5,27
Taurina	0,72
Prolina	4,81
Tirosina	1,90
<b><i>Essencial</i></b>	
Valina	2,96
Histina	1,56
Metionina	1,98
Cistina	0,25
Isoleucina	2,7
Treonina	3,08
Leucina	5,34
Fenilalanina	2,50
Lisina	5,92
Soma dos Aminoácidos	72,66
Umidade	10,52
Proteína	73,43
Extrato etéreo	1,40
Material mineral	4,55
Carboidratos	20,62

### 3.4.3 Análises Microbiológicas

A longevidade do produto e conformidade com os padrões de higiene e segurança alimentar estão diretamente dependentes ligados a fatores, como a ausência de microrganismos patogênicos. O concentrado proteico com gelatina de tilápia (CPGT) permaneceu livre de contaminação por microrganismos mesófilos por 60 dias de armazenamento sob temperatura ambiente, aproximadamente 30 °C. Karim e Bhat (2009) reportaram a importância da produção de gelatinas de baixo custo com qualidade elevada e ausência ou quantidade mínima de microrganismos contaminantes, além da aplicação de boas práticas de Práticas de Fabricação (BPF) e a HACCP (Análise de Perigos e Ponto Crítico de Controle) na fabricação de alimentos.

A microencapsulação fornece a desidratatação e confere maior estabilidade ao produto. A contaminação ocorre devido a falhas na manipulação e processamento de peixe que podem ocorrer a partir da coleta, transporte ou através de superfície de contato e utensílios, como caixas de polietileno utilizadas no transporte do pescado. Além disto, alguns fatores estão inerentes a contaminação microbiológica, como a água, pH, temperatura, luz e oxigênio. A técnica de spray drying aplicada ao concentrado proteico de tilápia apresentou resultados excelentes sob o ponto de vista microbiológico. O microencapsulamento foi eficiente na eliminação total de microrganismos mesófilos e apresentou resultados melhores reportados por Bueno-Solano et al. (2009) que contaram 1730 UFC / g de mesófilos totais em hidrolisados de proteicos de cabeça de camarão em pó.

Eves et al. (1995) relataram um crescimento inicial na contagem de mesófilos nos primeiros dias de armazenamento de tilápia congelada. Gatti-Junior et al. (2014) relataram contaminação fecal e detectaram níveis de coliformes totais e termotolerantes, além de presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nos músculos e filés de tilápia e um percentual elevado de coliformes totais na pele de *Oreochromis niloticus*. A maior parte da literatura disponível sobre peixes de água doce (robalo, tilápia, truta arco-íris e perca de prata) relata contagens bacterianas de 102-106 UFC / g (Gelman et al., 2001). Mbarki et al. (2009) encontraram mesófilos, coliformes e *Staphylococcus* na amostra de filés de *Scomber japonicas*.

### 3.4.4 Medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

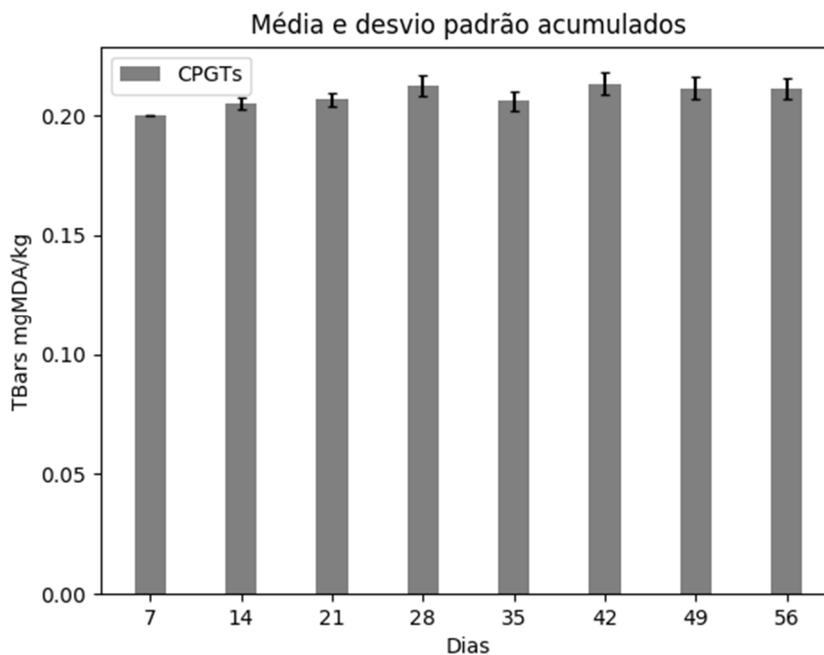
O alimento pode sofrer deterioração durante a estocagem, devido a processos oxidativos dos ácidos graxos poliinsaturados que podem reduzir a vida útil do produto. Os lípidos

desempenharam um papel importante na qualidade dos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis e proporcionam valor nutritivo dos alimentos, uma fonte de energia metabólica, ácidos graxos essenciais. O CPGT mostrou-se estável e não apresentou aumento nos níveis de TBARS, com isto permaneceu livre de oxidação lipídica (Fig. 4). Os óleos e os ácidos graxos poliinsaturados são instáveis e suscetíveis à rápida auto-oxidação. A microencapsulação confere estabilidade e inibe ou atrasa a oxidação dos ácidos graxos (Gharsallaoui et al., 2007, Barrow et al. 2009).

Neste estudo, a oxidação lipídica do CPGT foi monitorada através da medição de TBARS, produtos secundários da oxidação lipídica. Os valores de TBARS obtidos no presente estudo foram estáveis e demonstraram baixo nível de oxidação durante 56 dias de armazenamento. Um baixo teor de lipídeos é desejável de modo a diminuir a oxidação. Gharsallaoui et al. (2007), relataram que substâncias como maltodextrina, goma arábica e gelatina, são consideradas totalmente adequadas para microencapsulação, pelo fato de possuírem a propriedade de proteção da substância ativa contra oxidação e deterioração. Grattard et al. (2002), verificaram que a maltodextrina, como agente encapsulante, mostrou-se eficiente para evitar oxidação de óleo de linhaça.

Alguns autores (Grattard et al. 2002, Morales-Medina et al. 2016, Barrow et al. 2009) reportaram estabilidade das emulsões no microencapsulamento de óleos durante spray drying que evitaram a oxidação. A oxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos ácidos graxos que concomitante ao armazenamento sofrem alterações do tipo oxidativa, modificando as qualidades organolépticas do alimento. Gallardo et al. (2013) obtiveram micropartículas por spray-drying resistentes à oxidação lipídica, conferindo proteção ao óleo contra o oxigênio e altas temperaturas. A alta eficiência de encapsulamento com uso da gelatina (G10) como revestimento foi evidenciada no que diz respeito a proteção do produto contra oxidação dos lipídeos e promoveu estabilidade do CPP por 56 dias.

Figura 4: Tbars (mgMDA/kg) do CPGT durante 56 dias de estocagem



#### 4. Conclusão

O método utilizado na extração da gelatina a partir dos ossos de tilápia foi eficiente quanto aos níveis de rendimento apresentados. Da mesma forma, a composição centesimal apresentou elevados níveis de proteína G10 (78,7) e G3 (72,9%). As diferentes concentrações (G3 e G10) utilizadas não diferiram expressivamente o perfil físico-químico das gelatinas (composição centesimal, aminograma, pH, coloração e perfil eletroforético). A microscopia eletrônica de varredura demonstrou a formação de partículas de tamanho entre 10 – 33  $\mu\text{m}$ . As micropartículas (CPGT) formadas se apresentaram com a superfície lisa e com raras concavidades. O CPGT não oxidou e nem apresentou contaminação microbiológica ao longo de 60 dias de armazenamento. Foi demonstrado neste estudo, a estabilidade oxidativa e microbiológica dos pós (GPGT). A gelatina óssea dos resíduos de tilápia foi eficiente como material de revestimento e promoveu o microencapsulamento do concentrado proteico de peixe, sendo assim potenciais biomoléculas aplicáveis à indústria alimentícia e farmacêutica.

## 5. Referências

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

Association of Official Analytical Chemists, 1995a. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 991.20)*, 33. A.O.A.C., Arlington, pp. 10–1.

Association of Official Analytical Chemists, 1995b. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 920.39)*. A.O.A.C., Arlington, pp. 10–12.

Association of Official Analytical Chemists, 1996. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 926.12)*, 33. A.O.A.C., Arlington, pp. 5.

Ahmad, M.; Benjakul, S. 2011. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25, p. 381-388.

Arvanitoyannis, I. S. 2002 Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In: A. Gennadios (Ed.), *Protein-based films and coatings*. p. 275-304.

Barrow, C. J., Nolan, C., Holub, B. J. (2009). Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *Journal of functional foods* 1, 3 8 – 4 3.

Binsi, P. K., Shamasundara, B. A., Dileepa, A. O., Badiib, F., & Howell, N. K. (2009). Rheological and functional properties of gelatin from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus amrur*) fish: influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, 23, 132e145

Boscolo, W. R. Farinha de Resíduos da Filetagem de Tilápias na Alimentação de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) na Fase de Reversão Sexual. 2005. *Revista. Bras. Zootec*, v.34, n.6, p.1807-1812.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559–565.

Bougatef, A.; Balti, R.; Sila, A.; Nasri, R.; Graiaa, G.; Nasri, M. 2012. Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*Mustelus mustelus*) skin gelatin. *LWT - Food Science and Technology*, 48, p. 248 – 254.

Bueno-Solano, C., Lopez-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O.N., Lauterio-Garcia, R., Adan-Bante, N.P., Sanchez-Machado, D.I. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112, 671–675.

Caliskan, G.; Dirim, S. N. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioproducts Processing*, Rugby, v. 91, n. 4, p. 539-548, oct. 2013.

Cheng, Z. J.; Hardy, R. W.; Usry, J. L. (2005). Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture*, v. 215, n. 1–4, p. 255–265, 2003.

Cheow, C.S., Norizah, M.S., Kyaw, Z.Y., Howell, N.K. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrostoma*). *Food Chemistry*. 101, 386 -391.

Córdova-Murueta, J. H, Del Toro, M. De Los A, N.; Carreño, F, G. (2007). Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. *Food Chemistry* 100, 705–711.

Djabourov, M.; Lechaire, L.; Gaill, F. 1993. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*. v. 30, 191-205.

Eves, A., Turner, C.; Yakupitiyage, A., Tongdee, N., Ponza, S. 1995. The microbiological and sensory quality of septage-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 132, 261–272.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441.

Ferreira, A. C. M., Silva, J. F. X., Cahú, T.B., Silva, J.F, Souza, K.S., Basílio Junior, I. D; Bezerra, R. S., Carvalho Junior, L.B. (2017). Recovery of proteins and lipids from tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing waste. Artigo a ser submetido à publicação.

Finney J., Buffo, R., Reineccius G. A. (2002). Effects of type atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*, 67, 1108–1114.

Foh, M.B.K.; Wenshui, X.; Amadou, I.; Jiang, Q. (2012). Influence of pH Shift on Functional Properties of Protein Isolated of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscles and of Soy Protein Isolate. *Food Bioprocess Technol*, 5, 2192–2200.

Forster, I. P.; Dominy, W. G. Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 37, n. 4, p. 474–480, 2006.

Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M, C., Bernhardt, D., Blasco, R., Pedroza-Islas, R., Hermida, L, G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. (2013) *Food Research International* ,52, 473–482

Gatti Junior, P.; Assunção, A.W.A.; Baldin, J. C.; Amaral, L.A. (2014). Microbiological quality of whole and filleted shelf-tilapia. *Aquaculture* 433, 196–200.

Gelman, A., Glatman, L., Drabkin, V., Harpaz, S. 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf-life of the pond-raised freshwater fish, silver perch (*bidyanus bidyanus*). *J. food prot.* 64, 1584–1591.

Gharsallaoui, A.; Roudout, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, Barking, v. 40, n 9, p. 1107-1121, nov. 2007.

Ghosh, S. K. Functional coatings and microencapsulation: A general perspective, in: Swapan Kumar Ghosh (Ed.) *Functional Coatings*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. pp. 1–28.

Giménez, B., Turnay, J., Lizarbe, M. A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. 2005. Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatine. *Food Hydrocolloids*, v.19, p. 941–950.

Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López- Caballero, M.E., Montero, M.P. (2011). Funcional and bioactive properties of collagen and gelatina from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25, 1813 -1827.

Grattard, N.; Salaun, F.; Champion, D.; Roudaut, G.; Le Meste, M. Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 67, n. 8, p. 3002-3010, 2002.

Grossman, S., & Bergman, M. (1992). Process for the production of gelatin from fish skins. US patent 5,093,474.

Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (6), 912–916.

Hongsprabhas, P., Kerdchouay, P., Sakulsom, P. Lowering the Maillard reaction products (MRPs) in heated whey protein products and their cytotoxicity in human cell models by whey protein hydrolysate. *Food Research International*, 44, 748–754, 2011.

Jamilah, B.; Tan, K.W.; Umi Hartina, M.R.; Azizah, A. (2011). Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids*, 25, 1256-1260.

Jamilah, B. e Harvinder, K.G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, v. 77, 81–84

Karim, A.; Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, p. 563–576.

- Khiari, Z.; Rico, D.; Martin-Diana, A. B.; Barry-Ryan, C. 2013. Comparison between gelatines extracted from mackerel and blue whiting bones after different pre-treatments. *Food Chemistry* 139, p. 347–354.
- Koli, J.M., Basu, S., Nayak, B.B., Patange, S.B., Pagarkar, A.U., Gudipati, V. Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). (2012). *Food and bioproducts processing*, 90, 555–562.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685.
- Martins, I. M.; Barreiro, M.F.; Coelho, M.; Rodrigues, A. E. (2014) Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 2014. 245, 191–200.
- Mbarki, R., Miloud, B. N., Selmi, S., Dhib, S., Sadoka, S. (2009). Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiology*, 26, 821–826.
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., Drusch, S. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, 2016. 194, 1208–1216.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., Duodu, K. G. (2004). Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatine. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 581-592.
- Ninan, G., Jose, J., & Abubacker, Z. (2011). Preparation and characterization of gelatina extracted from the skins of rohu (*Labeo rohita*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(2), 143-162.
- Niu, L., Zhou, X., Yuan, C., Bai, Y., Lai, K., Yang, F., Huang, Y. (2013). Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatina extracted with alkaline and different acid pretreatments. *Food Hydrocolloids*. 33, 336-341.
- Piacentini, E.; Giorno, L.; Marijana M. Dragosavac .Goran T. Vladislavljević, Richard G. Holdich. 2013. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification, *Food Research International*, 53, p. 362–372.
- Sardar, P., Abid, M., Randhawa, H.S., Prabhakar, S.K. Effect of dietary lysine and methionine supplementation on growth, nutrient utilization, carcass compositions and haemato-biochemical

status in Indian Major Carp, Rohu (*Labeo rohita* H.) fed soy protein-based diet. *Aquaculture Nutrition*, v. 15, n. 4, p. 339–346, 2009.

Silva, J.F.X. ; Ribeiro, K. ; Silva, J.F.; Cahú , T.B.; Bezerra, R.S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate (2014). *Animal Feed Science and Technology* 196, 96–106.

Shahidi, F.; Han, X. Encapsulation of food ingredients. (1993). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 501-547.

Shakila, R. J., Jeevithan, E., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., Sukumar, D. 2012. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT-Food Science and Technology* 48 (1), 30-36.

Sinthusamran,S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2015). Molecular characteristics and properties of gelatin from skin of seabass with different sizes Sittichoke. *International Journal of Biological Macromolecules*. 73, 146–153

Smith, P. K. , Krohn RI, Hermanson, G.T, Mallia, A.K, Gartner, F. H, Provenzano, M.D, Fujimoto E.K, Goetze, N. M, Olson. B. J, Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150, p. 76-86.

White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C. 1986. An evaluation of the Waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *J. Autom. Chem.* 8 (4), 170–177.

U.K. FEEDING STUFFS (SAMPLE AND ANALYSIS) REGULATIONS, 1982. The Determination of Oil in Feeding Stuffs, 1119, I, 9-11. Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 130.

### 3.3 EFEITOS DA MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY DRYING NAS ESTABILIDADES FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO HIDROLISADO E CONCENTRADO PROTEICO DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Ferreira, A. C. M.<sup>a</sup>; Silva, J. F. X.<sup>b</sup>; Nascimento, R.M.<sup>a</sup>, Cahú, T.B.<sup>a</sup>, Silva, V. C.<sup>c</sup>, Basílio Junior, I. D.<sup>c</sup>; Bezerra, R. S.<sup>a</sup>; Carvalho Junior, L.B<sup>a</sup>

#### **Resumo**

A secagem por spray drying é um processo único no qual transforma um produto líquido em seco através de corrente de gás quente. O presente estudo tem como objetivo produzir Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP) e Concentrado Proteico de Peixe (CPP), obtidos a partir dos resíduos da tilápia (*Oreochromis niloticus*) através de spray dryer. Os produtos sob a forma seca (HPPs, CPPs) foram armazenados em recipientes estéreis, escuros, com ausência de luz e monitorados periodicamente (0, 7,15, 22, 28, 35, 43, 52, 60 dias) através de análises microbiológicas, medição de TBARS, pH, coloração, composição centesimal e de aminoácidos. Após 60 dias de armazenamento, os HPPs e CPPs mantiveram-se livres de contaminação microbiológica com ausência de microrganismos mesófilos, *Salmonella spp*, Coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase-positiva, bolores e leveduras e *Pseudomonas aeruginosa*. HPPs e CPPs exibiram elevado teor nutricional com respectivamente 47,32 g/100g e 67,08 g/100g de proteína; 30,81 g/100g e 9,62 g/100g de lipídio; 25,26 g/100g e 19,94 g/100g de carboidrato e 2,88 g/100g e 4,13 g/100g de cinzas. Baixos níveis (0,32 e 0,18 mgMDA/Kg) de TBARS foram encontrados em ambos tratamentos. Os parâmetros de luminosidade variaram durante estocagem (87,974-87,748) para CPPs e (72,586-82,302) para HPPs e apresentaram aumento nos padrões de amarelecimento e vermelhidão. Os tamanhos das partículas dos HPPs e CPPs variaram respectivamente, entre (19-37 µm) e (18-30 µm). O MEV apresentou micropartículas irregulares com mossas, enrugadas e com superfícies côncavas. Estes resultados mostraram a eficácia da técnica de spray drying no microencapsulamento do CPP e HPP com conseqüente preservação e estabilidade atribuindo qualidade ao produto desenvolvido.

**Palavras chave:** resíduos do pescado, secagem, proteína, vida útil, micropartículas.

## 1. Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), é o segundo peixe de água doce mais cultivado no mundo, e o filé é o principal produto comercializado, produzindo 30-40% de peso úmido do peixe inteiro (Clement e Lovell, 1994). A carcaça corresponde cerca de 60-70% do peso corporal no processamento industrial da tilápia, e este resíduo é uma fonte potencial de moléculas bioativas que podem ser empregadas em diversos processos biotecnológicos, tais como, na preparação de hidrolisado de proteico de peixe (HPP) (Silva et al, 2014). O hidrolisado proteico obtido a partir de proteases produzem peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres, com aumento da digestibilidade do produto (Shahidi e Kamil, 2001). No entanto, durante o processo de hidrólise são formados peptídeos bioativos de cadeia curta que podem contribuir com o sabor amargo do hidrolisado proteico, além da alta higroscopicidade devido à liberação de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e higroscópicos, sendo desvantajosa sua utilização direta na alimentação (Shahidi e Venugopal, 1995; Yang et al., 2012).

Com isto, é indispensável a aplicação de uma tecnologia que reduza o sabor amargo no hidrolisado proteico de peixe, causado pelos peptídeos e resíduos de aminoácidos, que preserve as atividades biológicas e funcionais do produto final. A técnica de spray drying foi utilizada de modo eficaz e benéfico na redução do amargor desagradável e higroscopicidade originados no processo de produção de hidrolisados proteicos (J-J Ma et al., 2014; Favaro-Trindade, Santana, Monterrey-Quintero, Trindade e Netto, 2010).

A microencapsulação através de spray drying é um processo comercial de baixo custo que é utilizado principalmente para a encapsulação de fragrâncias, óleos e na secagem do leite (Gharsallaoui et al., 2007; Ghosh, 2006). O objetivo principal da microencapsulação é aprisionar um material de núcleo numa matriz envoltória que protege e confere propriedades únicas em termos de liberação controlada, solubilidade e resistência à umidade de micropartículas, além de evitar a evaporação de compostos voláteis (Martins et al. 2014; Ghosh, 2006).

O HPP é comumente utilizado na forma líquida e o spray drying é um dos métodos alternativos para conversão deste produto a pó que possui como vantagem a estabilidade aumentada (Abdul-Hamid et al., 2002). A remoção de água e diminuição da atividade de água, através da secagem por atomização garantem estabilidade microbiológica, além de evitar a possibilidade de degradações químicas ou biológicas, reduzir os custos de armazenamento e transporte e, obter um alimento com solubilidade instantânea e boa estabilidade do produto acabado (Gharsallaoui et al.,

2007). A microencapsulação através de secagem por atomização pode ser utilizada para proteger o conteúdo de agentes oxidativos, tais como, calor, luz, umidade, contato com outras substâncias e prolongar a vida de prateleira (Ghosh, 2006). O hidrolisado proteico de peixe em pó é uma alternativa ao uso da forma líquida e confere estabilidade ao produto, através do microencapsulamento por técnica de spray drying (Morales-Medina et al., 2016; Abdul-Hamid et al., 2002). A deterioração dos hidrolisado proteico de peixe pode ocorrer devido a veiculadores externos e fatores inerentes ao HPP, tais como: atividade de água, microrganismos, oxigênio, luz, degradação proteica, oxidação lipídica.

Para melhor ciência da pesquisa, devido à escassez e ausência de estudos prévios relacionados à microencapsulação de hidrolisados e concentrados proteicos de peixe, é de extrema importância encontrar uma abordagem técnica prática e econômica como meio de evitar a degradação e o gosto amargo derivado dos peptídeos. Com isto, o objetivo deste trabalho é promover a secagem do hidrolisado proteico de peixe e do concentrado proteico de peixe, com uso de spray dryer, prolongar sua vida útil, e conferir estabilidade físico-química e microbiológica aos produtos.

## **2. Material e Métodos:**

### **2.1. Hidrolisado Proteico de Peixe (HPP)**

Os resíduos (carcaça) de tilápia (*Oreochromis niloticus*), sem vísceras, foram obtidos de um fornecedor local. O material foi acondicionado em gelo e transportado ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ) da UFPE. A carcaça (restos de carne, pele e ossos) da tilápia foi submetida a hidrólise, a partir do método descrito por Silva et al. (2014). A carcaça e a alcalase a 0,5% (m/v), foram adicionadas a um liquidificador industrial e submetidas a trituração por 5 minutos. A mistura foi submetida a digestão em banho maria a 45 °C durante 180 minutos a 250 rpm. Após 180 minutos de hidrólise, a temperatura foi elevada para 100 ° C durante 10 minutos para interromper a reação enzimática. As frações de sólidos e líquidos foram separadas por filtração (malha: 1 mm<sup>2</sup>) e o filtrado definido como hidrolisado proteico de peixe (HPP).

## **2.2. Concentrado Proteico de Peixe (CPP)**

O HPP foi submetido a um processo de extração lipídica, através de separação mecânica e o sobrenadante denominado Concentrado Proteico de Peixe (CPP) (Ferreira et al., 2017). O CPP foi acondicionado em vidros estéreis autoclavados e armazenados em freezer sob temperatura de -26 °C para posterior secagem.

## **2.3. Spray drying**

O CPP e HPP foram transportados para Universidade Federal de Alagoas, onde foram secos por spray dryer (Buchi Mini spray dryer B-290), para obtenção do produto sob a forma pó (Ferreira et al. 2017). Após secagem, o Concentrado Proteico de Peixe seco (CPPs) e Hidrolisado Proteico de Peixe seco (HPPs) foram armazenados em vidros estéreis sob temperatura ambiente e ausência de luz para análises subsequentes.

## **2.4. Análises microbiológicas**

### **2.4.1. Mesófilos**

A análise de microrganismos mesófilos foi realizada de acordo com a metodologia padrão Português NP 4405 (2002) adaptado. HPP, CPP, HPPs e CPPs foram monitorados nos dias 0, 7, 15, 22, 28, 35, 43, 52, 60. O ensaio foi realizado por diluição em série de amostras de 500 mg de amostra com uma solução de 950µL (0,1% água de peptona a 0,9% p / v de solução de NaCl) e homogeneizadas sob condições estéreis em cabine de segurança biológica (Pachane PC 410). Alíquotas de 1 mL de cada amostra diluída foram coletadas e inoculadas em placas de Petri em triplicata. Em cada placa de Petri foi adicionada 15 ml de plate count agar (PCA, Standard Methods Agar Acumedia). As amostras foram homogeneizadas imediatamente através de rotações das placas de Petri, a fim de obter uma dispersão uniforme das colônias. Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa (TE 394 / 1 Tecnal) para avaliação de crescimento de mesófilos.

### **2.4.2. Microrganismos específicos**

A pesquisa de Bolores e leveduras, coliformes a 45 °C, estafilococos coagulase-positiva, *Salmonella spp* e *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada segundo metodologia AOAC (1995) 997.02, 926.24, 975.55, 967.26 e SMWW 9213, respectivamente, no Laboratório de Experimentação de Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição da UFPE.

## **2.5 Medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas como descrito por Buege e Aust (1978). Foram misturadas 100µl das amostras diluídas em 500µl de uma solução de TBA contendo ácido tiobarbitúrico a 0,375%, ácido tricloroacético a 15% e 0,25 N de HCl. As misturas foram aquecidas em banho maria durante 10 minutos para desenvolver uma cor rosa e na sequência centrifugadas a 3600G a 25 °C durante 20 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532nm. Uma curva padrão foi preparada com 1,1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP) e TBARS foram expressos em mg de malonaldeído / kg de amostra.

## **2.6 pH**

O pH foi monitorado durante os dias 1, 12, 24, 36, 48, 60 e determinado conforme as normas do Instituto Adolf Lutz (1985). Foram coletadas alíquotas de 1g de HPPs e CPPs, diluídas em 10 mL de água destilada. Para o HPP e CPP foram utilizados 10mL de cada amostra. Em seguida, o pH foi mensurado em diferentes intervalos de tempo, através da leitura direta em potenciômetro (Analon PM 608) previamente calibrado.

## **2.7. Cor**

A cor do HPPs e CPPs foi analisada a cada 7 dias (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63) através de colorímetro (Konica Minolta, modelo Chroma Meter CR - 400). Para a calibração do instrumento, utilizou-se uma placa de coloração branca como fundo para as medições, e os valores foram relatadas no sistema CIELab perfil de cor como L\* (luminosidade), mede a variação de luminosidade entre o preto (0) e branco (100), a\*(vermelho), define a cor vermelha para valores positivos e verde para valores negativos e b\* (cor amarela), define a cor amarela para valores positivos e azul para valores negativos. Para cada tratamento, as determinações foram efetuadas em cinco repetições e os resultados expressos como média.

## **2.8 Composição centesimal, composição de aminoácidos e ácidos graxos**

A composição centesimal (umidade, carboidratos, proteína bruta, extrato etéreo, cinzas) foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e Experimental, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (AOAC,1995,1996) nos dias 15 e 60. A

composição de aminoácidos e perfil de ácidos graxos foram realizadas em CBO Análises Laboratoriais (AOAC, 2005, método 996.06, White et al., 1986, pp. 170-177, Hagen et al., 1989, pp. 912-916).

## **2.9 Caracterização das micropartículas de CPPs e HPPs**

### **2.9.1. Tamanho e morfologia**

CPPs e HPPs foram fixados em stub de alumínio com fita de carbono dupla face e em seguida, metalizadas com ouro. Para a metalização foi utilizado um Q150T Turbo-Pumped Sputter Coater/Carbon Coate, onde as amostras ficaram expostas por 60 segundos a uma corrente de 20 mA. O tamanho e a morfologia das partículas foram realizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) Evo LS15 (Zeiss).

### **2.10 Gráficos e estatística**

Os dados foram analisados e calculados o desvio padrão. Para isto foi utilizado um programa com linguagem de programação de alto nível interpretada de tipagem dinâmica. Os gráficos foram plotados no python 3.6.0. Foram utilizadas as bibliotecas numphy, scipy e matplotlib. Este programa e as bibliotecas estão disponíveis gratuitamente.

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1. . Determinação microbiológica**

Os resultados das análises microbiológicas do HPPs e CPPs foram negativos para a contagem de mesófilos, Colifomes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella spp* e *Pseudomonas aeruginosa* e mantiveram-se livres de contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes após 60 dias de estocagem (Tabela 1). A contagem inicial de mesófilos, (dia 1) em HPP e CPP foi de  $2,1 \times 10^8$  UFC/mL e de  $1,29 \times 10^{11}$  UFC/mL, respectivamente, no entanto apresentaram-se negativos para Colifomes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella spp* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A existência de microrganismos em produtos destinados a alimentação indica o nível de segurança para seu consumo. Devido à alta perecibilidade da carne do pescado, seus produtos e subprodutos também estão susceptíveis a deterioração. HPP e CPP líquidos mostraram contaminação por microrganismos mesófilos, com respectivas contagens de  $2,1 \times 10^8$  e de  $1,29 \times 10^{11}$

UFC/ml no período de 1 dia de armazenamento a 37 °C, no entanto, o nível de contaminação não ultrapassou o padrão recomendado pela ICMSF (1986) (tabela 1). Esses resultados corroboram com os encontrados por Bueno-Solano et al. (2009) que relatou 1730 UFC / g na contagem total. No entanto, o HPPs e CPPs não apresentaram contaminação por mesófilos. A atividade de água é um fator crucial na presença de microrganismos e a não contaminação pode ser explicada devido ao processo de secagem por spray dryer. Segundo Favaro-Trindade et al. (2010), valores de atividade de água menor que 0,6 são recomendados para garantir estabilidade microbiológica dos produtos atomizados. A secagem por pulverização é utilizada na indústria de alimentos por reduzir a atividade de água, e assegurar estabilidade microbiológica aos produtos, bem como evitar o risco de degradações químicas ou biológicas por reduzir a atividade de água (Gharsallaoui et al. 2007).

Bueno-Solano et al. (2009), reportaram resultados negativos para *Pseudomonas aeruginosa*, coliformes 45 °C, *Salmonella spp*, *Staphylococcus coagulase* positiva e fungos em hidrolisado de resíduo de camarão seco por técnica de spray drying. Os hidrolisados e concentrados (HPP, CPP, HPPs e CPPs) sob as formas líquidas e em pó não apresentaram contaminação por microrganismos patogênicos. A maior parte da literatura disponível sobre peixes de água doce (tilápia, truta arco-íris, perca de prata) relata contagens bacterianas de 102-106 UFC / g (Gelman et al., 2001). O tratamento térmico de peixes marinados constitui o método mais apropriado para destruir microrganismos patogênicos (Kilinc et al., 2005). A técnica de spray drying utiliza temperaturas elevadas durante o processo de secagem. Segundo, Ghosh (2006), na microencapsulação por spray dryer, o material de núcleo é disperso em uma solução com polímero e atomizado em uma câmara de secagem com temperatura elevada.

Tabela 1. Determinação microbiológica dos CPP, HPP, HPPs e CPPs

Produto	Mesófilos (UFC/ml)	Coliformes a 45 °C	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	<i>Salmonella</i> spp	Bolores e Leveduras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HPP <sup>a</sup>	2,1x10 <sup>8</sup>	< 3.0	< 10	Ausência	< 10	< 1.1
CPP <sup>a</sup>	1,29x10 <sup>11</sup>	< 3.0	< 10	Ausência	< 10	< 1.1
15 dias						
HPPs <sup>b</sup>	-	< 3.0	< 10	Ausência	< 10	< 1.1
CPPs <sup>b</sup>	-	< 3.0	< 10	Ausência	< 10	< 1.1
60 dias						
HPPs	-	< 3.0	< 10	Ausência	< 10	< 1.1
CPPs	-	< 3.0	< 10	Ausência	< 10	< 1.1

<sup>a</sup>: Hidrolisado Proteico de Peixe, Concentrado Proteico de Peixe;

<sup>b</sup>: Hidrolisado Proteico de Peixe seco, Concentrado Proteico de Peixe seco

UFC/ml: unidade formadora de colônia por mililitro

NMP: Número Mais Provável. Resultados expressos em <10 CFU / g e < 3.0 MPN / g, representa ausência de crescimento considerando o limite dos métodos.

(-): Não detectado.

### 3.2. Composição centesimal, composição de aminoácidos e ácidos graxos

A proteína bruta, lipídeos, carboidratos e cinzas são apresentados na tabela 2 e expressos em matéria seca. O teor de umidade está relacionado a atividade de água e as temperaturas elevadas empregadas durante o processo de secagem por pulverização nas amostras. O concentrado proteico de peixe seco e hidrolisado proteico de peixe seco apresentaram baixo teor de umidade com 3.96% e 6.29%, respectivamente. Abdul-Hamid et al. (2002) reportaram 3,93% de umidade em hidrolisado de tilápia preta em pó, similar ao HPPs descrito neste trabalho.

A composição centesimal dos HPPs e CPPs apresentou elevado teor de proteína com (47,84-47,32%) e (70,22-67,08%) respectivamente. O conteúdo de proteínas foi superior aos descritos por alguns autores (Abdul-Hamid et al., 2002) em hidrolisados de tilápia preta (49,60% – 37,7%). O teor de extrato etéreo do HPPs (26,06-30,81%) foi superior ao CPPs (3,20-9,62%) devido ao processo de extração de lipídeos. Similares resultados foram encontrados por Silva et al. (2014) em HPP de tilápia (37,4%). O teor de cinzas do HPPs (2,88%) e CPPs (4,13%) foram inferiores aos descritos por Foh et al. (2012) em isolados proteicos de tilápia (4,53%). Silva et al. (2014) relataram matéria mineral de 2,67% em HPP de tilápia. Conforme Cho et al. (1985), a boa qualidade da dieta para os organismos aquáticos deve conter teor de cinzas inferior a 13%, que demonstra que os HPPs e CPPs são excelentes ingredientes substitutos à farinha de peixe na alimentação de organismos aquáticos. Os teores de carboidratos encontrados (25,26%) para HPPs e (19,94%) para CPPs é justificado, devido a presença do material de parede (maltodextrina) utilizado na formulação das emulsões realizadas para microencapsulação do HPP e CPP. Resultados superiores (49,6%) foram descritos por Abdul-Hamid et al. (2002), o que evidencia a variação de percentual de maltodextrina no preparo das emulsões. Este estudo priorizou quantidade de proteína máxima possível à microencapsulação, isto explica o menor conteúdo de carboidrato nas composições.

A composição de ácidos graxos do CPPs e HPPs estão representados nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Os ácidos oleicos continham 29,1 g/kg (CPPs), 104,2 g/kg (HPPs) e linoleicos com 9,2 g/kg (CPPs), 14,2 g/kg (HPPs) representam o maior percentual dos ácidos graxos insaturados. O conteúdo de ácidos graxos saturados do CPPs e HPPs foram 4,68 e 15,64 g/100g respectivamente, e apresentaram-se predominantemente o ácido mirístico (C14: 0) 11,5 g / kg (HPP), 3,4 g / kg (CPP), ácido esteárico (C18:0), 29,5 g/kg (HPP), 9,9 g/kg (CPP) e palmítico (C16: 0), 31,0 g/kg (CPPs), 99,7 g/kg (HPPs). Os ácidos linoleicos e oleicos representam o maior

percentual presentes no HPPs e CPPs. Os conteúdos de ácidos graxos polinsaturados do HPPs e CPPs foram 19,5 e 12,8 g / kg, com predominância de ácido linoleico (C18: 2n-6), 9,2 g/kg (CPPs), 14,2 g/kg (HPPs), e alfa-linolênico-GLA (C18: 3n3), 1 g / kg (CPPs) e 0,8g / kg (HPPs). Além disso, foi encontrado ômega-3 com valores de 1g / kg (CPPs), 0,6 g / kg (HPPs), ômega-6, 11,8 g / kg (CPPs), 16,4 g / kg (HPPs) e ômega-9, 30,5 g / kg (CPPs), 109,6 g / kg (HPPs). Os ácidos graxos poliinsaturados trazem benefícios à saúde humana. Segundo, alguns autores (Menegazzo et al 2014; Gallardo et al.; 2013) os do ácidos do grupo ômega-3 mais importantes são o ácido alfa-linolênico (ALA, C18: 3), ácido eicosapentaenóico (EPA, C20: 5) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6), presentes em óleos de peixes.

O valor nutricional de um alimento depende do tipo e quantidade de aminoácidos disponíveis para o funcionamento do organismo. A soma total de aminoácidos no HPPs e CPPs foram 44,85% e 64,59%, respectivamente. Os aminoácidos mais presentes no HPPs e CPPs foram respectivamente, o ácido glutâmico (6,33% e 9,18%), seguidos de glicina (5,80% e 7,24%). Dentre os aminoácidos essenciais encontrados em maior concentração nos HPPs e CPPs estão, respectivamente: leucina - 3,14% e 4,56%; lisina – 3,40% e 5,63%; valina – 1,82% e 2,66% (tabela 5). Segundo Abdul-Hamid et al. (2002) temperaturas elevadas submetidas ao hidrolisado no processo de secagem por pulverização pode ocasionar redução significativa no teor de aminoácidos. Os valores de histidina e metionina foram respectivamente, (0,91% e 0,92%) (HPPs) e (1,37% e 1,68%) (CPPs). O conteúdo de aminoácidos essenciais e não essenciais foi superior aos relatados por (Abdul-Hamid et al., 2002) em hidrolisado pó de tilápia preta. Os aminoácidos histidina, metionina e cisteína são muito importantes para a atividade de eliminação de radicais livres dos peptídeos devido às suas estruturas especializadas (Chalamaiah et al., 2012), sendo relatada alta atividade antioxidantes devido a presença de histidina (Bougatef et al., 2010).

Tabela 2. Composição centesimal do HPPs e CPPs (DM basis)

Produto	Umidade	Proteína		Cinzas	Carboidratos
	Voláteis	Bruta	Extrato Etéreo		
15 dias					
HPPs <sup>a</sup>	0,52	47,84	26,06	2,82	23,28
CPPs <sup>a</sup>	3,25	70,22	3,20	3,60	22,98
60 dias					
HPPs <sup>a</sup>	3,96	47,32	30,81	2,88	18,99
CPPs <sup>a</sup>	6,29	67,08	9,62	4,13	19,17

<sup>a</sup>Hidrolisado Proteico de Peixe seco, Concentrado Proteico de Peixe seco

Tabela 3. Composição de ácidos graxos do concentrado proteico de peixe seco (%)

Ácidos Graxos	CPPs
Ácido Mirístico (C14:0)	0,34
Ácido Miristoleico (C14:1)	0,05
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,06
Ácido Palmítico (C16:0)	3,10
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,57
Ácido Margárico (C17:0)	0,11
Ácido Esteárico (C18:0)	0,99
Ácido Oleico (C18:1n9c)	2,91
Ácido Linoleico (C18:2n6c)	0,92
Ácido Gama-Linolênico GLA (C18:3n6)	0,07
Ácido Alfa Linolenico LNA (C18:3n3)	0,10
Ácido Araquídico (C20:0)	0,09
Ácido Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	0,13
Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienóico (C20:3n6)	0,07
Ácido Araquidônico AA (C20:4n6)	0,12
Gordura Monoinsaturada	3,66
Gordura Poli-insaturada	1,28
Gorduras Insaturadas	4,94
Gorduras Saturadas	4,68
Ômega 3	0,10
Ômega 6	1,18
Ômega 9	3,05

Tabela 4. Composição de ácidos graxos do hidrolisado proteico de peixe seco (%)

Ácidos Graxos	HPPS
Ácido Caprónico (C6:0)	0,34
Ácido caprílico (C8:0)	0,05
Ácido Cáprico (C10:0)	0,04
Ácido Láurico (C12:0)	0,04
Ácido Mirístico (C14:0)	1,15
Ácido Miristoleico (C14:1)	0,17
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,24
Ácido Palmítico (C16:0)	9,97
Ácido Palmitoleico (C16:1)	2,13
Ácido Margárico (C17:0)	0,39
Ácido Esteárico (C18:0)	2,95
Ácido Elaidico (C18:1n9t)	0,03
Ácido Oleico (C18:1n9c)	10,42
Ácido Linoleico (C18:2n6c)	1,42
Ácido Gama-Linolênico GLA (C18:3n6)	0,08
Ácido Alfa Linolenico LNA (C18:3n3)	0,08
Ácido Araquídico (C20:0)	0,21
Ácido Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	0,42
Ácido Heneicosenóico (C21:0)	0,04
Ácido cis-11,14- Eicosadienóico (C20:2)	0,11
Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienóico (C20:3n6)	0,06
Ácido Araquidônico AA (C20:4n6)	0,08
Ácido Behenico (C22:0)	0,09
Ácido Erúxico (C22:1n9)	0,04
Ácido Tricosanóico (C23:0)	0,04
Ácido Lignocérico (C24:0)	0,09
Ácido Nervonico (C24:1n9)	0,05
Ácido Docosahexaenóico DHA (C22:6n3)	0,07
Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienóico	0,02
Gordura Monoinsaturada	13,22
Gordura Poli-insaturada	1,95
Gorduras Insaturadas	15,18
Gorduras saturadas	15,64
Gorduras Trans	0,03
Ômega 3	0,06
Ômega 6	1,64
Ômega 9	10,96

Tabela 5. Composição dos aminoácidos do hidrolisado proteico de peixe seco e concentrado proteico de peixe seco (DM basis).

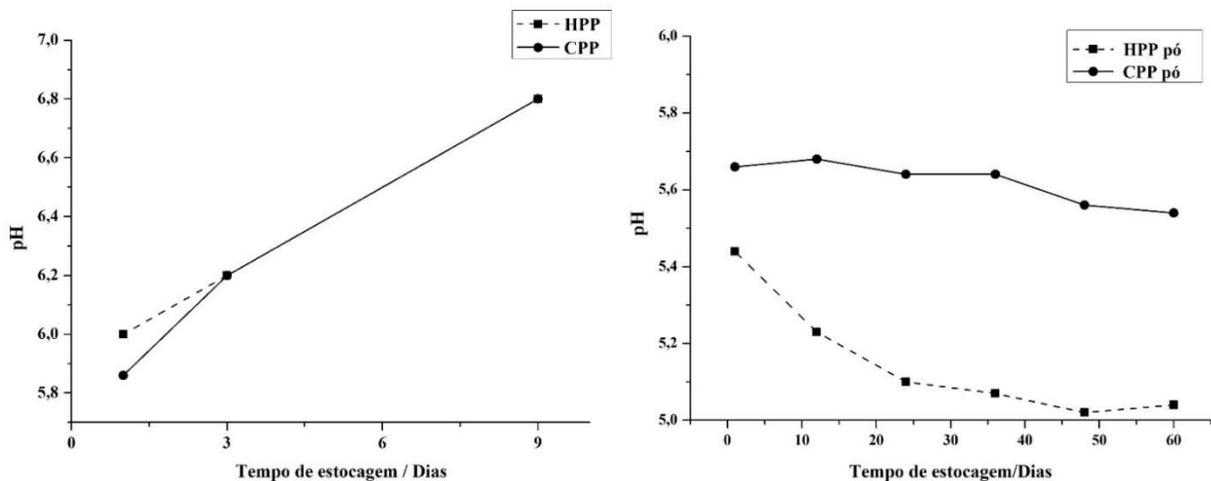
Aminoácidos (%)	HPPs	CPPs
<i><b>Não essencial</b></i>		
Ácido Aspártico	3,93	5,67
Ácido Glutâmico	6,33	9,18
Serina	1,89	2,76
Glicina	5,80	7,24
Taurina	0,42	0,60
Arginina	3,25	4,69
Alanina	3,40	4,75
Prolina	3,41	4,34
Tirosina	1,03	1,72
<i><b>Essencial</b></i>		
Valina	1,82	2,66
Metionina	0,92	1,68
Cistina	0,21	0,45
Isoleucina	1,64	2,38
Histidina	0,91	1,37
Treonina	1,79	2,62
Leucina	3,14	4,56
Fenilalanina	1,56	2,29
Lisina	3,40	5,63

### 4.3. pH

Os valores de pH encontrados foram (6.0, 6.2 e 6.8) (HPP) e (5.86, 6.2 e 6.8) (CPP), nos dias 01, 03 e 09, respectivamente. HPPs e CPPs apresentaram ligeira redução de pH após 60 dias de armazenamento (Fig. 1). Os valores de pH do CPPs e HPPs mantiveram-se na faixa de 5,02 e 5,68. O aumento do pH está relacionado a degradação do pescado. Zhou et al. (2014) relataram que pH próximo a neutralidade podem maximizar a atividade de enzimas proteolíticas e um pH mais baixo reduz a taxa de degradação durante o processo de fermentação.

O CPPs apresentou pH ligeiramente superior ao HPPs. Isto pode ser explicado devido a formulação do CPPs possuir teor mais elevado de proteína quando comparado ao HPPs. No entanto, os pHs do HPP (6.0, 6.2, 6.8) e CPP (5.86, 6.2, 6.8) nos dias 1, 3 e 9, respectivamente apresentaram-se mais elevados e aumentaram no decorrer do tempo. A produção de amônia pela desaminação bacteriana de aminoácidos foi considerada motivo de aumento do pH em sardinhas marinadas estragadas (Klinc et al., 2005).

Figura 1: pH do hidrolisado proteico de peixe (HPP), concentrado proteico de peixe (CPP), hidrolisado proteico de peixe seco (HPP pó) e concentrado proteico de peixe seco (CPP pó)



#### 4.4. Cor

As figs. 2 e 3 apresentam os valores para os parâmetros de cor durante 70 dias de armazenamento do HPPs e CPPs. Foram demonstrados aumento nos valores de amarelecimento HPPs ( $b * 21.192$ ), CPPs ( $b * 17.462$ ) e vermelhidão HPPs ( $a * -1.108$ ), CPPs ( $a * -1.692$ ) ao fim do período de estocagem. O CPPs apresentou menos variação no padrão de luminosidade ( $L * 87,974-87,748$ ) quando comparado ao HPPs ( $L * 72,586-82,302$ ).

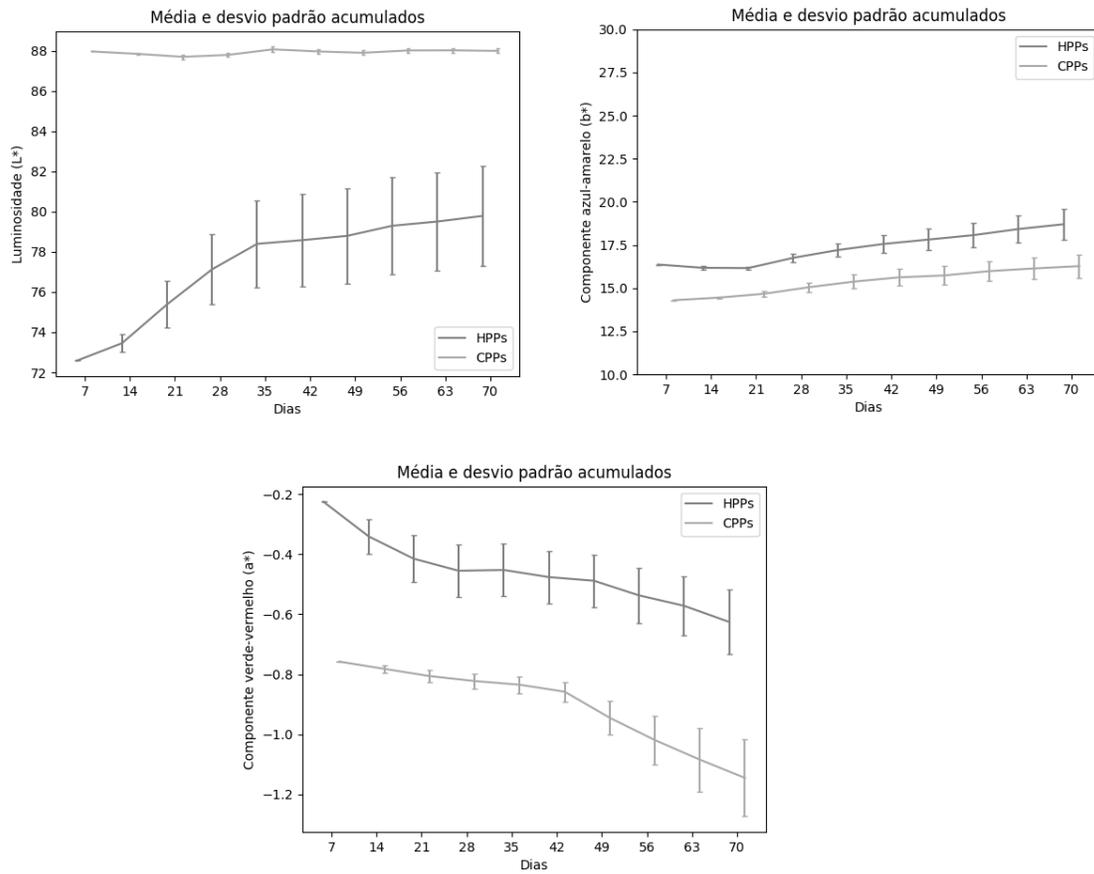
A luminosidade do HPPs e CPPs apresentou aumento no decorrer de 70 dias de armazenamento. O CPPs apresentou valores superiores ao HPPs. Isto pode ser explicado pela ausência de gordura e pela concentração de maltodextrina que possui coloração branca. Resultados similares foram descritos por Kha et al. (2010) que relataram que o aumento da concentração de maltodextrina representa aumento na luminosidade  $L^*$ . Os valores mais elevados de  $L^*$  podem ser

atribuídos à retenção de tecido conjuntivo. Resultados semelhantes foram encontrados por Foh et al. (2011).

O parâmetro  $a^*$  apresentou aumento significativo de -0.226 no dia 0 para -1.108 no HPPs e de -0.758 para -1.692 no CPPs. Isto demonstra uma intensificação na tonalidade verde, considerando os valores negativos. Estes resultados diferem dos descritos por Bueno-Solano et al. (2009) que apresentaram valores positivos em hidrolisado proteico de camarão seco por spray drying. Em relação ao parâmetro  $b^*$ , não houve diferença significativa das amostras durante o tempo e a tonalidade amarela foi evidenciada devido os valores positivos.

HPPs e CPPs apresentaram aumento de ( $a^*$ ) ao longo do armazenamento e não apresentaram degradação de proteínas. A ligeira diminuição do parâmetro verde-vermelho ( $a^*$ ) é atribuída à degradação das hemoproteínas em hidrolisados proteicos (Choi e Park, 2002). HPPs e CPPs apresentaram aumento para o parâmetro ( $b^*$ ) ao longo da estocagem. Aumento no amarelecimento ( $b^*$ ) pode ser atribuído a maior retenção de lipídios (Fig. 3). Thanonkaew et al. (2006) relataram que os radicais livres e os compostos carbonilos, produzidos a partir da oxidação dos ácidos graxos insaturados nas membranas celulares, podem reagir com grupos amino livres em proteínas com a subsequente condensação a pigmentos poliméricos marrons.

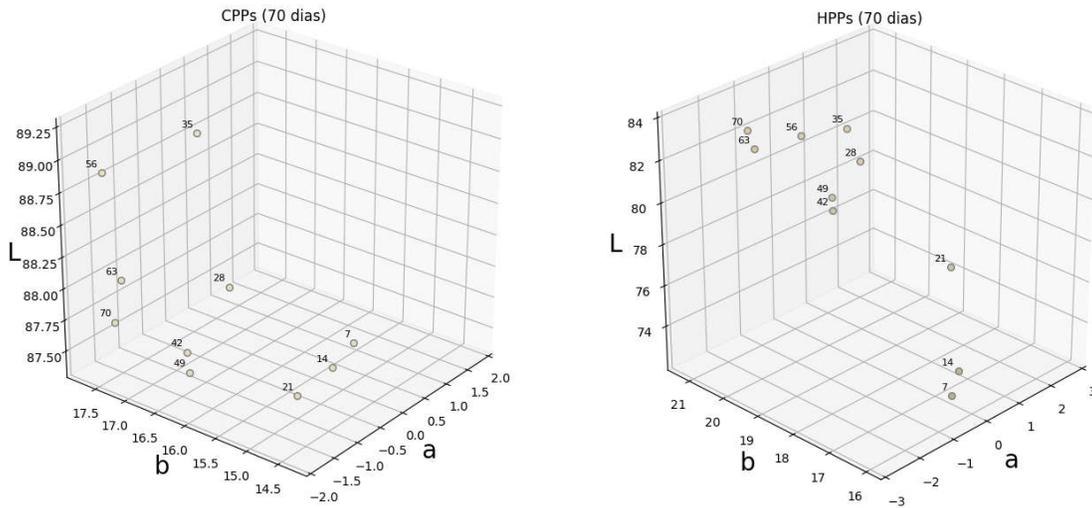
Figura 2: Luminosidade ( $L^*$ ), componente verde-vermelho ( $a^*$ ) e componente azul-amarelo do HPPs e CPPs.



HPPs: Hidrolisado proteico de peixe seco

CPPs: Concentrado proteico de peixe seco

Figura 3: Parâmetros luminodidade ( $L^*$ ), componente verde-vermelho ( $a^*$ ) componente azul-amarelo ( $b^*$ ) do HPPs e CPPs.



HPP: Hidrolisado proteico de peixe

CPP: Concentrado proteico de peixe

#### 4.5. Medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados obtidos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produtos secundários de oxidação lipídica, estão expressos na Fig. 4. A dosagem de mgMDA/kg do HPPs (0,53-0,32 mgMDA/kg) e CPPs (0,21-0,18 mgMDA/kg) apresentaram variações durante os 56 dias de armazenamento. Contudo estes valores não representam oxidação. Binsi et al. (2017) relataram valores de 1,03 e 0,92 mgMDA/kg em óleo de peixe microencapsulado. O alimento pode ser deteriorado durante o armazenamento através de processos oxidativos dos ácidos graxos. A oxidação lipídica pode reduzir a vida de prateleira e tornar o produto impróprio para o consumo. Esse fenômeno é uma das principais reações que ocorre na deterioração e causa perda de qualidade de alimentos com sabor desagradável do músculo do peixe (Karlsdottir et al., 2014; Thiansilakul et al., 2010) e uma causas é atribuída a proteína heme como catalisadora do processo (Yarnpakdee et al., 2012). Morales-Medina et al. (2016) descreveram teor de hidroperóxido ( $114 \pm 18$  a  $136 \pm 17$  mmol/kg) em micropartículas de óleo contendo hidrolisados proteicos de sardinha (*Sardina pilchardus*) e carapau (*Trachurus mediterraneus*).

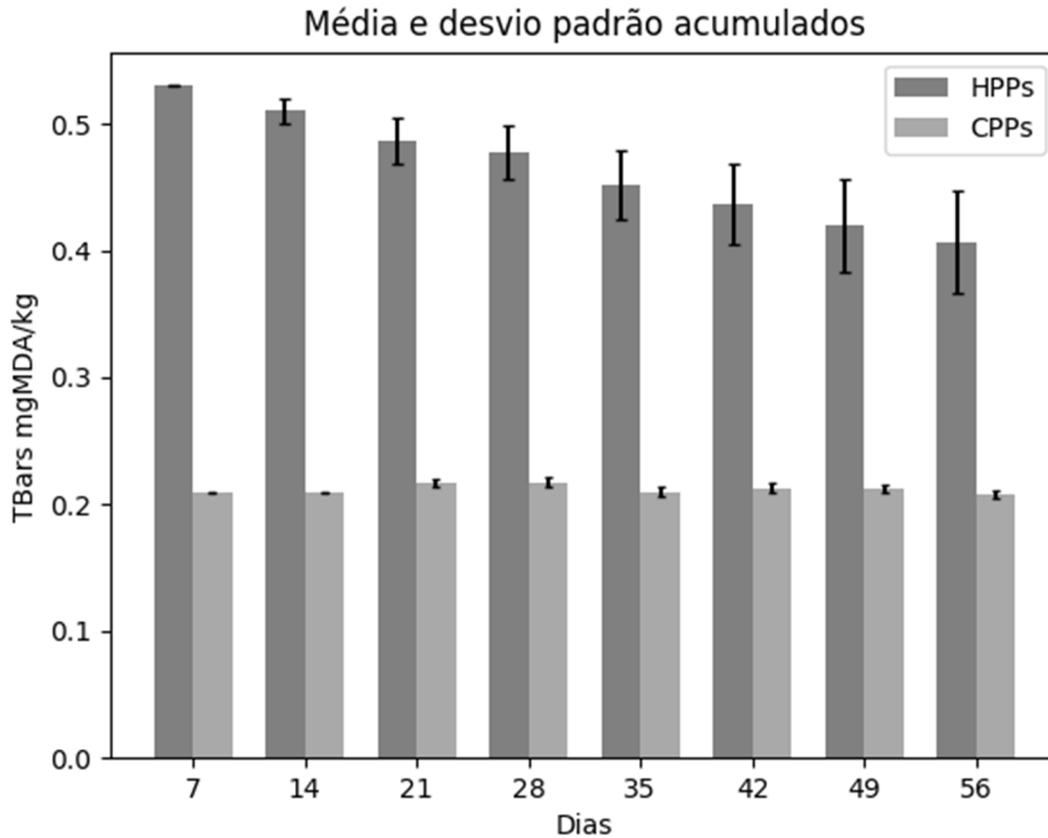
Gharsallaoui et al. (2007), descreveram que a encapsulação de alimentos, tem por objetivo, proteger uma substância sensível na cápsula ou na parede, isolando fisicamente o ingrediente do meio ambiente. Segundo Serfert et al. (2009), a oxidação lipídica pode ocorrer no processo de microencapsulação devido à homogeneização das emulsões e a temperatura imposta à secagem.

Um baixo teor de lipídeos é desejável de modo a diminuir a oxidação. Uma maior estabilidade oxidativa do CPPs foi observada quando comparado ao HPPs. Gharsallaoui et al. (2007), relataram que substâncias como maltodextrina, goma arábica e gelatina, são consideradas totalmente adequadas para microencapsulação, pelo fato de possuírem a propriedade de proteção da substância ativa contra oxidação e deterioração, além apresentarem baixa viscosidade com alto teor de sólidos e boa solubilidade. Grattard et al. (2002) verificou que o agente encapsulante maltodextrina mostrou-se eficiente para evitar oxidação de óleo de linhaça.

Morales-Medina et al. (2016) reportaram oxidação lipídica nas micropartículas contendo hidrolisados proteicos de sardinha (*Sardina pilchardus*) e carapau (*Trachurus mediterraneus*). Durante o armazenamento ocorreu aumento nos valores de TBARS em hidrolisado proteico de tilápia seco por liofilização e preparados com carne fresca e após 18 dias de armazenamento no gelo (Yarnpakdee et al., 2012). A oxidação lipídica é acelerada por temperaturas elevadas e tem como substrato principal os fosfolípidos de membrana, susceptíveis à oxidação (Yarnpakdee et al., 2012). Devido à instabilidade oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, a maioria dos produtos alimentares contendo óleo utiliza a microencapsulação por spray-dried para garantir a estabilidade e evitar características organolépticas indesejáveis (Barrow et al., 2007).

É conhecido que micropartículas secas por pulverização são resistentes à deterioração oxidativa (Gharsallaoui et al., 2007). Os radicais livres são consumidos através de reações de ligação com as proteínas e promovem ação antioxidante, além de retardar a oxidação de lipídeos (Morales-Medina et al., 2016). Os hidrolisados proteicos derivados de proteínas de peixe foram relatados como antioxidantes na literatura (Jemil et al, 2014; You et al., 2010, Bougateg et al., 2010). O lipídeo é protegido quando aminoácidos disponíveis no hidrolisado são mais oxidáveis que os ácidos graxos insaturados (Morales-Medina et al., 2016). Assim, a oxidação dos lipídios foi evitada através da microencapsulação por spray-drying, apesar da presença de aminoácidos lábeis à oxidação presentes no HPPs e CPPs.

Figura 4: Medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do hidrolisado proteico de peixe seco (HPPs) e concentrado proteico de peixe seco (CPPs)



#### 4.6. Tamanho e morfologia das micropartículas

No MEV foi visualizado na maioria das vezes aglomerados de micropartículas. Os tamanhos das partículas variaram com valores entre (19-37  $\mu\text{m}$ ) para HPPs e (18-30  $\mu\text{m}$ ) para CPPs. O MEV apresentou micropartículas irregulares com mossas, enrugadas e com superfícies côncavas, característico de partículas de material seco por técnica de spray drying.

As partículas de CPPs e HPPs apresentam uma superfície contínua, arredondada com a formação de poucas concavidades e raros encolhimentos (Figs. 5; 6). Isto pode ser devido ao tempo de estocagem e a pressão das micropartículas que favorecem a formação de mossas. Micropartículas arredondas, irregulares com presença de mossas, enrugadas e com superfícies côncavas são características de partículas de material seco por técnica de spray-dried. Isto é comum em micropartículas de produtos atomizados segundo alguns autores (Gallardo et al. 2013, Favaro-Trindade et al., 2010). Estes resultados são similares aos microencapsulados descritos por

(Caliskan, 2013) em extratos de sumac, (Gallardo et al. 2013) em óleo de linhaça, (Favaro-Trindade et al., 2010) em hidrolisado de caseína, (J-J Ma et al., 2014) em hidrolisado concentrado de proteína de leite, (Yang et al., 2012) em hidrolisado proteico de soro de leite, contudo as micropartículas deste trabalho apresentaram-se mais lisas e com menos irregulares. Por outro lado, Finney et al. (2002) relataram que superfícies mais lisas e menor encolhimento das partículas são alcançadas com uso de temperatura de entrada mais elevadas quando comparadas as de temperatura inferior, o que mostra que a temperatura utilizada neste trabalho foi ideal para formação deste tipo de partícula.

Yang et al. (2012) relataram poros na superfície de algumas partículas de hidrolisado do soro do leite encapsulado. As micropartículas do CPPs e HPPs não continham porosidade em sua morfologia, contudo foi evidenciado partículas fragmentadas e abertas com conteúdo encapsulado que sugere que estas micropartículas pertencem a matriz envoltória utilizada na microencapsulação.

A figura 5 demonstra os tamanhos das micropartículas entre (19-37  $\mu\text{m}$ ) para HPPs. Foram observadas partículas de (18-30  $\mu\text{m}$ ) de diâmetro no CPPs (Figura 6). Gallardo et al. (2013) observaram valores similares aos descritos neste trabalho. No entanto, as partículas produzidas neste estudo apresentaram dimensões inferiores as reportadas por Finney et al (2002) que compreenderam tamanhos entre 35 e 77  $\mu\text{m}$ . Segundo Ghosh (2006), a técnica de spray drying fornece tamanho de microcápsulas que compreendem de 5–5000  $\mu\text{m}$ . No entanto, Gharsallaoui et al (2007) descrevem partículas na ordem de diâmetro 1-100  $\mu\text{m}$  durante o processo inicial de secagem.

Figura. 5: Fotomicrografias MEV das micropartículas de concentrado proteico de peixe seco

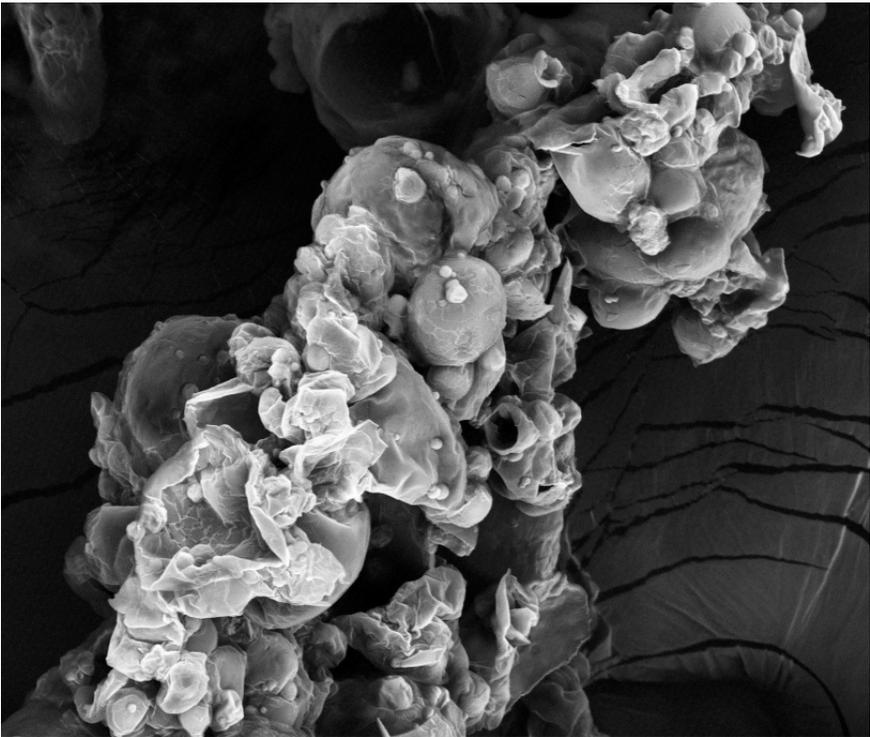
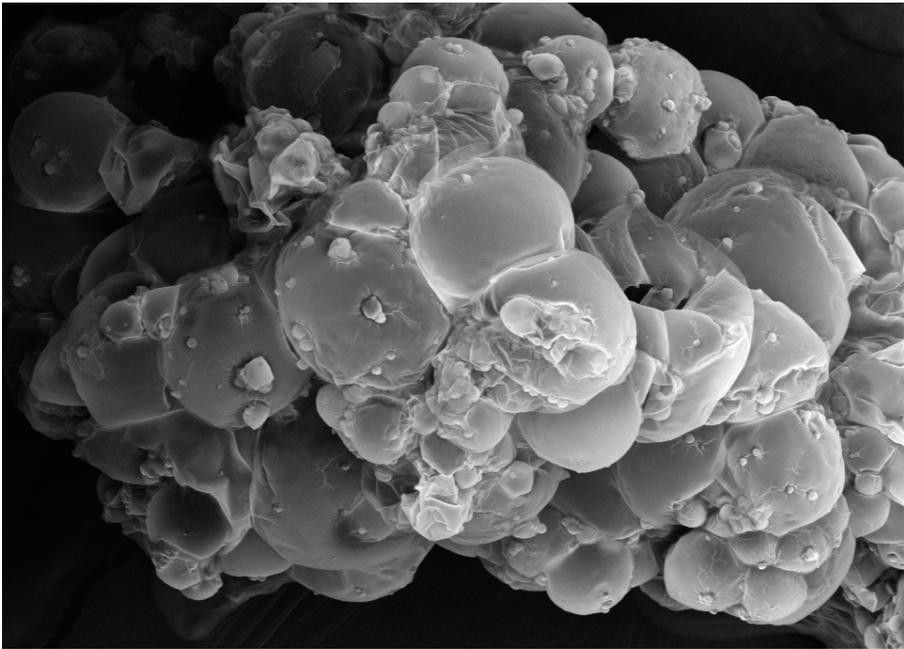


Figura 6: Fotomicrografias MEV das micropartículas de hidrolisado proteico de peixe seco



## 5. Conclusões

A ausência de bactérias patogênicas e de microrganismos mesófilos foi demonstrado nos HPPs e CPPs durante 60 dias de armazenamento. HPPs e CPPs não apresentaram oxidação lipídica após 56 dias. HPPs e CPPs exibiram elevado teor de proteína (70,22% e 47,84%). Os valores de histidina e metionina foram respectivamente, (0,91% e 0,92%) (HPPs) e (1,37% e 1,68%) (CPPs). Os conteúdos de ácido linoleico encontrados foram 9,2 g/kg (CPPs) e 14,2 g/kg (HPPs). Além disso, foi encontrado a presença de ômega-3, 6 e 9 nos dois produtos. Com isto, a técnica de spray drying apresentou eficiência como método de microencapsulação para o HPP e CPP e promoveu a extensão da vida útil dos produtos com a permanência de teores elevados de suas biomoléculas (proteína e lipídeo), passível de ser utilizado na indústria de alimentos fortificados.

## 6. Referências

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

Association of Official Analytical Chemists, 2005. In *Official Methods of Analysis of AOAC*, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg.

Association of Official Analytical Chemists, 1995a. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 991.20)*, 33. A.O.A.C., Arlington, pp. 10–12.

Association of Official Analytical Chemists, 1995b. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 920.39)*. A.O.A.C., Arlington, pp. 10–12.

Association of Official Analytical Chemists, 1996. In *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 926.12)*, 33. A.O.A.C., Arlington, pp. 5.

Binsi, P.K.; Nayak, N.; Sarkar, P.C., Jeyakumari, A., Muhamed Ashraf, P., Ninan, G., Ravishankar, C.N. Structural and oxidative stabilization of spray dried fish oil microencapsulates with gum arabic and sage polyphenols: Characterization and release kinetics, *Food Chemistry* 219, 158–168, 2017.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559–565.

Bueno-Solano, C. et al. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, v. 112, n. 3, p. 671–675, 2009.

Caliskan, G.; Dirim, S. N. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioproducts Processing*, Rugby, v. 91, n. 4, p. 539-548, oct. 2013

Cheng, Z. J.; Hardy, R. W.; Usry, J. L. (2005). Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture*, v. 215, n. 1–4, p. 255–265, 2003.

Cho, C. Y.; Cowey, C. B.; Watanabe, T. *Finfish nutrition in Asia: Methodological approaches to research and development*. International Development Research Center, p. 154, 1985.

Choi, Y. L., & Park, J. W. (2002). Acid-aided protein recovery from enzyme-rich Pacific whiting. *Journal of Food Science*, 67(8), 2962–2967.

Fávaro-Trindade, C.S., Santana, A.S., Monterrey-Quintero, E.S., Trindade, M.A., Netto, F.M. 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24, 336–340.

Ferreira, A. C. M.; Silva, J. F. X.; Cahú, T.B.; Basílio Junior, I. D.; Bezerra, R. B.; Carvalho Junior, L.B. (2017). Recuperação de proteínas e lipídeos dos resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Artigo a ser submetido à publicação.

Finney J., Buffo, R., Reineccius G. A. (2002). Effects of type atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*, 67, 1108–1114.

Foh, M.B.K.; Wenshui, X.; Amadou, I.; Jiang, Q. (2012). Influence of pH Shift on Functional Properties of Protein Isolated of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscles and of Soy Protein Isolate. *Food Bioprocess Technol*, 5, 2192–2200.

Forster, I. P.; Dominy, W. G. Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 37, n. 4, p. 474–480, 2006.

Gallardo, G.; Guida, L.; Martinez, V.; López, M, C.; Bernhardt, D.; Blasco, R.; Pedroza-Islas, R.; Hermida, L, G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. (2013) *Food Research International* ,52, 473–482

Gelman, A., Glatman, L., Drabkin, V., Harpaz, S. 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf-life of the pond-raised freshwater fish, silver perch (*bidyanus bidyanus*). *J. food prot.* 64, 1584–1591.

Gharsallaoui, A.; Roudout, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, Barking, v. 40, n 9, p. 1107-1121, nov. 2007.

Ghosh, S. K. Functional coatings and microencapsulation: A general perspective, in: Swapan Kumar Ghosh (Ed.) *Functional Coatings*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. pp. 1

Grattard, N.; Salaun, F.; Champion, D.; Roudaut, G.; Le Meste, M. Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 67, n. 8, p. 3002-3010, 2002.

Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (6), 912–916.

Jemil, I, Jridi, M, Nasri, R, Ktari, N, Salem, R, B, S-B, Mehiri, M; Hajji, M; Nasri, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* 49 (2014) 963–972

- ICMSF, 1986. International commission on microbiological specifications for foods, sampling plans for fish and shellfish. In: *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*, second ed. 2. University of Toronto Press, Toronto, pp. 181–196.
- Karlsdottir, M. G., Arason, S., Kristinsson, H. G., & Sveinsdottir, K. (2014) The application of near infrared spectroscopy to study lipid characteristics and deterioration of frozen lean fish muscles. *Food Chemistry*, 159, 420-427.
- Kha, T. C.; Nguyen, M. H.; Roach, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, v. 98, n. 3, p. 385–392, 2010.
- Ma, J-J, Mao, X-Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S-W., Li, Y-H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate LWT - *Food Science and Technology* 56, 296-302.
- Martins, I. M.; Barreiro, M.F.; Coelho, M.; Rodrigues, A. E. (2014) Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 2014. 245, 191–200
- Morales-Medina, R.; Tamm, F.; Guadix, A.M.; Guadix, E.M.; Drusch, S. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. (2016). *Food Chemistry*, 194, 1208–1216.
- Leal, A. L. G. et al. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeds. *Aquaculture International*, v. 18, n. 4, p. 635–646, 2010.
- Sardar, P., Abid, M., Randhawa, H.S., Prabhakar, S.K. Effect of dietary lysine and methionine supplementation on growth, nutrient utilization, carcass compositions and haemato-biochemical status in Indian Major Carp, Rohu (*Labeo rohita* H.) fed soy protein-based diet. *Aquaculture Nutrition*, v. 15, n. 4, p. 339–346, 2009.
- Silva, J.F.X.; Ribeiro, K.; Silva, J.F.; Cahú, T.B.; Bezerra, R.S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate (2014). *Animal Feed Science and Technology* 196, 96–106.
- Shahidi, F., Kamil, J.Y.A., 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 435–464
- Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Decker, E. A. 2006. The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze–thaw cycles. *Food Chemistry*. 95, 591–599.

Venugopal, V., & Shahidi, F. (1995). Value-added products from underutilized fish species. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 431–453.

White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C. 1986. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *J. Autom. Chem.* 8 (4), 170–177.

Yang, S., Mao, X. Y., Li, F. F., Zhang, D., Leng, X. J., Ren, F. Z., et al. (2012). The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research & Technology*, 235, 91-97.

Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Nalinanon, S., Kristinsson, H.G. (2012). Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chemistry* 132, 1781–1788.

You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., Ren, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, 43, 1167–1173, 2010.

U.K. FEEDING STUFFS (SAMPLE AND ANALYSIS) REGULATIONS, 1982. The Determination of Oil in Feeding Stuffs, 1119, I, 9-11. Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 130.

#### 4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que as biomoléculas recuperadas do resíduo do processamento de tilápia, a proteína do hidrolisado e concentrado é de excelente qualidade como fonte de aminoácidos essenciais, o óleo possui excelente teor de ácidos graxos poli-insaturados e a gelatina produzida a partir de ossos é uma valorosa e potencial substituta à gelatina comercial devido a excelente capacidade como material de revestimento na microencapsulação.

O concentrado proteico de peixe seco, hidrolisado proteico de peixe seco e o concentrado proteico com gelatina de tilápia se apresentaram livres de contaminação e excelente qualidade na composição centesimal. Com isto, manteve-se elevado valor nutritivo com alto teor de proteína, peptídeos, aminoácidos essenciais e ácidos graxos. A presença de aminoácidos essenciais e ácidos graxos polinsaturados nos alimentos é de extrema importância para a saúde humana, sendo a metionina responsável por aumentar a imunidade e PUFA associados à inteligência e memória. As micropartículas de concentrado e hidrolisado são passíveis de serem aplicadas em alimentos fortificados, produtos nutracêuticos e suplementos nutricionais.

Além disso, a técnica de spray drying utilizada mostrou-se eficiente na conservação das biomoléculas extraídas e conferiu estabilidade aos produtos sob a forma pó, promovendo valor agregado aos mesmos e longevidade com a permanência de suas características organolépticas. A secagem por pulverização compõe desta forma propriedades tecnológicas promissoras com aplicações às indústrias alimentícias e farmacêutica.

Face ao exposto, a utilização dos resíduos do beneficiamento de tilápia *Oreochromis niloticus* é uma alternativa viável a produção de produtos de qualidade com alto teor proteico e lipídico, além de elevado rendimento passíveis de aplicação e substituição aos existentes no mercado. O estudo concluiu que é possível aproveitar integralmente os resíduos do processamento de tilápia na produção de novos produtos de valor agregado.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 381-388, 2011.
- ARVANITOYANNIS, I. S. **Protein-based films and coatings**: Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. CRC press, 2002. 672 p.
- BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. London: Elsevier Applied Science, 1989, 365 p.
- BARROSO, R. M. et al. Gerenciamento genético da tilápia nos cultivos comerciais. **Embrapa**, 2015. 64 p.
- BARROW, C, J.; NOLAN, C, HOLUB, B, J. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. **Journal of functional foods**, v 1, p. 38–43, 2009.
- BARROW, C, J.; NOLAN, C., J, Y. Feature Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. **Lipid Technology**, v. 19, n. 5, 2007.
- BELTRÁN, R. -R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science**, n.1, v.11, 1–12, 2010.
- BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M.T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 3424-3430, 1997.
- BEZERRA, R. S., LINS, E. J. F., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO, L. C. B. B., CARVALHO JR, L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochem.** v. 40, p. 1829–1834, 2005.
- BOSCOLO, W. R. Farinha de Resíduos da Filetagem de Tilápias na Alimentação de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) na Fase de Reversão Sexual. **Revista. Bras. Zootec**, v.34, n.6, p.1807-1812, 2005.
- BOUGATEF, A.; BALTI, R.;SILA, A.; NASRI,R.; GRAIAA, G.; NASRI, M. Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*Mustelus mustelus*) skin gelatin LWT - **Food Science and Technology**,v. 48, p. 248–254, 2012.
- BUENO, C, M., ALVIM, I, D., DIAS, T, C, R.; PORTELA, M, C., GROSSO, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 65-73, 2011.
- CAHÚ, T. B., SANTOS, S. D., MENDES, A., CÓRDULA, C. R., CHAVANTE, S. F., CARVALHO JR., L. B., NADER, H. B., BEZERRA, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 570–577, 2012.

CALISKAN, G.; DIRIM, S. N. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 91, n. 4, p. 539-548, 2013.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. E.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quim. Nova**, v. 32, p. 1792-1798, 2009.

CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 93–102, 2015.

COUTO, R. O.; CONCEICAO, E. C.; CHAUL, L. T; OLIVEIRA, E. M. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray dried Rosemary extracts: physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, London, v. 131, n. 1, p. 99-105, 2012.

CRAWFORD, M. A., GOLFETTO, I., GHEBREMESKEL, K., MIN, Y., MOODLEY, T., POSTON, L., PHYLACTOS, CUNNANE, A. S., SCHMIDT, W. The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants. **Lipids**, v. 38, p. 303–315, 2003.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.

DE SOUZA, A.L.R., RODRIGUES, F.M., SILVA, G.V., SANTOS, R.R. (2015). Microencapsulação de sucos e polpas de frutas por *spray drying*: uma revisão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.3, p.327-338, 2015.

DE VRIES D. J., BEART, P. M. Fishing for drugs from the sea: status and strategies. **Trends Pharmacol Sci**, v. 16, p. 275–279, 1995.

DEKKERS, E., RAGHAVAN, S., KRISTINSSON, H. G., MARSHALL, M. R. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 640–645, 2011.

DJABOUROV, M.; LECHAIRE, L.; GAILL, F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. **Biorheology**. v. 30, p. 191-205, 1993.

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.

DROVER, J. R., FELIUS, J., HOFFMAN, D. R., CASTANEDA, Y. S., GARFIELD, S., WHEATON, D. H., BIRCH, E. E. A randomized trial of DHA intake during infancy: School readiness and receptive vocabulary at 2–3.5 years of age. **Early Human Development**, v. 88, p. 885–891, 2012.

DUMOULIN, E.; BIMBENET, J. J. **The Properties of water in foods ISOPOW 6: Spray drying and quality changes**. London, Blackie Academic & Professional, 1998, 512 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Documento Técnico sobre as Pescas. N. 334. FAO, Roma, 1997, 176p. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 336–340, jun. 2010.

FORSYTHE, STE PHEN J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo, Editora Artmed, 2002, 424p.

FRASCARELI, E. C., SILVA, V. M., TONON, R.V., HUBINGER, M.D. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and bioprocesses processing**, v. 90, p. 413–424, 2012.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTINEZ, V.; LÓPEZ, M, C.; BERNHARDT, D.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L, G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, p. 473–482, 2013.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDOUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, Barking, v. 40, n 9, p. 1107-1121, nov. 2007.

HAYASHI, C., BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. et al. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de crescimento. **Acta scientiarum**, v.21, n.3, p.733-737, 1999.

HE, S., FRANCO, C., ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, p. 289–297, 2013.

HILDSORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. **Boletim Instituto de Pesca**, v.22, n.1, p.73-78, 1995.

IBGE. Produção da pecuária municipal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 42, p. 1–39, 2014.

- IBRAHIM, M. S. Evaluation of Production and Quality of Salt-Biscuits Supplemented with Fish Protein Concentrate. **World J. Dairy Food Sciences**, v 4, n.1, p.28–31, 2009.
- JAFARI, S.M., ASSADPOOR, E., HE, Y., BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. **Dry Technol.** V. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.
- JEMIL, I, JRIDI, M, NASRI, R, KTARI, N, SALEM, R, B, S-B, MEHIRI, M; HAJJI, M; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 963–972, 2014.
- KARIM, A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 563–576, 2009.
- KIM, S. K; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**, v. 39, p. 383–393, 2006.
- KIM, S; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 1–9, 2010.
- KOLANOWSKI, W; LAUFENBERG, G. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3, p. 472–477, 2006.
- KOLI, J.M., BASU, S., NAYAK, B.B., PATANGE, S.B., PAGARKAR, A.U., GUDIPATI, V. Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 555–562, 2012.
- KRISTINSSON, H.G., B. RASCO. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131-139, 2000.
- KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí, SP: 1 ed., 2000, 285p.
- LEE, WOO-SHIN, JEON, JOONG-KYUN, BYUN, HEE-GUK. Characterization of a novel antioxidative peptide from the sand eel *Hypoptychus dybowskii*. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 1207–1211, 2011.
- MARTINS, I. M., BARREIRO, M.F., COELHO, M., RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p.191–200, 2014.
- MENEGAZZO, M, L.; PETENUCCI, M, E., FONSECA, G, G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. **Food Chemistry**, v. 157, p. 100–104, 2014.

MEURER, F.; HAYASHI, C., BOSCOLO, W, R., Soares, C, M. Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.566-573, 2002.

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 92, n. 3, p. 252-258, jul. 2014.

MUYONGA, J. H., COLE, C. G. B., & DUODU, K. G. Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatine. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 4, p. 581-592, 2004.

OETTERER, M., REGITANO-D'ARCE, M.A.B., SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, Manole, 612p, 2006.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, PR, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PIACENTINI, E., GIORNO, L., DRAGOSAVAC, M.M., VLADISAVLJEVIĆ, G.T., HOLDICH, R, G. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification, **Food Research International**, v. 53, p. 362–372, 2013.

PICOT, L., BORDENAVE, S., DIDELOT, S., FRUITIER-ARNAUDIN, I., SANNIER, F., THORKESSON, G., BERGÉ, J.P., GUÉRARD, F., CHABEAUD, A., PIOT, J. M. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1217–1222, 2006.

QUAN, J, KIM, S-M, PAN, C-H, CHUNG, D. Characterization of fucoxanthin-loaded microspheres composed of cetyl palmitate based solid lipid core and fish gelatin–gum arabic coacervate shell. **Food Research International**, v. 50, p. 31–37, 2013.

RAGHAVAN, S., KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 117, p. 582–588. 2009.

ROSLAN, J., YUNOS, K.F. MD; ABDULLAH, N., KAMAL, S.M.M. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 312–319, 2014.

RUXTON, C. H., REED, S. C., SIMPSON, M. J., & MILINGTON, K. J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 17, n. 5, p. 449–459, 2004.

SALAMPESSEY, J., PHILLIPS, M., SENEWEERA, S., KAILASAPATHY, K. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia sp.*) insoluble proteins. **Food Chemistry**, v. 120, p. 556–560, 2010.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice**, Wiley-VCH, Weinheim, 2007. 347 p.

SENARATNE, L. S.; PARK, P-J.; KIM, S-K. Isolation and characterization of collagen from brownbacked toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 191–197, 2006.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHAKILA, R. J., JEEVITHAN, E., VARATHARAJAKUMAR, A., JEYASEKARAN, G., SUKUMAR, D., 2012. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 48, n.1, p. 30-36, 2012.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D E VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n 1, p. 1-20, 2003.

SILVA, J.F.X., RIBEIRO, K., SILVA, J.F., CAHÚ, T.B., BEZERRA, R.S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96–106, 2014.

SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PETRY, F. C.; PINTO, L. A. A. Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 904-909, 2011.

STEVANATO, F.B., SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J.V. Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação. Londrina, **Pubvet**, v.1, n. 7, 2007.

WANG, B., ADHIKARI, B., BARROW, C.J. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 158, p. 358–365, 2014.

WU, H. C., CHEN, H. M., SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949–957, 2003.

YOU, L., ZHAO, M., REGENSTEIN, J.M., REN, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Research International**, v. 43, p. 1167–1173, 2010.