



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

**(21) BR 10 2012 032931-0 A2**



**(22) Data de Depósito:** 21/12/2012

**(43) Data da Publicação:** 23/12/2014  
**(RPI 2294)**

**(54) Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTO PROTEICO E LIPÍDICO A PARTIR DA IRRADIAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO

**(51) Int.Cl.:** A23J3/34; A23J3/04; A23B4/015

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE

**(72) Inventor(es):** ANA MARIA MENDONÇA DE ALBUQUERQUE MELO, ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA, GUILHERME OLIVEIRA FIRMINO, JULIETT DE FÁTIMA XAVIER DA SILVA, RANILSON DE SOUZA BEZERRA, SUZAN DINIZ SANTOS

**(57) Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTO PROTEICO E LIPÍDICO A PARTIR DA IRRADIAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO. A presente invenção diz respeito a um processo para a separação do óleo da parte proteica de hidrolisados proteicos de pescado de forma estéril. O processo de acordo com a presente invenção primeiramente refere-se ao ajuste das condições simples de hidrólise que tornem favoráveis a produção aumentada do hidrolisado proteico de 10 pescado a partir de resíduos da indústria pesqueira. Em segundo momento a aplicação de um processo de separação e conservação para aumentar o tempo de prateleira de hidrolisados proteicos e óleos de pescado estéreis com aplicações biotecnológicas

## RELATORIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO

### PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTO PROTEICO E LIPÍDICO A PARTIR DA IRRADIAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO

#### CAMPO DA INVENÇÃO

5                   A presente invenção diz respeito a um processo para a produção de hidrolisados proteicos de pescados e dos seus óleos de forma estéril. O produto é obtido a partir de resíduos da indústria pesqueira e pode ser utilizado pela as indústrias de cosmética, alimentícia e nutricional. A presente invenção refere-se, mais particularmente, a aplicação de um processo de separação e conservação  
10 com a aplicação de radiação para aumentar o tempo de prateleira de hidrolisados proteicos e óleos de pescado de forma estéril com aplicações biotecnológicas.

#### DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

O filé é o item de maior valor econômico, o seu rendimento varia de acordo como domínio tecnológico das empresas processadoras de pescado e  
15 pode chegar entre 30 e 40% do peso do animal dependendo da espécie, a outra parcela é considerado como resíduo sendo composto por restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras. Logo, os resíduos da indústria de processamento de pescado, por exemplo, da tilápia, representam de 60 a 70% da matéria-prima. Atualmente, estes resíduos gerados são ainda subutilizados e muitas vezes  
20 descartados de forma inadequada ocasionando danos ao meio ambiente. Diante dessa problemática, pesquisadores em todo o mundo vêm desenvolvendo diversos esforços para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses

resíduos em produtos passíveis de utilização tanto na nutrição humana quanto animal (MARTONE et al., 2005).

Os resíduos gerados pela indústria de processamento de pescado podem ser utilizados na obtenção de variados produtos como biofertilizantes, biogás, farinha de peixe, couro, gelatina, óleo e hidrolisado proteico (PI0604910-9 A; PI 1000529-3 A2; PI0506315-9 A; PI0804954-8 A2; PI0516797-3 A; PI1004335-8 A2).

O hidrolisado proteico de peixe é resultado da solubilização das proteínas do pescado gerando proteínas menores, peptídeos e aminoácidos. Pode ser obtido a partir da hidrólise química (hidrólise ácida e alcalina), por hidrólise enzimática através de enzimas de origem vegetal, animal ou microbianas adicionadas à matéria-prima a ser catalisada ou ainda por enzimas proteolíticas endógenas, ou seja, presentes no próprio organismo (KRISTINSSON e RASCO, 2000; MARTONE et al., 2005).

A hidrólise enzimática é um método baseado na adição de enzimas para clivagem das proteínas, sendo um processo usado para aperfeiçoar ou modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína sem prejudicar o seu valor nutricional. O processo enzimático ocorre sob condições brandas, sem produzir produtos de degradação, observados nas hidrólises ácida e alcalina. Este tipo de hidrólise oferece vantagens porque permite um bom controle do processo e, conseqüentemente, das propriedades dos produtos resultantes (FONKWE e SINGH, 1996). Enquanto que, a hidrólise por autólise enzimática é um método alternativo, em que se empregam as próprias enzimas proteolíticas

(proteases das vísceras do próprio peixe) para solubilização da proteína do pescado, tomando assim um método mais vantajoso em relação às enzimas comerciais, pois, reduz desta forma os custos de produção.

Os hidrolisados proteicos de carne são utilizados para modificar

5 propriedades funcionais de alimentos e, em alimentos dietéticos, como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos. Podem ser incorporados a uma série de produtos, como fórmulas balanceadoras para atletas, regimes de emagrecimento, e utilizados na alimentação animal como, por exemplo, em porcos e bezerras, e na forma de suplementos proteicos em rações para animais. Na alimentação

10 humana, servem como suplementos de biscoitos e produtos tipo hambúrguer, nuggets, entre outras, com possibilidade de também serem adotados para pessoas com problemas de digestão ou de má-absorção de proteínas, graças à sua elevada digestibilidade e aos aminoácidos essenciais disponíveis. Além do mais, estudos evidenciam que o hidrolisado proteico e peptídeos obtidos de

15 organismos marinhos e seus subprodutos podem promover a saúde humana por meio da prevenção de doenças crônicas (KIM et al., 2007; 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).

20 Durante o processo de hidrólise são gerados, não apenas, proteínas pequenas, peptídeos e aminoácidos, mais também, lipídeos que podem ser separados e removidos em uma etapa seguinte, resultando na formação de um hidrolisado proteico uniforme e com baixo teor de gordura e de um óleo de peixe

concentrado. O óleo de peixe apresenta aplicações diversas, não apenas, na indústria de cosméticos, mas também na de alimentos como item na composição de nutracêuticos, como pode ser visto nas patentes: PI0901392-0 A2; PI 0414818-5 A; PI 0509878-5 A e PI 0516797-3 A.

5                   A hidrólise dos triacilgliceróis e conseqüentemente o aumento do teor de ácidos graxos livres formados durante armazenamento e processamento, é um dos fatores que determinam a vida de prateleira e produzem características organolépticas indesejáveis ao alimento. (STEVANATO, 2007). As alterações na qualidade dos alimentos frescos podem ocorrer devido à oxidação de lipídeos e  
10 pigmentos contidos em alimentos gordurosos, resultando na liberação de sabor indesejável e na formação de compostos que possuem efeitos biológicos adversos ou que favoreçam a descoloração (FORSYTHE, 2002). VIEGAS (2000), estudando hidrolisado proteico de peixe a partir de resíduos do processamento de filés de tilápias, obteve um produto praticamente isento de lipídios, o que lhe  
15 conferiu excelente qualidade, devido ao fato de não apresentar problemas de rancidez oxidativa durante a estocagem.

Um fator de grande importância, uma vez que, o hidrolisado proteico de peixe é destinado à alimentação humana e animal é da sua inocuidade. Uma vez que para a obtenção de um alimento seguro é necessário que este esteja  
20 isento de microrganismos patógenos e deteriorantes, os quais estando presentes poderão comprometer a qualidade nutricional do produto. Para tanto é necessário à aplicação de formas de conservação e esterilização, garantindo a qualidade e uma maior vida de prateleira deste produto.

A conservação consiste em manter o alimento o mais estável possível no que se refere ao aspecto microbiológico. Sendo necessário retardar a proliferação dos microrganismos com o controle de variáveis como a temperatura, o pH e a umidade. Dentre os métodos baseados na redução do crescimento microbiano estão os tratamentos com aplicação de sais, aplicação térmicos, acidificação, utilização de embalagens com atmosfera modificada e irradiação (FORSYTHE , 2002).

Neste contexto existem patentes voltadas para produção de hidrolisado proteico de peixe utilizando enzimas comerciais no seu processo de hidrólise (W02009/101134A1; W02009/101146A1; PI0705220-0A2), utilização de hidrolisado proteico na composição de nutracêuticos (PI1000331-2 A2), na conservação do hidrolisado pela aplicação de sais, ácidos, ou desidratação (CN102125173 - A), e na utilização de óleos de peixes para composição de nutracêuticos e óleo diesel (PI0314100-4A; PI9611826-1A; PI0509878-5A; PI0516797-3A). Porém, ainda não foi desenvolvido de forma conjunta um processo que envolvesse a produção e separação de um hidrolisado proteico de peixe do seu óleo de forma estéril.

## **APRESENTAÇÃO DOS PROBLEMAS EXISTENTES**

A Separação de lipídios do hidrolisado proteico comumente envolve técnicas de custo elevado tais como centrifugação e ultrafiltração, além do uso de sais como sulfato de amônio e solventes como etanol e acetona que produzem resíduos e não são recomendados pela ANIVISA (BR), quando o produto é destinado ao uso farmacêutico, alimentício ou cosmético.

Para tomar economicamente viável a produção de hidrolisado proteico de peixe em larga escala são necessários esforços no sentido de melhorar o rendimento do produto principal e de aproveitar outros subprodutos gerados como o óleo, agregando valor ao processamento do filé de peixes.

5 A esterilização destes produtos requerem métodos que inibam temporariamente a proliferação de microrganismos patogênicos. Tradicionalmente utiliza-se aplicação de sais ou ácidos e tratamentos térmicos. No entanto, esses métodos são utilizados apenas para a conservação e não para separar a parte proteica do óleo do hidrolisado proteico de peixe.

#### 10 **APRESENTAÇÃO DA SOLUÇÃO EM LINHAS GERAIS**

A presente invenção vem solucionar os problemas citados, não apenas quando propõe um processo de produção de hidrolisado proteico de peixe que proporciona um aproveitamento dos resíduos da indústria pesqueira, mas quando também propõe um processo caracterizado pela simplicidade e pelo baixo  
15 custo para recupera biomoléculas. A extração de óleo através da esterilização por irradiação (2,5 KGr), objeto do presente pedido de patente, separa a parte proteica dos lipídios, não sendo necessário assim o uso de técnicas laboriosas para a acessibilidade do produto.

Outra vantagem da irradiação a 2,5 KGr é que é está dentro do limite  
20 da faixa de irradiação para alimentos de acordo com as normas da ANVISA, e essa técnica de conservação permite que o produto fique armazenado a 4°C por até 60 dias sem o uso de nenhum conservante. Sendo assim o produto é passível de ser utilizado tanto para a nutrição humana quanto para animal.

A irradiação (cobalto 60) promove a esterilização do produto e proporciona a separação dos lipídios sem necessariamente ter que passar por outro processo de separação mecânica.

A presente invenção vem agregar valor ao processamento de filés de tilápias e de outros pescados devido ao aproveitamento de resíduos que antes era descartado contribuindo com o desenvolvimento sustentável do processo.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

A presente invenção tem o objetivo de apresentar um método de obtenção de um produto proteico (hidrolisado proteico) e lipídico estéril, a partir da irradiação de hidrolisados proteicos de pescado. Este método permite a conservação do produto por 60 dias. O processo de obtenção compreende as seguintes etapas:

#### **1. Preparação dos hidrolisados**

- a) Lavagem do resíduo do processamento de pescado;
- b) Trituração da carcaça com extrato de intestino de peixe (600mg/mL) ou Alcalase (0,5%) na proporção 1:1.
- c) Hidrólise enzimática (digestão em banho-maria por 2 horas a 45°C);
- d) Desativação enzimática (aquecimento a 100°C/10min);
- e) Separação da parte sólida da parte líquida

A produção do hidrolisado proteico de peixe da presente invenção

compreende a utilização de carcaças e com adição de enzimas endógenas (extrato de intestino de peixe de 200 a 600mg/mL) ou enzima comercial Alcalase (0,5%), sem ajuste de pH, de acordo com o método desenvolvido por Bezerra (2000) modificado. Os resíduos (carcaça adicionado ao extrato ou enzima comercial) são triturados na proporção de 1:1. A mistura é submetida à digestão entre temperatura de 35 e 50 °C onde permanece por 2 horas a uma pequena agitação contínua para otimizar o contato enzima/substrato. Posteriormente o hidrolisado é fervido a 100°C, durante 10 minutos, para desativação enzimática. Ao final do processo a parte líquida (hidrolisado proteico de peixe) é separada da parte sólida através de uma peneira.

## **2. Obtenção de um produto proteico e lipídico estéril a partir da irradiação do hidrolisado proteico de pescado**

A presente invenção compreende o acondicionamento do hidrolisado proteico de peixe em recipientes autoclaváveis, posteriormente são submetidos ao processo de irradiação em Reator Gama Cell 220 (<sup>60</sup>Co), nas doses entre 2 KGy a 8 KGy de 29 a 93 minutos. Em seguida armazenados sob refrigeração a ± 4°C com ausência de luz, onde se inicia o processo de separação do óleo da parte proteica. A presente invenção consiste também de outra forma de extração do óleo do hidrolisado proteico de pescado podendo ser aplicada anterior ao processo de irradiação compreendendo um processo que utiliza um equipamento que permite, a aplicação de uma força centrífuga que separe as fases onde os sólidos são depositados no fundo, o hidrolisado proteico de pescado suba pela área externa de pratos e a gordura que é mais leve siga para o

centro do equipamento saindo do seu rotor por tubulações para em seguida ser submetido ao processo de irradiação para esterilização do produto descrito anteriormente.

A seguir serão expostos exemplos específicos da invenção.

## 5 Exemplo 1:

### Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas com a finalidade de comprovar a eficiência dos métodos de conservação.

#### a) Contagem total de microorganismos e psicrotróficos

10 A contagem total de microorganismos psicrotróficos para os irradiados foram realizados nos dias 0, 12, 24, 36, 48, 60. Sendo coletadas amostras de 1mL de cada hidrolisado proteico de peixe em triplicata e submetidas a diluição seriada (1:10; 1:100 e 1:1000) em tubos de ensaios esterelizados contendo 9 mL de solução (0.1% de água peptonada em 0,9% de NaCl de  
15 solução) e homogeneizadas sob condições estéreis em cabine de segurança biológica Pachane(Pc 410). Foi coletado 1mL de cada amostra diluída e inoculada em 3 placas de Petri. Para cada placa foi adicionado 15 mL de Plate Count Agar (Standard Methods Agar Acumedia). As amostras foram homogeinizadas imediatamente após ser vertido o meio através de rotações das placas de Petri, de  
20 forma a obter a dispersão uniforme das colônias. Após a completa solidificação as placas são invertidas e incubadas a 4°C por 5 dias para análise de microorganismos psicrotróficos.

b) Análises microbiológicas de microrganismos específicos

Para verificar se o hidrolisado proteico de peixe atende a regulamentação (Anvisa/7d da RDC 12/2001) e obedece a padrões de segurança alimentar foram realizadas análises microbiológicas (bolores e leveduras, colifonnes a 45°C, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella ssp* e *Pseudomonas*). O hidrolisado proteico de peixe foi submetido a irradiação e foi analisado após 60 dias e o hidrolisado proteico de peixe controle foi analisados após 2 dias de armazenamento de acordo com metodologia da "Bacteriological Analytical Manual" da Food and Drug Administration , editado por Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC) em suas últimas edições e ou revisões (BRASIL, 2001) e Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). As análises foram realizadas no Laboratório de Experimento e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

15 Exemplo 2:

A contagem total de microrganismos psicrotróficos, expressos em unidades formadora de colônia por mL (UFC/mL), dos hidrolisados proteicos de peixe irradiados foram expressos em 0 UFC/mL.

Os resultados comprovam a conservação o produto sob o ponto de vista microbiológico. Desta forma os hidrolisados permaneceram livres de contaminação por microrganismos psicrotróficos e apresentaram-se conservados por 60 dias de armazenamento sob refrigeração a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

Para avaliar a segurança alimentar dos hidrolisados proteicos de peixe foi realizada a pesquisa de microrganismos específicos. A presença em níveis predeterminados de alguns microrganismos em um produto alimentício avalia seu estado de segurança alimentar e se o mesmo em sua produção obedece às normas de boas práticas de fabricação e manipulação, os princípios do HACCP, dentre outras normas que possam garantir o consumo do produto.

A tabela 1 fornece os resultados das pesquisas de microrganismos nos hidrolisados submetidos aos métodos de conservação a 4°C durante 60 dias.

Tratamentos	Coliformes	A Estafilococos	<i>Salmonella</i>	Bolores e	<i>Pseudomonas</i>
	45°C	Coag(+)	AOAC(967.26	Leveduras	<i>Aeruginosa</i>
	AOAC(926.24)	AOAC(975.55		AOAC(997.02	SMWW(9213)
Controle	< 3,0	< 10	Ausência	8,7 x 10 <sup>2</sup>	-
2,5kGy	< 3,0	< 10	Ausência	< 10	< 1,1
5kGy	< 3,0	< 10	Ausência	< 10	< 1,1
7kGy	< 3,0	< 10	Ausência	< 10	< 1,1

Os resultados apresentados na tabela 1 atendem ao item 7d da RDC 12/2001- ANVISA quanto aos parâmetros obrigatórios para as amostras.

Os tratamentos realizados nos hidrolisados foram eficientes

quanto à presença de microrganismos patógenos e/ou deteriorantes estando livres destes mantendo-se assim conservados a 4°C até o prazo de 60 dias.

O produto obtido pela presente invenção apresenta a vantagem de ser uma forma de conservação e extração de óleo mais estável por apresentar uma baixa atividade microbiológica não sendo necessários tratamentos e  
5 adição de conservantes.

Exemplo 3:

Avaliação da atividade antioxidante do hidrolisado proteico de peixe obtido por autólise

10 A carcaça de peixe (*Oreochromis niloticus*), sem vísceras, foram misturados com 600 mg / mL extrato bruta de intestino e água na proporção 1:1 (w / v). A mistura foi incubada a 45 ° C durante 4 horas e em seguida aquecida num banho de água a 100°C durante 10 minutos para inativar as enzimas. Depois disso o hidrolisado proteico do *Oreochromis niloticus* foram centrifugadas por 10,000 g  
15 durante 10 minutos, e o sobrenadante foram recolhidos e armazenados a -20 ° C até ser utilizado. A atividade antioxidante dos hidrolisados foi avaliada por testes de DPPH e Potencial redutor. Todas as análises foram feitas em triplicado e os resultados foram expressos por médias  $\pm$  desvio padrão.

O hidrolisado proteico mostrou um IC50 cerca de 916  $\mu$ g / mL no  
20 ensaio de inibição de DPPH e exibiu Potencial Redutor de 1mg/mL, equivalente à redução do antioxidante BHT de 39,11  $\pm$  4,364  $\mu$ g/mL.

Portanto os resultados obtidos pela experimentação demonstra que o

processo de autólise foi eficaz na obtenção de um hidrolisado proteico de peixe com atividades antioxidantes, sugerindo que pode ser utilizado como um nutracêutico, alimento funcional ou como um antioxidante em alimentos.

## REIVINDICAÇÕES

1. A presente invenção é caracterizada por um processo de produção compreendendo a separação e conservação por meio da aplicação de radiação do hidrolisado proteico de pescado para produção de um produto composto por um hidrolisado proteico e óleo de pescado estéril.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por envolver uma hidrolise proteolítica por autólise utilizando as enzimas de pescado como enzimas das vísceras de peixes, ou enzimas comerciais como Alcalase.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo acondicionamento do hidrolisado proteico de pescado em recipiente autoclavável seguido pelo processo de irradiação por Reator Gama Cell 220 ( $^{60}\text{CO}$ ) ou outro, nas doses entre 2 KGy a 8 KGy de 29 a 93 minutos.
4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo armazenamento do referido hidrolisado irradiado sob uma refrigeração a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  com ausência de luz, para separação do óleo da parte proteica.
5. Processo de acordo com a reivindicação 1 a 4, caracterizado por utilizar um equipamento antes do processo referente à reivindicação de 3 a 4 o qual aplica um força centrífuga separando diferentes fases (sólido, hidrolisado proteico de pescado suba pela área externa de pratos presentes no referido equipamento e que o óleo siga para o centro do equipamento saindo do seu rotor por tubulações.
6. Produto de acordo com a reivindicação de 1 a 5, caracterizado por um hidrolisado proteico e óleo de pescado estéril por radiação.

## RESUMO

### PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTO PROTEICO E LIPÍDICO A PARTIR DA IRRADIAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO

A presente invenção diz respeito a um processo para a separação  
5 do óleo da parte proteica de hidrolisados proteicos de pescado de forma estéril. O  
processo de acordo com a presente invenção primeiramente refere-se ao ajuste  
das condições simples de hidrólise que tornem favoráveis a produção aumentada  
do hidrolisado proteico de 10 pescado a partir de resíduos da indústria pesqueira.  
Em um segundo momento a aplicação de um processo de separação e  
10 conservação para aumentar o tempo de prateleira de hidrolisados proteicos e  
óleos de pescado estéreis com aplicações biotecnológicas.