



## Hidrolisados Proteicos de Tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*): Propriedades Bioativas e Vida de Prateleira

**Palavras-Chave:** atividade antioxidante, hidrólise enzimática, resíduos de pescado

**Autores(as):**

Sâmella Silva Dias | FEA, UNICAMP

Geodriane Zatta Cassol | FEA, UNICAMP

**Orientador(a):** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hélia Harumi Sato | FEA, UNICAMP

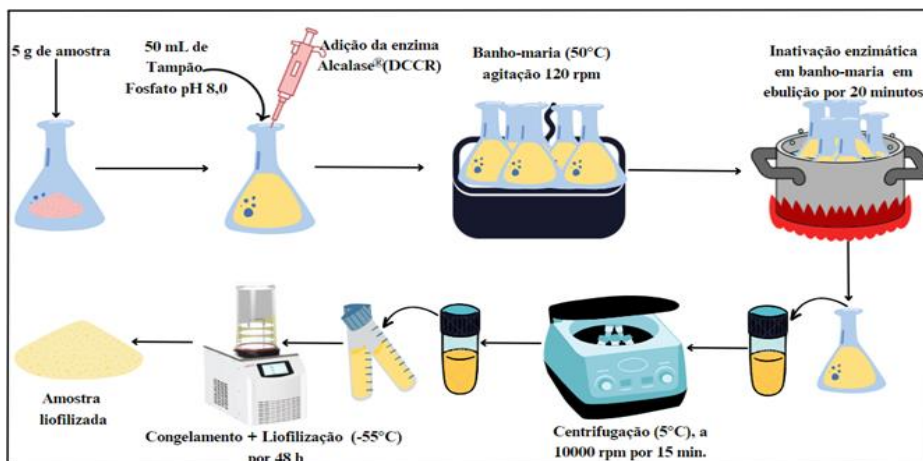
### INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de peixes mais cultivadas no Brasil, o híbrido tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) possui destaque na região Centro-Oeste, por ter uma produção que se aproximou de 25 mil toneladas no ano de 2020 (BRASIL, 2020). Apesar da grande produção, um dos maiores problemas na cadeia produtiva de peixes é a geração de resíduos durante o processamento, que podem representar mais de 50% da matéria-prima, podendo variar de acordo com a espécie (SANTOS, 2016). Grande parte desses resíduos possuem excelente qualidade em relação a nutrientes, principalmente no que diz respeito a proteínas (IDOWU et al., 2020), podendo, em alguns casos, serem comparados ao teor nutricional dos produtos de primeira linha, como os filés, por exemplo. Uma das alternativas para o aproveitamento dos resíduos gerados no processamento de pescado é a produção de hidrolisados proteicos de pescados (HPP). Os HPP podem conter peptídeos bioativos, sendo seu modo de ação dependente da sequência de aminoácidos. Os HPP podem apresentar atividade antioxidante, antimicrobiana e ser utilizados tanto na indústria de alimentos como na produção de fármacos (IDOWU et al., 2020). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar o padrão microbiológico do filé e resíduo (espinhaço) *in natura* de tambatinga, assim como elaborar, avaliar e comparar o grau de hidrólise e as atividades antimicrobiana e antioxidante ABTS, DPPH e FRAP dos hidrolisados proteicos, por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR<sup>2</sup>). Após a avaliação dos resultados estatísticos e das superfícies de resposta, os melhores ensaios foram selecionados para as análises de vida prateleira, a fim de determinar a estabilidade dos hidrolisados em diferentes tempos de congelamento.

### METODOLOGIA

O filé e o espinhaço de tambatinga foram adquiridos de uma empresa processadora de pescado, localizada na cidade de Várzea Grande – MT, já triturados individualmente e acondicionados em sacos de polietileno, congelados à -25 °C e, em seguida, transportados em caixas de isopor com gelo atóxico reutilizável, por meio de transporte aéreo, até o Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. As amostras foram descongeladas à 5 °C e então avaliadas quanto ao Padrão Microbiológico estabelecido pela legislação vigente da ANVISA para “7. Pescados: a) Pescados (peixes, crustáceos, moluscos) e miúdos (ovas, moela, bexiga natatória) crus, temperados ou não, frescos, resfriados ou congelados”, composto por *Salmonella* sp., estafilococos coagulase positiva e *Escherichia coli* (BRASIL, 2022), seguindo metodologia descrita por SILVA et al. (2017), utilizando métodos ISO 6579, ISO 6888 e ISO 7251 para os micro-organismos citados, respectivamente.

Foram produzidos 4 tipos de hidrolisados: hidrolisado de filé *in natura* (FI); hidrolisado de filé seco (FS); hidrolisado de espinhaço *in natura* (EI) e hidrolisado de espinhaço seco (ES). Para a obtenção da matéria-prima seca, o filé e o espinhaço *in natura* foram submetidos a processo de secagem em estufa com circulação de ar à 55 °C por 7 horas (valores estabelecidos a partir de pré-testes), sendo posteriormente triturados, individualmente, em liquidificador. Os hidrolisados foram elaborados conforme descrito no DCCR, sendo também elaborado um ensaio controle para cada tipo de



**Figura 1.** Hidrólise enzimática e obtenção dos hidrolisados proteicos de tambatinga.

hidrolisado, utilizando o tempo máximo de reação (180 min) e sem adição da enzima. A **Figura 1** ilustra um esquema simplificado da metodologia utilizada para a obtenção dos hidrolisados proteicos de tambatinga (CASTRO e SATO, 2014) e a **Tabela 1** ilustra os valores das variáveis estudadas, conforme o DCCR.

**Tabela 1.** Concentração da protease Alcalase® e tempo de reação de cada ensaio descrito no DCCR-2<sup>2</sup> para a produção de hidrolisados proteicos de tambatinga

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	controle
Concentração da protease (U/mL)	71,8	178,2	71,8	178,2	50	200	125	125	125	125	125	0
Tempo (min)	77,5	77,5	162,5	162,5	120	120	60	180	120	120	120	180

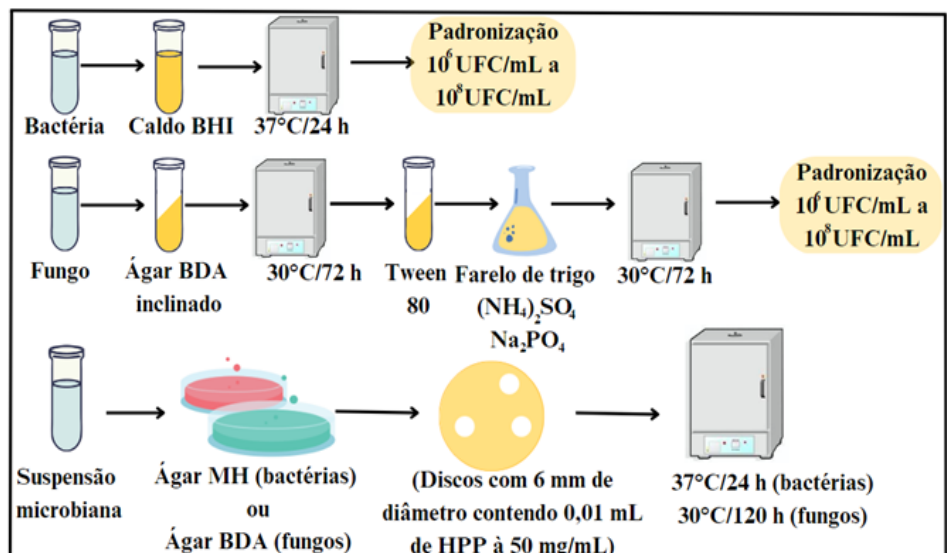
O teor de proteína solúvel foi determinado conforme a metodologia descrita por Lowry et al. (1953), utilizando albumina sérica bovina como padrão. O grau de hidrólise foi estimado indiretamente pelo teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético (TCA; 0,44 mol/L), conforme descrito por Pericin et al. (2009), com adaptações de De Matos et al. (2022). A razão entre o teor de proteína solúvel em TCA (sobrenadante) e o teor de proteína total nas amostras (sem TCA) foi determinada e expressa em porcentagem.

A atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos foi testada contra seis cepas de bactérias (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 e *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium ATCC 14028) e cinco fungos filamentosos (*Alternaria alternata* ISO34, *Aspergillus flavus* ATCC 16883, *Aspergillus niger* ATCC 1004, *Fusarium oxysporum* ATCC 48112 e *Penicillium digitatum* ISO003), podendo ser visualizado a metodologia (CLSI, 2012) simplificada na **Figura 2**.

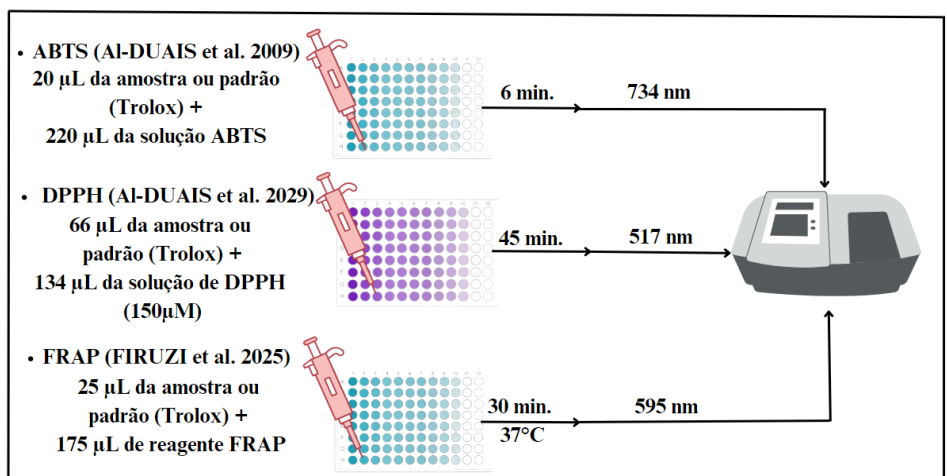
A **Figura 3** ilustra um esquema simplificado das metodologias de atividade antioxidante ABTS ([2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], de eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (AL-DUAIS et al., 2009) e o ensaio FRAP (poder antioxidante redutor férrico) (FIRUZI et al., 2005).

Após a avaliação dos resultados estatísticos e das superfícies de resposta, as amostras dos melhores ensaios foram selecionadas para o estudo da vida prateleira dos hidrolisados. Para esse estudo, após a secagem dos hidrolisados por liofilização, as amostras foram ressuspensas em água destilada e armazenadas sob congelamento a -18 °C, por um período médio de 120 dias, com intervalo de 30 dias entre as análises de atividade antimicrobiana e antioxidante.

Os dados do presente estudo foram tratados por ANOVA e comparados por Tukey ( $p < 0,05$ ; Minitab 19) e os ensaios do DCCR foram avaliados pela qualidade dos modelos gerados baseados no coeficiente de determinação ( $p < 0,1$ ), utilizando o software Statistica® 13.3 da TIBCO (Palo Alto, Califórnia, USA).



**Figura 2.** Preparo do pré-inóculo e análise da atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de tambatinga.



**Figura 3.** Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de tambatinga, estimada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de Padrão Microbiológico, tanto o espinhaço quanto o filé *in natura* encontravam-se de acordo com o preconizado pela legislação, sendo determinado a ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de amostra, contagens < 3,0 NMP/g para estafilococos coagulase positiva e < 3,0 NMP/g para *Escherichia coli*, demonstrando que a indústria processadora, bem como seus manipuladores, possui boas condições higiênico-sanitárias.

De maneira geral, todos os hidrolisados enzimáticos produzidos apresentaram teor de proteína solúvel aumentado, quando comparados aos seus respectivos controles. O mesmo ocorreu com o grau de hidrólise e com a maioria dos ensaios para as análises de atividade antioxidante. Entretanto, não foi detectada atividade antimicrobiana para nenhum dos hidrolisados elaborados na concentração estudada para a atividade de inibição (50 mg de hidrolisado).

Após o processo de hidrólise de FI, houve aumento da proteína solúvel de 3,7 a 6,2 vezes, em comparação ao controle (Tabela 2). Além disso, no estudo do grau de hidrólise das proteínas de FI, foi observado que ocorreu

**Tabela 2.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de proteína solúvel, proteína solúvel em TCA e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de filé *in natura* de tambatinga

Ensaio	Proteína solúvel (%)	Proteína solúvel em TCA (%)	FRAP	DPPH		ABTS
				( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
1	33 <sup>g</sup> ( $\pm 1,18$ )	89,88 <sup>a</sup> ( $\pm 4,95$ )	36,78 <sup>abc</sup> ( $\pm 1,75$ )	26,27 <sup>bc</sup> ( $\pm 1,95$ )	351,0 <sup>ab</sup> ( $\pm 5,13$ )	
2	52 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,44$ )	77,65 <sup>b</sup> ( $\pm 2,36$ )	41,71 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,56$ )	23,40 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,54$ )	336,2 <sup>cde</sup> ( $\pm 7,66$ )	
3	39 <sup>ef</sup> ( $\pm 0,66$ )	86,40 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,96$ )	28,41 <sup>de</sup> ( $\pm 1,21$ )	27,15 <sup>b</sup> ( $\pm 1,99$ )	327,8 <sup>def</sup> ( $\pm 8,23$ )	
4	37 <sup>fg</sup> ( $\pm 2,89$ )	84,79 <sup>ab</sup> ( $\pm 5,41$ )	26,98 <sup>e</sup> ( $\pm 3,39$ )	25,28 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,80$ )	316,3 <sup>f</sup> ( $\pm 2,16$ )	
5	36 <sup>fg</sup> ( $\pm 3,18$ )	90,20 <sup>a</sup> ( $\pm 3,97$ )	23,87 <sup>e</sup> ( $\pm 1,02$ )	24,63 <sup>bcd</sup> ( $\pm 2,24$ )	329,0 <sup>def</sup> ( $\pm 5,63$ )	
6	43 <sup>de</sup> ( $\pm 1,90$ )	84,94 <sup>ab</sup> ( $\pm 4,45$ )	22,68 <sup>e</sup> ( $\pm 0,75$ )	24,10 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,31$ )	333,8 <sup>cde</sup> ( $\pm 8,03$ )	
7	45 <sup>cd</sup> ( $\pm 2,37$ )	82,74 <sup>ab</sup> ( $\pm 7,22$ )	42,32 <sup>a</sup> ( $\pm 2,58$ )	25,74 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,65$ )	360,8 <sup>a</sup> ( $\pm 4,23$ )	
8	56 <sup>a</sup> ( $\pm 3,59$ )	75,98 <sup>b</sup> ( $\pm 4,69$ )	15,46 <sup>f</sup> ( $\pm 1,29$ )	20,44 <sup>def</sup> ( $\pm 1,84$ )	324,1 <sup>ef</sup> ( $\pm 1,33$ )	
9	51 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,29$ )	76,90 <sup>b</sup> ( $\pm 1,43$ )	33,93 <sup>cd</sup> ( $\pm 1,02$ )	20,08 <sup>ef</sup> ( $\pm 1,14$ )	352,6 <sup>ab</sup> ( $\pm 1,83$ )	
10	51 <sup>ab</sup> ( $\pm 1,14$ )	75,69 <sup>b</sup> ( $\pm 1,34$ )	36,14 <sup>bc</sup> ( $\pm 3,70$ )	18,12 <sup>f</sup> ( $\pm 1,46$ )	345,9 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,72$ )	
11	49 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,22$ )	78,87 <sup>ab</sup> ( $\pm 1,19$ )	36,07 <sup>bc</sup> ( $\pm 1,03$ )	21,81 <sup>cdef</sup> ( $\pm 1,05$ )	342,0 <sup>bcd</sup> ( $\pm 2,27$ )	
Controle	9 <sup>h</sup> ( $\pm 0,27$ )	39,93 <sup>c</sup> ( $\pm 1,36$ )	28,53 <sup>de</sup> ( $\pm 1,45$ )	44,66 <sup>a</sup> ( $\pm 2,45$ )	223,3 <sup>g</sup> ( $\pm 1,08$ )	

Letras iguais na mesma coluna não possuem diferença significativa a nível de 5% pelo teste de Tukey

estimada pelo método DPPH, em relação ao ensaio sem o uso de enzima.

A Tabela 3 ilustra que após o tratamento com a protease Alcalase® nas amostras FS houve aumento da proteína solúvel de 4,1 a 6,5 vezes, em relação à proteína solúvel do ensaio controle. Além disso, no estudo para estimar o grau de hidrólise das proteínas foi observado que ocorreu um aumento da proteína solúvel em TCA após tratamento com a protease de 5,3 a 7 vezes, em relação ao ensaio controle. O hidrolisado proteico de filé seco de tambatinga, obtido no ensaio 7, apresentou diferença estatística significativa nas atividades antioxidantes estimadas pelos métodos FRAP e ABTS, com aumentos de 1,5 e 1,6 vezes, em relação aos controles, respectivamente. Não houve aumento significativo entre o controle e as amostras dos demais ensaios quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH.

A Tabela 4 ilustra que para as amostras de EI, tratadas enzimaticamente, houve aumento da proteína solúvel de 4 a 7 vezes, em relação à proteína solúvel do ensaio controle. No estudo do grau de hidrólise foi observado que ocorreu um aumento da proteína solúvel em TCA de 6,6 a 8,9 vezes em relação ao controle.

**Tabela 3.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de proteína solúvel, proteína solúvel em TCA e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de filé seco de tambatinga

Ensaio	Proteína solúvel (%)	Proteína solúvel em TCA (%)	FRAP	DPPH		ABTS
				( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
1	52 <sup>a</sup> ( $\pm 1,54$ )	69,87 <sup>ab</sup> ( $\pm 3,86$ )	28,52 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,04$ )	41,90 <sup>bc</sup> ( $\pm 2,53$ )	285,6 <sup>e</sup> ( $\pm 11,04$ )	
2	45 <sup>cd</sup> ( $\pm 1,32$ )	74,31 <sup>ab</sup> ( $\pm 11,01$ )	25,10 <sup>de</sup> ( $\pm 2,42$ )	37,51 <sup>e</sup> ( $\pm 0,79$ )	286,0 <sup>e</sup> ( $\pm 6,59$ )	
3	49 <sup>b</sup> ( $\pm 0,95$ )	66,37 <sup>b</sup> ( $\pm 4,41$ )	25,89 <sup>de</sup> ( $\pm 0,84$ )	41,39 <sup>bc</sup> ( $\pm 1,87$ )	297,6 <sup>de</sup> ( $\pm 0,27$ )	
4	33 <sup>g</sup> ( $\pm 0,58$ )	88,74 <sup>a</sup> ( $\pm 16,60$ )	32,57 <sup>b</sup> ( $\pm 1,07$ )	51,36 <sup>a</sup> ( $\pm 1,34$ )	323,8 <sup>bc</sup> ( $\pm 2,33$ )	
5	42 <sup>ef</sup> ( $\pm 0,44$ )	80,35 <sup>ab</sup> ( $\pm 4,71$ )	30,79 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,48$ )	50,70 <sup>a</sup> ( $\pm 2,85$ )	328,0 <sup>b</sup> ( $\pm 4,16$ )	
6	44 <sup>cde</sup> ( $\pm 1,32$ )	75,45 <sup>ab</sup> ( $\pm 3,15$ )	32,19 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,61$ )	42,47 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,61$ )	326,9 <sup>b</sup> ( $\pm 5,82$ )	
7	34 <sup>g</sup> ( $\pm 1,02$ )	88,73 <sup>a</sup> ( $\pm 0,76$ )	41,57 <sup>a</sup> ( $\pm 3,03$ )	46,90 <sup>ab</sup> ( $\pm 1,86$ )	353,7 <sup>a</sup> ( $\pm 7,73$ )	
8	45 <sup>cd</sup> ( $\pm 0,64$ )	76,54 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,84$ )	24,42 <sup>e</sup> ( $\pm 1,69$ )	46,79 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,59$ )	306,2 <sup>cd</sup> ( $\pm 5,18$ )	
9	41 <sup>f</sup> ( $\pm 0,30$ )	75,49 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,00$ )	26,73 <sup>bcd</sup> ( $\pm 2,44$ )	45,72 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,97$ )	300,8 <sup>de</sup> ( $\pm 10,48$ )	
10	46 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,66$ )	73,05 <sup>ab</sup> ( $\pm 1,36$ )	25,55 <sup>de</sup> ( $\pm 3,52$ )	41,73 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,80$ )	300,7 <sup>de</sup> ( $\pm 5,67$ )	
11	43 <sup>def</sup> ( $\pm 0,64$ )	74,01 <sup>ab</sup> ( $\pm 1,09$ )	28,21 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,39$ )	41,95 <sup>bc</sup> ( $\pm 2,71$ )	315,9 <sup>bcd</sup> ( $\pm 3,71$ )	
Controle	8 <sup>h</sup> ( $\pm 0,73$ )	12,65 <sup>c</sup> ( $\pm 6,75$ )	33,02 <sup>b</sup> ( $\pm 1,34$ )	49,53 <sup>a</sup> ( $\pm 2,63$ )	227,5 <sup>f</sup> ( $\pm 1,54$ )	

Letras iguais na mesma coluna não possuem diferença significativa a nível de 5% pelo teste de Tukey

Os hidrolisados dos ensaios do ponto central (9, 10 e 11) apresentaram aumento médio de 1,8 e 1,4 vezes na atividade antioxidante, estimadas por FRAP e ABTS, em relação aos controles, respectivamente. Também houve aumento significativo para a atividade antioxidante estimada por DPPH, quando comparado ao controle.

A Tabela 5 ilustra que, após a hidrólise com protease houve aumento 2,6 a 3,3 vezes no teor de proteína solúvel nas amostras de ES comparado com o controle. Na determinação do grau de hidrólise das proteínas, foi observado que ocorreu aumento da proteína solúvel em TCA dos hidrolisados proteicos de 8,6 a 11,6 vezes em relação ao ensaio controle. Nas análises de atividade antioxidante dos hidrolisados foram observados aumentos estatisticamente significativos para todas os ensaios, quando comparado aos respectivos controles, variando de 1,1 a 1,8 vezes para FRAP; 1,3 a 1,6 vezes para DPPH e 1,2 a 1,4 vezes para ABTS.

Segundo De Quadros et al. (2019), a eficiência de um processo de hidrólise enzimática de proteínas pode ser medida por meio do grau de hidrólise (GH). Os HPP podem ser classificados de acordo com o GH sendo: GH < 10% baixa hidrólise e GH >10% alta hidrólise. Portanto, todos os hidrolisados proteicos deste estudo, produzidos com a protease Alcalase® podem ser considerados de alta hidrólise.

Os peptídeos de baixa massa molecular (3-20 resíduos de aminoácidos) possuem maior bioatividade que as proteínas nativas ou peptídeos com mais que 20 resíduos de aminoácidos (IDOWU et al., 2020). A atividade antioxidante de um peptídeo pode ser atribuída à sua capacidade de eliminação de radicais livres, quelação de íons metálicos e poder redutor (DE QUADROS et al., 2019). O método ABTS é utilizado para determinação da capacidade antioxidante de compostos

**Tabela 4.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de proteína solúvel, proteína solúvel em TCA e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de espinhaço *in natura* de tambatinga

Ensaio	Proteína solúvel (%)	Proteína solúvel em TCA (%)	FRAP	DPPH		ABTS
				( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
1	28 <sup>c</sup> ( $\pm 0,81$ )	86,55 <sup>a</sup> ( $\pm 5,33$ )	7,20 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,09$ )	10,88 <sup>c</sup> ( $\pm 0,18$ )	1854,8 <sup>a</sup> ( $\pm 17,3$ )	
2	43 <sup>b</sup> ( $\pm 0,39$ )	86,90 <sup>a</sup> ( $\pm 2,99$ )	6,74 <sup>bcd</sup> ( $\pm 0,52$ )	12,48 <sup>b</sup> ( $\pm 0,17$ )	1682,3 <sup>b</sup> ( $\pm 53,9$ )	
3	38 <sup>c</sup> ( $\pm 1,05$ )	63,96 <sup>f</sup> ( $\pm 1,81$ )	6,58 <sup>cd</sup> ( $\pm 0,37$ )	12,21 <sup>b</sup> ( $\pm 0,79$ )	1759,7 <sup>ab</sup> ( $\pm 64,3$ )	
4	36 <sup>c</sup> ( $\pm 0,00$ )	71,38 <sup>bcd</sup> ( $\pm 0,23$ )	8,32 <sup>abc</sup> ( $\pm 0,17$ )	12,53 <sup>b</sup> ( $\pm 0,54$ )	1788,0 <sup>ab</sup> ( $\pm 68,7$ )	
5	32 <sup>d</sup> ( $\pm 0,88$ )	70,18 <sup>cdef</sup> ( $\pm 3,22$ )	3,99 <sup>e</sup> ( $\pm 1,26$ )	8,10 <sup>e</sup> ( $\pm 0,22$ )	1720,0 <sup>ab</sup> ( $\pm 5,22$ )	
6	43 <sup>b</sup> ( $\pm 1,61$ )	64,67 <sup>ef</sup> ( $\pm 3,13$ )	7,39 <sup>bcd</sup> ( $\pm 0,47$ )	11,11 <sup>c</sup> ( $\pm 0,19$ )	1779,0 <sup>ab</sup> ( $\pm 62,4$ )	
7	36 <sup>c</sup> ( $\pm 0,58$ )	70,30 <sup>cdef</sup> ( $\pm 1,34$ )	7,64 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,36$ )	9,30 <sup>d</sup> ( $\pm 0,31$ )	1347,7 <sup>cd</sup> ( $\pm 50,4$ )	
8	49 <sup>a</sup> ( $\pm 1,10$ )	66,75 <sup>def</sup> ( $\pm 2,23$ )	6,08 <sup>cde</sup> ( $\pm 1,05$ )	13,74 <sup>a</sup> ( $\pm 0,19$ )	1449,7 <sup>c</sup> ( $\pm 54,5$ )	
9	32 <sup>d</sup> ( $\pm 0,08$ )	76,59 <sup>b</sup> ( $\pm 0,30$ )	10,52 <sup>a</sup> ( $\pm 0,74$ )	12,29 <sup>b</sup> ( $\pm 0,10$ )	1729,8 <sup>ab</sup> ( $\pm 26,7$ )	
10	31 <sup>d</sup> ( $\pm 0,58$ )	78,34 <sup>b</sup> ( $\pm 1,12$ )	8,36 <sup>abc</sup> ( $\pm 0,33$ )	11,87 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,37$ )	1829,3 <sup>ab</sup> ( $\pm 10,41$ )	
11	33 <sup>d</sup> ( $\pm 0,22$ )	73,64 <sup>bcd</sup> ( $\pm 1,97$ )	9,16 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,97$ )	12,37 <sup>b</sup> ( $\pm 0,38$ )	1726,0 <sup>ab</sup> ( $\pm 73,5$ )	
Controle	7 <sup>f</sup> ( $\pm 0,22$ )	9,74 <sup>g</sup> ( $\pm 1,42$ )	5,27 <sup>de</sup> ( $\pm 0,45$ )	12,29 <sup>b</sup> ( $\pm 0,23$ )	1288,8 <sup>d</sup> ( $\pm 66,3$ )	

Letras iguais na mesma coluna não possuem diferença significativa a nível de 5% pelo teste de Tukey

Os peptídeos de baixa massa molecular (3-20 resíduos de aminoácidos) possuem maior bioatividade que as proteínas nativas ou peptídeos com mais que 20 resíduos de aminoácidos (IDOWU et al., 2020). A atividade antioxidante de um peptídeo pode ser atribuída à sua capacidade de eliminação de radicais livres, quelação de íons metálicos e poder redutor (DE QUADROS et al., 2019). O método ABTS é utilizado para determinação da capacidade antioxidante de compostos

**Tabela 5.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de proteína solúvel, proteína solúvel em TCA e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de espinhaço seco de tambatinga

Ensaio	Proteína solúvel (%)	Proteína solúvel em TCA (%)	FRAP	DPPH		ABTS
				( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ )		
1	36 <sup>c</sup> ( $\pm 0,81$ )	97,45 <sup>a</sup> ( $\pm 2,32$ )	16,60 <sup>de</sup> ( $\pm 1,56$ )	60,83 <sup>a</sup> ( $\pm 0,53$ )	653,9 <sup>d</sup> ( $\pm 13,78$ )	
2	42 <sup>abc</sup> ( $\pm 2,85$ )	97,93 <sup>a</sup> ( $\pm 8,23$ )	19,98 <sup>cd</sup> ( $\pm 1,46$ )	54,92 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,29$ )	675,1 <sup>abcd</sup> ( $\pm 21,3$ )	
3	36 <sup>de</sup> ( $\pm 0,95$ )	90,40 <sup>ab</sup> ( $\pm 7,68$ )	19,26 <sup>cd</sup> ( $\pm 0,42$ )	56,58 <sup>b</sup> ( $\pm 1,25$ )	708,0 <sup>abc</sup> ( $\pm 4,94$ )	
4	46 <sup>ab</sup> ( $\pm 2,29$ )	73,00 <sup>c</sup> ( $\pm 5,02$ )	24,59 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,80$ )	48,81 <sup>d</sup> ( $\pm 0,57$ )	672,8 <sup>bcd</sup> ( $\pm 18,0$ )	
5	45 <sup>abc</sup> ( $\pm 1,44$ )	79,64 <sup>bc</sup> ( $\pm 3,73$ )	20,66 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,54$ )	54,56 <sup>bc</sup> ( $\pm 1,32$ )	592,0 <sup>e</sup> ( $\pm 22,0$ )	
6	46 <sup>a</sup> ( $\pm 1,61$ )	78,65 <sup>bc</sup> ( $\pm 5,73$ )	28,05 <sup>a</sup> ( $\pm 0,80$ )	50,59 <sup>d</sup> ( $\pm 0,20$ )	678,9 <sup>abcd</sup> ( $\pm 21,1$ )	
7	46 <sup>abc</sup> ( $\pm 1,32$ )	82,56 <sup>bc</sup> ( $\pm 1,74$ )	26,26 <sup>a</sup> ( $\pm 0,22$ )	57,00 <sup>b</sup> ( $\pm 1,30$ )	671,9 <sup>cd</sup> ( $\pm 16,42$ )	
8	44 <sup>abc</sup> ( $\pm 1,46$ )	83,78 <sup>abc</sup> ( $\pm 3,12$ )	26,32 <sup>a</sup> ( $\pm 0,53$ )	49,87 <sup>d</sup> ( $\pm 0,33$ )	700,9 <sup>abcd</sup> ( $\pm 15,94$ )	
9	43 <sup>abc</sup> ( $\pm 2,46$ )	91,30 <sup>ab</sup> ( $\pm 4,90$ )	20,76 <sup>bc</sup> ( $\pm 2,50$ )	56,04 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,75$ )	711,1 <sup>abc</sup> ( $\pm 2,87$ )	
10	41 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,51$ )	88,74 <sup>ab</sup> ( $\pm 3,77$ )	20,17 <sup>cd</sup> ( $\pm 2,50$ )	55,55 <sup>bc</sup> ( $\pm 1,46$ )	723,0 <sup>a</sup> ( $\pm 11,28$ )	
11	41 <sup>cd</sup> ( $\pm 1,76$ )	87,74 <sup>ab</sup> ( $\pm 4,89$ )	21,03 <sup>bc</sup> ( $\pm 0,57$ )	53,94 <sup>c</sup> ( $\pm 0,47$ )	721,8 <sup>ab</sup> ( $\pm 20,0$ )	
Controle	14 <sup>f</sup> ( $\pm 0,24$ )	8,45 <sup>d</sup> ( $\pm 2,12$ )	15,19 <sup>e</sup> ( $\pm 1,70$ )	37,81 <sup>e</sup> ( $\pm 0,60$ )	499,3 <sup>f</sup> ( $\pm 19,8$ )	

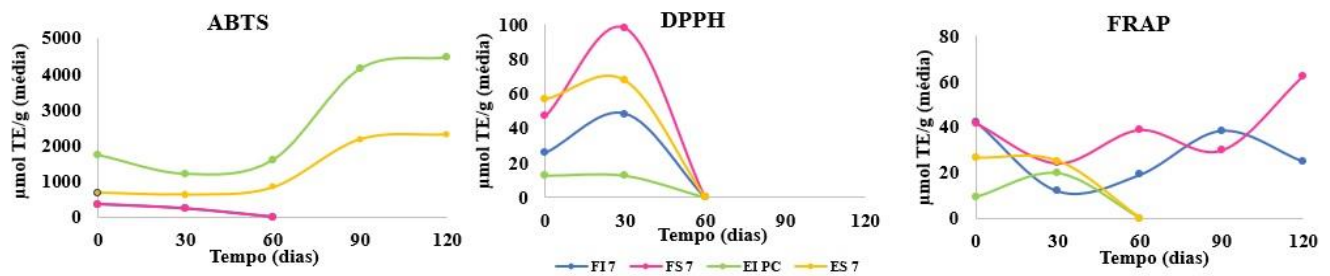
Letras iguais na mesma coluna não possuem diferença significativa a nível de 5% pelo teste de Tukey

hidrofílicos e lipofílicos por meio da captura do radical ABTS, agindo como doadores de elétrons, causando a redução desse radical livre. Para estimar o poder redutor férrico (FRAP), os compostos antioxidantes também atuam como doadores de elétrons, levando a redução do complexo de Fe<sup>3+</sup> para o estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>), aumentando a absorvância da reação, que está diretamente relacionada com o poder redutor total de antioxidantes doadores de elétrons. Já no ensaio de captura dos radicais DPPH, este é reduzido, causando mudança na coloração da solução violeta para amarelada, uma vez que os radicais são eliminados ao receberem átomos de hidrogênio ou elétron. Assim, os resultados do presente estudo mostram que os hidrolisados proteicos de tambatinga possuem peptídeos capazes de sequestrar radicais livres, doando elétrons ou hidrogênio, além de quelar íons metálicos, como o ferro e, assim, inibir e/ou retardar processos oxidativos. Estudos com hidrolisados proteicos de carne mecanicamente separada de tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando Alcalase®, também demonstraram potencial antioxidante considerável (DE QUADROS et al., 2019).

Após a análise de dados de todos os DCCR, foi observado que a qualidade dos modelos gerados pelo coeficiente de determinação não foram significativos ( $p > 0,1$ ), não sendo possível gerar uma superfície de resposta bem definida. Foi observado que não houve um ensaio específico e estatisticamente diferente dos demais, indicando que as variáveis estudadas (tempo e concentração de protease) não apresentaram influência significativa no processo de hidrólise. Desta forma, para a realização da análise de vida de prateleira dos hidrolisados quanto à atividade antioxidante, os ensaios escolhidos foram baseados nos resultados gerados pelo teste de Tukey e, de maneira individual, nas análises antioxidantes, teor de proteína solúvel, teor de proteína solúvel em TCA, rendimento (dados não mostrados) e variáveis utilizadas no processo de hidrólise, tendo como prioridade para este último àqueles ensaios com menor ou médio tempo de processo e menor ou média concentração enzimática. Sendo assim, os ensaios escolhidos para a análises de vida de prateleira para FI, FS, EI e ES foram os ensaios 7, 7, PC (ensaio do ponto central) e 7, respectivamente.



A **Figura 4** mostra a análise de vida de prateleira dos hidrolisados proteicos de tambatinga, por um período de 120 dias, quanto à estabilidade das atividades antioxidantes ABTS, DPPH e FRAP. Na análise da atividade antioxidante por ABTS os hidrolisados de EI e ES apresentaram maior estabilidade do que os hidrolisados de FI e FS. As curvas da análise antioxidante pelo método DPPH mostraram que os hidrolisados de todos os ensaios perderam atividade em 60 dias. Os hidrolisados FI e FS apresentaram maior estabilidade na atividade antioxidante estimada por FRAP, comparada com os hidrolisado de EI e ES.



**Figura 4.** Vida de prateleira quanto às atividades antioxidantes ABTS, DPPH e FRAP de hidrolisados proteicos de filé *in natura* (FI), filé seco (FS), espinhaço *in natura* (EI) e espinhaço seco (ES) de tambatinga

A capacidade antioxidante de peptídeos está relacionada à habilidade de inibir processos oxidativos em alimentos, sendo este uma das principais causas de deterioração em alimentos, mas que podem ser retardados por meio da adição de agentes antioxidantes naturais, como uma alternativa aos aditivos químicos. Os hidrolisados proteicos, obtidos de diversas fontes, podem ser utilizados com intuito de conferir estabilidade à produtos alimentícios por meio da inibição da oxidação lipídica (DE QUADROS et. al, 2019).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o filé e o espinhaço *in natura* obtidos da indústria processadora se encontravam de acordo com a legislação brasileira vigente para os padrões microbiológicos exigidos.

Após o processo de hidrólise do filé *in natura*, filé seco, espinhaço *in natura* e espinhaço seco de tambatinga, houve aumento no teor de proteína solúvel, no teor de proteína solúvel em TCA e nas atividades antioxidantes estimadas pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, entretanto, não foi detectado atividade antimicrobiana nos hidrolisados.

A análise de vida de prateleira dos hidrolisados demonstraram estabilidade na atividade antioxidante durante 60 dias de armazenamento sob congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

A matéria-prima seca (filé seco e espinhaço seco) apresentou melhor desempenho nas análises estudadas, em comparação com a matéria-prima *in natura*, indicando que o processo inicial de secagem das amostras à  $55^{\circ}\text{C}$  por 7 horas não causa degradação proteica significativa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n.5, p. 813–821, 2009.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal., Rio de Janeiro, v. 48, p.1-12, 2020.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, n.3, p.58-65, 2014.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, a qual dispõe sobre os Padrões Microbiológicos de Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial Da União, 2022.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M02 – A11 v.32, n.1. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, 2012.
- DE QUADROS, C. D. C.; LIMA, K. O.; BUENO, C. H. L.; DOS SANTOS FOGAÇA, F. H.; DA ROCHA, M.; PRENTICE, C. Effect of the edible coating with protein hydrolysate on cherry tomatoes shelf life. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.44, n.10, e14760, 2020.
- DE MATOS, F. M., DE LACERDA, J. T. J. G., ZANETTI, G., & DE CASTRO, R. J. S. Production of black cricket protein hydrolysates with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities using a mixture of proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.39, n.102276, 2022.
- FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; & SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 174–184, 2005.
- IDOWU, A. T.; IGIEHON, O. O.; IDOWU, S.; OLATUNDE, O. O.; BENJAKUL, S. Bioactivity potentials and general applications of fish protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics** (2021) 27:109–118, May 2020.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent., **J. Biol. Chem.** V. 193, p. 265–275, 1953.
- PERIČIN, D.; RADULOVIC-POPOVIC, L.; VAŠTAG, Z.; MADAREV-POPOVIC, S.; TRIVIC, S. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. **Food Chemistry**, 115,753-757, 2009.
- SANTOS, W. M. Aproveitamento de subprodutos de resíduos de pesca para a produção de farinha. 52 p. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; DE ARRUDA SILVEIRA, N. F.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. Bluncher, 5ª edição, São Paulo, 560p., 2017.