

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**

***OBTENÇÃO DE UM HIDROGEL PROVENIENTE DE PROTEÍNAS DA  
CORVINA (*Micropogonias furnieri*) E SOLUBILIZAÇÃO DAS  
PROTEÍNAS FIBROSAS RESIDUAIS***

**Vilásia Guimarães Martins**

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Tese apresentada para  
obtenção do título de Doutora  
em Engenharia e Ciência de  
Alimentos.

**Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ**

**Orientador**

**Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA**

**Co-Orientador**

**RIO GRANDE, RS**

**2009**



## AGRADECIMENTOS

Aos amigos do LTA, Graciela, Gustavo, Inajara, Juliana, Kessiane, William e a professora Myriam, vocês foram muito importantes, pois sempre estiveram dispostos a contribuir no que fosse necessário, muitas vezes não só no trabalho, mas também na vida pessoal.

Aos amigos do LEB, Adriano, Ana, Christiane, Daniele, Elisângela, Fabrício, Felipe, Lisiane, Mara, Michele Andrade, Michele Moraes, Roberta, Roque e Thaísa, obrigado pelo incentivo e conversas constantes, vocês foram muito importantes, pois sempre me auxiliaram e aguentaram em momentos difíceis desta etapa da minha vida.

Às amigas, Jaqueline e Lúcia, que muito me escutaram e me aconselharam durante este período, obrigada pelos cafés e longas tardes de conversas intermináveis.

A Simone, Fernanda e Fabiana que ajudaram na parte experimental do trabalho, sempre com muita dedicação.

A Elessandra que teve muita paciência e me auxiliou nas análises realizadas na UFPel.

A Silvana que me ajudou nas análises realizadas na UFRGS.

Aos professores do curso de doutorado, Eliana, Janaína, Leonor, Luiz Antônio, Marta e Susana, que sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse necessário.

Ao professor Adriano Brandelli da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que disponibilizou o seu laboratório para que eu pudesse fazer uma parte da Tese, e também sempre foi muito prestativo no que foi pedido.

Ao professor Srinivasan Damodaran da Universidade de Wisconsin-Madison, nos Estados Unidos, que me recebeu em seu laboratório e sempre esteve disposto a me auxiliar e esclarecer todas as minhas dúvidas.

À Coordenação do curso de Pós-graduação que sempre foi muito prestativa.

Aos meus amigos de fora da Universidade, não vou citar nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém, estes também foram muito importantes, pois sempre estiveram me incentivando, ajudando e aguentando as eventuais (quase constantes) lamentações.

À família Fernandes, Ivo, Soraia, Vanessa, Rodrigo e Rafael, por estarem sempre presentes na minha vida, seja nos momentos bons ou ruins, estando sempre dispostos a incentivar e ajudar.

Aos meus pais, Odilon e Ilva, as minhas irmãs, Manoela e Roberta, aos meus sobrinhos Mariana e Lucas, a minha tia e prima, Ilca e Lidiana, um agradecimento especial por sempre estarem ao meu lado, me incentivando quando estava desmotivada, me acalmando quando estava irritada e me dizendo que tudo ia dar certo quando eu achava que tudo estava no caminho errado.

Ao meu co-orientador, Jorge, que sempre me ajudou, incentivou e me escutou em momentos difíceis durante este período. Agradeço a amizade, o conhecimento e tempo dispensados.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Carlos, pela paciência, confiança, amizade, conhecimento e tempo dispensados. Devo dizer que se fui para os Estados Unidos e terminei a Tese como eu gostaria, foi por causa do incentivo dele, pois ele sempre acreditou que seria possível, enquanto eu sempre duvidava.

A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço a Deus, por ter me mostrado o caminho a seguir e também pelo auxílio recebido em momentos difíceis da minha vida.

OBRIGADO A TODOS que tornaram possível a realização desta Tese!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>4</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
<b>4.1 Pescado</b> .....	<b>7</b>
4.1.1 Composição do Pescado.....	7
4.1.2 Corvina ( <i>Micropogonias furnieri</i> ).....	9
<b>4.2 Proteínas</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2.1 Proteínas do Pescado</b> .....	<b>13</b>
4.2.2 Proteínas insolúveis.....	14
4.2.2.1 Colágeno.....	14
4.2.2.2 Queratina.....	17
4.2.3 Ponto Isoelétrico das Proteínas.....	19
4.3 Aplicações do Resíduo de Pescado.....	20
<b>4.4 Isolados e Hidrolisados Protéicos de Pescado</b> .....	<b>22</b>
<b>4.4.1 Processos Químicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4.2 Processos Enzimáticos</b> .....	<b>27</b>

4.4.2.1 Flavourzyme.....	29
4.4.2.2 Alcalase.....	29
4.4.2.3 Grau de Hidrólise.....	29
4.4.2.4 Término da Reação Enzimática.....	30
<b>4.5 Propriedades Funcionais das Proteínas.....</b>	<b>30</b>
4.5.1 Solubilidade.....	31
4.5.2 Capacidade de Retenção de Água.....	32
4.5.3 Capacidade de Retenção de Óleo.....	33
<b>4.6 Modificação Química das Proteínas .....</b>	<b>33</b>
4.6.1 Procedimentos utilizados para a modificação química.....	34
4.6.2 Aplicações das proteínas modificadas.....	38
<b>4.7 Agentes de Ligação Cruzada.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Hidrogel.....</b>	<b>39</b>
4.8.1 Tipos de hidrogéis.....	41
4.8.2 Formação dos hidrogéis.....	43
4.8.3 Hidrogéis baseados em biopolímeros.....	44
4.8.4 Aplicações dos hidrogéis.....	44
<b>5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 HIDROLISADO PROTÉICO DE PESCADO OBTIDO POR VIA QUÍMICA E ENZIMÁTICA A PARTIR DE CORVINA (<i>Micropogonias furnieri</i>).....</b>	<b>47</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>48</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
<b>2.1 Matéria-prima.....</b>	<b>50</b>

<b>2.2 Enzimas.....</b>	<b>50</b>
<b>2.3 Caracterização da Matéria-prima e dos Hidrolisados .....</b>	<b>51</b>
<b>2.4 Processos de Obtenção do Hidrolisado Protéico .....</b>	<b>51</b>
<b>2.5 Grau de Hidrólise .....</b>	<b>52</b>
<b>2.6 Propriedades Funcionais.....</b>	<b>52</b>
2.6.1 Capacidade de retenção de água.....	52
2.6.2 Capacidade de retenção de óleo .....	52
2.6.3 Solubilidade.....	52
<b>2.7 Liofilização.....</b>	<b>53</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Composição Centesimal.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Grau de Hidrólise .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3 Capacidade de Retenção de Água .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4 Capacidade de Retenção de Óleo .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5 Solubilidade.....</b>	<b>59</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2 SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS DE PESCADO UTILIZANDO <i>Bacillus cereus</i>, <i>Bacillus velezensis</i> E <i>Chryseobacterium sp.</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>68</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
<b>2.1 Matéria-prima.....</b>	<b>71</b>
<b>2.2 Obtenção do Substrato.....</b>	<b>71</b>
<b>2.3 Microrganismos.....</b>	<b>72</b>
<b>2.4 Cultivo Microbiano .....</b>	<b>72</b>

2.5 Concentração Celular .....	72
2.6 Atividade Proteolítica.....	72
2.7 Análise da Concentração de Aminoácidos Livres .....	73
2.8 Determinação de Proteína Solúvel.....	73
2.9 Delineamento Experimental.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
3.1 Proteína Solúvel .....	75
3.2 Aminoácidos Livres .....	77
3.3 Atividade Proteolítica.....	79
4 CONCLUSÃO .....	82
5 REFERÊNCIAS .....	83
5.3 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS INSOLÚVEIS PROVENIENTES DA CORVINA ( <i>Micropogonias furnieri</i> ) UTILIZANDO FUNGOS.....	87
ABSTRACT .....	89
1 INTRODUÇÃO .....	90
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	92
2.1 Matéria-prima.....	92
2.2 Microrganismos.....	92
2.3 Substratos Ácidos e Alcalinos .....	92
2.4 Cultivo Microbiano .....	93
2.5 Concentração Celular .....	93
2.6 Atividade de Proteases .....	94
2.7 Análise da Concentração de Aminoácidos Livres .....	94
2.8 Proteína Solúvel .....	94
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
3.1 Análise do pH .....	95
3.2 Proteína Solúvel .....	96
3.3 Aminoácidos Livres .....	97

3.4 Atividade Proteolítica.....	98
4 CONCLUSÃO .....	100
5 REFERÊNCIAS .....	100
5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL E CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE UM HIDROGEL OBTIDO A PARTIR DE ISOLADOS PROTÉICOS DE CORVINA ( <i>Micropogonias furnieri</i> ) .....	104
ABSTRACT .....	106
1 INTRODUÇÃO .....	107
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	109
2.1 Matéria-prima.....	109
2.2 Hidrolisado protéico.....	109
2.3 Modificação do hidrolisado protéico .....	110
2.4 Determinação do conteúdo protéico .....	110
2.5 Extensão da modificação .....	111
2.6 Titulação eletrométrica .....	111
2.7 Eletroforese .....	112
2.8 Ligação Cruzada por Glutaraldeído .....	112
2.9 Cinética da Absorção de Água .....	112
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	113
3.1 Extensão da modificação dos isolados.....	113
3.2 Eletroforese .....	114
3.3 Titulação eletrométrica .....	115
3.4 Cinética de absorção de água .....	118
4 CONCLUSÃO .....	121
5 REFERÊNCIAS .....	121
5.5 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE HIDROGEL A BASE DE PROTEÍNAS DE PESCADO SUBMETIDO A TRATAMENTO COM ETANOL.....	125
ABSTRACT .....	127
1 INTRODUÇÃO .....	128

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>130</b>
2.1 Matéria-prima.....	130
2.2 Processamento dos isolados protéicos .....	130
2.3 Modificação dos isolados protéicos .....	131
2.4 Determinação do conteúdo protéico .....	131
2.5 Extensão da modificação .....	132
2.6 Ligação Cruzada por Glutaraldeído .....	132
2.7 Tratamento com etanol.....	133
2.8 Cinética da absorção de água do gel.....	133
2.9 Efeito da força iônica sobre a capacidade de absorção de água do gel .....	133
2.10 Efeito do pH sobre a capacidade de absorção de água .....	133
2.11 Absorção e Reversibilidade do Gel.....	134
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>134</b>
3.1 Extensão da modificação química .....	134
3.2 Cinética de absorção de água .....	135
3.3 Efeito da força iônica sobre a capacidade de intumescimento dos géis .....	138
3.4 Efeito do pH sobre a capacidade de retenção de água .....	139
3.5 Reversibilidade dos hidrogéis.....	141
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>143</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>144</b>
<b>6 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>148</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>150</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>151</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>183</b>
9.1 Artigos publicados.....	183
9.1.1 Artigo 1 publicado na Revista Química Nova.....	183
9.1.2 Artigo 2 publicado na Revista Food and Bioprocess Technology .....	190



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ligação peptídica .....	10
Figura 2 Estruturas de alguns aminoácidos.....	12
Figura 3 Conformação da proteína $\alpha$ -hélice e conformação $\beta$ .....	12
Figura 4 Fluxograma do processo de obtenção de um isolado protéico.....	24
Figura 5 Estrutura molecular do dianidrido etilenodiamino tetraacético .....	37
Figura 6 Reações dos resíduos da lisina com o EDTAD .....	38
Figura 7 Esquema representativo dos métodos de formação dos hidrógeis com ligações cruzadas pela reação de reagentes multifuncionais. ....	43

### **ARTIGO 1 - HIDROLISADO PROTÉICO DE PESCADO OBTIDO POR VIA QUÍMICA E ENZIMÁTICA A PARTIR DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)**

Figura 1 Grau de hidrólise enzimática do filé e do resíduo da corvina.....	55
Figura 2 Capacidade de retenção de água do filé e dos hidrolisados em diversos pHs .....	56
Figura 3 Capacidade de retenção de água do resíduo e dos hidrolisados em diversos pHs .....	57
Figura 4 Capacidade de retenção de óleo no filé, resíduos e nos hidrolisados protéicos de corvina .....	58
Figura 5 Solubilidade apresentada pelo filé e hidrolisados de corvina.....	60
Figura 6 Solubilidade apresentada pelo resíduo e hidrolisados de corvina.....	61

### **ARTIGO 2 - SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS DE PESCADO UTILIZANDO *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis* E *Chryseobacterium sp.***

Figura 1 Solubilização da proteína durante o período de cultivo nos substratos (a) ácido e (b) alcalino. ....	76
Figura 2 Concentração de aminoácidos solubilizados durante o processo fermentativo nas diferentes condições estudadas. ....	778
Figura 3 Atividade proteolítica nos substratos ácido (a) e alcalino (b) durante o processo fermentativo com diferentes bactérias e diferentes concentrações .....	800
Figura 4 Superfícies de repostas apresentadas pelos substratos ácido (a) e alcalino (b) em 72 h de cultivo .....	811

### **ARTIGO 3 - HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS INSOLÚVEIS PROVENIENTES DA CORVINA (*Micropogonias furnieri*) UTILIZANDO FUNGOS**

A Figura 1 mostra a solubilização dos aminoácidos ao longo das 96 h de cultivo para cada um dos fungos estudados, nos substratos, ácido e alcalino. No substrato alcalino, a liberação de aminoácidos acontece desde o tempo zero, já no substrato ácido começa a ocorrer uma liberação de aminoácidos foi mais pronunciada a partir de 24 h de cultivo.....97

Figura 1 Concentração de aminoácidos livres ao longo do cultivo (a) Substrato Alcalino e (b) Substrato Ácido. Todos os pontos dos gráficos são valores médios de três repetições. ....97

#### **ARTIGO 4 - ANÁLISE ESTRUTURAL E CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE UM HIDROGEL OBTIDO A PARTIR DE ISOLADOS PROTÉICOS DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)**

Figura 1 Extensão da modificação dos isolados protéicos.....1133

Figura 2 Eletroforese dos isolados e isolados modificados com EDTAD. ....11515

Figura 3 Grupamentos carboxílicos existentes no isolado alcalino não modificado e nos isolados modificados com EDTAD. ....11615

Figura 4 Grupamentos carboxílicos no isolado ácido não modificado e em nos hidrolisados modificados com EDTAD, provenientes de resíduos da corvina.....11716

Figura 5 Cinética de absorção dos hidrogéis produzidos a partir do isolado ácido proveniente de resíduos da corvina.....11818

Figura 6 Cinética de absorção de água dos hidrogéis formulados a partir do isolado alcalino proveniente de resíduos da corvina.....1200

#### **ARTIGO 5 - CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE HIDROGEL A BASE DE PROTEÍNAS DE PESCADO SUBMETIDO A TRATAMENTO COM ETANOL**

Figura 1 Cinética de absorção de água dos hidrogéis. (a) isolado protéico alcalino modificado (b) isolado protéico ácido modificado .....13636

Figura 2 Efeito da força iônica sobre os hidrogéis. (a) isolado alcalino modificado (b) isolado ácido modificado .....13838

Figura 3 Efeito do pH sobre os hidrogéis. (a) isolado alcalino modificado (b) isolado ácido modificado .....1400

Figura 4 Cinética de absorção e desidratação dos hidrogéis produzidos a partir dos isolados protéicos de pescado alcalinos.....1422

Figura 5 Cinética de absorção e desidratação dos hidrogéis produzidos a partir dos isolados protéicos ácidos .....1433



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição de aminoácidos de diversos tipos de colágeno extraídos de resíduo de pescado (Resíduos de aminoácidos/total de aminoácidos).....16

### **ARTIGO 2 - SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS DE PESCADO UTILIZANDO *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis* E *Chryseobacterium sp.***

Tabela 1 Fatores avaliados e os níveis de variação para os experimentos realizados. ....74

Tabela 2 Proteínas solúveis, aminoácidos ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade proteolítica ( $\text{U mL}^{-1}$ ) apresentados nos ensaios do planejamento experimental. ....75

### **ARTIGO 3 - HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS INSOLÚVEIS PROVENIENTES DA CORVINA (*Micropogonias furnieri*) UTILIZANDO FUNGOS**

Tabela 1 Atividade proteolítica em  $\text{U mL}^{-1}$  ao longo do cultivo no substrato alcalino..98

Tabela 2 Atividade proteolítica em  $\text{U mL}^{-1}$  ao longo do cultivo no substrato ácido.....99

### **ARTIGO 5 - CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE HIDROGEL A BASE DE PROTEÍNAS DE PESCADO SUBMETIDO A TRATAMENTO COM ETANOL**

Tabela 1 Extensão da modificação nos isolados protéicos de pescado nas diversas proporções de EDTAD:proteína (p/p) .....1344

## RESUMO

Com o aumento na captura de pescado e da poluição do meio ambiente, esta-se à margem de exceder a estimativa do limite da sustentabilidade, e obviamente isto faz com se utilize os recursos marítimos com mais inteligência e precaução. Aplicando tecnologia enzimática ou química é possível recuperar as proteínas do processamento do pescado, produzindo hidrolisados e isolados protéicos. Uma grande quantidade de proteínas insolúveis está disponível em escamas, peles e ossos, subprodutos do processamento do pescado, que podem ser solubilizadas através de fungos e bactérias. Utilizando isolados protéicos é possível obter biopolímeros, estes têm chamado a atenção nos últimos anos, pois são biodegradáveis, não-tóxicos e geralmente biocompatíveis. Os hidrogéis protéicos são polímeros que podem absorver uma quantidade de água a partir de 10 até centenas de vezes o seu peso seco. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um hidrogel protéico, com propriedades superabsorventes, a partir das proteínas solúveis e insolúveis da corvina (*Micropogonias furnieri*). Para a produção dos hidrolisados a partir das proteínas solúveis foi utilizado processo enzimático (Alcalase e Flavourzyme) e químico (solubilização ácida e alcalina). Nos processos de solubilização das proteínas insolúveis foram utilizados microrganismos (bactérias e fungos). Tanto as bactérias como os fungos avaliados apresentaram capacidade de solubilizar as proteínas insolúveis presentes nos resíduos (escamas, ossos, cartilagens e outros). A bactéria que atingiu a maior atividade proteolítica foi a *Bacillus velesensis* (47,56 U mL<sup>-1</sup>) e o fungo foi o *Penicillium* sp. (E20) (31,20 U mL<sup>-1</sup>). Para a produção dos hidrogéis, foram utilizados isolados protéicos provenientes de solubilização ácida ou alcalina, produzidos a partir de resíduos da industrialização de pescado, modificados quimicamente com dianidrido etilenodiamino tetraacético (EDTAD) e adicionados de agente de ligação cruzada (glutaraldeído). Algumas proteínas modificadas ainda foram submetidas a tratamento com etanol. Foram realizadas análise estrutural das proteínas modificadas e estudo da capacidade de retenção de água dos hidrogéis assim obtidos. Os hidrogéis produzidos apresentaram alta capacidade de retenção de água. A máxima absorção de água foi alcançada pelo hidrogel ácido sem o tratamento com etanol foi de 103,25 g<sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub>, enquanto que a mesma amostra tratada com etanol alcançou 216,05 g<sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub>. Os hidrogéis produzidos podem ser utilizados em diversas indústrias, tais como, farmacêutica, alimentícia, médica, agroindústria, entre outras, que necessitem de hidrogéis com alta capacidade de retenção de água.

Palavras-chave: Pescado, resíduos, hidrogel, proteínas, isolado, hidrolisado,

## ABSTRACT

With the increase in the fish capture and the environment pollution, the margin has been of exceeding the estimate of the sustainability limit, and obviously this required that the marine resources are used with more intelligence and precaution. Applying enzymatic or chemical technology, it is possible to recover the proteins of the fish processing, producing protein hydrolysed and isolated. A great amount of fibrous proteins, are present in scales, skins and bones which are by-products of the fish processing and could be solubilized by fungi and bacteria. Using protein isolated it is possible produce protein-based hydrogels that can absorb water in the amount from 10 up to thousands of times their dry weight. Natural-based superabsorbent polymers have attracted much attention, because of their non-toxicity, biocompatibility and biodegradability. The aim of this study was to develop a hydrogel, with superabsorbent properties, from protein hydrolysate of corvina (*Micropogonias furnieri*) and solubilization of the fibrous proteins from the residues of protein hydrolysate processing performed with fish wastes. For the hydrolysates production were used enzymatic (Alcalase and Flavourzyme) and chemical (acid or alkaline and isoelectric precipitation) processes. In the solubilization process of insoluble proteins microorganisms were used (bacteria and fungi). The bacteria and fungi tested were capable to hydrolyse the insoluble proteins presents in the residues (scales, bones, cartilage, etc.). The bacteria that reached the highest proteolytic activity was the *Bacillus velesensis* (47.56 U mL<sup>-1</sup>) and the fungus was *Penicillium* sp. (E20) (31,20 U mL<sup>-1</sup>). To the production of the hydrogels were used the protein isolated produced from fish wastes, these were modified with the chemical, ethylenediaminetetraacetic dianhydride (EDTAD) and added of a crosslink reagent (Glutaraldehyde). Some modified proteins were treated with ethanol. The analysis accomplished in the biopolymers were, structure of the modified proteins and studies of swelling behavior of hydrogels. To the hydrogels production were used the acid and alkaline isolated from fish wastes. The produced hydrogels showed superabsorbent properties. The maximum water swelling were attained by hydrogel without treatment with ethanol and produced with acid substrate (103,25 g<sub>water</sub>/g<sub>dry gel</sub>), while the same sample treated with ethanol reached (216,05 g<sub>água</sub>/g<sub>dry gel</sub>). The produced hydrogels could be used in many industries, such as, pharmaceutical, food, medical, agribusiness, among other, that could need products with water uptake.

Keywords: fish, waste, hydrogel, proteins, isolated, hydrolysed

## 1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento dos limites dos recursos naturais e o aumento da poluição ambiental têm enfatizado a necessidade de uma melhor utilização das espécies de baixo valor comercial e também dos resíduos gerados por indústrias processadoras de pescado. Dentre estes resíduos as biomoléculas que se encontram em maior quantidade são as proteínas. A elaboração de hidrolisados protéicos a partir de subprodutos da indústria de pescado tem recebido mais atenção nos últimos anos (Nolsoe e Undeland, 2008; Slizyte et al., 2005). Muitos estudos têm sido realizados sobre a avaliação das condições para a hidrólise e as propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de pescado a partir de pescado inteiro, filé ou músculo.

As proteínas são substâncias nitrogenadas complexas, de elevada massa molecular. A hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, destas moléculas origina os aminoácidos, sendo estes componentes essenciais a todas as células vivas e estando relacionadas a todas as funções fisiológicas.

De acordo com diferentes autores (Undeland et al., 2002; Kristinsson e Rasco, 2000; Cheng et al., 1998; Reguly, 1983), o isolamento de proteína é basicamente, um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes. Os isolados protéicos podem ser obtidos de diversas matérias-primas, tais como: soja, leite, feijão, amaranto ou pescado, entre outros.

Os hidrolisados protéicos geralmente são adicionados em produtos alimentícios para aumentar o valor nutricional ou melhorar as propriedades funcionais destes. Além disso, os hidrolisados protéicos também podem ser utilizados para outras finalidades, como produção de hidrogéis.

Dos hidrolisados protéicos obtidos a partir de resíduos de pescado, resultam proteínas fibrosas insolúveis, derivadas da pele, ossos, escamas, cartilagens que não foram solubilizadas durante o processo. Estes resíduos são ricos em queratina e colágeno, que são de difícil degradação devido as suas estruturas de caráter fibroso. A utilização de resíduos agroindustriais, além de adicionar valor para a indústria, aumenta a conservação e a reciclagem consciente de energia, motivando a busca por alternativas para converter resíduos de queratina e colágeno em produtos com maior valor agregado.

A queratina e o colágeno, em grande quantidade em resíduos de animais, podem ser convertidos em biomassa útil, concentrados protéicos e aminoácidos, utilizando proteases (enzimas queratinolíticas) produzidas por fungos, actinomicetes, e por bactérias isoladas a partir de solos onde materiais queratinosos tenham sido depositados (Riffel e Brandelli, 2006; Kaul e Sumbali, 1997).

As queratinas também podem ser convertidas, após hidrólise enzimática, em produtos alimentícios, fertilizantes, colas e filmes ou usadas para a produção de aminoácidos raros como, serina, cisteína e prolina. O colágeno e seus fragmentos peptídicos, tem tido suas aplicações comerciais aumentado para a composição de medicamentos, bebidas, alimentos, cosméticos e uma variedade de produtos para cuidado da saúde (Watanabe, 2004).

Os hidrogéis são uma classe de materiais leves e úmidos, cujas propriedades dependem da rede de polímero construída e do seu conteúdo de água (Cheng et al., 1998). Um dos grandes desafios para a ciência de materiais é o desenvolvimento de biomateriais para reparo do organismo humano e também para combater problemas relacionados com a poluição. Para isso têm sido utilizadas modificações químicas de proteínas com o propósito de expor grupos funcionais das proteínas, determinar grupos funcionais de enzimas e compreensão do mecanismo de ação de drogas.

Os materiais superabsorventes possuem um grande número de atributos que se fazem atrativos em diferentes aplicações. Como resultado de seu atributo superior que é a absorção de água, materiais superabsorventes têm substituído muitos absorventes tradicionais em fraldas descartáveis e tem feito melhoras significantes em produtos descartáveis para a higiene feminina. A propriedade básica da absorção de água tem sugerido o uso de materiais absorventes em diversas indústrias, tais como, biomédicas, farmacêuticas e biotecnológicas (Rathna e Damodaran, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir um hidrogel superabsorvente, através da modificação química de hidrolisados protéicos provenientes da corvina (*Micropogonias furnieri*) e recuperar aminoácidos de proteínas insolúveis através de hidrólise microbiana.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as propriedades funcionais de hidrolisados protéicos obtidos por métodos químicos (ácido e alcalino) e enzimáticos (Alcalase e Flavourzyme);

- Verificar o potencial de degradação das bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus velesensis* e *Chryseobacterium* sp. e de dez fungos, sobre as proteínas insolúveis derivadas da elaboração de isolados protéicos de pescado;

- Modificar e caracterizar proteínas de hidrolisados de pescado visando a produção de hidrogel;

- Estudar a capacidade de absorção de água de um hidrogel, submetido a tratamento com etanol, obtido de hidrolisados protéicos modificados quimicamente.

### 3 JUSTIFICATIVA

O reconhecimento dos limites dos recursos naturais e o aumento da poluição do meio ambiente têm enfatizado a necessidade de uma utilização mais valorizada das espécies de baixo valor comercial e também dos resíduos gerados por indústrias processadoras de pescado. Tradicionalmente, esse material é convertido em farinha de pescado, matéria-prima para rações animais (Ferreira e Hultin, 1994). Do pescado inteiro, mais de 50% é considerado resíduo após o processamento e não é utilizado como alimento (Mackie, 1982). Com o crescimento da população mundial e o aumento na captura de pescado atualmente, estamos a margem de exceder a estimativa do limite da sustentabilidade que sugere um valor em torno de 100 milhões ton/ano, e obviamente este aumento faz com que se utilize os recursos marítimos com mais inteligência e precaução. A hidrólise protéica é uma alternativa que aborda a recuperação da biomassa a partir do pescado e que resulta em um produto solúvel conhecido como hidrolisado protéico de pescado. O hidrolisado solúvel é submetido à desidratação, resultando em maior estabilidade e em um alto conteúdo de proteína (Guerard et al., 2002).

A indústria pesqueira riograndina processa uma grande variedade de espécies, das quais somente uma parte se emprega como alimento para consumo humano direto, o restante constitui um subproduto rico em proteínas e lipídios que pode se transformar em diversos produtos úteis, tais como hidrolisados protéicos.

A corvina do Atlântico (*Micropogonias furnieri*) é um pescado de baixo valor comercial que é capturado em grande quantidade pelos navios pesqueiros de Rio Grande, no Sul do Rio Grande do Sul. As indústrias pesqueiras de Rio Grande industrializam este pescado e geram uma quantidade de resíduo muito grande.

A utilização de enzimas para hidrolisar proteínas alimentícias é um processo importante, pois é empregado para modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas nativas, sem colocar em risco o valor nutritivo.

A recuperação e alteração das proteínas do músculo do pescado, presentes em subprodutos, e a utilização desta como ingredientes funcionais em alimentos, é uma alternativa para a indústria desenvolver processos para recuperar e

utilizar o resíduo do processamento do pescado se torna mais viável economicamente do que descartar os subprodutos (Kristinsson e Rasco, 2000).

As proteínas fibrosas, presentes em resíduos de chifres, cascos, penas, unhas, escamas e cabelos, estão disponíveis abundantemente na natureza e podem ser convertidas em biomassa utilizável, tais como, concentrados protéicos e aminoácidos, utilizando enzimas microbianas (Anwar e Saleemuddin, 1998)

Estes resíduos ricos em queratina e colágeno são dificilmente degradados, pois no caso da queratina, esta é um polipeptídeo densamente empacotado e fortemente estabilizado por muitas pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, além de pontes dissulfeto. O colágeno é uma proteína fibrosa que perfaz a maior parte de ossos, pele e tecido conectivo. Devido à estrutura espacial e ao alto peso molecular, o colágeno nativo é naturalmente insolúvel em água.

Durante o processo de hidrólise do resíduo de pescado, é obtida uma grande quantidade de escamas, pedaços de ossos, cartilagens e pele, que contêm queratina e colágeno. Estas proteínas e hidrolisados associados possuem características desejadas para várias aplicações industriais, pois além de não serem perigosos para a saúde humana, são capazes de reter água em escala molecular, apontam aminoácidos essenciais e podem servir como partículas estacionárias em sistemas cromatográficos. Além disso, podem ser utilizados em materiais para a indústria cosmética, produção de órgãos artificiais, etc. (Morimura et al., 2002).

Entre os biopolímeros, as proteínas talvez sejam as menos utilizadas em termos de aplicações industriais. Primeiramente, por serem consideradas unicamente como ingredientes funcionais e nutricionais de produtos alimentícios. Seu enorme potencial como elemento estrutural em aplicações industriais que não em alimentos, não é reconhecido e nem aplicado rotineiramente. As proteínas oferecem muitas vantagens sobre os mais convencionais tipos de biomassa. Por exemplo, ao contrário de polímeros naturais baseados em polióis (celulose e outros carboidratos), as proteínas contêm diversos grupos reativos, incluindo grupamentos amino, hidroxilas, sulfidrilas, fenólicos e carboxílicos. Esses grupos reativos podem ser usados como sítios de modificações químicas e ligação cruzada para produzir novas estruturas poliméricas.

A principal característica de um hidrogel produzido a partir de biopolímeros é a capacidade de absorver uma grande quantidade de água relativa à sua massa sendo resistente à dissolução. No caso dos hidrogéis sintéticos, muitas desvantagens os acompanham, e podem ser melhoradas pelo uso de hidrogéis derivados de fontes naturais de polímeros.

Em geral, os hidrogéis apresentam uma grande importância tecnológica e econômica pelo amplo campo de aplicações, podendo ser utilizados nas indústrias, farmacêutica, biomédica, alimentícia, cosmética, entre outras (Kinney e Scranton, 1994).

Se considerarmos o interesse na saúde humana, no meio ambiente, a grande depleção das reservas de petróleo, em combinação com a flutuação no preço do petróleo devido aos conflitos econômicos e políticos, uma menor dependência dos produtos produzidos à base de petróleo seria prudente.

Os hidrogéis protéicos convencionais induzidos termicamente não voltam ao seu volume original depois de terem sido desidratados. Esta diminuição da capacidade de intumescimento está relacionada com o aumento das ligações de hidrogênio, as interações eletrostáticas e hidrofóbicas, que ocorrem se formam durante a desidratação das proteínas. Esta perda da capacidade de intumescimento dos hidrogéis protéicos induzidos termicamente limita sua aplicabilidade industrial, portanto, fica clara a necessidade de obter um hidrogel protéico que seja altamente absorvente, biodegradável, que intumesça reversivelmente, e que seja substancialmente livre de resíduos de agentes de ligações cruzadas.

A premissa básica da nossa pesquisa é que através da modificação da estrutura química da proteína, ocorra a modificação dos resíduos da lisina, sendo possível introduzir um grande número de grupos carboxílicos dentro da molécula da proteína. Esses grupos carboxílicos adicionados, juntamente com o extensivo desdobramento da molécula protéica via repulsões eletrostáticas intramoleculares, podem dar um caráter polianiónico para a proteína com numerosos sítios de ligação para a água. Ligações cruzadas de proteínas polianiónicas com glutaraldeído poderão produzir um hidrogel com propriedades superabsorventes.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Pescado

A região Sul do Brasil é a terceira em potencial pesqueiro nacional. Dentre os estados desta região, o Rio Grande do Sul é responsável por grande parte deste potencial, apresentando um desembarque de 36.896.227 kg em 2006, dos quais 23,16% foram representados pela corvina (*Micropogonias furnieri*). A cidade do Rio Grande, localizada na zona litorânea do extremo sul do Brasil, caracteriza-se como o principal centro de pesca da região Sul (Brasil, 2007).

O pescado é consumido, principalmente, como fonte protéica. O músculo é composto de proteínas de elevado valor nutritivo e contem alta proporção de aminoácidos essenciais, particularmente aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal (Ayala, 2001).

#### 4.1.1 Composição do Pescado

A composição química do pescado varia de espécie para espécie e de indivíduo para indivíduo dependendo de fatores, tais como, sexo, idade, ambiente e estações do ano. O conhecimento da composição proximal do pescado tem importância fundamental na aplicação de diferentes processos tecnológicos, influenciando no aspecto de qualidade da matéria-prima, bem como nos atributos sensoriais e na estabilidade do armazenamento do produto (Yeannes e Almandos, 2003).

O músculo do pescado pode conter 60 a 85% de umidade, 20% de proteína bruta, 1 a 2% de cinza, 0,3 a 1% de carboidrato e 0,6 a 36% de lipídio (Ogawa e Maia, 1999). Em termos de proteínas, a carne de pescado se equivale em média a carne de mamíferos e aves, porém as proteínas do pescado apresentam digestibilidade de 90 a 100%, valores que são ligeiramente superiores que da carne bovina e de frango (Contreras-Guzmán, 1994).

Morfologicamente, o pescado é composto de músculo ordinário (branco) e sanguíneo (escuro). Bioquimicamente sabe-se que o músculo escuro tem maior proporção de proteínas sarcoplasmáticas e de estroma que o músculo ordinário e que

o conteúdo de glicogênio é mais alto em carnes sanguíneas, o músculo escuro é mais rico em lipídios, taurina (aminoácido sulfônico) e ferro (Ogawa e Maia, 1999).

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente da alta sensibilidade à hidrólise e composição balanceada em aminoácidos essenciais, principalmente os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina, cisteína e a lisina (Neves et al., 2004).

As proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e as do tecido conjuntivo são sob o ponto de vista tecnológico as mais importantes. As sarcoplasmáticas, solúveis em água, encontradas no plasma celular, atuam como enzimas e transportadoras de oxigênio. Correspondem de 18 a 20% da proteína total. As miofibrilares, em maior proporção, 65 a 80% respondem a estrutura fibrilar e atividade muscular. Estas representadas principalmente pela miosina e actina, solúveis em soluções salinas. As proteínas do tecido conjuntivo, que se concentram ao redor das fibras musculares e na pele, incluem principalmente o colágeno e a elastina. Compreendem 3 a 5% do total de proteína, são insolúveis em soluções salinas concentradas e facilmente solubilizadas por aquecimento (Hultin, 1985; Spinelli e Dassow, 1982).

Os lipídios do pescado apresentam baixa percentagem de ácidos graxos saturados e elevado nível de poliinsaturados, salientando-se os da série ômega-3. Entre estes, destacam-se os ácidos essenciais eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (Luzia et al., 2003). Os ácidos EPA e DHA favorecem o desenvolvimento e função do cérebro, auxiliam na prevenção de trombose e arteriosclerose (Jayasinghe et al., 2003).

Além disso, o músculo contém quantidade significativa de fósforo (250 mg/100g de tecido), e de iodo (peixes de mar); pouco cálcio e ferro. Nos pescados com teor de gordura acima de 15%, são encontrados níveis elevados de vitaminas A e D na musculatura. Nos demais, a concentração é sempre elevada no fígado. Apesar da carne conter quantidades apreciáveis de vitamina B1, apenas nos pescados frescos é possível aproveitá-la, pois a tiaminase, presente na musculatura, transforma rapidamente a B1 em piridina e em tiazol (Lederle, 1991).

#### 4.1.2 Corvina (*Micropogonias furnieri*)

A corvina é uma espécie da família dos Cienídeos, considerada um dos mais importantes recursos costeiros da plataforma Sul do Brasil. Em 2006 o desembarque na cidade de Rio Grande foi de 8.546.032 kg, o que representou 23,16% do total de pescado desembarcado. A corvina pode atingir até 70 cm de comprimento. Apresenta ampla distribuição geográfica, e está presente no Atlântico desde o México até a Argentina (Elsdon e Gillanders, 2002). Possui grande tolerância às variações de salinidade, o que facilita a alimentação e possibilita melhores condições de proteção dos predadores (Castello, 1986). É uma espécie onívora e prefere uma dieta baseada em pequenos crustáceos como caranguejos e camarões (Costa e Araújo, 2003).

No ciclo de vida desta espécie os indivíduos jovens migram para as áreas estuarinas e os adultos alcançam o litoral para reproduzir. Dessa forma, o tamanho da população de corvina varia de um ano para outro em consequência da migração, a qual também ocorre devido à disponibilidade de alimento (Costa e Araújo, 2003).

Segundo estudo realizado por Luzia et al. (2003) a corvina capturada no verão tem em média 1.080 g e mede 46,6 cm e no inverno pesa 671,8 g e mede 38 cm. O conteúdo de lipídios foi de 0,6% no verão e 3,29% no inverno, em base seca. Pesquisadores reportaram que o efeito do clima sobre o conteúdo de lipídios em algumas espécies pode variar aproximadamente 10% de acordo com a estação de captura (Krzynowek, 1985).

#### 4.2 Proteínas

As proteínas são macromoléculas complexas, compostas de aminoácidos, e necessárias para os processos químicos que ocorrem nos organismos vivos. São os constituintes básicos da vida, tanto que seu nome deriva da palavra grega "*proteios*", que significa "*em primeiro lugar*" (Bobbio e Bobbio, 1992). Nos animais, as proteínas correspondem cerca de 80% do peso do músculo desidratado, cerca de 70% da pele e 90% do sangue seco.

A importância das proteínas, entretanto, está relacionada com suas funções no organismo, e não com sua quantidade. A maioria das enzimas conhecidas são proteínas; muitas vezes, as enzimas existem em porções muito pequenas. Mesmo assim, estas substâncias catalisam as reações metabólicas e capacitam aos

organismos à construção de outras moléculas - proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios - que são necessárias para a vida (Lehninger et al., 1995).

As proteínas também são chamadas de polipeptídeos, porque os aminoácidos que as compõem são unidos por ligações peptídicas (uma ligação peptídica é a união do grupo amina ( $-NH_2$ ) de um aminoácido com o grupo carboxila ( $-COOH$ ) de outro aminoácido, através da formação de uma amida, como mostra a Figura 1. A ligação C-N, em um peptídeo, é especial, pois esta é 10% mais "curta" do que uma ligação C-N normal, e o ângulo de ligação também é diferente do esperado para um carbono  $sp^2$ . Isto porque a ligação peptídica, na verdade, apresenta uma estrutura de ressonância, tendo um forte caráter de dupla ligação. Através destas ligações, os aminoácidos formam cadeias longas; a maioria das proteínas tem mais de 200 aminoácidos. Todos os aminoácidos têm, em comum, um carbono ligado a um grupo amina e a um grupo carboxila (Fennema, 1993).

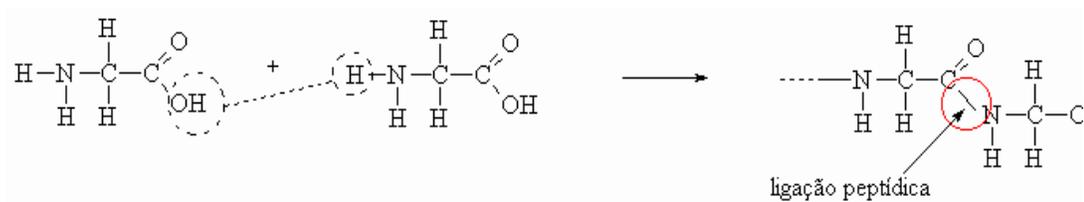
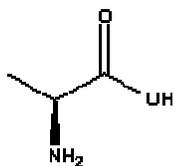
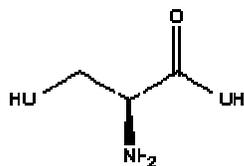


Figura 1 Ligação peptídica (QMCWEB, 2008)

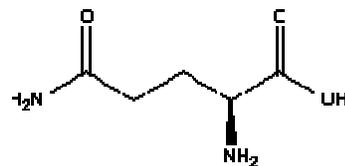
Na Figura 2 podemos observar as fórmulas estruturais de 20 aminoácidos.



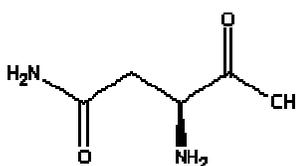
Alanina



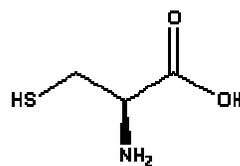
Serina



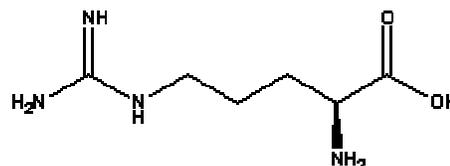
Glutamina



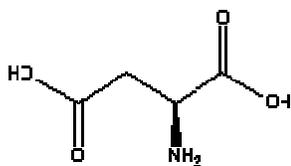
Asparagina



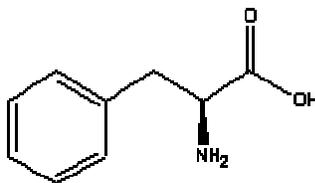
Cisteína



Arginina



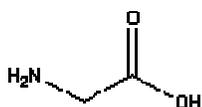
Ácido aspártico



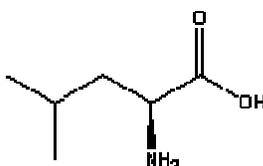
Fenilalanina



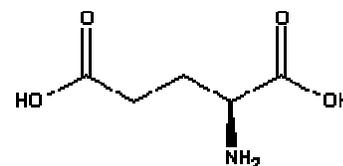
Ácido amino butírico



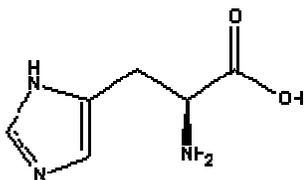
Glicina



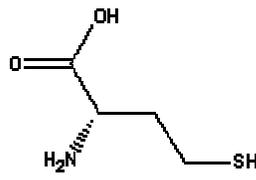
Leucina



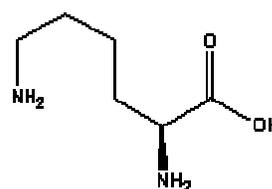
Ácido glutâmico



Histidina



Homocisteína



Lisina

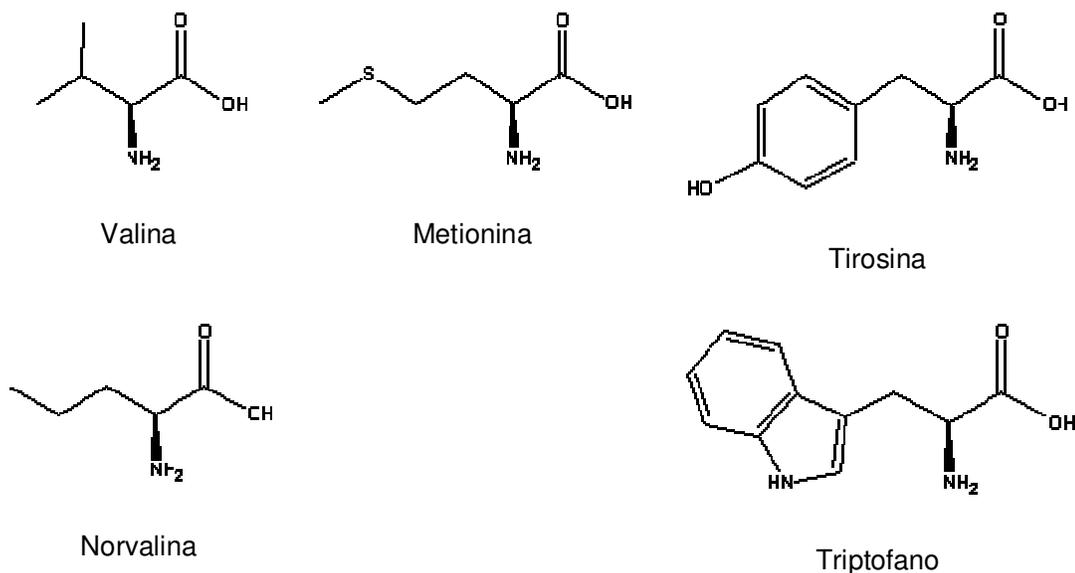


Figura 2 Estruturas de alguns aminoácidos (QMCWEB, 2008)

As proteínas são formadas exclusivamente por apenas 20 aminoácidos, que se repetem em uma sequência característica para cada proteína. Esta sequência, conhecida como estrutura primária, é que, de fato, determina a forma e a função da proteína. A estrutura primária é somente a sequência dos aminoácidos, sem se preocupar com a orientação espacial da molécula. As interações intermoleculares dos aminoácidos das proteínas fazem com que a cadeia protéica assuma uma estrutura secundária e, algumas vezes, uma estrutura terciária (Lehninger et al., 1995).

A estrutura secundária, como mostra a Figura 3, é uma função dos ângulos formados pelas ligações peptídicas que ligam os aminoácidos. A conformação espacial é mantida graças às interações intermoleculares entre os hidrogênios dos grupos amino e os átomos de oxigênio dos outros aminoácidos (Fennema, 1993).

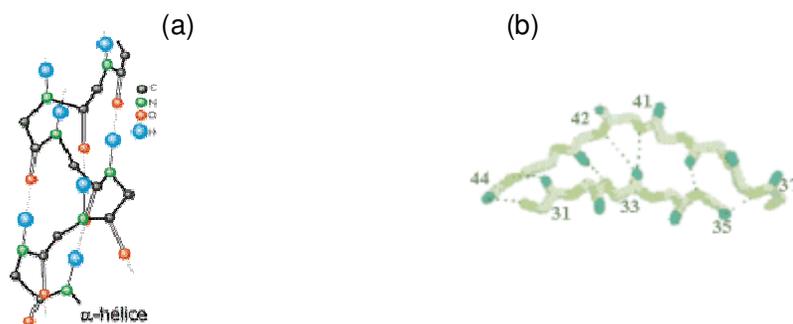


Figura 3 Conformação da proteína  $\alpha$ -hélice (a) e conformação  $\beta$  (b) (QMCWEB, 2008)

Em geral, estas interações forçam a proteína a assumir uma forma helicoidal, como uma corda enrolada em torno de um eixo imaginário. Esta forma, a mais comum, é chamada de  $\alpha$ -hélice. Outra forma na estrutura secundária é a conformação  $\beta$ . Na conformação  $\beta$ , um segmento da cadeia interage com outro, como mostra a Figura 3b (Belitz e Grosch, 1997).

A estrutura terciária relaciona-se com as voltas e dobraduras da cadeia protéica sobre ela mesma. É a conformação espacial da proteína, como um todo, e não de determinados segmentos particulares da cadeia protéica. A forma das proteínas está relacionada com sua estrutura terciária. O que determina a estrutura terciária são as cadeias laterais dos aminoácidos (Fennema, 1993).

Existe, finalmente, a estrutura quaternária. Certas proteínas, tal como a hemoglobina, são compostas por mais de uma unidade polipeptídica (cadeia protéica). A conformação espacial destas cadeias, juntas, é que determina a estrutura quaternária. Esta estrutura é mantida pelas mesmas forças que determinam as estruturas secundárias e terciárias (Lehninger et al., 1995).

As proteínas podem ser simples (constituídas somente por aminoácidos) ou conjugadas (que contém grupos prostéticos, isto é, grupos que não são aminoácidos, tais como carboidratos, íons, pigmentos, etc.) (Bobbio e Bobbio, 1992).

#### **4.2.1 Proteínas do Pescado**

Em geral, a exemplo de outras carnes, leites e ovos, o músculo esquelético do pescado é rico em proteínas e lipídios. Estas proteínas apresentam alto valor nutritivo, pois possuem aminoácidos essenciais, sendo, especialmente, ricas em lisina, um aminoácido limitante em cereais como arroz, milho e farinha de trigo (Suzuki, 1987).

As proteínas musculares podem ser classificadas em três grandes grupos: miofibrilares (proteínas contrácteis); sarcoplasmáticas (proteínas metabólicas) e estroma (proteínas do tecido conectivo) (Salas, 2001).

As proteínas miofibrilares constituem de 65 a 75% das proteínas do músculo. Nesse grupo, as principais são, miosina e actomiosina, não somente pela quantidade, mas também por suas propriedades funcionais. Estas apresentam grande influência sobre a textura, suculência, capacidade de retenção de água, capacidade emulsificante, entre outras (Ayala, 2001).

As proteínas sarcoplasmáticas compreendem 30% do total das proteínas do músculo do pescado. Estas apresentam a propriedade de serem solúveis em água e em soluções salinas diluídas. Compreendem as proteínas do sarcoplasma, as integrantes do líquido extracelular e as proteínas presentes nas pequenas partículas do sarcoplasma. As proteínas do estroma são o colágeno e a elastina, que são o resíduo da extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (Sikorski, 1990).

Durante a transformação do pescado em produtos processados ou semi-processados, o congelamento e armazenamento podem favorecer a desnaturação das proteínas, a oxidação e hidrólise de lipídios, as interações lipídio-proteína e as interações proteína-carboidrato. As consequências podem ser, alterações de textura, sabor, palatabilidade, redução da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e destruição de vitaminas (Sgarbieri, 1996).

#### **4.2.2 Proteínas insolúveis**

As proteínas fibrosas presentes em chifres, cascos, penas, unhas, peles, ossos, escamas e cabelos, disponíveis abundantemente na natureza, podem ser convertidas em biomassa utilizável, tais como, concentrados protéicos e aminoácidos, utilizando enzimas microbianas (Anwar e Saleemuddin, 1998).

Na literatura disponível, são poucos os trabalhos relacionados com a hidrólise das proteínas insolúveis resultantes dos processos de solubilização de proteína. Liaset e Espe (2008) estudaram a fração insolúvel resultante da hidrólise enzimática utilizando a enzima Protamex em três diferentes espécies de pescado e observaram que a fração peptídica insolúvel em bacalhau e saithe continham mais aminoácidos hidrofóbicos, triptofano e traços de selênio, ferro e zinco, que a fração solúvel. A fração insolúvel também continha mais lipídios que os hidrolisados protéicos. Ambas frações, insolúveis e solúveis apresentaram altas concentrações de iodo.

##### **4.2.2.1 Colágeno**

O colágeno é o polímero protéico mais abundante no corpo dos animais, representando cerca de 30% do conteúdo total de proteína. O colágeno é o principal elemento estrutural de ossos, cartilagens, peles, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos, dentes, córneas, entre outros (Watanabe, 2004).

O colágeno é único entre as proteínas por causa da sua composição de aminoácidos. Este contém uma grande quantidade de hidroxiprolina, sendo rico em glicina e prolina. Os anéis pirrolídicos (imino ácidos) não possuem átomos de hidrogênio nas ligações peptídicas, então a estrutura é estabilizada pelas ligações de hidrogênio intramoleculares (Iannace e Nicolais, 1997). A estrutura molecular do colágeno contém três cadeias polipeptídicas unidas em uma tríplice hélice. Cada polipeptídeo denominado de cadeia  $\alpha$  consiste de uma sequência repetida do tripé (Gli-X-Y)<sub>n</sub>, onde X e Y são frequentemente prolina e hidroxiprolina (Watanabe, 2004; Vielle e Zeikus, 2001).

Considerando que o colágeno é um biomaterial importante, muitas indústrias têm demonstrado interesse (Senaratne et al., 2006). As maiores aplicações do colágeno incluem produtos de couro, cosméticos devido a sua propriedade umidificante, produtos biomédicos, tais como, curativos, implantes e portador de medicamentos (Swatscheck et al., 2002). Na indústria de alimentos é utilizado em envoltórios comestíveis, necessários em indústrias cárneas (embutidos) e desnaturado pelo calor (gelatina) que é importante na elaboração de diversos alimentos (Senaratne et al., 2006).

Entretanto, muitos cientistas têm focado as pesquisas em encontrar fontes alternativas de colágeno. Os pesquisadores observaram que peles, ossos e escamas de peixe, pele de frangos, pele de lulas, tentáculos de polvo, esponjas marinhas e pele de sapos podem ser utilizados como alternativas (Nam et al., 2008; Nagai et al., 2004; Li et al., 2004; Muyonga et al., 2004; Sadowska et al., 2003; Swatschek et al., 2002; Morales et al., 2000).

Entre as fontes alternativas de colágeno, o peixe possui a melhor fonte de matéria-prima por causa da alta disponibilidade, não apresenta risco de transmissão de doenças, não possui barreiras religiosas e tem a possibilidade de uma alta produção de colágeno (Senaratne et al., 2006). Durante o processamento do peixe, é gerado uma grande quantidade de resíduos cerca de 50-70% do peso total do peixe, é descartado na forma de ossos, peles, cabeça, vísceras e escamas (Kittiphattanabawon et al., 2005). O descarte inapropriado destes resíduos pode causar sérios problemas ambientais. Cerca de 30% dos resíduos do processamento do peixe consiste em peles, escamas e ossos, os quais são ricos em colágeno (Kittiphattanabawon et al., 2005).

Recentemente, colágenos a partir de diversas espécies têm sido isolados e caracterizados (Jongjareonrak et al., 2005; Morimura et al., 2002; Yoshimura et al., 2000; Montero et al. 1999), porém os métodos de extração de colágeno, encontrados na literatura, na grande maioria são processos químicos, que diferem quanto ao agente químico e parâmetros físicos utilizados durante a extração (Nam et al., 2008; Wang et al., 2008; Senaratne et al., 2006). A Tabela 1 apresenta a composição de aminoácidos de colágenos extraídos de resíduos de pescados.

Tabela 1 Composição de aminoácidos de diversos tipos de colágeno extraídos de resíduo de pescado (Resíduos de aminoácidos/total de aminoácidos)

Aminoácidos	Pele peixe-sapo (a)	Pele peixe vermelho (b)	Escamas peixe vermelho (b)	Ossos peixe vermelho (b)	Pele externa de lula (c)	Pele interna de lula (c)
Hidroxiprolina	77	64	65	61	87	79
Ácido aspártico	27	50	54	56	73	82
Treonina	20	23	26	23	24	32
Serina	28	61	56	58	38	41
Ácido glutâmico	95	78	81	75	105	116
Prolina	93	101	95	102	82	82
Glicina	363	335	328	341	226	207
Alanina	96	105	103	98	73	66
Cisteína	0	---	---	---	---	---
Valina	24	25	18	15	22	28
Metionina	21	14	14	12	17	19
Isoleucina	12	9	11	10	26	25
Leucina	20	21	25	25	42	43
Tirosina	6	6	5	5	18	21
Fenilalanina	28	20	22	25	23	26
Histidina	5	4	6	8	11	12
Lisina	25	28	33	32	22	26
Arginina	52	50	49	46	95	91
Hydroxilisina	8	6	9	9	16	4
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000

(a) Senaratne et al. (2006); (b) Wang et al. (2008); (c) Nam et al. (2008).

A propriedade de insolubilidade do colágeno em solventes aquosos limita a utilização deste em diversas indústrias. Entretanto, é vantajoso obter derivados do colágeno, pois desta forma podemos aumentar a solubilidade destes em solventes aquosos (Nam et al., 2008).

Algumas pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de utilizar hidrolisados do colágeno. Morimura et al. (2002) trataram ossos de tubarão de cauda amarela para obter colágeno e utilizaram enzimas para degradar o colágeno obtido. Os resultados indicaram uma recuperação de proteína de até 53% e alta degradação do colágeno pela enzima L (85,5%) em comparação com a enzima K (69,2%), ambas originadas de espécies de *Bacillus*. O hidrolisado, um composto de oligopeptídeos, pode ser utilizado como aditivo alimentar, pelo seu potencial antioxidante e também pode ser utilizado para reduzir a pressão sanguínea.

Nam et al. (2008) extraíram colágeno da pele interna e externa de lula e submetem o colágeno extraído a hidrólise enzimática com Alcalase 2,4 L, o hidrolisado mostrou ter propriedades antioxidantes e ter atividades inibitórias de tirosinase e elastase.

Ohba et al. (2003) avaliaram a hidrólise de colágeno e queratina contidos em resíduos de pescado e encontraram que o hidrolisado enzimático dos resíduos da queratina e do colágeno apresentaram atividade inibitória de ECA (enzima conversora da angiotensina) e atividade antioxidante, a qual age para prevenir diversas doenças. Então, os pesquisadores concluíram que o colágeno e a queratina contidos nos resíduos de pescado podem ser convertidos pela hidrólise enzimática em diversos produtos que apresentam funções fisiológicas.

#### **4.2.2.2 Queratina**

Apesar da alta resistência, a queratina pode ser hidrolisada por enzimas queratinolíticas produzidas por alguns microrganismos. Estas enzimas são produzidas por fungos e bactérias queratinolíticas que na sua maioria são representadas por espécies de *Streptomyces* e *Bacillus* (Onifade et al., 1998).

A queratina é uma proteína estrutural insolúvel de penas, lãs, unhas, cascos, entre outros, sendo conhecida por sua alta estabilidade (Bradbury, 1973). A cadeia da queratina é densamente empacotada em  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -sheet

( $\beta$ -queratina) dentro de uma cadeia polipeptídica supercoloidal (Parry e North, 1998), resultando em estabilidade mecânica e resistência as enzimas proteolíticas comuns, tais como, pepsina, tripsina e papaína. Além disso, ligações cruzadas de cadeias protéicas pelas pontes de cisteína conferem alta estabilidade mecânica e resistência à degradação proteolítica das queratinas. A resistência da queratina é devido à força das ligações dissulfídicas intermoleculares e outras interações moleculares, e também à estrutura supercoloidal das cadeias protéicas (Jones et al., 1999). Estas propriedades promovem um grau de resistência à hidrólise peptídica.

As queratinas são agrupadas em queratinas pesadas e leves de acordo com o conteúdo sulfúrico. Queratinas pesadas são encontradas em penas, cabelos, cascos e unhas, estas possuem conteúdo alto de ligações dissulfídicas e são inextensíveis e resistentes. Enquanto que, queratinas leves, tais como, pele e calos, possuem baixo conteúdo de ligações dissulfídicas e são mais flexíveis (Schrooyen et al., 2001; Voet e Voet, 1995). A modificação da estrutura da queratina pode ser realizada pelo tratamento térmico e pela hidrólise enzimática com clivagem das pontes dissulfídicas e ligações peptídicas (Kim et al., 2005; Williams et al., 1990). De qualquer maneira, os métodos que utilizam calor destroem aminoácidos e requerem uma quantidade significativa de energia (Papadopoulos et al., 1986).

As enzimas queratinolíticas são produzidas por fungos, actinomicetes, e bactérias que têm sido frequentemente isolados a partir de solos onde estão depositados materiais queratinosos (Riffel e Brandelli, 2006; Kaul e Sumbali, 1997).

Dentre os fungos, o grupo mais queratinolítico pertence aos fungos imperfeitos que incluem os seguintes gêneros: *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gleomastis*, *Monodictys*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Stachybotrys*, *Urocladium*, *Scopulariopsis*, *Sepedoniun*, *Penicillium*, *Doratomyces*, que não têm muito valor comercial, pois a maioria são categorizados como dermatófitos (Gradisar et al., 2000).

Entre as bactérias, a degradação é mais confinada para as linhagens gram-positivas, incluindo *Bacillus*, *Lysobacter*, *Nesternokia*, *Kocuria* e *Microbacterium*, sendo que algumas linhagens de bactérias gram-negativas, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* e *Chryseobacterium* (Lucas et al., 2003; De Toni et al., 2002; Yamamura et al., 2002; Sangali e Brandelli, 2000), têm sido recentemente reportadas como queratinolíticas. Poucas bactérias termofílicas e extremofílicas que pertencem

aos gêneros *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus* e *Nesternokia* têm sido descritas (Gassesse et al., 2003; Nam et al., 2002; Rissen e Antranikian, 2001; Friedrich e Antranikian, 1996).

As queratinases são ativas em diversos substratos protéicos solúveis e insolúveis. Entre as proteínas solúveis, estas possuem a habilidade de hidrolisar caseína, gelatina, albumina bovina e hemoglobina, enquanto que, entre as proteínas insolúveis, estas hidrolisam, penas, lãs, colágeno, elastina, seda, chifres, cabelo, azoqueratina e unhas (Gupta e Ramnani, 2006).

As queratinases podem ser aplicadas, na indústria de alimentos, fertilizantes, produção de filmes e colas, detergentes, degradação de proteínas, indústria de couro (Gupta e Ramnani, 2006), digestão anaeróbica de resíduos da indústria de frango para gerar gás natural (Brutt e Ichida, 1999), modificação de fibras, tais como, seda e lã (Rissen e Antranikian, 2001), na medicina e farmácia para eliminação de acne, preparo de vacinas para dermatofitoses, entre outros (Vignardet et al., 2001).

A queratinase produzida a partir da *Chryseobacterium* sp. hidroliza diversas proteínas globulares e fibrilares, incluindo caseína, albumina e queratina (Brandelli, 2005). Peptídeos derivados de caseína e queratina apresentam importantes funções biológicas e tecnológicas (Gupta e Ramnani, 2006; Clare e Swaisgood, 2000). Além disso, proteólises limitadas têm sido utilizadas para modificar propriedades funcionais das proteínas, tais como, solubilidade, emulsificação e gelatinização. Esta enzima também tem potencial para a aplicação no preparo de peptídeos através da hidrólise da caseína e da queratina (Casarin et al., 2008).

Queratinases de *Bacillus* são geralmente proteases do tipo serina da família subtilisina (Zaghloul, 1998; Lin et al., 1995), mas recente metaloproteases, como a partir da linhagem queratinolítica do *Bacillus* sp. (Werlang e Brandelli, 2005) foram descritas. O gênero *Bacillus* fornece a maioria das proteases neutras e alcalinas com valor comercial, e este gênero possui vantagens de ser facilmente mantido e cultivado (Takami et al., 1989).

#### **4.2.3 Ponto Isoelétrico das Proteínas**

O ponto isoelétrico é o pH onde as cargas positivas e negativas de uma molécula se equivalem. Nesse pH a proteína não migra para nenhum pólo quando

colocada em campo elétrico. O pH isoelétrico depende dos pks dos grupos ionizáveis e será mais alto quanto mais resíduos básicos houver e mais baixo quanto mais resíduos ácidos estiverem presentes. A maioria das proteínas apresenta um pH isoelétrico na faixa de 4,5 a 6,5 (Sgarbieri, 1996).

Os íons  $H^+$  e  $OH^-$  da água provocam efeitos parecidos, no entanto além de afetar a envoltura das proteínas também afetam a carga elétrica dos grupos ácidos e básicos das cadeias laterais dos aminoácidos. Esta alteração na carga superficial das proteínas elimina as interações eletrostáticas que estabilizam a estrutura terciária e provocam a precipitação. A solubilidade de uma proteína é mínima no ponto isoelétrico, já que sua carga é zero e desaparece qualquer força de repulsão eletrostática que poderia dificultar a formação de precipitados (Pardi et al., 2001).

É necessária alta solubilidade para extrair as proteínas (em pH inferior a 3 ou superior a 10,5) e baixa solubilidade para precipitar as proteínas (pH entre 5 e 6). No ponto isoelétrico a proteína apresenta a menor solubilidade, formando precipitados (Sathivel, 2003).

#### **4.3 Aplicações do Resíduo de Pescado**

Resíduos orgânicos de indústrias pesqueiras não afetam somente a área onde é colocado diretamente o efluente, mas também podem alterar a zona costeira em diferentes níveis do ecossistema, reduzindo assim a biomassa, densidade e diversidade de bentos, plânctons e nectons, e modificando os sítios locais de alimentação natural (Vezzulli et al., 2003; Gowen, 1991; Pillay, 1991).

Uma importante estratégia na redução de resíduos para as indústrias é a recuperação de subprodutos com fins comerciais a partir de resíduos de pescado. Os hidrolisados de resíduos de pescado podem ser utilizados para elaboração de alimentos para animais e fertilizantes. As aplicações mais comuns destes resíduos são: produção de ração animal, óleo de pescado, silagem e fertilizantes orgânicos. A utilização de subprodutos é uma importante oportunidade para a indústria, este pode gerar uma renda adicional, assim como reduzir os custos de tratamentos residuais (Arvanitoyannis e Kassaveti, 2008).

Os resíduos da indústria pesqueira podem ser utilizados como ingrediente em alimentos, pois representam uma fonte valiosa de proteína de alta qualidade e

energia (Gabrielsen e Austreng, 1998). Os resíduos de pescado têm mostrado ser uma boa fonte de minerais (22%), proteínas (58%) e lipídios (19%). Ácidos graxos monoinsaturados, ácido oléico e palmítico são abundantes em resíduos de pescado (Esteban et al., 2006).

A silagem é um produto líquido que resulta da liquefação do pescado inteiro ou de partes do mesmo (Tatterson e Windsor, 1974). A liquefação é um processo de autólise realizado pelas enzimas já presentes no pescado e acelerado pela adição de ácidos que propiciam melhores condições para as enzimas hidrolisarem os tecidos, limitando o crescimento microbológico (Gildberg, 1993). De qualquer maneira, a silagem de resíduo de pescado é caracterizada pelo odor desagradável e este pode ser considerado um fator limitante para a aplicação em produtos alimentícios (Hammoumi et al., 1998).

A produção de quitina e quitosana a partir de resíduos de pescado têm comprovado ser atrativa ambientalmente e economicamente, especialmente quando este processo inclui a recuperação de carotenóides (Kumar, 2000; Arvanitoyannis, 1999).

Biodiesel adquirido a partir de óleos e gorduras de vegetais e animais, é um substituto ou um aditivo, para combustíveis derivados do petróleo (Alcantara et al., 2000). Kato et al. (2004) avaliaram óleo de pescado tratado com ozônio como óleo diesel para transporte. O óleo encontrado obteve propriedades adequadas para o uso em motores a diesel, apresentando valores quase idênticos aos de aquecimento ( $10700 \text{ kcal kg}^{-1}$ ), densidade (a  $15^\circ\text{C}$ ,  $0,87 \text{ g cm}^{-3}$ ) e pontos de derrame ( $37$  e  $-16^\circ\text{C}$ , respectivamente) quando comparados com o óleo diesel, não produziu óxidos sulfurosos, pouca ou nenhuma presença de fuligem, poliaromáticos e emissões de dióxido de carbono. Estas propriedades sugerem que o óleo obtido possui melhores propriedades que os resíduos de óleos vegetais metil-esterificados e é adequado para motores a diesel especialmente em áreas de baixa temperatura.

Existe uma extensa literatura sobre produção de biogás a partir de adubo de gado, águas residuárias de criação de suínos, subprodutos da aquacultura e agroindústrias e resíduos urbanos (Sanchez et al., 1995; Montuelle et al., 1992; Chapman et al., 1990; Ng e Chin, 1987; Lo et al., 1986; Lo e Liao, 1986); por enquanto não há informação sobre digestão anaeróbia utilizando resíduos sólidos de plantas de pescado (Arvanitoyannis e Kassaveti, 2008).

Os carotenóides são responsáveis pela cor de muitos pescados e moluscos importantes. A recuperação de carotenóides pode ser efetivamente utilizada em formulações alimentícias para aquacultura em vez de se utilizar carotenóides sintéticos. O resíduo disponível após a extração ainda pode ser utilizado para a preparação de quitina/quitosana (Sachindra et al., 2006).

A recuperação de componentes químicos a partir de resíduos de pescado, os quais podem ser utilizados em outros segmentos da indústria alimentícia, é uma área promissora de pesquisa e desenvolvimento. Os pesquisadores têm apresentado um grande número de compostos que podem ser isolados a partir dos resíduos, incluindo enzimas, gelatina e proteínas que contêm capacidades antimicrobianas e antitumorais (Arvanitoyannis e Kassaveti, 2008).

As proteases fazem parte do grupo mais importante de enzimas industriais utilizadas no mundo e possuem várias aplicações na indústria de alimentos (Garcia-Carreño et al., 1994). Proteases são principalmente derivadas de plantas, animais e fontes microbianas, considerando que derivados marinhos e outras fontes aquáticas não têm sido extensivamente utilizadas (Haard e Simpson, 1994). As enzimas extraídas da mucosa estomacal de pescado têm sido utilizadas para coagular o leite na produção de queijo, estas representam uma fonte alternativa e mais econômica para a indústria de laticínios (Tavares et al., 1997).

Óleos produzidos a partir de resíduos de pescado também são utilizados extensivamente na indústria de alimentos como matéria-prima e ingrediente (Jacobs et al., 1997). O colágeno recuperado de resíduos de pescado pode ser utilizado em nível industrial, em alimentos, cosméticos e materiais biomédicos (Nagai e Suzuki, 2000).

#### **4.4 Isolados e Hidrolisados Protéicos de Pescado**

Isolados e hidrolisados protéicos de pescado, geralmente são obtidos por solubilização química, ácida ou alcalina, ou por via enzimática, respectivamente, a partir de resíduos ou de pescado inteiro. Estes podem ser utilizados como ingredientes funcionais em uma ampla e sempre crescente faixa de aplicação em diversos alimentos e em outros produtos. Segundo Salas (2001) a recuperação dos princípios ativos presentes no pescado de baixo valor comercial é uma alternativa, pois representa uma forma de agregar valor ao produto. O teor protéico das diferentes

espécies de pescado varia de 15 a 20% o que viabiliza a utilização de qualquer espécie para obter isolados protéicos.

Métodos químicos e biológicos são amplamente utilizados para a hidrólise, a hidrólise química é comumente mais utilizada na prática industrial, porém os processos biológicos que utilizam adição de enzimas são os mais promissores, pois resultam em produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo. Existem muitas técnicas potenciais para a extração da proteína a partir de tecido animal (Martin e Porter, 1995; Vieira et al., 1995; Pigott, 1982). As propriedades funcionais dos hidrolisados protéicos são influenciadas pelo método de produção utilizado. A hidrólise química das proteínas é realizada pela clivagem das ligações peptídicas com ácido ou base (Skanderby, 1994).

#### **4.4.1 Processos Químicos**

Em 1999, foi realizada a maior inovação considerando o isolamento de proteínas a partir de músculos de matérias-primas de baixo valor comercial. Hultin e Kelleher (1999) patentearam o processo de solubilização ácida como uma maneira de melhorar a produtividade e a estabilidade de isolados protéicos. Poucos anos depois, um processo similar, mas baseado na solubilização alcalina foi patenteada. Três vantagens principais relacionadas com as tecnologias ácidas e alcalinas precisam ser realçadas. A primeira é que o músculo não precisa ser mecanicamente removido a partir de ossos e peles para ser processado. A matéria-prima picada ou homogeneizada pode ser submetida diretamente à solubilização protéica ácida ou alcalina, desde que todos os outros materiais contaminantes tenham sido removidos. Outra vantagem é que as proteínas sarcoplasmáticas também são recuperadas, aumentando a quantidade de proteína no hidrolisado. Por último, os lipídios neutros e as membranas lipídicas podem ser efetivamente removidos durante o processo de produção do hidrolisado, diminuindo o risco de oxidação lipídica durante o armazenamento. A Figura 4 mostra um fluxograma de um processo de obtenção de um hidrolisado protéico.

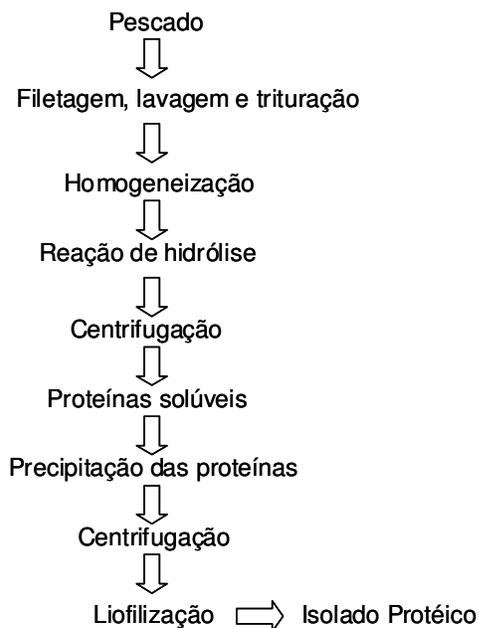


Figura 4 Fluxograma do processo de obtenção de um isolado protéico

Os processos de solubilização, ácida e alcalina, utilizam o princípio de que a solubilidade do material contendo proteína quando homogeneizado com água é afetada pelo pH da mistura. Em condições extremamente ácidas ou alcalinas, forças de repulsão atuam sobre as proteínas miofibrilares e citoesqueléticas, ocorrendo interações com água, e acontecendo a solubilização (Nolsoe e Undeland, 2008).

Uma característica importante dos processos por solubilização ácida ou alcalina, é que quando o músculo protéico é submetido a valores extremos de pH, as proteínas são parcialmente desdobradas. Este desdobramento parcial leva a mudanças substanciais na parte estrutural e conformacional das proteínas, as quais conduzem a diferentes propriedades quando são recuperadas (Kristinsson e Hultin, 2003). Kristinsson (2001) avaliou mudanças conformacionais, estruturais e funcionais de duas proteínas, hemoglobina e miosina, durante exposição a pHs ácidos e alcalinos, assim como subsequente recuperação das proteínas no ponto isoelétrico. As mudanças de pH foram cruciais para a hemoglobina quanto à oxidação lipídica. Mudanças na molécula de miosina, por outro lado, influenciaram grandemente na funcionalidade dos isolados protéicos, tais como, capacidade de retenção de água, gelatinização e emulsificação.

*Conteúdo Protéico*

A produção de proteína obtida durante o processo por mudança de pH (conhecido como *pH shifting process*) é determinada por três fatores principais, a solubilidade das proteínas em condições extremas de pH, o tamanho do sedimento insolúvel formado durante o processo de centrifugação e a solubilidade das proteínas ao pH selecionado para a precipitação (Nolsoe e Undeland, 2008).

Utilizando processos de solubilização protéica, ácido e alcalino, Undeland et al. (2002) encontraram 74% e 68%, respectivamente, de proteína recuperada a partir do músculo branco de arenque (*Clupea harengus*). A baixa produção apresentada pelo processo alcalino foi atribuída à grande quantidade de sedimento formado na primeira centrifugação.

Em comparação similar entre os processos com pH, ácido e alcalino, Kristinsson e Ingadottir (2006) avaliaram a produção protéica a partir de tilápia (*Orochromis niloticus*). Os autores reportaram encontrar entre 56 e 61% de proteína para o processo ácido e 61 a 68% para o processo alcalino.

Batista et al. (2003) avaliaram o conteúdo protéico recuperado a partir de sardinha (*Sardina pilchardus*) e pescada azul (*Micromesistius poutassou*). Os autores utilizaram processos de solubilização ácida e alcalina, similares aos descritos acima e obtiveram 73% e 77% de proteína recuperada, respectivamente, para a sardinha e 53,6% e 49,1%, respectivamente para a pescada azul.

#### *Estudos realizados com pescado inteiro ou resíduos de pescado*

Bechtel et al. (2005) investigaram as possibilidades de usar o processo alcalino na produção de isolados protéicos solúveis e insolúveis a partir de vísceras de salmão rosa e cabeças de salmão vermelho. Após liofilizar os isolados, o conteúdo protéico foi analisado, obtendo o seguinte resultado: fração insolúvel das cabeças do salmão vermelho (50,7%), fração insolúvel das vísceras do salmão rosa (69,4%), fração solúvel do salmão vermelho (90%) e fração solúvel das vísceras do salmão rosa (87,2%).

Utilizando uma mistura de subprodutos de Pescada (*Merluccius capensis*), Batista et al. (2006) avaliaram a quantidade de proteínas que poderia ser recuperada usando os processos de solubilização ácida e alcalina. Após a remoção da pele e ossos, o resto dos subprodutos foi triturado, uma parte sofreu uma pré-lavagem e a

outra foi utilizada normalmente. O conteúdo protéico obtido foi de 58,7% para o processo ácido e 63% para o alcalino, para o material sem lavagem. A produção de proteína correspondente para o material que sofreu a pré-lavagem foi de 43,6% para a extração ácida e 50,1% para a alcalina.

Chen e Jaczynski (2007) aplicaram os métodos, ácido e alcalino, no processamento de resíduo de trutas (ossos, cabeça, pele, etc.) usando duas centrifugações contínuas. O conteúdo protéico encontrado variou de 77,7 a 89%, dependendo do pH utilizado para a solubilização e precipitação.

Em um estudo preliminar de isolamento de proteína utilizando os processos, ácido e alcalino, com arenque inteiro e vísceras. Røkaeus e Undeland (2007) informaram que o conteúdo de proteína total para o pescado inteiro variou entre 60 e 65%, e para as vísceras foram encontrados valores inferiores. Para os isolados protéicos, o processo ácido resultou em valores de 59 e 54% quando utilizado intestino e o arenque inteiro. Para o processo alcalino, os valores correspondentes foram 58 e 55%, respectivamente.

Estudo realizado por Chen et al. (2007) com resíduos de truta mostrou que a solubilização alcalina produziu um isolado protéico com uma maior concentração de aminoácidos essenciais que o isolado produzido por solubilização ácida.

#### *Cor e força de gel*

Outros parâmetros importantes quando se compara diferentes processos de extração, são a cor do isolado protéico e a força do gel. Nolsoe e Undeland (2008) afirmam que a espécie de pescado utilizada e o método de processamento têm uma grande influência na força do gel. Em comparações entre processos ácidos e alcalinos, os processos alcalinos geralmente produzem isolados com maior força de gel. As indústrias, geralmente, estão mais interessadas em isolados mais claros (Tabilo-Munizaga e Barboza-Canovas, 2004). De qualquer maneira, a exata aplicação do hidrolisado é que vai determinar o quão importante é a cor. A cor pode ser afetada pela quantidade de músculo escuro, pela presença de sangue e pela presença de pigmentos como a melanina.

#### *Lipídios*

A capacidade dos processos de solubilização ácida e alcalina de remover grande parte dos lipídios neutros e das membranas lipídicas é uma das características mais importantes. A quantidade de lipídios que pode ser removida está relacionada a fatores, tais como, conteúdo lipídico inicial da matéria-prima, viscosidade do homogeneizado e velocidade de centrifugação. A redução lipídica pode ser importante para a redução da susceptibilidade do isolado protéico à oxidação lipídica (Nolsoe e Undeland, 2008).

Em pesquisa realizada por Kristinsson e Demir (2003) sobre a redução lipídica de hidrolisados protéicos resultantes de processos, ácidos e alcalinos, com quatro diferentes espécies de pescado, peixe-gato, cavala espanhola, corvina e tainha, mostrou que a maior redução lipídica ocorreu nos isolados resultantes do processo alcalino. Em base seca, as reduções para os isolados protéicos do processo alcalino foram 68,4% para corvina, 81,4% para a tainha, 79,1% para a cavala e 88,6% para o peixe-gato. Para os isolados resultantes da solubilização ácida, os valores de redução foram de 38,1, 58, 76,9 e 85,4%, respectivamente.

Fica evidente que a maioria das espécies apresenta resposta diferente para a solubilização ácida e alcalina, quando os dois métodos são comparados. É observado que o processo ácido normalmente possui certas vantagens, geralmente apresenta maior produção de proteína, enquanto que o processo alcalino possui outras, como maior remoção de lipídios, cor mais clara, maior força do gel, entre outras. Então, a escolha do método vai depender da aplicação posterior do hidrolisado (Nolsoe e Undeland, 2008).

#### **4.4.2 Processos Enzimáticos**

A hidrólise bioquímica para a produção de hidrolisados protéicos de pescado ou de outras proteínas alimentícias é realizada pela utilização de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Esta pode ser realizada via enzimas proteolíticas já presentes nas vísceras ou músculos do pescado (proteínas endógenas), ou pela adição de enzimas de outras fontes (Kristinsson e Rasco, 2000).

Enzimas são essenciais na catálise bioquímica, porque aceleram as reações químicas entre os constituintes orgânicos e o interior das células o que de outra forma demoraria um longo tempo para se completar. As enzimas são empregadas para realizar funções desejadas no processamento e análise e para

facilitar a conversão de subprodutos em produtos de alta qualidade (Richardson e Hyslop, 1984). As enzimas conseguem executar este tipo de atividade porque o sítio ativo de uma enzima é altamente específico para determinados substratos. As enzimas catalisam somente uma reação e função específica, pela formação de um complexo com o substrato o qual modificará (Kristinsson e Rasco, 2000).

A hidrólise enzimática das proteínas é um processo complexo devido às muitas ligações peptídicas e sua acessibilidade específica para reações enzimáticas (Linder et al., 1995). A especificidade das enzimas não é o único fator que afeta o perfil dos peptídeos no produto final. Fatores ambientais, tais como temperatura e pH também são extremamente importantes, pois afetam extensivamente a cinética das reações enzimáticas, e o efeito destes fatores é diferente para cada enzima. Geralmente, existe uma combinação ótima de pH e temperatura, onde a enzima é mais reativa. Temperaturas e pHs extremos desativam as enzimas pela desnaturação das mesmas (Kristinsson e Rasco, 2000).

Na hidrólise enzimática, a capacidade das proteases clivarem as ligações peptídicas é dependente das interações físicas entre o substrato e a enzima no ambiente aquoso presente durante a hidrólise. A grande porção de aminoácidos hidrofóbicos reside dentro de regiões hidrofóbicas da cadeia peptídica das matérias-primas, e é por este motivo que o acesso das proteases nessas regiões pode ser limitado (Chothia, 1974). Portanto, as frações com peptídeos insolúveis podem apresentar alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos quando comparados com os hidrolisados protéicos (Liaset e Espe, 2008)

A hidrólise protéica de pescado utilizando enzimas proteolíticas selecionadas possibilita o controle do grau de clivagem das proteínas no substrato. Em proporções adequadas de enzima/substrato e tempos de reação, se permite a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e diferentes propriedades funcionais que podem encontrar aplicações em várias formulações alimentícias (Onodenalore e Shahidi, 1996).

As enzimas microbianas, quando comparadas com enzimas provenientes de animais e plantas, oferecem várias vantagens, incluindo uma ampla variedade de atividades catalíticas disponíveis, e grande estabilidade frente a diferentes pHs e temperaturas. O hidrolisado protéico resultante apresentará propriedades peculiares de acordo com os novos peptídeos gerados (Guerard et al., 2002).

#### 4.4.2.1 Flavourzyme

A Flavourzyme é um complexo de protease/peptidase produzido por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*, desenvolvido pela Novozyme Nordisk (Bagsvaerd, Denmark), o qual não é modificado geneticamente. É utilizada para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. As condições ótimas de trabalho para a Flavourzyme 500 L reportadas são pH 5,0-7,0 com uma temperatura ótima em torno de 50°C. A Flavourzyme tem uma atividade de 500 L APU/g (Slizyte et al., 2005). Esta enzima tem sido utilizada por diversos pesquisadores nos últimos anos para a preparação de hidrolisados protéicos de pescado (Klompong et al., 2008; Dong et al., 2008; Thiansilakul et al., 2007).

#### 4.4.2.2 Alcalase

A Alcalase é uma enzima alcalina produzida pelo *Bacillus licheniformis* e desenvolvida pela Novozyme Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes, tem sido explicitada repetidamente por vários pesquisadores como uma das melhores enzimas utilizadas para preparar hidrolisados enzimáticos de pescado funcionais e outros hidrolisados protéicos (Santos et al., 2008; Bhaskar et al., 2008; Klompong et al., 2008; Wasswa et al., 2007).

#### 4.4.2.3 Grau de Hidrólise

O grau de hidrólise, o qual indica a porcentagem de ligações peptídicas clivadas é um dos parâmetros básicos que descrevem as propriedades dos hidrolisados e precisam ser controlados durante o processo de hidrólise (Adler-Nissen, 1976). Através do grau de hidrólise é possível determinar claramente as propriedades do hidrolisado protéico para um dado sistema proteína-enzima (Petersen, 1994).

A hidrólise das ligações peptídicas ocasiona muitas mudanças, tais como, aumento dos grupos aminos e carboxilas, os quais aumentam a solubilidade. A massa molecular da proteína diminui e a estrutura terciária é destruída, afetando as propriedades funcionais da proteína (Nielsen, 1997).

As propriedades funcionais do hidrolisado de pescado podem ser modificadas de acordo com o grau de hidrólise aplicado. Desta maneira, uma hidrólise extensiva permite alta solubilidade e uma hidrólise limitada conduz a uma alta

capacidade de emulsificação, estabilidade da emulsão e absorção de óleo (Gbogouri et al., 2004).

Na literatura encontram-se descritas diversas metodologias para se monitorar o grau de hidrólise durante a hidrólise protéica, por exemplo, pH-stat, osmometria, conteúdo de nitrogênio solúvel e o método do ácido trinitro-benzeno-sulfônico (TNBS) (Nielsen et al, 2001).

#### **4.4.2.4 Término da Reação Enzimática**

Quando um determinado grau de hidrólise é atendido, é necessário finalizar a reação enzimática. Esta etapa é muito importante, pois de outra forma as enzimas poderiam permanecer ativas no substrato e continuar hidrolisando as proteínas e peptídeos. A desativação das enzimas pode ser realizada tanto por métodos químicos como térmicos. Usualmente o hidrolisado juntamente com as enzimas é transferido para um banho aquecido, onde as enzimas são desativadas pela exposição a temperaturas que alcançam entre 75 e 100°C por um tempo que varia de 5 a 30 min, dependendo do tipo de enzima. Por exemplo, a papaína é termotolerante, e tem sido reportado que é necessário ao menos 90°C por 30 min para inativá-la totalmente (Hoyle e Merritt, 1994). Estudo realizado por Santos et al. (2009), mostrou que a Alcalase é inativada a 90°C por 15 min e a Flavourzyme necessita 80°C por 15 min. Porém terminar a reação por aplicação de calor é indesejável (Haque, 1993), porque resulta em alterações nas propriedades físico-químicas e funcionais (Kinsella, 1976). Pode ser realizada a inativação química com o aumento ou diminuição do pH, a ponto de desativar as enzimas. Extremos de pH, assim como temperaturas elevadas, podem causar efeitos indesejáveis sobre as proteínas e peptídeos (Adler-Nissen, 1986; Shahidi et al., 1995).

#### **4.5 Propriedades Funcionais das Proteínas**

O termo funcionalidade tem sido aplicado para se referir às propriedades não nutritivas que conferem aos alimentos maior conveniência ao manuseio, melhor aparência na apresentação e melhor aceitação pelo consumidor. A maioria das propriedades funcionais influencia o caráter sensorial de um alimento, em especial a textura (Borderías e Monteiro, 1988).

A manifestação de funcionalidade por certos componentes dos alimentos irá depender das seguintes propriedades (Sgarbieri, 1998):

- Propriedades de hidratação: dependentes das interações com a água como solubilidade, dispersão, adsorção e retenção de água, suculência;
- Propriedades dependentes da interação entre macromoléculas e entre macromoléculas e a água, geleificação, textura, formação de estruturas viscoelásticas;
- Propriedades de superfície: dependentes da formação de películas bipolares na interface entre duas fases imiscíveis como as propriedades emulsificantes e espumantes;
- Propriedades que dependem do tamanho e da forma das moléculas ou de partículas em suspensão como viscosidade, sensação tátil, modificada em função da transformação de material sólido em micropartículas;
- Propriedades que resultam da interação de um grande número de constituintes dos alimentos, tais como, água, proteínas, polissacarídeos e componentes solúveis e insolúveis das fibras alimentares.

As propriedades funcionais dependem das características físico-químicas intrínsecas da proteína, como sequência e composição de aminoácidos, peso molecular, conformação e carga distribuída sobre a molécula. A natureza e densidade da carga facilitam interações com outros componentes alimentares, tais como água, íons, lipídios, carboidratos, vitaminas, constituintes de cor e do sabor dependendo do envolvimento (pH, temperatura, força iônica) durante a preparação, processo e estocagem (Belitz e Grosch, 1997).

#### **4.5.1 Solubilidade**

A solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas, também classificada como uma propriedade funcional, pela importância que essa exerce sobre a funcionalidade das proteínas dos alimentos (Sgarbieri, 1996). Para efeito de propriedades funcionais, a solubilidade é difícil de ser definida, uma vez que a maioria dos componentes macromoleculares, quando em meio aquoso pode formar uma solução verdadeira ou uma solução coloidal ou ainda uma suspensão estável de partículas insolúveis. A solubilidade de uma proteína depende da proporção

entre grupos hidrofóbicos (normalmente situados no interior da molécula) e de grupos hidrofílicos situados na superfície (Sgarbieri, 1998).

As proteínas, em geral, são mais solúveis em pHs ácidos ou alcalinos por causa do excesso de cargas de mesmo sinal que produz repulsão das moléculas, contribuindo para maior solubilidade. O pH de menor solubilidade é o pH do ponto isoelétrico da proteína, que possui igual número de cargas positivas e negativas nas moléculas, não se repelem, e portanto, diminuem de solubilidade tendendo a formar precipitados (Kinsella, 1982).

A solubilidade das proteínas é relativamente elevada em água e reduzida em solventes orgânicos. Segundo Maldonado (1994), a solubilidade de uma proteína é influenciada pela maior ou menor afinidade das moléculas de proteína pelo solvente. Sgarbieri (1996) salienta que, a solubilidade de uma proteína depende de vários fatores como: peso molecular, conformação das moléculas, densidade e distância das cargas elétricas, que por sua vez é influenciada pelo pH, natureza e concentração de íons ou força iônica e temperatura. A solubilidade de uma proteína depende grandemente do número de cargas na molécula, que por sua vez dependerá da composição de aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos e básicos (Kristinsson, 2003). As partes não protéicas da molécula como lipídios, carboidratos, fosfatos, etc., também afetam a solubilidade das proteínas (Sgarbieri, 1996).

#### **4.5.2 Capacidade de Retenção de Água**

Segundo Sgarbieri (1996) a capacidade de retenção de água envolve uma interação entre proteína ou alimento protéico com a água. A maior ou menor afinidade da proteína com a água esta relacionada com outras propriedades funcionais como textura, viscosidade, geleificação e emulsificação. A capacidade de retenção de água é a que permanece na proteína após exposição a um excesso de água e aplicação de uma força de centrifugação ou pressão.

Conforme afirma Aldea (1995), a capacidade de retenção de água é influenciada pelo pH e depende do número de cargas livres, positivas e negativas, das cadeias de actina e actomiosina, bem como de sua capacidade de ligar-se com a água. No ponto isoelétrico a capacidade do músculo para fixar a água é praticamente nula. Assim, conforme se eleva ou diminui o pH, uma maior quantidade de água pode ficar ligada aumentando assim a capacidade de retenção de água.

Outro fator que afeta a capacidade de retenção de água é a incorporação de cloreto de sódio. Quando esta é aumentada, há um decréscimo na capacidade de retenção de água devido à formação do complexo sal-proteína. Nos casos, de concentração iônica elevada, o sal passa a exercer um efeito desidratante (Pardi et al., 2001).

#### **4.5.3 Capacidade de Retenção de Óleo**

O mecanismo de absorção de óleo é atribuído principalmente a entrada física do óleo, deste modo, aumenta a densidade das proteínas, com consequente aumento da absorção de óleo (Kinsella, 1976). Wang e Kinsella (1976) reportaram que a correlação entre o aumento da densidade e a absorção de óleo é maior que 0,95.

A capacidade de retenção de óleo também está correlacionada com a hidrofobicidade da superfície (Kristinsson e Rasco, 2000). Os resíduos de lipídios retidos no hidrolisado seco depois da hidrólise deve ser menor que 0,5% para reduzir o desenvolvimento de sabores rancificados durante o armazenamento (Spinelli et al., 1972).

Um hidrolisado com um grau de hidrólise em torno de 5% tem uma absorção de óleo significativamente maior (5,98 para 7,07 mL óleo/g hidrolisado protéico de pescado (HPP)) do que um com 10% de grau de hidrólise (3,22 para 5,12 mL óleo/g HPP) e com 15 % de grau de hidrólise (2,86 para 3,86 mL óleo/g HPP) devido ao maior tamanho dos peptídeos (Kristinsson, 1998).

#### **4.6 Modificação Química das Proteínas**

A estrutura primária das proteínas pode ser modificada quimicamente para melhorar as suas propriedades funcionais e também para estudar as relações entre estrutura e função das proteínas (Feeney et al., 1982).

A maneira mais antiga e simples de modificar proteínas é tratar as mesmas com um determinado reagente o qual irá reagir com os grupos funcionais expostos na superfície das proteínas. Por exemplo, anidrido acético,  $\text{CH}_3\text{COOCOCH}_3$  reage com os grupamentos amino da cadeia lateral da lisina resultando em  $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$ . Um efeito importante desta reação é que a carga positiva da lisina é perdida. Estes reagentes são frequentemente não seletivos. Um desafio é produzir um reagente que reaja somente com uma posição da proteína (Doig e Stenberg, 1995).

Polímeros naturais, tais como, dextranas (Hovgaard e Brondsted, 1995), pectinas (Munjeri et al., 1997), goma guar (Gliko-Kabir et al., 1998) e inulina (Vervoort et al., 1997), têm sido modificados quimicamente para atender características da indústria têxtil. Após modificação, estes polissacarídeos são quimicamente ou fisicamente ligados para reduzir sua solubilidade em sistemas aquosos (Reis et al., 2006).

As modificações químicas intencionais das proteínas também podem trazer resultados inconvenientes, como a deterioração das propriedades nutritivas similares às observadas em tratamentos intensivos, a formação de derivados de aminoácidos que podem ser tóxicos e a incorporação de residuais de reagentes que podem ser igualmente nocivos (Fennema, 1993).

#### **4.6.1 Procedimentos utilizados para a modificação química**

A modificação química de proteínas é baseada nas diferenças das reatividades individuais das cadeias laterais dos aminoácidos. Estes incluem o imidazol da histidina, o indol do triptofano, o *p*-hidroxifenil da tirosina, o tioéter da metionina, o grupamento tiol da cisteína, a ligação dissulfídica da cisteína, os grupamentos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico, os grupamentos terminais carboxílicos dos aminoácidos e os grupos amino da lisina e grupamentos aminos terminais de outros aminoácidos. Estas cadeias laterais reagem em diferentes proporções, não somente com reagentes diferentes, mas também sob diferentes condições e localizações de ambientes específicos de uma proteína particular (Means e Feeney, 1998).

Aquecendo proteínas em pHs ácidos ou alcalinos, é possível modificar as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Assim, por exemplo, o aquecimento da glutenina em ambiente ácido leva consigo a desamidação de 30% dos resíduos da glutamina e asparagina, o que melhora a solubilidade e as propriedades de superfície da proteína. Estes efeitos benéficos são resultados das trocas conformacionais produzidas pela diminuição do número de pontes de hidrogênio e do incremento das repulsões eletrostáticas. Os tratamentos alcalinos provocam a conversão de alguns resíduos de cisteína ou fosfoserina à deidroalanina (Fennema, 1993).

As principais classes de reações utilizadas para modificar quimicamente as cadeias laterais das proteínas são as acetilações, alquilações, oxidações e reduções.

Uma determinada cadeia lateral pode reagir com diversas classes de reativos e um determinado reativo também pode fazê-lo com diferentes cadeias laterais resultando na introdução de grupos laterais idênticos em diversos aminoácidos. Durante a acetilação, os grupos reativos acilantes reagem com os grupos  $\alpha$  e  $\epsilon$ -amino, hidroxila, fenol, imidazol e tiol (Fennema, 1993).

Um determinado tipo de cadeia lateral não tem que desempenhar em todas proteínas, a mesma reatividade frente a um determinado reativo, visto que a sua reatividade é função dos aminoácidos próximos da cadeia protéica e da conformação da mesma. A introdução dos grupos ionizáveis, geralmente, melhora a capacidade de absorção de água da proteína e sua estabilidade frente ao calor e aumenta a estabilidade quanto à precipitação por íons de cálcio. Tais efeitos têm sido observados nas proteínas de pescado, soja, glúten, etc. (Fennema, 1993).

O grau de hidrofobicidade partindo da proteína modificada depende do tipo de aminoácido ou ácido graxo e da proporção de grupos da proteína susceptíveis a mudanças para formar derivados. Assim, por exemplo, a acetilação melhora as propriedades emulsificantes das proteínas do leite, porém prejudica a absorção de água nas proteínas da soja (Fennema, 1993).

A modificação pode causar desdobramento das proteínas devido às repulsões eletrostáticas entre grupos carboxílicos adicionados e os grupos carboxílicos nativos adjacentes, produzindo mais interação proteína-água e menos interação proteína-proteína (Ponnampalam et al., 1988).

Os anidridos, acético e succínico, são os acilantes de maior utilização direta em proteínas para consumo humano. Esses reagentes são considerados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela *Food and Drug Administration* - FDA dos Estados Unidos (Johnson, 1982). A acetilação têm sido aplicada em proteínas vegetais de diversas espécies e partes das plantas, tais como, folha (Franzen e Kinsella, 1976), amendoim (Beuchat, 1977), girassol (Canella et al., 1979), *Vicia faba* (Schmandke et al., 1981), algodão (Choi et al., 1982), ervilha (Johnson, 1982), aveia (Ma, 1984), feijão alado (Narayana e Rao, 1984), germe de milho (Messinger et al., 1987), concentrado protéico de aveia (Goulet et al., 1987), Canola (Paulson e Tung, 1988), isolados protéicos de sementes de algaroba (Silva et al., 1997), entre outros.

A modificação química por acetilação é a mais utilizada por causa de sua especificidade por grupos amino livres, principalmente a lisina. A esterificação dos grupos aminos livres com um grupo acetil neutro resulta na redução das cargas positivas do isolado sob condições ácidas. Esta perda dos grupos com carga positiva resulta em uma possível mudança no ponto isoelétrico para menores valores de pH, isto faz com que haja um aumento de solubilidade nos pHs de 4,5 até 7. Além disso, a perda destes grupos resulta ainda em um decréscimo do número de ligações de moléculas de água por molécula de proteína (Kuntz, 1971) e também reduz as atrações iônicas entre moléculas vizinhas que são responsáveis em parte pela estabilização dos géis protéicos (Catsimpooulas et al., 1970).

Considine (2002) reportou que, para a aplicação em hidrogéis, as propriedades físicas dos polímeros de pescados são muito superiores as das proteínas vegetais, pois proteínas animais são ricas em lisina, um aminoácido essencial e que pode ser facilmente modificada quimicamente. As proteínas do pescado tendem a ser muito grandes, com uma inerente capacidade de retenção de água. A solubilidade de uma proteína em água está conectada com a natureza dos seus grupamentos laterais. Grupamentos polares, tais como, OH, CO, NH<sub>2</sub>, interagem com a água, estabilizando as pontes de hidrogênio entre as cadeias. Grupamentos carregados, tais como, NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ou COO<sup>-</sup> também influenciam na hidrofiliabilidade das cadeias. A quantidade de grupamentos carregados ou não varia com o pH (Iannace e Nicolais, 1997).

Hwang e Damodaran (1996) verificaram que através da modificação química dos resíduos da lisina com dianidrido tetracarboxílico, é possível introduzir um grande número de grupos carboxílicos dentro da molécula de proteína. Teoricamente, para cada resíduo de lisina modificada, três grupos carboxílicos foram incorporados na molécula protéica. Esses grupamentos carboxílicos, juntamente com o extensivo desdobramento da molécula protéica via repulsões eletrostáticas intramoleculares, proporcionaram um caráter polianiónico para a proteína com numerosos sítios de ligação para a água. Proteínas polianiónicas com agentes de ligação cruzada podem produzir um hidrogel com propriedades superabsorventes.

Em pesquisa realizada por Hwang e Damodaran (1996) com isolado protéico de soja e diversos dianidridos tetracarboxílicos, tais como, dianidrido benzenotetracarboxílico, dianidrido dietilenotriamino pentaacético, dianidrido

ciclobutano tetracarboxílico e dianidrido etilenodiamino tetraacético (EDTAD), foi verificado que o EDTAD é o melhor reagente a ser utilizado na modificação química dos resíduos de lisina, pois possui uma alta taxa de reação com residuais de lisina, não possui potencial tóxico e tem um menor custo quando comparado aos outros reagentes. A estrutura do EDTAD é apresentada na Figura 5.

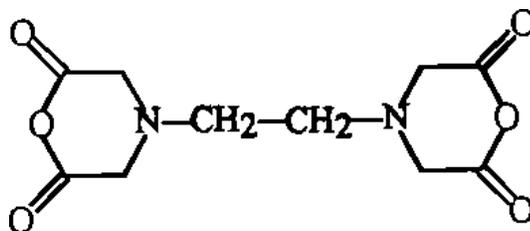


Figura 5 Estrutura molecular do dianidrido etilenodiamino tetraacético

O EDTAD é um reagente bifuncional. Consequentemente, em solução aquosa a reação do EDTAD com resíduos de lisina pode seguir duas rotas distintas, como mostra a Figura 6. Na reação I, uma molécula de EDTAD reage simultaneamente com dois resíduos de lisina a partir de duas moléculas de proteína ou duas cadeias polipeptídicas de uma proteína oligomérica para formar uma ligação. Quando a reação procede pela reação I, o resultado é a incorporação de somente um grupo carboxílico por resíduo de lisina. Além disso, se a reação I ocorre entre subunidades da molécula de proteína, a ligação cruzada intramolecular pode prejudicar a absorção de água da molécula modificada. Na reação II, uma molécula de EDTAD reage com um resíduo de lisina e uma molécula de água. Nessa reação, três grupos carboxílicos por resíduo de lisina são incorporados na proteína e não são formadas ligações cruzadas. Este grande aumento na carga aniônica da rede protéica modificada pode ajudar no desdobraimento da estrutura da proteína. Como não forma ligações cruzadas, o intumescimento da proteína modificada não é prejudicado (Hwang e Damodaran, 1996).

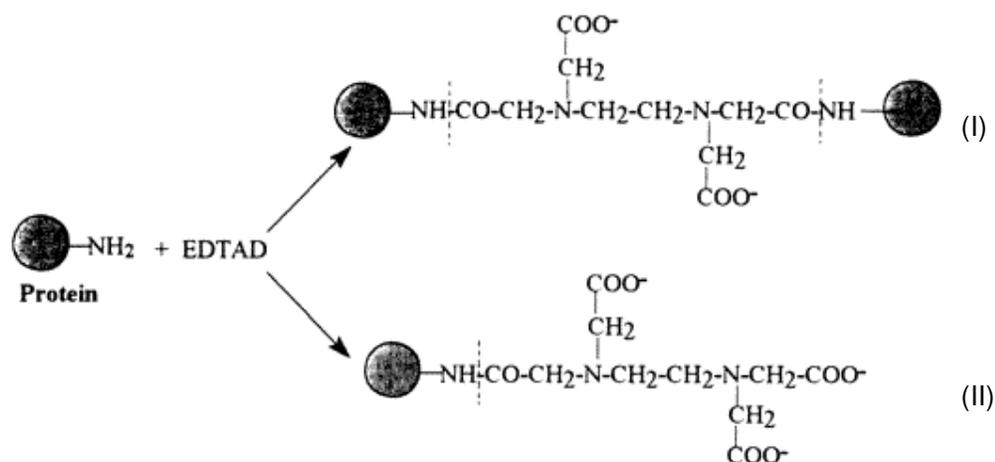


Figura 6 Reações dos resíduos da lisina com o EDTAD

#### 4.6.2 Aplicações das proteínas modificadas

Entre os anos de 1960 e 1980, muitas pesquisas foram publicadas utilizando modificação química para identificar resíduos de aminoácidos requeridos para atividade catalítica de enzimas e para propriedades funcionais de outras proteínas. Muitos livros (Lundblad e Noyes, 1984; Glazer et al., 1975; Means e Feeney, 1971) e revisões (Means e Feeney, 1998; Widder e Green, 1985; Pfeleiderer, 1985) foram publicados descrevendo procedimentos para modificações químicas de proteínas e suas aplicações.

Atualmente, as muitas aplicações da modificação química incluem determinação da reatividade relativa de grupamentos das cadeias laterais, identificação e quantificação de resíduos individuais de aminoácidos necessários para a atividade biológica, desenvolvimento da afinidade e reagentes baseados em mecanismos para usos farmacêuticos, reagentes de ligação cruzada, técnicas especiais para biopróteses, reagentes bloqueadores para a síntese de peptídeos, reagentes para hidrólise específica de ligações peptídicas, bioconjugação e modificações especiais para uso analítico, tal como, espectrometria de massa (Means e Feeney, 1998).

Fennema (1993) cita outras possíveis aplicações das proteínas quimicamente modificadas, tais como, inserção de extremidades radioativas, medir o grau de exposição, medir o pKa pela reatividade da dependência do pH, determinar o estado iônico da cadeia lateral pela reatividade da dependência do pH, acessar grupos

importantes na catálise, inibição irreversível pela reação com um grupo catalítico no lado ativo ou pelo bloqueio do lado ativo.

#### **4.7 Agentes de Ligação Cruzada**

Os polímeros com ligações cruzadas são obtidos através de condições homogêneas ou heterogêneas pela adição do agente de ligação cruzada bi ou polifuncional, tais como, epícloridrina (Chiou et al., 2004; Delval et al., 2000), etilenoglicol diglicil éter (Chiou e Li, 2003; Mi et al., 2002), glutaraldeído (Rathna e Gunasekaran, 2004; Chiou e Li, 2003; Arrascue et al., 2003; Rathna e Damodaran, 2001; Hwang e Damodaran, 1996), benzoquinona (Mcfee et al., 2001), oxíclorito de fósforo (Kim e Lim, 1999), ácidos carboxílicos (Seidel et al., 2001), anidrido maléico (Girek et al., 2000) ou isocianatos (Lee et al., 2002; Mocanu et al., 2001).

Estudo realizado com hidrogéis produzidos a partir de gelatina mostrou que a reação entre o glutaraldeído e a gelatina envolveu somente os grupamentos de lisina das cadeias protéicas (Chatterji, 1989). O grupamento da lisina também pode sofrer reações típicas de aminos primários formando produtos, como, amidas (reação com ácidos carboxílicos, ésteres ou anidridos), uréia (reação com isocianetos), imina (reação com aldeído ou cetonas), sais (reação com sais) e uretano (Iannace e Nicolais, 1997).

#### **4.8 Hidrogel**

Hidrogéis são estruturas poliméricas sólidas, as quais contêm uma fração significativa de água (regularmente acima de 90%). A estrutura polimérica tridimensional no hidrogel é usualmente formada por ligação cruzada, não somente por interações físicas, tais como, Van der Waals ou ligações de hidrogênio mas também por ligações covalentes formadas por reagentes de ligação cruzada ou  $\gamma$ -irradiação (Kunioka e Choi, 1998).

Os géis poliméricos possuem características interessantes, pois têm uma grande capacidade de absorção de água, porém são insolúveis na mesma. Quando absorvem água se intumescem e aumentam consideravelmente o seu volume, porém mantêm a forma e são elásticos (Peppas, 1985). Estas peculiaridades são consequências de diferentes fatores, tais como:

- a) A capacidade de absorção de água se deve a presença de grupos hidrofílicos, tais como, os grupos: -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub> ou -SO<sub>3</sub>H;
- b) A insolubilidade em água do hidrogel é originada pela existência de uma rede tridimensional em sua estrutura;
- c) Sua aparência suave e consistência elástica é devido ao alto conteúdo de água e a baixa densidade de entrecruzamentos do polímero.

Inicialmente, os hidrogéis eram preparados polimerizando-se um único monômero hidrofílico, porém estudos posteriores demonstraram que ao utilizar dois ou mais monômeros em diferentes proporções permitia variar algumas características destes materiais, o que resultava em poder preparar hidrogéis com melhores propriedades mecânicas, ópticas e de absorção de água (Pal et al., 2007).

A maioria dos hidrogéis é feito de poliacrilato, substância sintética com alta capacidade de absorção de água. Um grama de poliacrilato absorve em torno de 400 g de água e acima de 35 g de solução salina. Moléculas de poliacrilato possuem grupos carboxílicos ligados. Estes grupos carboxílicos contêm cargas negativas, estas atraem moléculas de água que são polares. Mais de sete moléculas de água podem se ligar a cada grupo carboxílico. O pó de poliacrílico seco absorve água, este se expande e torna-se um gel (Considine, 2002).

Os polímeros que formam hidrogéis são preferencialmente de ligações cruzadas leves para prestar sua substancial insolubilidade em água. A ligação cruzada pode ser realizada pela irradiação por ligações covalentes, iônicas, Van der Waals ou interações de pontes de hidrogênio. O material absorvente desejado é um hidrocolóide com ligações cruzadas leves (Reeves et al., 2002).

Considine (2002) na tentativa de encontrar um hidrogel biodegradável que pudesse substituir o poliacrílico em fraldas descartáveis, fez um estudo com produção de um hidrogel baseado nas proteínas da soja, obtendo como resultado que este absorveu 300 g de água e acima de 22 g de solução salina por g de gel. Os fabricantes de fraldas descartáveis, no entanto, desejam um produto mais absorvente do que o hidrogel de soja, tal como o poliacrílico que absorve 400 g de água e 35 g de solução salina.

Muitas desvantagens acompanham os hidrogéis sintéticos (não biodegradáveis), pois podem ser superados pelo uso de hidrogéis derivados de fontes naturais de polímeros. Os requerimentos mais críticos para qualquer tipo de hidrogel produzido a partir de biopolímeros são que esses géis devem ter a capacidade de absorver uma grande quantidade de água relativa a sua massa e o material deve resistir à dissolução (Pal et al., 2007).

De qualquer maneira, os hidrogéis protéicos convencionais induzidos termicamente não voltam ao seu volume original depois de terem sido desidratados. Esta diminuição na capacidade de intumescimento é relacionada com o aumento das ligações de hidrogênio, tão bem quanto às interações eletrostáticas e hidrofóbicas as quais ocorrem na desidratação da proteína. A perda da capacidade de entumescimento dos hidrogéis protéicos induzidos termicamente limitam a aplicabilidade industrial (Hwang e Damodaran, 1996).

Hwang e Damodaran (1997) descreveram um hidrogel protéico o qual é superabsorvente, reversível ao intumescimento, biodegradável, e capaz de ligar cátions. O hidrogel protéico descrito foi produzido através do tratamento da proteína com um agente acetilante e um agente de ligação cruzada, porém os pesquisadores ressaltaram que um residual do agente de ligação cruzada pode remanescer no gel e isto faria com que o gel fosse menos desejável para algumas aplicações.

#### **4.8.1 Tipos de hidrogéis**

Hidrogéis são polímeros hidrofílicos que podem reter uma quantidade significativa de água enquanto mantém uma distinta estrutura tri-dimensional. Nos anos 60 foi proposto que os hidrogéis poderiam ser utilizados em biomateriais (Wichterle e Lim, 1960). Baseado na natureza da força da ligação cruzada, os hidrogéis podem ser caracterizados como químicos (covalentes) ou físicos (Park et al., 1993). A estrutura e as propriedades das cadeias primárias, assim como a densidade das ligações cruzadas, contribuem para as propriedades globais dos hidrogéis químicos. Géis físicos são redes que se fixam pelos arranjos moleculares e/ou interações moleculares secundárias. Estas interações podem ser desfeitas pelas mudanças no ambiente, tais como, temperatura, pH, força iônica, presença de solutos específicos e estresse, conseqüentemente, a formação de hidrogéis físicos pode ser reversível. A formação dos hidrogéis físicos depende da organização espontânea e da

associação específica de moléculas através de um número de interações não-covalentes (Rajapopal e Schneider, 2004; Zhang, 2002).

Hidrogéis híbridos são usualmente definidos como sistemas de hidrogéis nos quais os componentes são formados por um mínimo de duas diferentes classes de moléculas (por exemplo, polímeros sintéticos e macromoléculas biológicas) interconectadas tanto por ligações covalentes como não covalentes (Vandermeulen e Klok, 2004; Kopecek et al., 2001). Segundo Xu e Kopecek (2007) a conjugação de peptídeos e de polímeros sintéticos, pode conduzir a novos materiais com propriedades superiores àqueles dos componentes individuais.

Polímeros sintéticos têm sido elaborados com ligações cruzadas por sequências de oligopeptídeos (West e Hubbell, 1999; Subr et al., 1990), com proteínas, tal como, albumina bovina (Park, 1988), oligodeoxiribonucleotídeos (Nagahara e Matsuda, 1996) e polissacarídeos (De Jong et al., 2000).

Polímeros biodegradáveis podem ser consumidos por microrganismos e são reduzidos a compostos simples, tais como, dióxido de carbono, água e amônia (Hideki, 1992). De qualquer maneira, hidrogéis baseados em polímeros naturais são menos hidrofílicos e provêm baixa força mecânica, o que é indesejado em polímeros sintéticos. Os polímeros naturais são únicos, possuem vários grupos funcionais, os quais através de modificações químicas podem desenvolver as propriedades desejadas nos hidrogéis baseados em polímeros naturais (Rathna e Gunasekaran, 2004).

Um gel hidrofílico, tal como a poli(acrilamida), se contrai durante a desidratação dirigida por um processo de entropia até o seu completo colapso ou se contém partículas rígidas, contrai seu volume até o ponto de percolação (Eichler et al., 1998).

Um gel hidrofóbico, tal como, a poli-n-isopropilacrilamida (PNIPA), exibe uma fase de separação devido às mudanças de temperatura ou concentração (Shibayama e Tanaka, 1993; Schild, 1992). Este processo causa no gel uma contração espontânea e colapso enquanto forma as duas fases (Panyukov e Rabin, 1996). Uma das fases da densa matriz é “rica em polímeros” onde as propriedades mecânicas aumentam significativamente (Shibayama et al., 1994).

#### 4.8.2 Formação dos hidrogéis

A Figura 7 mostra a formação de hidrogéis químicos e físicos. Quando um gel começa a absorver água, primeiramente os grupamentos hidrofílicos são hidratados pelas moléculas de água que entram na matriz. Após os grupos polares serem hidratados, a rede tri-dimensional absorve água levando a exposição dos grupamentos hidrofóbicos, os quais também interagem com as moléculas de água. Após os grupamentos polares e hidrofóbicos terem interagido com as moléculas de água, os hidrogéis retêm mais água adicional, devido às forças osmóticas das cadeias da rede polimérica. Essa retenção adicional é promovida pelas ligações covalentes ou físicas, o que leva a uma força de retração elástica do gel (Pal et al., 2007). Nesse intumescimento adicional é assumido que a água preenche espaços entre as cadeias da rede polimérica.

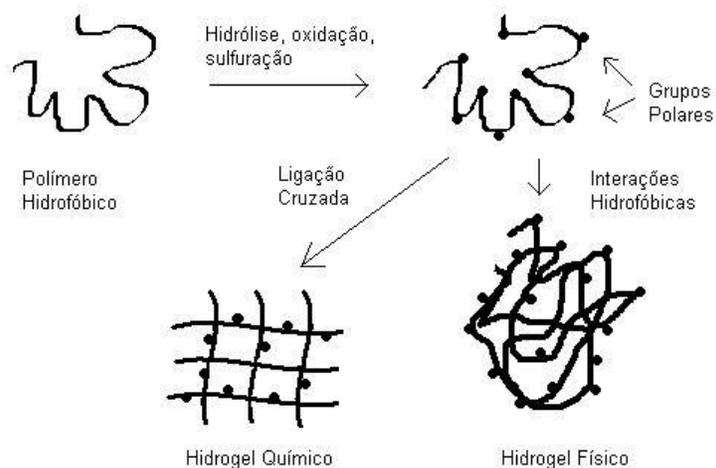


Figura 7 Esquema representativo dos métodos de formação dos hidrógéis com ligações cruzadas pela reação de reagentes multifuncionais (Adaptado de Pal et al., 2007).

A difusão através de polímeros ligados ionicamente é principalmente influenciada por interações iônicas entre cadeias poliiônicas do polímero e a densidade da ligação cruzada durante a formação da rede polimérica. Um aumento na densidade das ligações cruzadas diminui o intumescimento e assim a difusão pelo melhoramento da estabilidade da rede (Pal et al., 2007).

### 4.8.3 Hidrogéis baseados em biopolímeros

Existe uma explosão de interesses em hidrogéis derivados de moléculas biológicas, desde que seus componentes sejam análogos com aqueles que pertençam às células. Polissacarídeos têm sido muito utilizados em formação de hidrogéis, incluindo ágar (Liu et al., 2004), dextrana, quitosana e alginato (Zhang et al., 2005; Donati et al., 2005; Cascone et al., 2001).

#### *Hidrogéis baseados em proteínas naturais*

Têm sido elaborados, hidrogéis, a partir de proteínas naturais, tais como, colágeno e gelatina. Colágeno é uma proteína estrutural com uma tripla hélice na sua estrutura secundária. Em altas temperaturas ou conteúdo de sal, as macromoléculas do colágeno mudam a sua conformação para a forma semicristalina e alongam as tríplexes hélices para amorfos e compactos espirais, resultando na contração dos hidrogéis de colágeno (Oplatka e Yonath, 1968). Estes hidrogéis têm sido estudados como biomateriais injetáveis ou que liberam proteína (Ikada e Tabata, 1998; Muniruzzaman et al., 1998).

#### *Hidrogéis baseados em polipeptídeos sintéticos*

A forma dos hidrogéis baseados em proteínas frequentemente reflete na estrutura biológica das macromoléculas. Hidrogéis baseados em elastina (Urry, 1999) foram designados e sintetizados com uma sequência repetida de pentapeptídeos  $(VPGVG)_m(VPGXG)_n$  onde X podem ser qualquer um dos 20 aminoácidos. A desvantagem desses hidrogéis é que se contraem quando a temperatura está acima de 25°C. Em baixas temperaturas, as cadeias protéicas continuam estendidas, por causa da rede de água pentagonal à volta. Quando a temperatura aumenta, os pentágonos de água perdem a sua estrutura permitindo que as cadeias protéicas se dobrem em estruturas compactas (Xu e Kopecek, 2007).

### 4.8.4 Aplicações dos hidrogéis

Os hidrogéis têm uma grande importância tecnológica e econômica pelo amplo campo de aplicações, podem ser utilizados em materiais absorventes, lentes de contato, papel toalha, esponjas cirúrgicas, bandejas de carne, tapetes de banheiros, fraldas, próteses de tecidos, membranas de hemodiálise, suporte para catalisadores, depósitos de água, nutrientes para plantas e cultivos (Shih et al., 2001; Kinney e Scranton, 1994; Dubrovskii et al., 1990), material para imobilização de enzimas (Park e

Hoffman, 1992), processos de troca iônica, remediação de solos contaminados com metais pesados (Qin, 1993; Mitani et al., 1992) e suporte biodegradável para herbicidas e pesticidas (Weinhold et al., 1993; Schreiber et al., 1993).

As aplicações de maior relevância na atualidade estão na biomedicina e na produção de materiais absorventes. Na biomedicina se requer que o material que compõe o hidrogel tenha boa compatibilidade com os tecidos os quais estará em contato, inalterabilidade frente a processos degenerativos e que possua propriedades mecânicas adequadas para o uso. A presença de água é benéfica para a biocompatibilidade dos hidrogéis, porém causa uma diminuição nas suas propriedades mecânicas, por isso são requeridos hidrogéis que possuam grande capacidade de absorção, porém que mantenham boas propriedades mecânicas (Pal et al., 2007).

## 5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para melhor compreensão do trabalho, este foi dividido em 5 artigos, a seguir:

Artigo 1: Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*)

Artigo 2: Solubilização de proteínas e aminoácidos provenientes da extração química de resíduos de proteínas de pescado utilizando *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis* e *Chryseobacterium* sp.

Artigo 3: Hidrólise de resíduos de proteínas insolúveis por fungos a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*)

Artigo 4: Análise estrutural e capacidade de absorção de água de um hidrogel obtido a partir de isolados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*)

Artigo 5: Capacidade de absorção de água de hidrogel a base de proteínas de pescado submetido a tratamento com etanol

Os artigos 1 e 3 foram desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande, sendo que as cepas dos fungos utilizados no artigo 3 foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo.

O artigo 2 foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a supervisão do Professor Adriano Brandelli

Os artigos 4 e 5 foram desenvolvidos na Universidade de Madison – Wisconsin nos Estados Unidos da América no Departamento de Ciência dos Alimentos sob a supervisão do Professor Srinivasan Damodaran.

**5.1 HIDROLISADO PROTÉICO DE PESCADO OBTIDO POR VIA QUÍMICA E  
ENZIMÁTICA A PARTIR DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)**

(Publicado na revista Química Nova, volume 32, pg. 61-66, 2009, ver Anexo 1)

## HIDROLISADO PROTÉICO DE PESCADO OBTIDO POR VIA QUÍMICA E ENZIMÁTICA A PARTIR DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

### RESUMO

As proteínas musculares presentes no pescado apresentam alta sensibilidade à hidrólise e possuem a vantagem de possuírem uma composição balanceada em aminoácidos. A recuperação e alteração das proteínas do músculo do pescado presentes em subprodutos e a utilização destas, como ingredientes funcionais em alimentos é uma alternativa promissora. Uma das vantagens de hidrolisar enzimaticamente as proteínas do pescado é a modificação que estas apresentam com relação às propriedades funcionais e este aspecto tem recebido mais atenção. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de hidrolisados protéicos a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*) utilizando métodos químicos e enzimáticos, através de propriedades funcionais. Na elaboração dos hidrolisados foram analisados dois métodos químicos, o ácido no qual se trabalhou em pH 2,5 e um alcalino a pH 12. Também foi realizada hidrólise enzimática, onde foram utilizadas as enzimas, Alcalase e Flavourzyme. Os resultados mostraram que a produção de hidrolisados protéicos através de ambas as metodologias aplicadas aprimoraram as propriedades funcionais das proteínas encontradas no filé e no resíduo, o que é desejado para aplicações posteriores.

Palavras-chave: Pescado, hidrolisado protéico, propriedades funcionais.

### ABSTRACT

The muscular proteins of fish present the advantage of possessing a high sensibility to the hydrolysis, and balanced composition in amino acids. The recovery and alteration of the muscle proteins presents in the fish by-products and the use of these, as functional ingredients in feedstuffs are an exciting and promising alternative. One of the advantages of enzymatic hydrolysis of fish proteins are the modification that these present in relation of the functional properties and this aspect has received more attention. The aim of this work was to evaluate the production of protein hydrolyzed from *Micropogonias furnieri* through chemical and enzymatic methods, verifying some functional properties. For production of the hydrolysates were used two different methods, a chemical methodology, using pH 2.5 for acid process and pH 12 for the alkaline process and enzymatic methodology, using the enzymes Alcalase and Flavourzyme. The results showed that the production of the hydrolyzed improved the functional properties of the proteins found in the filet and in the waste, what is desirable for a subsequent application.

Keywords: Fish; protein hydrolyzed; functional properties.

## 1 INTRODUÇÃO

A captura de pescado tem diminuído nos últimos anos, devido à pesca mais seletiva e à estrita regulamentação, mas ainda existem muitas oportunidades de reduzir as perdas durante o processamento do pescado (Dumay et al., 2006). De acordo com a Organização de Agricultura e Alimentos (FAO) sobre estatísticas de descarte e captura, se estima que anualmente uma média de 7,3 milhões de toneladas de pescado são descartadas (Kelleher, 2005).

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente da sensibilidade à hidrólise e da composição balanceada em aminoácidos, particularmente daqueles que costumam ser os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína. Outra vantagem relacionada com o uso do pescado é o fato de que certas espécies não serem apropriadas para a comercialização, geralmente, por não possuírem rendimento satisfatório com relação à filetagem, devido à estrutura corporal e por apresentarem baixo valor comercial (Bárzana e Garibay-García, 1994).

Os hidrolisados podem ser definidos como proteínas que são clivadas química ou enzimaticamente em peptídeos de vários tamanhos (Skanderby, 1994), produzidos para serem utilizados em ampla variedade de produtos alimentícios, incluindo substitutos de leite, suplementos protéicos, realçadores de sabor e estabilizadores em bebidas, dentre outros.

Para realizar a hidrólise, métodos químicos e biológicos são amplamente utilizados; a hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, porém os processos biológicos que utilizam adição de enzimas são mais promissores quando se deseja produtos com alto valor nutritivo e funcionalidade. Existem muitas técnicas potenciais para a extração da proteína a partir de tecido animal, incluindo a utilização de água, solventes orgânicos, processos convencionais de cozimento, aplicação de altas pressões, secagem e extração à quente de óleo (Pigott, 1982).

A produção de materiais solúveis que constituem o produto final da hidrólise depende de diversos fatores, tais como: reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima (Adler-Nissen, 1986). Proteases como Alcalase e Flavourzyme, produzidas pela Novozymes, têm sido reportadas como eficientes para hidrolisar proteínas de pescado. Em geral, a

hidrólise é um processo eficiente para a solubilização das proteínas do pescado. (Dumay et al., 2006; Normah et al., 2005; Kristinsson e Rasco, 2000;).

Este trabalho teve por objetivo estudar a produção de hidrolisados protéicos a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*) através de métodos químicos e enzimáticos, verificando as propriedades funcionais resultantes.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

As matérias-primas utilizadas foram filé e resíduo do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*), coletadas nas indústrias processadoras de pescado da cidade de Rio Grande, localizada no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram transportadas rapidamente em recipientes com gelo (proporção de 1:1, pescado:gelo) para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FURG (Universidade Federal do Rio Grande), onde foram obtidos os hidrolisados protéicos. Inicialmente, o pescado foi lavado e filetado, separados nas porções o filé e o resíduo, que foram lavados com água clorada 5 ppm. O filé foi triturado em *cutter* e o resíduo em moedor com parafuso sem fim, sendo ambos congelados a -18°C e reservados até sua utilização.

### **2.2 Enzimas**

Foram utilizadas duas enzimas, Alcalase 2,4 L, endopeptidase bacteriana produzida a partir do *Bacillus licheniformis*, e Flavourzyme, complexo de protease/peptidase produzido por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*, não modificado geneticamente, e utilizadas para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. As condições ótimas reportadas para Flavourzyme 500 L são pH entre 5,0 e 7,0 com temperatura ótima em torno de 50°C. A Flavourzyme tem atividade de 500 LAPU g<sup>-1</sup>. Uma LAPU é referente à unidade de leucina aminopeptidase, que é a quantidade de enzima que hidrolisa um µmol de leucina-p-nitroanilida por minuto. As enzimas utilizadas foram produzidas pela empresa Novozymes, de Araucária, Estado do Paraná. A atividade enzimática de cada uma das enzimas foi determinada pelo método descrito por Rebeca et al. (1991).

### **2.3 Caracterização da Matéria-prima e dos Hidrolisados**

As matérias-primas e os hidrolisados foram caracterizados pelas análises de proteína, lipídios, umidade e cinzas. O pH foi medido em potenciômetro digital da marca Analion PM 608. Proteína, lipídios, umidade e cinzas foram determinados de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995).

### **2.4 Processos de Obtenção do Hidrolisado Protéico**

Para obtenção dos hidrolisados protéicos foram utilizados dois tipos de processo: químico e enzimático e dois substratos, o filé e o resíduo.

A extração química para a obtenção do hidrolisado protéico, constituiu em solubilização ácida e alcalina, sendo as proteínas homogeneizadas com água destilada na proporção de 1:5. A hidrólise foi realizada em reator de vidro encamisado, acoplado a um banho termostatizado e agitador. Como agente alcalinizante foi utilizado o NaOH 1M e como agente acidificante, HCl 1N. A etapa alcalina foi mantida por 20 min a 20°C e pH 12 e a ácida foi de 20 min a 30°C e pH 2,5. Após a extração, o hidrolisado foi centrifugado a 7500 x g por 15 min. Após a centrifugação, a amostra ficou separada em três fases, sendo que a fase superior (lipídios neutros) e a fase inferior (fração insolúvel) foram descartadas, e a fase intermediária (proteínas solúveis) foi submetida à precipitação ácida ou alcalina até atingir o ponto isoelétrico das proteínas (pH = 5,0), onde foi utilizado como agente acidificante o HCl 1N e como alcalinizante o NaOH 1M, com tempo de exposição de 20 min a 30°C sob agitação. Após, foi realizada nova centrifugação a 7500 x g por 15 min. O precipitado constituiu o isolado protéico, armazenado e reservado a -18°C até ser liofilizado (Santos, 2006).

As condições de hidrólise enzimática utilizadas foram as recomendadas por Santos (2006). A hidrólise foi realizada em reator de vidro encamisado, sendo que para Alcalase os parâmetros utilizados foram: concentração 0,5% de enzima substrato<sup>-1</sup>, 60°C, pH 8,0 por 60 min; e para a Flavourzyme foram: concentração 2% de enzima substrato<sup>-1</sup>, 50°C, pH 7,0 por 120 min. Após a hidrólise, a amostra foi centrifugada a 7500 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi considerado como hidrolisado protéico, reservado a -18°C até liofilização.

## **2.5 Grau de Hidrólise**

Atendendo as especificações dos fabricantes, o grau de hidrólise foi medido nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 min na hidrólise com Alcalase e nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min na hidrólise com a Flavourzyme. O grau de hidrólise foi calculado segundo a quantidade de proteína solúvel, conforme método descrito por Pezoa e Mellado (1979), que consistiu em retirar 1 mL do hidrolisado e diluir em 9 mL de TCA 6,25%, agitar e deixar em repouso por 15 min, então a amostrada foi filtrada e realizada uma diluição de 1:9 com água destilada. Foi retirado 1 mL desta solução para a determinação de proteína pelo método de Lowry et al. (1959).

## **2.6 Propriedades Funcionais**

### **2.6.1 Capacidade de retenção de água**

A determinação da capacidade de retenção de água foi realizada segundo Regenstein et al. (1984) com modificações, consistindo em utilizar uma solução protéica 1% para cada um dos pHs testados (3, 5, 7, 9 e 11), agitar e centrifugar a 3000 x g por 25 min, e determinar proteína pelo método de Lowry et al. (1951) no sobrenadante para que fosse possível descontar a quantidade de proteína solubilizada. O cálculo foi realizado dividindo a quantidade de líquido retido pela quantidade de proteína presente na amostra. A proteína presente na amostra foi determinada segundo metodologia da AOAC (1995).

### **2.6.2 Capacidade de retenção de óleo**

A capacidade de retenção de óleo foi determinada segundo método descrito por Fonkwe e Singh (1996), onde 0,5 g de proteína foi homogeneizada por 10 min com 10 mL de óleo de soja e a seguir a mistura foi centrifugada a 9000 x g por 15 min. A capacidade foi estimada pela relação da quantidade de óleo retido pela quantidade de proteína existente na amostra.

### **2.6.3 Solubilidade**

A solubilidade foi determinada segundo Morr et al. (1985), com modificações, sendo utilizado 0,5 g de proteína adicionado de 2 mL de NaCl 0,1 M e 38 mL do tampão correspondente (pH 3, 5, 7, 9 e 11). Posteriormente, o material foi agitado, o volume completado a 50 mL e centrifugado a 9000 x g por 35 min. As

amostras foram filtradas e a quantidade de proteína solubilizada foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). O cálculo da solubilidade foi realizado a partir da Equação 1.

$$\% \text{Solubilidade} = \frac{A * 50}{W * S / 100} \quad (1)$$

Onde, A é a concentração de proteína em mg mL<sup>-1</sup>; W é o peso da amostra em mg; S é a quantidade de proteína na amostra original em porcentagem.

## 2.7 Liofilização

As matérias-primas e os hidrolisados foram liofilizados em equipamento da marca Edwards com capacidade para 1,5 L, sendo as amostras mantidas à temperatura de -70°C por 15 h, antes de serem liofilizadas por 24 h.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos problemas, usualmente encontrado na hidrólise protéica com vísceras de pescado, é a falta de repetibilidade, causada principalmente pela presença de proteases endógenas, que interferem no processo de hidrólise, pois já desnaturam e hidrolisam previamente as proteínas.

### 3.1 Composição Centesimal

O resíduo liofilizado apresentou 64,3% de proteínas, 21,1% de lipídios e 8,1% de cinzas. Nos isolados, obtidos por extração química ácida e alcalina foi observado aumento na quantidade de proteína, sendo estas de 86,9 e 72,3%, respectivamente. Nos hidrolisados enzimáticos foram obtidos valores menores, 50,1% para o hidrolisado com Flavourzyme e 47,1% para o hidrolisado com Alcalase. Esses valores baixos estão relacionados com a alta quantidade de lipídios encontrados nesses hidrolisados (30,4 e 23,4%, respectivamente), enquanto que nos processos ácido e alcalino os valores de lipídios encontrados foram de 3,5 e 6,6%, respectivamente. Essa diferença é esperada quando se compara o método químico e o enzimático, pois na extração química a maioria dos lipídios foi extraída juntamente com a fração das proteínas insolúveis pela centrifugação, porém no método

enzimático há uma precipitação simultânea das proteínas insolúveis e solúveis, devido à temperatura que foi realizada a hidrólise, vindo a interferir nessa separação.

Diminuindo o conteúdo de lipídios no hidrolisado protéico pode-se contribuir significativamente para a estabilidade da oxidação lipídica. Isto pode aumentar a estabilidade do produto (Synowiecki e Al-Khateeb, 2000; Diniz e Martin, 1997; Shahidi et al., 1995). O conteúdo de cinzas nos isolados ácido e alcalino foi menor que 1%, enquanto que nos hidrolisados enzimáticos esses valores foram de 13% para a Flavourzyme e 16,9% para a Alcalase. Marquez et al. (2004) atribuíram a elevada concentração de cinzas verificada nos hidrolisados de maria-luiza (*Paralichthys brasiliensis*) e perna-de-moça (*Cynoscion* sp) de 10,7 a 18,7% a formação de NaCl em razão do ajuste do pH durante a hidrólise enzimática das proteínas. Elevados teores de minerais também foram encontrados por Liceaga-Gesualdo e Li-chan (1999) em hidrolisados protéicos de arenque (21,7%) e por Diniz e Martin (1997) em estudo realizado com cação (14%).

O filé liofilizado apresentou 75,5% de proteína, 7,1% de lipídios e 3,9% de cinzas. Os valores de proteínas encontrados para os hidrolisados liofilizados foram 78,0% para a extração ácida, 88,3% para o processo alcalino, 81,4% para a hidrólise com a Flavourzyme e 70,5% para a Alcalase. O conteúdo de proteína do hidrolisado foi similar ao reportado em outras pesquisas ficando entre 70 e 90% (Kristinsson e Rasco, 2000; Imm e Lee, 1999; Benjakul e Morrissey, 1997).

O conteúdo de cinzas ficou abaixo de 1% para os isolados químicos, e 7,8% para o ensaio com a Flavourzyme e 13,6% para a Alcalase. Esse aumento no conteúdo de cinzas já era esperado, pois durante a hidrólise enzimática ocorre a formação de sais devido à adição de bases. Liceaga-Gesualdo e Li-chan (1999) observaram que o conteúdo de cinzas no hidrolisado de salmão realizado com Alcalase foi 21% maior do que no material inicial. Isto foi consequência da adição de álcali requerido para o controle do pH durante a hidrólise.

O conteúdo de lipídios encontrado foi de 3,1% para o processo ácido, 4,4% para o alcalino, 9,1% para a hidrólise com a Flavourzyme e 13,7% com Alcalase. Utilizando a mistura de enzimas endo- e exopeptidase Flavourzyme™ para a produção de um hidrolisado protéico de pescado a partir de um concentrado solúvel de pescado, Nilsang et al. (2005) obtiveram um hidrolisado com 66,4% de proteína, 2,4% de lipídios e 25,9% de cinzas.

### 3.2 Grau de Hidrólise

Na Figura 1 está representado o grau de hidrólise dos ensaios realizados com as enzimas Flavourzyme e Alcalase, nos substratos utilizados. Foi observado que a enzima Flavourzyme, embora com o dobro do tempo de hidrólise da Alcalase, alcançou um grau de hidrólise máximo em torno de 18%, independentemente do substrato utilizado. Este resultado era esperado, pois a Flavourzyme é uma exo-enzima. A Alcalase obteve um grau de hidrólise de 56% para o filé e 37% para o resíduo, após 60 min de hidrólise. Essa diferença entre o filé e o resíduo provavelmente foi devida às diferentes frações protéicas encontradas nos substratos. A Alcalase é uma endo-enzima, conseguindo, portanto, uma hidrólise mais efetiva em tempo menor, quando comparada com a Flavourzyme.

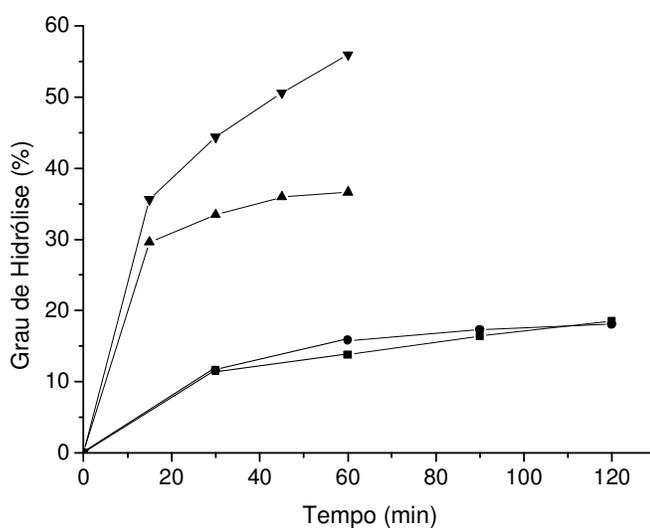


Figura 1 Grau de hidrólise enzimática do filé e do resíduo da corvina. ■ Resíduo e Flavourzyme; ● Filé e Flavourzyme; ▲ Resíduo e Alcalase; ▼ Filé e Alcalase

### 3.3 Capacidade de Retenção de Água

Os resultados obtidos para a capacidade de retenção de água do filé *in natura* e dos hidrolisados nos diferentes pHs estudados estão apresentados na Figura 2.

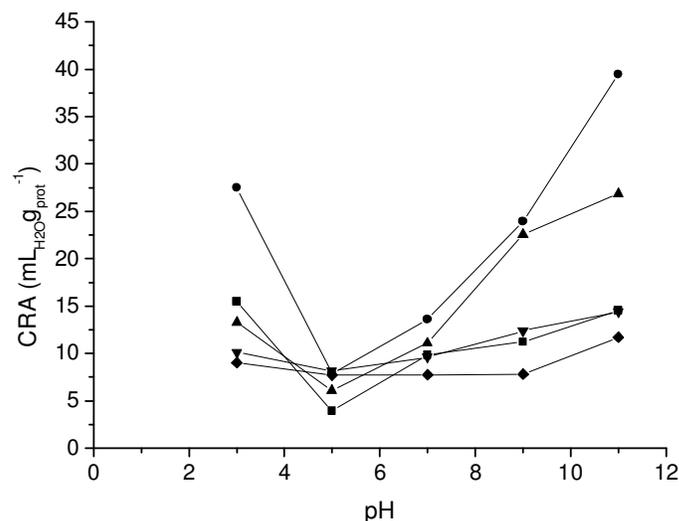


Figura 2 Capacidade de retenção de água do filé e dos hidrolisados em diversos pHs. ■ Filé ● Extração Ácida ▲ Extração Alcalina ▼ Hidrólise Flavourzyme ◆ Hidrólise Alcalase

Todos os ensaios apresentaram o mínimo de capacidade de retenção de água a pH 5,0, que é próximo do ponto isoelétrico dessas proteínas. Os hidrolisados enzimáticos obtiveram menor capacidade de retenção de água, quando comparados com os hidrolisados químicos; provavelmente isso ocorreu devido à grande quantidade de peptídeos de baixo peso molecular gerados durante a hidrólise, que acabou prejudicando a absorção de água. Segundo Kristinsson (1998), a hidrólise com Alcalase produziu mais peptídeos com baixo peso molecular do que com outras enzimas.

Os menores resultados de capacidade de retenção de água foram encontrados no ensaio utilizando a Alcalase, o que está de acordo com Diniz e Martin (1997) que estudaram a hidrólise protéica utilizando tubarão como substrato, e observaram que o controle, representando o substrato protéico original de tubarão, obteve valores significativamente maiores de capacidade de retenção de água do que as outras amostras (hidrolisado por Alcalase e por autólise), atribuindo os efeitos às cadeias laterais hidrofílicas da proteína original. A extração química conseguiu aumentar a capacidade de retenção de água em praticamente todos os pHs, a extração ácida, no pH 11,0 aumentou de 14,56 mL g<sub>prot.</sub><sup>-1</sup> no filé *in natura* para 39,47

$\text{mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$ . No processo alcalino foi obtido um acréscimo de 84% na CRA em pH 11,0, que foi o pH onde se alcançou a maior capacidade de retenção de água; os pHs 5,0 e 7,0, foram os que obtiveram as menores CRAs para todos os ensaios.

Na Figura 3 estão apresentados os resultados de capacidade de retenção de água obtidos para os ensaios realizados com resíduo da corvina (*Micropogonias furnieiri*).

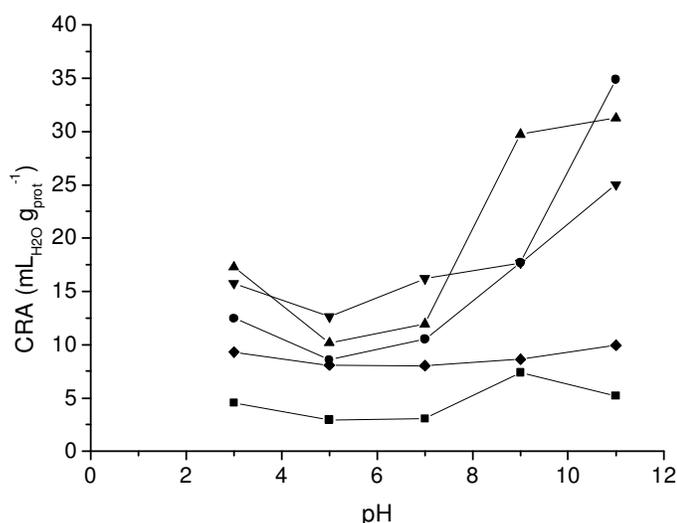


Figura 3 Capacidade de retenção de água do resíduo e dos hidrolisados em diversos pHs. ■ Resíduo ● Extração Ácida ▲ Extração Alcalina ▼ Hidrólise Flavourzyme ◆ Hidrólise Alcalase

Os ensaios com resíduo também apresentaram a mínima capacidade de retenção de água no pH 5,0, devido à precipitação das proteínas pela aproximação ao ponto isoelétrico. O resíduo original apresentou uma CRA muito baixa em todos os pHs, sendo o valor máximo de  $7,37 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$  no pH 7,0. Os hidrolisados enzimáticos apresentaram valores menores que os hidrolisados químicos, porém o hidrolisado enzimático com a Alcalase apresentou  $9,92 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$ , enquanto que o hidrolisado com a Flavourzyme apresentou CRA de  $25,20 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$  no pH 11,0. Dado consistente com o relatado por Diniz e Martin (1997), que encontraram menores resultados de capacidade de retenção de água no ensaio que utilizou Alcalase no hidrolisado protéico a partir de resíduo de tubarão. O processo químico alcançou valores máximos no pH 11,0 de  $34,89 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$  para a extração ácida e de  $31,23 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$  para o

processo alcalino. O pH afeta a magnitude da carga da rede sobre as moléculas protéicas, a qual, em troca, altera as interações atrativas e repulsivas. As proteínas são capazes de ligar grande quantidade de água por causa da habilidade de formar ponte de hidrogênio entre moléculas de água e grupos polares de polipeptídeos (Slizyte et al., 2005).

Não foi observada uma relação entre o grau de hidrólise e a capacidade de retenção de água para ambos os substratos e enzimas utilizadas.

### 3.4 Capacidade de Retenção de Óleo

Os resultados da capacidade de retenção de óleo para o resíduo, filé e os hidrolisados são mostrados na Figura 4. Todos os hidrolisados obtiveram valores superiores ao encontrado para o filé e o resíduo *in natura*. Os maiores valores foram obtidos para os hidrolisados químicos, o processo ácido resultou em um aumento de 102% e o alcalino, de 67%, em relação ao filé original. Os processos enzimáticos obtiveram valores próximos, aumentando a absorção de óleo em torno de 20%.

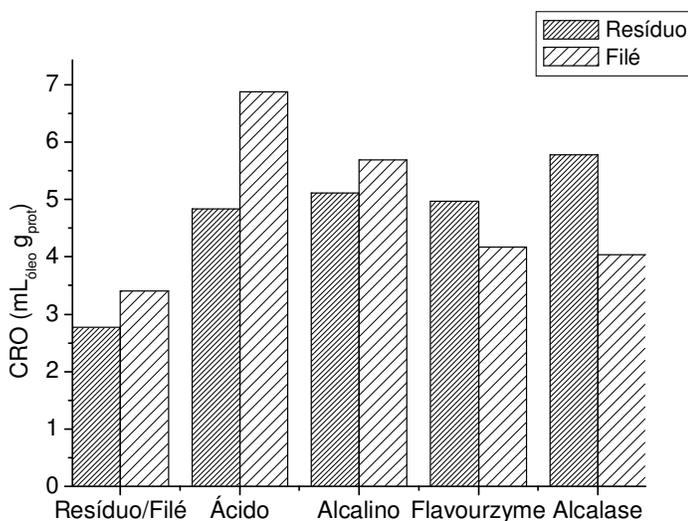


Figura 4 Capacidade de retenção de óleo no filé, resíduos e nos hidrolisados protéicos de corvina

O resíduo original apresentou absorção de óleo de  $2,77 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$ , todos os hidrolisados alcançaram valor superior ao do resíduo *in natura*. Os resultados dos hidrolisados foram próximos, sendo que o máximo alcançado foi com uso da Alcalase ( $5,78 \text{ mL g}_{\text{prot.}}^{-1}$ ). Os resultados obtidos foram relativamente maiores que os encontrados na literatura. Estudo realizado por Slizyte et al. (2005) com hidrólise realizada com resíduos de bacalhau mostrou que a habilidade das misturas de absorverem óleo foi constante, em torno de  $2,3 \text{ g}_{\text{óleo}} \text{ g}_{\text{prot.}}^{-1}$  para todas as amostras. A quantidade de lipídios presente nas amostras aparentemente não interferiu na absorção de óleo, pois os hidrolisados apresentaram resultados diferentes de lipídios e a capacidade de retenção de óleo foi praticamente a mesma para todos os ensaios, com exceção do resíduo original. Porém alguns pesquisadores encontraram relação entre a quantidade de lipídios e a absorção de óleo; os hidrolisados enzimáticos de resíduos de bacalhau (com Flavourzyme e Neutrase) contendo a maior quantidade de lipídios apresentaram maior absorção de óleo, enquanto que a mistura original apresentava tendência oposta (Slizyte et al., 2005).

O grau de hidrólise não influenciou na absorção de óleo, mesmo a Alcalase tendo apresentado praticamente o dobro do grau de hidrólise da Flavourzyme para o resíduo, e três vezes mais para o filé; os resultados foram muito próximos e independentes do substrato utilizado. Em estudo realizado por Gbogouri et al. (2004) com cabeças de salmão, foi demonstrado que o hidrolisado com grau de hidrólise de 11,5% apresentou maior capacidade de retenção de óleo que os hidrolisados com maior grau de hidrólise e que o caseinato de sódio. A proteína de salmão não-hidrolisada obteve uma capacidade de retenção de óleo significativamente maior do que o hidrolisado.

### 3.5 Solubilidade

Os resultados de solubilidade para o filé *in natura* e os hidrolisados são apresentados na Figura 5. A solubilidade foi mínima em pH 5,0 para todos os ensaios, pois próximo ao ponto isoelétrico a carga da rede da proteína é minimizada e conseqüentemente se formam mais interações proteína-proteína e menos interações proteína-água (Chobert et al., 1988; Adler-Nissen, 1976).

A maior solubilidade foi alcançada em pH extremos, no pH 11,0 as solubilidades foram máximas, concordando com Kristinsson e Rasco (2000) o pH é

muito importante no efeito que exerce sobre a solubilidade, alterando o arranjo de cargas das cadeias laterais de aminoácidos.

Os extratos, ácido e alcalino, apresentaram os maiores resultados (74,8 e 84,1%, respectivamente). A hidrólise enzimática alcançou valores de 29,8% para a Flavourzyme e 44,4% para a Alcalase; como a Alcalase apresentou grau de hidrólise maior, era esperado que obtivesse uma solubilidade maior que a Flavourzyme. O filé não hidrolisado foi o que apresentou a menor solubilidade (13,3%) em pH 11,0. O aumento da solubilidade decorre da hidrofiliicidade dos peptídios formados durante a hidrólise protéica. Segundo Gbogouri et al. (2004) o balanço das forças hidrofílicas e hidrofóbicas dos peptídeos é um fator importante no aumento da solubilidade, além do seu tamanho. Espera-se que peptídeos menores gerados a partir das proteínas miofibrilares apresentem mais resíduos polares, com a habilidade de formar pontes de hidrogênio com a água, o que aumenta a solubilidade. Kristinsson e Rasco (2000) e Linder et al. (1996) trabalharam com hidrolisados de filé de salmão; estes foram mais solúveis do que a proteína nativa e indicaram solubilidades superiores a 75%.

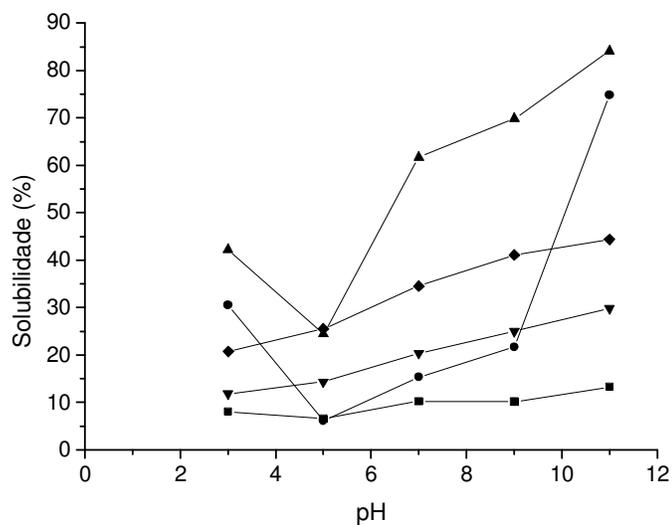


Figura 5 Solubilidade apresentada pelo filé e hidrolisados de corvina. ■ Filé ● Extração Ácida ▲ Extração Alcalina ▼ Hidrólise Flavourzyme ◆ Hidrólise Alcalase

Os resultados de solubilidade encontrados para o resíduo e hidrolisados são apresentados na Figura 6. A menor solubilidade para todos os ensaios foi em pH 5,0, assim como aconteceu para os hidrolisados de filé. A solubilidade máxima

encontrada também foi em pH 11,0 para todas as amostras. Os hidrolisados químicos apresentaram maiores valores de solubilidade (89% para o isolado ácido e 86,6% para o isolado alcalino). O resíduo original alcançou um valor máximo de 9,5% e os hidrolisados enzimáticos apresentaram 45,9% para a Flavourzyme e 57% para a Alcalase. Batista (1999) estudou a solubilidade da proteína dos hidrolisados de resíduo de pescado por extração alcalina e observou que a solubilidade aumentou tanto no lado ácido quanto alcalino, sendo que o aumento da solubilidade fosse mais pronunciado no lado alcalino.

O aumento na solubilidade dos hidrolisados é devido ao menor tamanho molecular comparado com a proteína intacta, e também à exposição de novos grupos aminos e carboxilas ionizáveis dos aminoácidos, que aumentam a hidrofiliicidade do hidrolisado. Tal comportamento é explicado pelo fato de que são produzidos polipeptídeos menores e mais hidrofílicos durante a hidrólise; por isso, não há formação de agregados longos, a não ser no ponto isoelétrico (Cheftel et al., 1985).

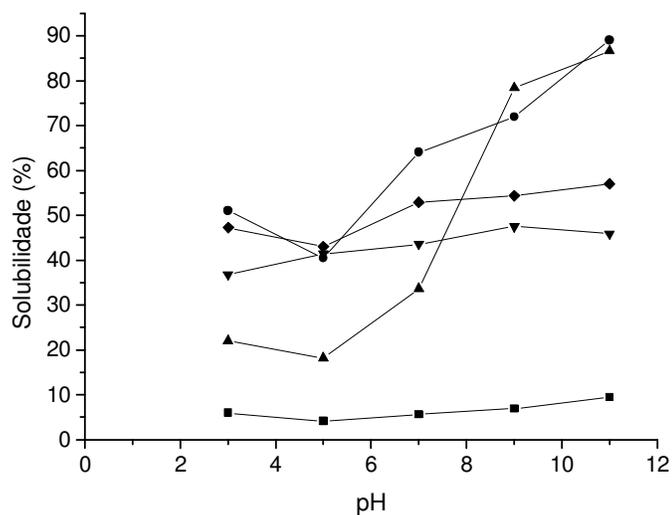


Figura 6 Solubilidade apresentada pelo resíduo e hidrolisados de corvina. ■ Resíduo ● Extração Ácida ▲ Extração Alcalina ▼ Hidrólise Flavourzyme ◆ Hidrólise Alcalase

Os resultados das propriedades funcionais dos hidrolisados estudados mostraram que os mesmos poderiam ser utilizados para diversas aplicações na indústria de alimentos. A extração química apresentou resultados mais expressivos

quando comparada com a hidrólise enzimática; além disso, os processos químicos são de fácil execução e de custo operacional menor.

As aplicações do hidrolisado podem ser aumentadas pela melhor descrição de todas as frações após a hidrólise, percebendo aplicações também para a fração insolúvel. Poucos trabalhos têm sido realizados sobre a avaliação da parte insolúvel após a hidrólise. O valor do processo de hidrólise poderia ser aumentado significativamente pela continuação da hidrólise e/ou encontrando uso e aplicação para as frações não hidrolisadas.

#### **4 CONCLUSÃO**

Os substratos utilizados se mostraram adequados para a produção dos hidrolisados, porém os resultados indicaram que seria mais vantajoso utilizar o resíduo do que o filé, pois o resíduo quando submetido aos processos de extração químicos alcançou 86,9% (ácido) e 72,3% (alcalino) de proteína. Os hidrolisados provenientes do resíduo de corvina apresentaram resultados satisfatórios em todas as propriedades funcionais avaliadas; que demonstram que o resíduo de pescado, que geralmente é utilizado para produzir farinha ou ração animal, poderia ser utilizado para a elaboração de um produto com maior valor agregado.

Os métodos químicos se mostraram mais vantajosos, pois além de apresentarem resultados de composição centesimal e propriedades funcionais relevantes, são métodos simples de se aplicar.

#### **5 REFERÊNCIAS**

Adler-Nissen, J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 24, 1090-1093, 1976.

Adler-Nissen, J. A review of food hydrolysis specific areas. In: Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. Copenhagen, Denmark, 57-109, 1986.

AOAC. Official Methods of Analysis of International. 16<sup>th</sup> Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

Bárzana, E.; Garibay-García, M. Production of fish protein concentrates in fisheries processing: biotechnological applications. Chapman & Hall, London, 206-222, 1994.

Batista, I. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. **European Food Research and Technology**. 210, 84-89, 1999.

Benjakul, S.; Morrisey, M. T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 61, 131-138, 1997.

Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. Amino acids, peptides, and proteins. In: Fennema, O. R. (Ed). *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc. 245-369, 1985.

Chobert, J. M.; Bertrand-Harb, C.; Nicolas, M. G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 36, 883-886, 1988.

Diniz, F. M. e Martin, A. M. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. **Food Science and Technology**. 30, 266-272, 1997.

Dumay, J.; Donnay-Moreno, C.; Barnathan, G.; Jaquen, P.; Bergé, J. P. Improvement of lipid and phospholipids recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**. 41, 2327-2332, 2006.

Fonkwe, L. G.; Singh, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**. 31, 605-616, 1996.

Gbogouri, G. A.; Linder, M.; Fanni, J; Parmentier, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Journal of Food Science**. 69, 615-622, 2004.

Imm, J. Y. e Lee, C. M. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47, 2360-2366, 1999.

Kelleher, K. Discards in the world's marine fisheries: an update. FAO Fisheries technical paper 470, 2005.

Kristinsson, H. G. Reaction kinetics, biochemical and functional properties of salmon muscle proteins hydrolyzed by different alkaline proteases. Masters thesis. University of Washington, Seattle, WA, 1998.

Kristinsson, H. G.; Rasco, B. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 657-666, 2000.

Liceaga-Gesualdo, A. M. e Li-Chan, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **Journal of Food Science**. 64, 1000-1004, 1999.

Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. Functional properties of veal bone hydrolysates. **Journal of Food Science**. 61, 712-716, 1996.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193, 265-275, 1951.

Marquez, V. M. L.; Neves, R. A. M.; Mira, N. V. M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24, 101-108, 2004.

Morr, V.; German, B.; Kinsella, J. E.; Regenstein, J. M.; Van Buren, J. P.; Killara, A.; Lewis, B. A.; Mangino, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**. 50, 1715, 1985.

Nilsang, S.; Lertsiti, S.; Suphantharika, M.; Assavanig, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**. 70, 571-578, 2005.

Normah, I.; Jamilah, B.; Saari, N.; Yaakob, B. C. M. Optimization of hydrolysis conditions for the production of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by Alcalase. **Journal of Muscle Foods**. 16, 87-102, 2005.

Pezoa, V. G.; Mellado, M. S. Estudo das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de extratos dos componentes do aparelho digestivo da corvina (*Micropogonias furnieri*) e da castanha (*Umbrina canosa*). Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado. Editora FURG, 5-38, Rio Grande, 1979.

Pigott, G. M.; Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products, AVI Publishing Company, Westport, CT, 1982.

Rebeca, B. D.; Pena-Vera, M. T.; Diaz-Castaneda, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value. **Journal of Food Science**. 56, 309-314, 1991.

Regenstein, J. M.; Jauregui, C. A.; Baker, R. The effect of pH, polyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscle. **Journal of Food Biochemistry**. 8, 123-131, 1984.

Santos, S. D. Obtenção e avaliação de hidrolisado enzimático obtido a partir de pescado de baixo valor comercial. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

Shahidi, F.; Han, X-Q.; Synowiccki, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**. 53, 285-293, 1995.

Skanderby, M. Protein hydrolysates: their functionality and applications. **European Food Technology International**. 10, 141-144, 1994.

Slizyte, R.; Dauksas, E.; Falch, E.; Storro, I.; Rustad, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhus*) by-products. **Process Biochemistry**. 40, 2021-2033, 2005.

Synowiecki, J. e Al-Khateeb, N. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Craxon craxon* processing discards. **Food Chemistry**. 68, 147-152, 2000.

**5.2 SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS PROVENIENTES DA  
EXTRAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS DE PESCADO UTILIZANDO  
*Bacillus cereus*, *Bacillus velesensis* E *Chryseobacterium sp.***

(Publicado On Line na revista Food and Bioprocess Technology, DOI:  
10.1007/s11947-008-0168-5, ver Anexo 2)

**SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS PROVENIENTES DA  
EXTRAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS DE PESCADO UTILIZANDO  
*Bacillus cereus*, *Bacillus velesensis* E *Chryseobacterium sp.***

**RESUMO**

O reconhecimento dos limites dos recursos naturais e o aumento da poluição do meio ambiente têm enfatizado a necessidade de uma melhor utilização das espécies de baixo valor comercial, e também dos resíduos gerados pelas indústrias processadoras de pescado, por serem estes, ricos em proteínas e lipídios. Os processos de hidrólise protéica, química ou enzimática geram como subprodutos, proteínas insolúveis provenientes de espinhaços, escamas, pele e ossos que pela dificuldade de degradação, não são recuperados e terminam sendo utilizados para fabricação de rações animais ou descartados no meio ambiente. Como alternativa, as proteínas insolúveis poderiam ser convertidas em biomassa útil, tais como, concentrados protéicos ou aminoácidos, utilizando proteases produzidas por microrganismos. Este trabalho objetivou avaliar a solubilização de proteínas insolúveis, descartadas durante o processo de mudança de pH em resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*), mediante o uso de proteases produzidas por bactérias. As condições de pH e temperatura dos cultivos foram ajustadas para cada microrganismo e o tempo foi de 96 h. Foram avaliados dois substratos (ácido e alcalino), três cepas de microrganismos e a concentração de substrato utilizada. Das três bactérias, a *Bacillus velesensis* atingiu a maior atividade proteolítica (47,56 U mL<sup>-1</sup>), seguido da *Chryseobacterium sp.* com 23,46 U mL<sup>-1</sup>, e *Bacillus cereus* (3,13 U mL<sup>-1</sup>) que apresentou baixa atividade proteolítica. Os resultados mostraram que foi possível solubilizar proteínas e aminoácidos utilizando as três bactérias e que estas poderão ser utilizadas principalmente para aumentar o rendimento dos processos de hidrólise ou em formulações de alimentos.

Palavras-chave: Pescado, proteínas insolúveis, proteases bacterianas, solubilização.

## ABSTRACT

The exploitation of natural resources and increased environmental pollution have stressed the need for more valued use of residues generated by the fish processing plants, and species with low commercial value. Protein hydrolysis processes – whether chemical or enzymatic – generate insoluble proteins from bones, scales and skin, which are not recovered and are often used as animal feed or disposed off into the environment. As an alternative, insoluble proteins could be converted in useful biomass protein concentrates or amino acids, by using microbial proteases. This work examines the solubilization of insoluble proteins discarded in the process of pH change in fish residues from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*), through the use of bacterial proteases. Temperature and pH conditions in the fermentations were adjusted for each microorganism, and time was set at 96 h. Two substrates (acid and alkaline), three microorganism strains, and the substrate concentration used were examined. Among the three strains, *Bacillus velesensis* reached the higher proteolytic activity (47.56 U mL<sup>-1</sup>), followed by *Chryseobacterium* sp. with 23.46 U mL<sup>-1</sup>. *Bacillus cereus* (3.13 U mL<sup>-1</sup>) showed low proteolytic activity. *B. velesensis* was the bacterium that presented better results with the analyzed substrates, achieving larger amount of soluble protein and free amino acids. The findings showed that these bacteria could be used to solubilize proteins from fish byproducts, which may be particularly useful to increase the yield of hydrolysis process or food formulations.

Key words: Bacterial proteases; fish; insoluble proteins; solubilization

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de um processo de mudança de pH para recuperação da proteína do músculo do pescado apresenta grande potencial para aumentar o rendimento e adicionar valor a produtos de origem marinha (Kristinsson e Liang, 2006; Costa et al., 2005; Perez-Mateos et al., 2004; Gildberg et al., 2002). A partir deste processo, a elaboração de isolados protéicos altamente funcionais e estáveis derivados de subprodutos da industrialização do pescado, têm recebido especial atenção. Porém, deste processo resulta uma quantidade considerável de proteínas insolúveis, provenientes de ossos, peles, tecidos conectivos, membranas celulares e escamas, que poderiam ser solubilizadas através de proteases específicas e os aminoácidos resultantes utilizados para diversos fins (Kristinsson e Liang, 2006).

A produção dos isolados protéicos poderia ter seu valor aumentado se todas as frações após a solubilização das proteínas musculares fossem utilizadas, percebendo assim aplicações também para a fração não-solúvel (Kristinsson e Ingadottir, 2006). Poucos trabalhos têm sido realizados sobre a avaliação da parte não-solúvel. O valor do processo poderia aumentar significativamente pela continuação do processo, ou encontrando uso e aplicação para as frações não solubilizadas (Slizyte et al., 2005).

As proteínas fibrosas, disponíveis abundantemente como subprodutos do processamento agroindustrial (chifres, cascos, penas, unhas, escamas, espinhos e cabelos), podem ser convertidas em biomassa utilizável, tais como concentrados protéicos e aminoácidos, utilizando enzimas microbianas (Hulse, 2004; Anwar e Saleemuddin, 1998).

A quebra de macromoléculas insolúveis, tais como, colágeno, elastina e queratina, depende da secreção microbiana de enzimas extracelulares que possuem atividades sobre a superfície compacta dessas moléculas (Brandelli, 2008; Riffel et al., 2007; Aspino et al., 2005).

A queratina é uma proteína estrutural encontrada em penas, escamas, lãs, cabelos e está distribuída abundantemente na natureza como resíduo. Esta é resistente à degradação pelas proteases comuns, tais como tripsina, pepsina e papaína (Shih, 1993; Papadopoulos et al., 1986). Esta propriedade é conferida principalmente à composição e conformação molecular dos aminoácidos encontrados

na queratina, que estão empacotados na  $\alpha$ -hélice ou  $\beta$ -lâmina dentro de uma cadeia polipeptídica supercoloidal devido ao alto grau de pontes dissulfídicas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Parry e North, 1998). A queratina é o maior componente da epiderme e seus apêndices, cabelos, penas, unhas, chifres, cascos, escamas e lã (Brandelli, 2008; Gupta e Ramnani, 2006). Além do mais, a queratina não se acumula na natureza desde que possa ser degradada por microrganismos (Onifade et al., 1998). A atividade queratinolítica é conhecida entre *Bacillus* spp. Muitas linhagens de *B. licheniformis* e *B. subtilis* são descritas como queratinolíticas (Suh e Lee, 2001; Lin et al., 1999), e outras espécies, tais como *B. pumilus* e *B. cereus* também produzem queratinases (Werlang e Brandelli, 2005; Kim et al., 2001).

O colágeno é o principal constituinte orgânico dos ossos e também o principal componente da matriz extracelular, um biomaterial que garante a integridade estrutural de animais multicelulares pela formação de um suporte para as células ou órgãos. A estrutura molecular do colágeno é conhecida pela composição de aminoácidos características compostas de numerosas unidades repetidas de tripeptídeos de tipo Gli-Pro-X, onde X é regularmente a prolina sendo modificada posteriormente para hidroxiprolina (Watanabe, 2004; Luiten et al., 2003; Vieille e Zeikus, 2001; Miller, 1984).

A linhagem de *Chryseobacterium* tem sido isolada a partir de vários ecossistemas, tais como, água, solo, pescados, ambientes marinhos e amostras clínicas. Muitas linhagens de *Chryseobacterium* possuem alta atividade proteolítica (Yamaguchi e Yokoe, 2000; Jooste e Britz, 1986).

Considerando o potencial biotecnológico desses microrganismos e o fato de que os mecanismos de degradação do colágeno e da queratina ainda não estarem completamente esclarecidos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de degradação que apresentam *Bacillus cereus*, *Bacillus velesensis* e *Chryseobacterium* sp. sobre as proteínas insolúveis, subprodutos provenientes da elaboração de isolados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima

Foi utilizada a espécie corvina (*Micropogonias furnieri*), proveniente de empresas processadoras de pescado da cidade do Rio Grande, localizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O pescado foi transportado em recipientes com gelo até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foi realizado o processamento. Assim, o pescado foi imediatamente lavado com água clorada 5 ppm, descabeçado, eviscerado e filetado. Os resíduos, tais como, vísceras, cabeças, peles, cartilagens e escamas, foram acondicionados em embalagens plásticas de polietileno e armazenados sob congelamento a -18°C até a utilização.

### 2.2 Obtenção do Substrato

Foram utilizados dois tipos de substrato, resultantes do processo de isolamento de proteínas por mudança de pH, realizado com resíduos do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. Inicialmente, foram realizados dois processos de solubilização química (ácida e alcalina) para a obtenção dos isolados protéicos. As amostras foram homogeneizadas com água destilada (proporção 5:1, água:substrato). As reações foram realizadas em reator encamisado, com agitação e temperatura controlada. Como agente alcalinizante foi utilizado NaOH 1M e como agente acidificante HCl 1N. A solubilização ácida foi realizada em pH 2,5 por 20 min a 30°C e a solubilização alcalina em pH 12 por 20 min a 20°C (Santos et al., 2009). Após a solubilização, o substrato foi centrifugado a 9000 x g por 15 min. Nesta centrifugação a amostra ficou separada em três fases, na superior ficaram os lipídios neutros, que foram descartados; na intermediária estavam as proteínas solúveis que foram submetidas à precipitação isoelétrica na inferior ficaram as proteínas insolúveis que foram reservadas para este processo. O substrato foi desidratado em secador de bandejas por 13 h a 50°C, e depois triturado em moinho de facas, para padronizar o tamanho das partículas das amostras em 1mm.

### 2.3 Microrganismos

As bactérias utilizadas foram *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel et al., 2003), *Bacillus cereus* kr16 (Werlang e Brandelli, 2005) e *Bacillus velesensis* P11 (Giongo et al., 2007) isoladas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Estes microrganismos foram escolhidos por possuírem atividade queratinolítica. Os microrganismos foram mantidos em ágar-ágar 2% e ágar farinha de penas 1% a temperatura de 4°C.

### 2.4 Cultivo Microbiano

Os dois tipos de substrato, utilizando três microrganismos, em concentrações diferentes foram submetidos a um cultivo nas condições descritas no planejamento experimental. O volume total do meio foi de 100 mL. Além do microrganismo e do substrato ácido ou alcalino, também foi adicionado um meio mineral mínimo com a seguinte composição em (g L<sup>-1</sup>), NaCl (0,5), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,015) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4). O pH do meio foi ajustado em 8,0 para a bactéria kr6 e em 7,0 para as outras duas bactérias (kr16 e P11). O agente alcalinizante utilizado para o ajuste do pH foi NaOH 1,8 N. A temperatura utilizada no cultivo foi de 30°C para a kr6 e 37°C para a kr16 e a P11. A quantidade de inóculo foi calculada em relação à escala de Mc Farland, onde uma absorbância de 0,5 a 600 nm corresponde a 10<sup>8</sup> ufc na curva de concentração celular. A partir disto, foi adicionado 1% da suspensão das bactérias em meio mineral mínimo. O cultivo foi finalizado após 96 h.

### 2.5 Concentração Celular

O controle da concentração celular foi realizado através de plaqueamento em diversas diluições segundo o método descrito por Sangali e Brandelli (2000). A diluição sucessiva foi de 100 µL de amostra em 900 µL de solução salina NaCl 0,85%. O meio utilizado para o plaqueamento foi 2% de ágar-ágar e (40 g L<sup>-1</sup>) ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Em uma mesma placa foram efetuadas 4 diluições diferentes em triplicatas de 10 µL.

### 2.6 Atividade Proteolítica

As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min para que as partículas do meio em suspensão e os microrganismos fossem separados do sobrenadante. A determinação da atividade proteolítica foi realizada em triplicata no

tempo zero e a cada 24 h. O método utilizado foi o recomendado por (Thys et al., 2004), onde foi retirado 120  $\mu$ L do sobrenadante e adicionado em 480  $\mu$ L de azocaseína 1% em tampão tris HCl 25 mM em pH 8,0. A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C por 40 min e foi adicionado 600  $\mu$ L de TCA 10% para cessar a reação, resfriada por 10 min a 10°C e centrifugada a 10000 x g por 5 min. Após a centrifugação, foram retirados 800  $\mu$ L do sobrenadante aos quais foram adicionados 200  $\mu$ L de NaOH 1,8 N, foi lida a absorvância no espectrofotômetro UVmini-1240 Shimadzu a 420 nm. Também foi realizado um ensaio em branco. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de proteína que resulta em um aumento de 0,01 na absorvância medida a 420 nm, sob as condições utilizadas nos ensaios.

## **2.7 Análise da Concentração de Aminoácidos Livres**

Foi utilizada a técnica descrita por Moore (1968), com o emprego de ninidrina. Foi adicionado 100  $\mu$ L de amostra em 2 mL de tampão fosfato 0,1 M em pH 7,2, foi retirado 500  $\mu$ L da solução de amostra e adicionado 500  $\mu$ L de reagente de ninidrina 5%. A reação ocorreu em banho-maria a 100°C por 15 min, seguido de um resfriamento em banho com gelo. Por fim foram adicionados 5 mL de etanol 50%. As determinações de aminoácido total de cada ponto foram realizadas em triplicata e a absorvância lida a 560 nm em espectrofotômetro UV/VIS marca Shimadzu mini-1240. Paralelamente, foi preparada uma amostra controle com 100  $\mu$ L de água destilada mais reagentes. A curva padrão foi preparada com glicina (0 a 0,08 mg de glicina).

## **2.8 Determinação de Proteína Solúvel**

Foi utilizado o método descrito por Lowry et al. (1951) com o emprego do reagente de Folin Ciocalteau. Dois reagentes, o reagente combinado, preparado com 0,5 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% e 0,5 mL de solução de tartarato de Na/K 1%, até esta solução completar o volume de 50 mL com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1 N; o reagente de Folin-Ciocalteau diluído (1:1) com água destilada.

Para a reação foram misturados 200  $\mu$ L de amostra e 2,5 mL do reagente combinado, a mistura foi deixada a temperatura ambiente por 10 min. Então, foi adicionado 300  $\mu$ L do reagente de Folin Ciocalteau diluído e deixado em repouso, a temperatura ambiente, por mais 30 min. A absorvância foi medida a 750 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-1100. Paralelamente, foi preparada uma amostra

controle com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada mais reagentes, a curva padrão foi preparada com albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0 a 0,25  $\text{mg mL}^{-1}$ .

## 2.9 Delineamento Experimental

Foi aplicado um planejamento experimental fatorial misto ( $3^2 \times 2^1$ ). As variáveis estudadas foram os substratos, os microrganismos e as concentrações do substrato no meio de cultivo. Na Tabela 1 estão demonstrados os fatores a serem avaliados e as suas respectivas variações.

Tabela 1 Fatores avaliados e os níveis de variação para os experimentos realizados.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Substrato	Ácido	---	Alcalino
Microrganismo	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	<i>Bacillus cereus</i> kr16	<i>Bacillus velesensis</i> P11
Concentração de Substrato ( $\text{g L}^{-1}$ )	10	20	30

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a cada 24 h do processo fermentativo. Para cada experimento realizado foi observado em que tempo as respostas foram mais expressivas, sendo a análise estatística realizada neste tempo.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores concentrações celulares alcançadas foram com *Chryseobacterium* sp. em ambos os substratos, sendo que o substrato ácido propiciou as máximas concentrações ( $4 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), independente da concentração de substrato utilizada. A *Chryseobacterium* sp. na concentração 10  $\text{g L}^{-1}$  alcançou ( $2 \times 10^9$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ), 20  $\text{g L}^{-1}$  ( $4 \times 10^9$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ) e 30  $\text{g L}^{-1}$  ( $2,5 \times 10^9$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ). A *Bacillus cereus* mostrou os valores máximos em torno de  $1 \times 10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ , após 96 h, independente da concentração e tipo de substrato. A *Bacillus velesensis* apresentou os maiores valores na concentração de 20  $\text{g L}^{-1}$ , no substrato alcalino ( $3,6 \times 10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ) e ácido ( $1,3 \times 10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ), nas outras concentrações os valores máximos foram em torno de  $4 \times 10^7$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ .

Na Tabela 2 estão descritos os resultados do planejamento fatorial ( $3^2 \times 2^1$ ) para as proteínas solúveis, aminoácidos e atividade proteolítica, nos respectivos tempos avaliados.

Tabela 2 Proteínas solúveis, aminoácidos ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade proteolítica ( $\text{U mL}^{-1}$ ) apresentados nos ensaios do planejamento experimental.

Exp.	Substrato	Microorganismo	Concentração Substrato	Proteínas Solúveis (24 h)	Proteínas Solúveis (48 h)	Amino-ácidos (48 h)	Atividade Proteolítica (72 h)
1	-1	-1	-1	0,293	0,695	0,046	12,883
2	-1	-1	0	0,504	1,123	0,082	6,383
3	-1	-1	+1	0,848	1,863	0,114	5,841
4	-1	0	-1	0,204	0,900	0,047	1,512
5	-1	0	0	0,874	1,378	0,092	1,991
6	-1	0	+1	1,576	1,851	0,114	2,416
7	-1	+1	-1	1,544	2,265	0,058	38,633
8	-1	+1	0	2,361	3,293	0,104	35,933
9	-1	+1	+1	3,000	3,631	0,131	27,316
10	+1	-1	-1	0,791	0,900	0,049	20,433
11	+1	-1	0	2,374	1,576	0,100	15,883
12	+1	-1	+1	1,665	2,859	0,122	18,750
13	+1	0	-1	1,334	1,270	0,045	0,695
14	+1	0	0	1,774	2,565	0,070	2,229
15	+1	0	+1	3,331	2,565	0,091	1,629
16	+1	+1	-1	1,065	0,925	0,048	1,858
17	+1	+1	0	2,406	2,208	0,081	1,441
18	+1	+1	+1	3,587	3,338	0,087	2,066

### 3.1 Proteína Solúvel

A concentração de proteína solúvel foi determinada ao longo do cultivo (Figura 1). É possível verificar que para o substrato resultante da hidrólise alcalina o máximo para a maioria das amostras ocorreu em 24 h e para o substrato resultante da hidrólise ácida os máximos ocorreram no tempo de 48 h. Isto mostrou que os microrganismos tiveram maior facilidade em solubilizar as proteínas presentes no

substrato alcalino. Após alcançar o máximo de proteína solúvel, os dois substratos apresentam uma diminuição nesta concentração, porém no substrato ácido em 96 h começou a aumentar novamente, enquanto que no substrato alcalino na maioria dos ensaios a concentração de proteína solúvel tendeu a estabilizar. Estes resultados mostraram que, provavelmente, no substrato ácido ainda tenha proteína a ser solubilizada, então a hidrólise continua, e no alcalino toda a proteína insolúvel passível de hidrólise já havia sido solubilizada. O mesmo aconteceu em estudo realizado com *B. cereus* que foi cultivado a 30°C no meio com farinha de penas a pH 7. O trabalho mostrou que a produção de proteína solúvel obteve um aumento até 48 h e depois estabilizou. A quantidade de proteína solúvel ficou em torno de 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Kim et al., 2001). Estudo realizado por Riffel et al. (2003) com a *Chryseobacterium* sp. kr6 em meio contendo penas de frango a pH 8 e 30°C, mostrou que a concentração de proteína solúvel máxima foi obtida em 48 h (2,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e depois diminuiu chegando a 1,6  $\text{mg mL}^{-1}$  em 192 h.

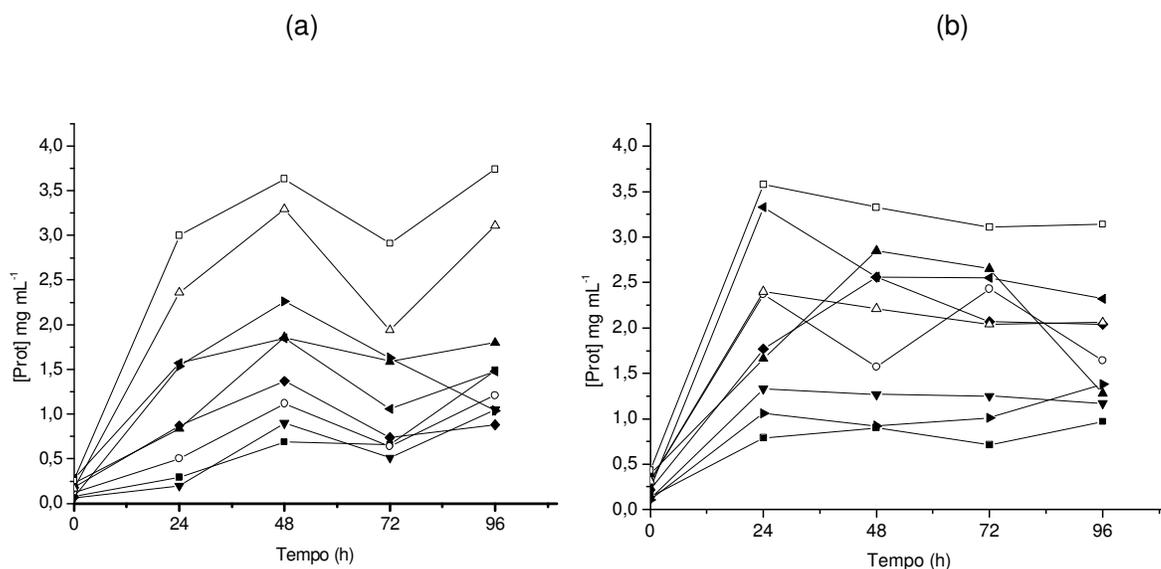


Figura 1 Solubilização da proteína durante o período de cultivo nos substratos (a) ácido e (b) alcalino. . ■ kr6 (10  $\text{g L}^{-1}$ ); ○ kr6 (20  $\text{g L}^{-1}$ ); ▲ kr6 (30  $\text{g L}^{-1}$ ); ▼ kr16 (10  $\text{g L}^{-1}$ ); ◆ kr16 (20  $\text{g L}^{-1}$ ); ◀ kr16 (30  $\text{g L}^{-1}$ ); ► P11 (10  $\text{g L}^{-1}$ ); Δ P11 (20  $\text{g L}^{-1}$ ); □ P11 (30  $\text{g L}^{-1}$ ).

A concentração de proteína solúvel é maior que a concentração de aminoácidos livres em todas as etapas do cultivo. A bactéria P11 foi o microrganismo que conseguiu a maior solubilização das proteínas comparada aos outros dois.

A análise do planejamento fatorial foi realizada em três etapas, utilizando a comparação entre duas bactérias de cada vez. Considerando que a solubilização máxima se apresentou em dois tempos distintos, a análise foi realizada para 24 e 48 h. Quando se comparou o comportamento de kr6 e a P11, as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) foram os microrganismos e a concentração de substrato utilizada, nos dois tempos avaliados, mostrando que a P11 na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  obteve os melhores resultados. Avaliando a kr6 e kr16 as variáveis que foram significativas ( $p < 0,05$ ) foram o substrato e a concentração de substrato no tempo de 48 h. Estas bactérias apresentaram valores muito próximos de proteína solubilizada. Analisando a kr16 e a P11 foi observado que para o tempo de 24 h todas as variáveis foram significativas e para o tempo de 48 h apenas o microrganismo e a concentração de substrato foram significativos. Os resultados mostraram que as variáveis mais importantes para a solubilização das proteínas foram o microrganismo utilizado e a concentração de substrato, mostrando que a P11 foi a que apresentou os melhores resultados e a concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de substrato foi a mais eficiente, por conter maior quantidade de proteínas insolúveis.

### **3.2 Aminoácidos Livres**

A Figura 2 mostra a solubilização dos aminoácidos ao longo das 96 h de cultivo para cada uma das bactérias estudadas. A concentração máxima de aminoácidos livres, obtida para as três bactérias foi na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  substrato, o que era esperado, pois esta apresenta a maior quantidade de proteína. As bactérias kr16 e a P11 obtiveram os melhores resultados no substrato ácido ( $0,1146$  e  $0,1780 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente). A kr6 alcançou  $0,1263 \text{ mg mL}^{-1}$  em substrato alcalino. Na maioria dos ensaios, foi verificado um declínio na concentração de aminoácidos após atingir o ponto máximo, provavelmente, isto ocorreu devido ao consumo como nutriente destes aminoácidos pelo próprio microrganismo. Estudo realizado por Riffel et al. (2003) com a kr6 e utilizando como substrato penas de frango, verificou que a cinética de aminoácidos livres aumentou até 48 h e depois estabilizou, ficando em torno de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . A kr6 atuando sobre as proteínas insolúveis do hidrolisado protéico de pescado estudadas no presente trabalho

apresentou comportamento muito semelhante ao reportado por Riffel et al. (2003), porém mostrou uma quantidade menor de aminoácidos livres  $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ .

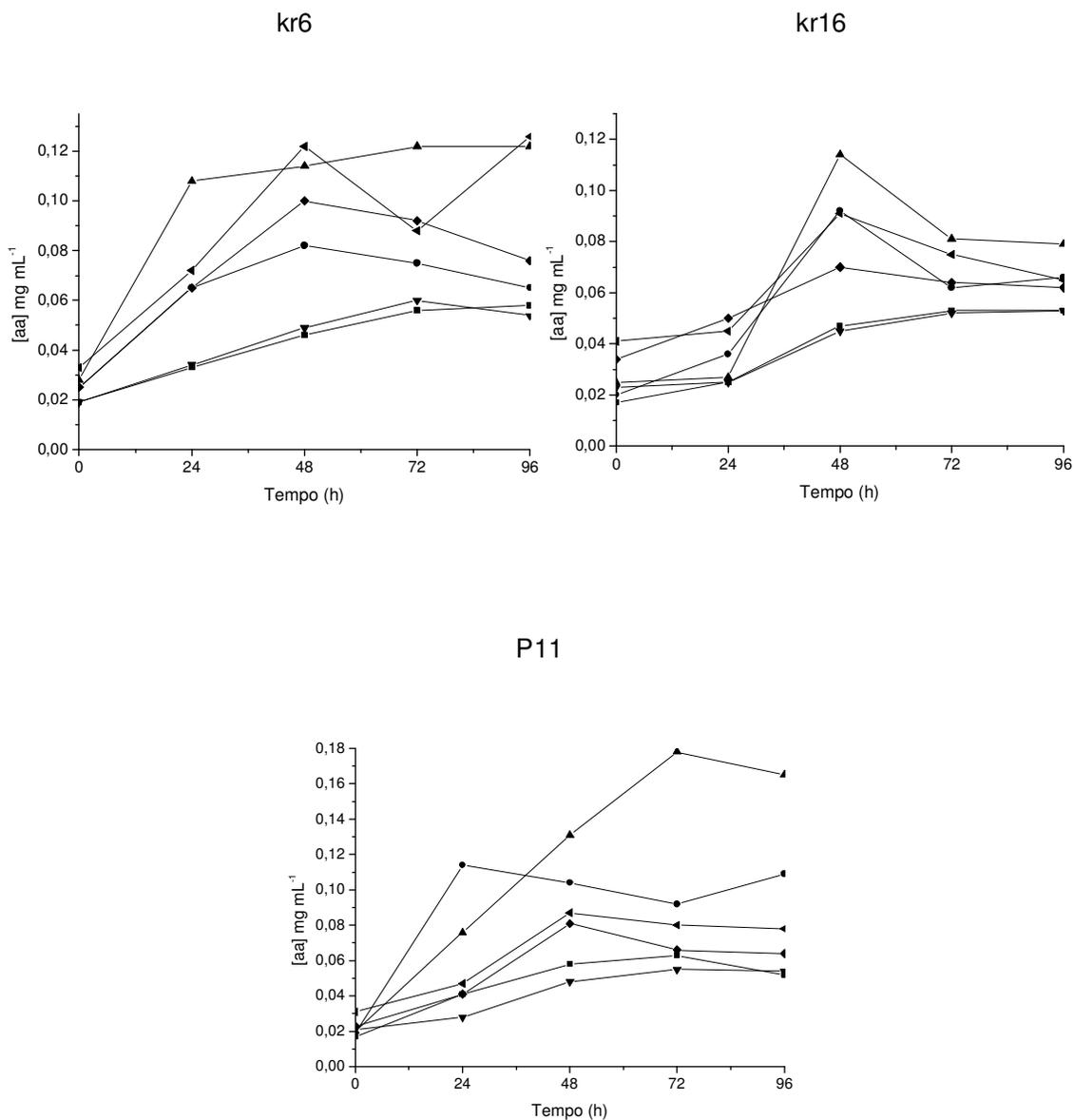


Figura 2 Concentração de aminoácidos solubilizados durante o processo fermentativo nas diferentes condições estudadas. ■ ácido ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ); ● ácido ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ); ▲ ácido ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ); ▼ Alcalino ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ); ◆ Alcalino ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ); ◀ Alcalino ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ).

Como durante o período de cultivo, o tempo de 48 h apresentou a máxima concentração de aminoácidos livres para a maioria dos experimentos, então, a análise estatística do planejamento fatorial foi realizada neste tempo.

A análise estatística foi realizada dividindo o planejamento em três partes, avaliando duas bactérias de cada vez. Todas as análises apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a variável concentração de substrato, independente do substrato e do microrganismo utilizado. O substrato também apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a kr16 e a P11, mostrando que o substrato ácido liberou uma maior concentração de aminoácidos livres.

As bactérias não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) o que era esperado, pois a partir da Figura 2 observa-se que as bactérias obtiveram valores muito próximos.

### 3.3 Atividade Proteolítica

A *Bacillus cereus* (kr16) apresentou resultados muito baixos de atividade proteolítica quando comparada com as outras duas bactérias utilizadas. A kr6 e a P11 atingiram um máximo de 23,46 e 47,56 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que kr16 obteve a atividade máxima de 3,13 U mL<sup>-1</sup>, por isso, esta não foi avaliada no planejamento fatorial junto com a kr6 e a P11. Estudo realizado por Casarin et al. (2008) utilizando um preparado de pescado e a bactéria *Chryseobacterium* sp. apresentou baixa atividade proteolítica (1 U mL<sup>-1</sup>) quando comparada com os resultados encontrados em nosso estudo com resíduos dos hidrolisados ácido e alcalino.

A Figura 3 mostra o comportamento dos microrganismos nos dois substratos avaliados. Pode-se observar que as maiores atividades proteolíticas foram alcançadas quando utilizado o substrato ácido. A maioria dos experimentos apresentou uma diminuição da atividade proteolítica em 48 h e após esse período aumentou novamente. Provavelmente o que ocorreu foi uma autólise das proteases produzidas até esse momento e após a atividade proteolítica continuou aumentando. O mesmo comportamento foi observado em estudo realizado por Riffel et al. (2003) com a bactéria *Chryseobacterium* sp. (kr6) em meio com penas de frangos a pH 8 e temperatura de 30°C, a atividade proteolítica alcançou um máximo de atividade em 48 h, coincidindo com o final da fase exponencial, então diminuiu e aumentou novamente

em 100 h. Trabalho realizado por Kim et al. (2001) com *B. cereus* em penas de frango mostrou que a produção de protease teve a mesma tendência que a produção de proteína solúvel, ou seja, ocorria um aumento até 48 h e depois estabilizou-se. O mesmo comportamento para este microrganismo foi observado em nosso trabalho. Esakkiraj et al. (2008) realizaram experimentos utilizando hidrolisados ácidos e alcalinos a partir de resíduos de atum e avaliaram a produção de proteases. Os resultados mostraram uma atividade de 60,37 e 65,96 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os máximos foram obtidos em 48 h, após esse período apresentaram um decréscimo. Estes pesquisadores obtiveram valores mais elevados, no entanto, em nosso trabalho foi utilizado somente às proteínas insolúveis resultantes dos hidrolisados ácido e alcalino, enquanto eles realizaram os experimentos com os hidrolisados protéicos brutos.

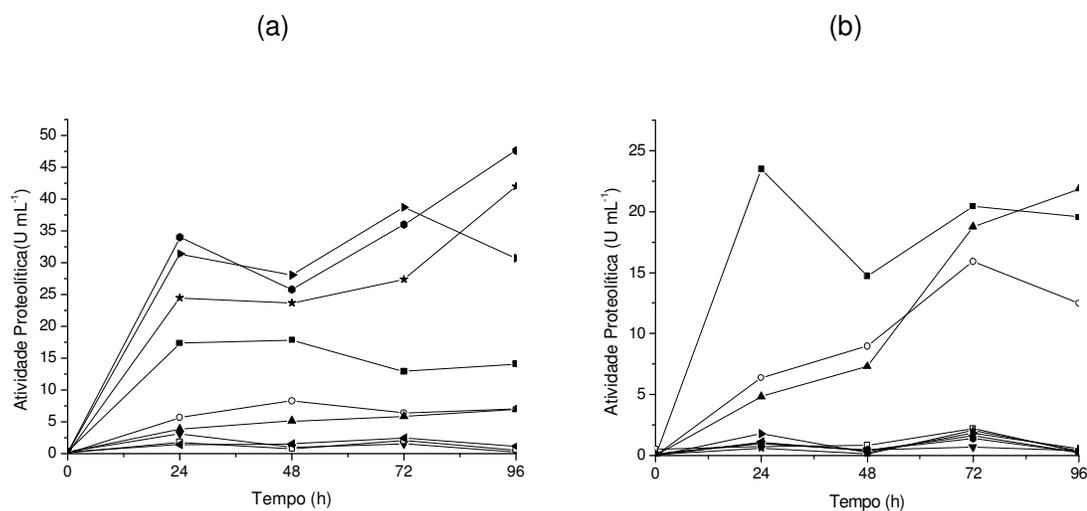


Figura 3 Atividade proteolítica nos substratos ácido (a) e alcalino (b) durante o processo fermentativo com diferentes bactérias e diferentes concentrações. ■ kr6 (10 g L<sup>-1</sup>); ○ kr6 (20 g L<sup>-1</sup>); ▲ kr6 (30 g L<sup>-1</sup>); ▼ kr16 (10 g L<sup>-1</sup>); □ kr16 (20 g L<sup>-1</sup>); ◀ kr16 (30 g L<sup>-1</sup>); ► P11 (10 g L<sup>-1</sup>); ● P11 (20 g L<sup>-1</sup>); \* P11 (30 g L<sup>-1</sup>).

Foi verificado que as maiores atividades proteolíticas para kr6 e P11 foram em 72 h, portanto, a análise do planejamento experimental fatorial misto 3<sup>2</sup> x 2<sup>1</sup> foi realizada neste tempo. As variáveis significativas foram o microrganismo ( $p = 0,045$ ), o substrato ( $p = 0,008$ ) e a interação substrato/microrganismo ( $p = 0,002$ ). A Figura 4

mostra o comportamento dos microrganismos nas diferentes concentrações de substrato e nos substratos ácido e alcalino. Os resultados mostram que nas condições estudadas, a maior atividade proteolítica a partir do substrato ácido, foi conseguida utilizando *Bacillus velesensis* (P11), na concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de substrato. Para o substrato alcalino o melhor foi utilizar a *Chryseobacterium* sp. (kr6) também na concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de substrato.

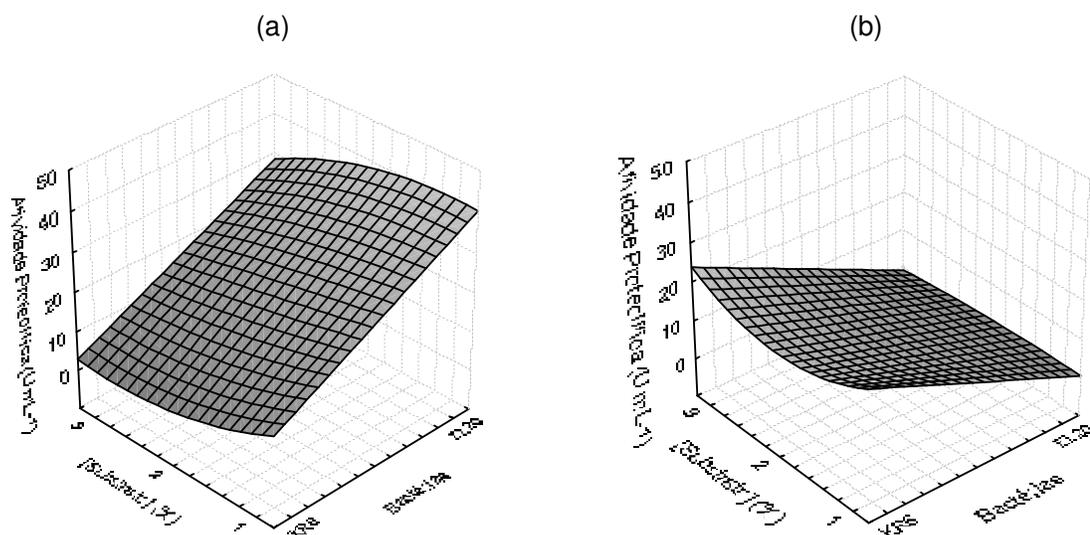


Figura 4 Superfícies de repostas apresentadas pelos substratos ácido (a) e alcalino (b) em 72 h de cultivo.

A concentração de substrato não apresentou significância estatística para a atividade proteolítica, este dado concorda com Casarin et al. (2008) que estudou diferentes concentrações de substratos, utilizando a bactéria *Chryseobacterium* sp. em diferentes meios de cultivo contendo proteínas insolúveis. A variável menos significativa no cultivo foi a concentração de substrato.

#### 4 CONCLUSÃO

As três bactérias utilizadas foram capazes de solubilizar proteínas e aminoácidos provenientes de escamas, ossos, peles, membranas celulares e cartilagens, que estão contidos nas proteínas insolúveis descartadas nos processos de solubilização ácida e alcalina, realizadas com os resíduos do processamento da corvina (*Micropogonias furnieri*). A porcentagem média de proteína solubilizada com estes tratamentos foi em torno de 50 a 60%.

A *Bacillus velesensis* (P11) foi a bactéria que apresentou melhor interação com os substratos avaliados, esta obteve as maiores atividades proteolíticas, conseqüentemente obteve maior quantidade de proteína solubilizada e de aminoácidos livres.

Na literatura não são encontrados trabalhos utilizando o resíduo da hidrólise protéica de pescado, então foram empregadas três bactérias que possuíam atividade queratinolítica conhecida para atuar sobre estas proteínas insolúveis. A partir dos resultados obtidos, podemos verificar a necessidade de desenvolver mais pesquisas utilizando estes substratos, como por exemplo, identificar o tipo de proteases que estão sendo produzidas durante o processo fermentativo, pois pelo tipo de matéria que está sendo hidrolisado, existem indícios que estejam sendo produzidas queratinases e colagenases. Também poderia ser estudado o perfil dos aminoácidos solubilizados, entre outros.

As proteínas, peptídeos e aminoácidos recuperados podem ser utilizados para aumentar o rendimento dos processos tradicionais de concentração de proteínas a base de pescado. Outros usos seriam, a recuperação das enzimas queratinolíticas produzidas a partir destas bactérias, estas poderiam ser empregadas em processos biotecnológicos envolvendo resíduos contendo queratina de sub-produtos das indústrias de pesca, frango e couro através de processos não poluentes. Queratinas insolúveis também poderiam ser convertidas após hidrólise enzimática em produtos alimentícios, fertilizantes, colas e filmes ou usados para a produção de aminoácidos

## 5 REFERÊNCIAS

Anwar, A.; Saleemuddin, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**. 64, 175-183, 1998.

Aspmo, S. I.; Horn, S. J.; Eijsink, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**. 40, 1957-1966, 2005.

Brandelli, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**. 1, 105-116, 2008.

Casarin, F.; Oliveira, F. C.; Brandelli, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**. 1, 301-305, 2008.

Costa, P. G.; Fontana, A.; Prentice, C. H. Obtención y caracterización de un aislado proteico proveniente de la matriz de exoesqueletos de camarón rosado (*Farfantepenaeus paulensis*). **Alimentaria**. 42, 82-89, 2005.

Esakkiraj, P.; Immanuel, G.; Sowmya, S. M.; Iyapparaj, P.; Palavesam, A. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. **Food Bioprocess and Technology**. DOI:10.1007/s11947-007-0046-6, in press, 2008.

Gildberg, A.; Arnesen, J. A.; Carlehög, M. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**. 38, 475-480, 2002.

Giongo, J. L.; Lucas, F. S.; Casarin, F.; Heeb, P.; Brandelli, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23, 375-382, 2007.

Gupta, R.; Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 70, 21-33, 2006.

Hulse, J. H. Biotechnologies: past history, present state and future prospect. **Trends in Food Science and Technology**. 15, 3-18, 2004.

Jooste, P. J.; Britz, T. J. The significance of Flavobacteria as proteolytic psychrotrophs in milk. **Milchwissenschaft**. 41, 618-621, 1986.

Kim, J. M.; Lim, W. J.; Suh, H. J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**. 37, 287-291, 2001.

Kristinsson, H. G.; Ingadottir, B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. **Journal of Food Science**. 71, E132-E141, 2006.

Kristinsson, H. G.; Liang, Y. Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins. **Journal of Food Science**. 71, C304-C312, 2006.

Lin, X.; Inglis, G. D.; Yanke, L. J.; Cheng, K. J. Selection and characterization of feather degrading bacteria from canola meal compost. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 23, 149-153, 1999.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193, 267-275, 1951.

Luiten, E. E. M.; Akkerman, I.; Koulman, A.; Kamermans, P.; Reith, H.; Barbosa, M. J.; Sipkema, D.; Wijffels, R. H. Realizing the promises of marine biotechnology. **Biomolecular Engineering**. 20, 429-439, 2003.

Miller, A.; Parker, S. B. Collagen: the organic matrix of bone. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 304, 455-477, 1984.

Moore, S. Amino acid analysis: aqueous DMSO as solvent for the ninhydrin reaction. **Journal of Biological Chemistry**. 243, 6281-6283, 1968.

Onifade, A. A.; Al-Sane, N. A.; Al-Musallam, A. A.; Al-Zarban, S. Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**. 66, 1-11, 1998.

Papadopoulos, M. C.; El-Boushy, A. R.; Roodbeen, A. E.; Ketelaars, E. H. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen

characteristics of feather meal. **Animal Feed Science Technology**. 14, 279-290, 1986.

Parry, D. A. D.; North, A. C. T. Hard  $\alpha$ -keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domain soft type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**. 122, 67-75, 1998.

Pérez-Mateos, M.; Amato, P. M.; Lanier, T. C. Gelling properties of Atlantic croaker surimi processed by acid or alkaline solubilization. **Journal of Food Science**. 69, FCT328-FCT333, 2004.

Riffel, A.; Lucas, F.; Heeb, P.; Brandelli, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**. 179, 258-265, 2003.

Riffel, A.; Brandelli, A.; Bellato, C. M.; Souza, G. H. M. F.; Eberlin, M. N.; Tavares, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**. 128, 693-703, 2007.

Sangali, S.; Brandelli, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 87, 17-24, 2000.

Santos, S. D. ; Martins, V. G. ; Salas-Mellado, M. ; Prentice-Hernández, C. . Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, 32, 72-77, 2009.

Shih, J. C. H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization a review. **Poultry Science**. 72, 1617-1620, 1993.

Slizyte, R.; Daukas, E.; Falch, E.; Storro, I.; Rustad, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhus*) by-products. **Process Biochemistry**. 40, 2021-2033, 2005.

Suh, H. J.; Lee, H. K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. **Journal of Protein Chemistry**. 20, 165-169, 2001.

Thys, R. C. S.; Lucas, F. S.; Riffel, A.; Heeb, P.; Brandelli, A. Characterization of a protease of a feather degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**. 39, 181-186, 2004.

Vieille, C.; Zeikus, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular and Biology Reviews**. 65, 1-43, 2001.

Watanabe, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63, 520-526, 2004.

Werlang, P. O.; Brandelli, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 120, 71-80, 2005.

Yamaguchi, S.; Yokoe, M. A. Novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. Nov. a newly isolated bacterium from soil. **Applied Environmental and Microbiology**. 66, 3337–3343, 2000.

**5.3 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS INSOLÚVEIS PROVENIENTES DA  
CORVINA (*Micropogonias furnieri*) UTILIZANDO FUNGOS**

(Artigo submetido para a revista Brazilian Journal of Microbiology em 27.10.2008)

## HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS INSOLÚVEIS PROVENIENTES DA CORVINA (*Micropogonias furnieri*) UTILIZANDO FUNGOS

### RESUMO

Uma quantidade importante de proteínas fibrosas insolúveis, em forma de penas, cabelos, unhas, chifres, escamas, peles e outras estão disponíveis como subprodutos do processamento agroindustrial. Estes resíduos são ricos em queratina e colágeno, que são de difícil degradação devido a sua estrutura molecular. A modificação da estrutura da queratina e do colágeno pode ser realizada por tratamento térmico ou por hidrólise enzimática. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de dez fungos em produzirem enzimas responsáveis pela solubilização de proteínas e aminoácidos a partir de proteínas fibrosas derivadas de processos químicos de hidrólise protéica de pescado. A hidrólise protéica foi realizada com resíduo do processamento da corvina (*Micropogonias furnieri*), através de mudança de pH, as proteínas insolúveis resultantes foram desidratadas e trituradas para serem submetidas a um cultivo por 96 h. As determinações realizadas foram: pH, concentração celular por contagem na Câmara de Neubauer, aminoácidos livres, proteínas solúveis e atividade proteolítica. Os resultados mostraram que os fungos utilizados apresentaram poder queratinolítico. Os que obtiveram a maior atividade proteolítica foram *Trichoderma* sp. (E13) em substrato alcalino (28,99 U mL<sup>-1</sup>) e *Penicillium* sp. (E20) em substrato ácido (31,20 U mL<sup>-1</sup>). O *Penicillium* sp. (E20) foi o que conseguiu a maior solubilização de aminoácidos 0,146 mg mL<sup>-1</sup> e o *Fusarium* sp. (E5), a maior solubilização de proteínas alcançando 6,17 mg mL<sup>-1</sup>. Estes aminoácidos e proteínas resultantes da hidrólise podem ser utilizados em indústria cosmética, de alimentos, entre outras, porém deve ser avaliado o potencial toxigênico apresentado pelos fungos utilizados para a solubilização destes produtos.

**Palavras-chave:** Resíduo de pescado, fungos, proteínas fibrosas

## ABSTRACT

A significant amount of insoluble fibrous protein, in form of feather, hair, nails, horns, scales, skin and others are available as co-products of agroindustrial processing. These wastes are rich in keratin and collagen, which have difficult degradation processes due their molecular structure. The keratin and collagen structure modification can be performed by thermal treatment or enzymatic hydrolysis. This paper evaluates different fungi in the hydrolysis of insoluble fish protein residues on substrate alkaline and acid through the solubilization of proteins and amino acids. The protein hydrolysis was performed with the waste of Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) processing through the pH-change processes. The proteins resulting from these processes were dried and milled to be submitted to the fermentation process by 96 h. The analyses performed were pH, cellular concentration, free amino acids, soluble proteins and proteolytic activity. The results showed that the utilized fungi were able to release keratinolytic enzymes in the medium. *Trichoderma* sp. (E13) on alkaline substrate ( $28.99 \text{ U mL}^{-1}$ ) and *Penicillium* sp. (E20) on acid substrate ( $31.20 \text{ U mL}^{-1}$ ) were the fungi that reached the highest proteolytic activities. *Penicillium* sp. (E20) was the fungi that attained the largest free amino acid solubilization  $0.146 \text{ mg mL}^{-1}$  and *Fusarium* sp. (E5), the highest protein solubilization  $6.17 \text{ mg mL}^{-1}$ . These solubilized amino acids and protein could be used in the food and cosmetic industries, among other, but it is important to evaluate the toxigenic potential of the fungi that produced these products.

**Key-words:** Fish waste; Fungi; Fibrous proteins

## 1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento dos limites dos recursos naturais e o aumento da poluição do meio ambiente têm apontado para a necessidade de uma utilização melhor e mais valorizada dos resíduos gerados por indústrias processadoras de pescado. Tradicionalmente, esse material é convertido em rações animais (Ferreira e Hultin, 1994). A hidrólise é uma alternativa que aborda a recuperação da biomassa a partir do pescado e que resulta em um produto solúvel conhecido como hidrolisado protéico de pescado (Guerard et al., 2002). Desta hidrólise, quando realizada com resíduo de pescado, resultam proteínas insolúveis, presentes nas escamas, peles e ossos, que poderiam ser convertidas em biomassa utilizável, tais como, concentrados protéicos ou aminoácidos, utilizando enzimas microbianas (Anwar e Saleemuddin, 1998).

A utilização de resíduos agroindustriais, para adicionar valor e aumentar a conservação e a reciclagem de energia consciente, tem estimulado a procura por alternativas para converter resíduos de queratina em produtos com maior valor agregado. Apesar da hidrólise de queratina por enzimas microbianas ter sido descrita desde a década de 50 (Noval e Niekerson, 1959), pesquisas sobre queratinases têm sido retomadas a partir do final do século passado, disponibilizando informações promissoras sobre hidrólise de queratina. O mecanismo de degradação da queratina por microrganismos não está completamente elucidado (Brandelli, 2008; Böckle e Müller, 1997; Kunert, 1992; Kunert e Stransky, 1988) e as pesquisas com microrganismos proteolíticos têm sido intensificadas.

O colágeno é uma proteína fibrosa insolúvel que perfaz a maior parte de ossos, peles e tecidos conectivos. Devido à estrutura espacial e a alta massa molecular, o colágeno nativo é naturalmente insolúvel em água. As queratinas são proteínas fibrosas insolúveis com ligações cruzadas e ligações dissulfídicas, as quais, juntamente com uma cadeia polipeptídica supercoloidal empacotada, resultam em alta estabilidade mecânica e resistência à hidrólise proteolítica (Jones et al., 1999).

Os fungos filamentosos sintetizam uma variedade de enzimas hidrolíticas. Estes fungos, especialmente as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, têm uma longa história de uso em indústrias de alimentos e bebidas, portanto estes fungos têm sido garantidos como seguros para a saúde (Park et al., 2008).

Muitas espécies são utilizadas para a produção industrial de várias enzimas, tais como, diferentes proteases, carboidrases e lipases. Marcondes et al. (2008) avaliaram uma variedade de fungos comuns para identificar linhagens ativas que pudessem ser utilizadas como produtoras de queratinases, dentre os gêneros dos fungos avaliados estão *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, entre outros. Farag e Hassan (2004) avaliaram a produção de queratinases por *Aspergillus oryzae* e verificaram que este foi capaz de produzir enzimas que degradaram diferentes substratos, tais como, queratina, penas de frango, colágeno, penas de pato e lã de ovelha.

As queratinases fazem parte de uma classe particular de enzimas proteolíticas que possuem capacidade de degradar substratos queratinolíticos insolúveis. A modificação da estrutura da queratina pode ser realizada por tratamento térmico ou por hidrólise enzimática, com clivagem das pontes dissulfídicas e ligações peptídicas (Kim et al., 2005; Williams et al., 1990).

As enzimas queratinolíticas são produzidas por fungos, actinomicetes e bactérias, estes têm sido frequentemente isolados a partir de solos onde materiais queratinosos são depositados (Riffel e Brandelli, 2006; Kaul e Sumbali, 1997). Foram descritas linhagens de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* produtores de queratinases (Santos et al., 1996). Porém, antes dos produtos destas hidrólises serem aplicados a alimentos é recomendável, que seja avaliado o potencial toxigênico dos fungos utilizados.

Em vista desta discussão, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade proteolítica de dez fungos de quatro gêneros diferentes sob substratos insolúveis resultantes da hidrólise ácida e alcalina realizada a partir de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima

Foi utilizada a espécie corvina (*Micropogonias furnieri*), proveniente de empresas processadoras de pescado da cidade do Rio Grande, localizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O pescado foi transportado em recipientes com gelo até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foi realizado o processamento. Assim, o pescado foi, imediatamente, lavado com água clorada 5 ppm, descabeçado, eviscerado e filetado. Os resíduos, tais como, vísceras, cabeças, peles, cartilagens e escamas, foram acondicionados em embalagens plásticas de polietileno e armazenados sob congelamento a -18°C até a utilização.

### 2.2 Microrganismos

Foram utilizados dez fungos diferentes, sendo quatro do gênero *Aspergillus* sp. (E7, E17, E19 e O5), dois de *Fusarium* sp. (E1 e E5), dois de *Penicillium* sp. (E12 e E20) e dois de *Trichoderma* sp. (E13 e E18), isolados do tratamento de efluentes de uma indústria de leite pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade de Passo Fundo, Brasil. Os microrganismos foram mantidos em meio PDA com adição de 0.5% de ágar-ágar 2% a 4°C.

### 2.3 Substratos Ácidos e Alcalinos

Foram utilizados dois tipos de substrato, sendo estes, subprodutos de um processo hidrolítico. Estes substratos são resíduos com alto índice de proteínas insolúveis que resultam do processo de hidrólise química. O processo de hidrólise foi realizado com resíduos do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*) com o objetivo de obter hidrolisados protéicos. Foram realizados dois tipos de processo de extração química para a obtenção do hidrolisado protéico, por meio de solubilização ácida e alcalina, onde a amostra foi homogeneizada com água destilada na proporção de 1:5. A hidrólise foi realizada em reator encamisado, associado a um banho termostático e acoplado a um agitador de eixo-hélice. Como agente alcalinizante foi utilizado o NaOH 1M e como agente acidificante o HCl 1N; a solubilização alcalina foi a 20°C por 20 min e pH 12 e a solubilização ácida foi a 30°C por 20 min e pH 2,5 (Martins et al., 2009a). O hidrolisado foi centrifugado a 7500 rpm por 15 min. Nesta

centrifugação, a amostra ficou separada em três fases, a fase superior (lipídios) foi descartada, a fase inferior (proteínas insolúveis) foi utilizada para o processo fermentativo e a fase intermediária (proteínas solúveis) foi submetida à precipitação com ácido ou com álcali até atingir o ponto isoelétrico das proteínas. Foi realizada nova centrifugação a 7500 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado como hidrolisado protéico foi armazenado a -18°C até ser liofilizado. As proteínas insolúveis provenientes do processo ácido e alcalino foram desidratadas em secador de bandejas por um período de 13 h a temperatura de 50°C, logo após foram trituradas em moinho de facas, para padronizar a granulometria da amostra.

## 2.4 Cultivo Microbiano

Os esporos dos fungos foram retirados dos tubos inclinados com 5 mL de Tween 80 0,2%, sendo 0,5 mL dessa suspensão transferida para frascos Roux contendo PDA. Os frascos foram incubados a 30°C por 5 dias para permitir a cobertura completa da superfície e esporulação dos fungos. Os esporos foram retirados do PDA e suspensos em Tween 80 0,2% para a enumeração, sendo esta realizada em Câmara de Neubauer (Martins et al., 2006). Durante o processo fermentativo submerso foram utilizados dez microrganismos e dois tipos de substrato (ácido e alcalino) na concentração de 2%. O volume total do meio foi de 100 mL. Além do microrganismo e do substrato, também foi adicionado um meio mineral mínimo, com a seguinte composição em (g L<sup>-1</sup>): NaCl (0,5), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,015), e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4). O pH do meio foi ajustado a 4,5 para todos os fungos, utilizando como agente acidificante HCl 1 N. A temperatura utilizada no cultivo foi de 30°C com agitação de 100 rpm. A quantidade de inóculo inicial foi de 1 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>. O cultivo teve duração de 96 h e o pH do meio foi medido a cada 24 h.

## 2.5 Concentração Celular

O controle da concentração celular foi realizado a cada 24 h pela contagem de esporos através da Câmara de Neubauer (Martins et al., 2006). O cálculo da concentração celular foi realizado segundo a Equação 1.

$$\text{Concentração Celular} = \frac{\text{média esporos} * 100\text{mm}^3 * \text{Diluição}}{0,04\text{mm}^2 * 0,1\text{mm} * 1\text{mL}} \quad (1)$$

## 2.6 Atividade de Proteases

As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min para que as partículas do meio em suspensão e os microrganismos fossem separados do sobrenadante. A análise da atividade proteolítica foi realizada em triplicata no tempo zero e a cada 24 h. O método utilizado foi de Thys et al. (2004), que consistia em retirar 120 µL do sobrenadante e adicionar 480 µL de azocaseína 1% em tampão tris HCl 25mM pH 8,0. A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C por 40 min, sendo adicionados 600 µL de TCA 10% para cessar a reação. Após resfriamento por 10 min na geladeira o material foi centrifugado a 10000 x g por 5 min. Foram retirados 800 µL do sobrenadante, adicionados 200 µL de NaOH 1,8 N, a absorbância determinada em espectrofotômetro Biospectro SP-22 a 420 nm. Também foi realizado um ensaio em branco para ser considerado nos cálculos da atividade proteolítica. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de proteína que resulta em um aumento de 0,01 na absorbância medida a 420 nm, sob as condições utilizadas nos ensaios.

## 2.7 Análise da Concentração de Aminoácidos Livres

A técnica utilizada para a determinação de aminoácidos livres foi a descrita por Moore (1968), com o emprego do reagente ninidrina. Foram adicionados 100 µL de amostra em 2 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,2; retirados 500 µL da solução de amostra e adicionados 500 µL de reagente de ninidrina 5%. A mistura foi colocada em banho-maria a 100°C por 15 min, seguido de um resfriamento em banho com gelo e adição de 5 mL de etanol 50%. As determinações de aminoácido total de cada ponto foram realizadas em triplicata e foi medida a absorbância a 560 nm em espectrofotômetro Biospectro SP-22. Paralelamente, foi preparado um ensaio em branco com 100 µL de água destilada e demais reagentes. A curva-padrão foi preparada com glicina nas concentrações entre 0 e 0,08 mg.

## 2.8 Proteína Solúvel

Foi realizada pelo método descrito por Lowry et al. (1951) com o emprego do reagente Folin Ciocalteau. Dois reagentes, o reagente combinado, preparado com 0,5 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% e 0,5 mL de solução de tartarato de Na/K 1%, até esta solução completar o volume de 50 mL com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1 N; o reagente de Folin-Ciocalteau foi diluído (1:1) com água destilada.

Para a reação foi misturado 200  $\mu\text{L}$  de amostra e 2,5 mL do reagente combinado, este foi deixado 10 min a temperatura ambiente. Então, foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin diluído e foi deixado em repouso, a temperatura ambiente, por mais 30 min.

A absorbância foi medida a 750 nm em espectrofotômetro Biospectro SP-22. Paralelamente, foi preparado um branco com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada mais reagentes. A curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina nas concentrações entre 0 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores concentrações celulares alcançadas foram com as espécies de *Fusarium* E1 e E5 em ambos os substratos, sendo que o substrato alcalino propiciou as máximas concentrações ( $1 \times 10^7$  esporos mL<sup>-1</sup>) em 96 h de cultivo. No substrato resultante da hidrólise ácida a concentração celular máxima ( $7 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>) foi em 96 h com a espécie de *Fusarium* E1.

#### 3.1 Análise do pH

O pH inicial de todos os meios de cultivo foi ajustado para 4,5. Todos os ensaios terminaram com o valor de pH entre 7 e 8. Alguns experimentos se mantiveram em torno de pH 4 durante quase todo o processo e aumentaram somente nas últimas 24 h, enquanto em outros ensaios houve um aumento gradual desde os 4,5 iniciais até a faixa de pH final entre 7 e 8. Sangali e Brandelli (2000) também observaram um aumento nos valores de pH durante a degradação de penas de frango, que reportaram como sendo uma tendência similar a outros microrganismos com maior atividade queratinolítica. Esta tendência de alcalinizar o meio resulta da produção de amônia pela deaminação dos peptídeos e aminoácidos originados a partir da degradação da queratina (Gradisar et al., 2005; Riffel et al., 2003; De Toni et al., 2002). O aumento do pH durante o cultivo é apontado como uma indicação importante do potencial queratinolítico dos microrganismos (Kim et al., 2001).

A liberação dos grupos tióis é devido à redução das ligações dissulfídicas pelos mecanismos enzimáticos, redutases dissulfídicas, e pela interconversão química, sulfito e tiosulfato (Ramnani et al., 2005; Yamamura et al., 2002).

### 3.2 Proteína Solúvel

Foi possível verificar ao longo do período de cultivo que, para o substrato resultante da hidrólise alcalina e ácida, os valores máximos de proteína solúvel ocorreram entre os tempos de 24, 48 e 72 h. Foi observada uma diminuição da produção de proteína solúvel para os dois substratos utilizados. Este comportamento, provavelmente se deve ao consumo das proteínas solubilizadas pelos próprios microrganismos e a diminuição da velocidade de proteólise por diminuição da concentração de substrato. Em alguns casos, a concentração de proteína solúvel aumentou novamente, depois da redução ocorrida.

No substrato alcalino, os microrganismos que solubilizaram a maior quantidade de proteína solúvel foram o *Fusarium* E5 (6,17 mg mL<sup>-1</sup>) em 72 h e o *Aspergillus* E7 (5,72 mg mL<sup>-1</sup>) em 96 h de cultivo. No substrato ácido o máximo alcançado foi de 0,987 mg mL<sup>-1</sup> com o fungo O5 em 96 h, sendo este o único que obteve o máximo neste tempo, todos os outros microrganismos obtiveram o máximo em tempos menores. Estudo realizado por Santos et al. (1996) com *Aspergillus fumigatus* em meio contendo 1% de penas de frango apresentaram menor quantidade de proteínas solúveis, sendo o máximo alcançado de 0,31 mg mL<sup>-1</sup> com pH 7,2.

Martins et al. (2009b) avaliaram a capacidade de bactérias com potencial queratinolítico de solubilizarem as proteínas insolúveis presentes nos resíduos das hidrólises ácidas e alcalinas de resíduos de pescado, estudadas em condições similares ao do presente estudo. Utilizando a bactéria *Bacillus velesensis*, o máximo alcançado para o substrato alcalino foi de 3,58 mg mL<sup>-1</sup> em 24 h de cultivo com concentração de substrato de 3%. Para o substrato ácido o máximo (3,29 mg mL<sup>-1</sup>) foi alcançado em 48 h também com esta bactéria e concentração de substrato de 3%. Os resultados mostram que apesar de não se conhecer o poder queratinolítico e/ou colagenolítico dos fungos avaliados, os resultados de proteína solubilizada foram melhores quando comparados à ação das bactérias sobre os mesmos substratos.

A concentração de proteína solúvel foi maior que a concentração de aminoácidos livres em todas as etapas do cultivo. O *Aspergillus* O5 foi o microrganismo que conseguiu a maior solubilização das proteínas no substrato ácido e o *Fusarium* E5 no substrato alcalino quando comparados aos demais.

### 3.3 Aminoácidos Livres

A Figura 1 mostra a solubilização dos aminoácidos ao longo das 96 h de cultivo para cada um dos fungos estudados, nos substratos, ácido e alcalino. No substrato alcalino, a liberação de aminoácidos acontece desde o tempo zero, já no substrato ácido começa a ocorrer uma liberação de aminoácidos foi mais pronunciada a partir de 24 h de cultivo.

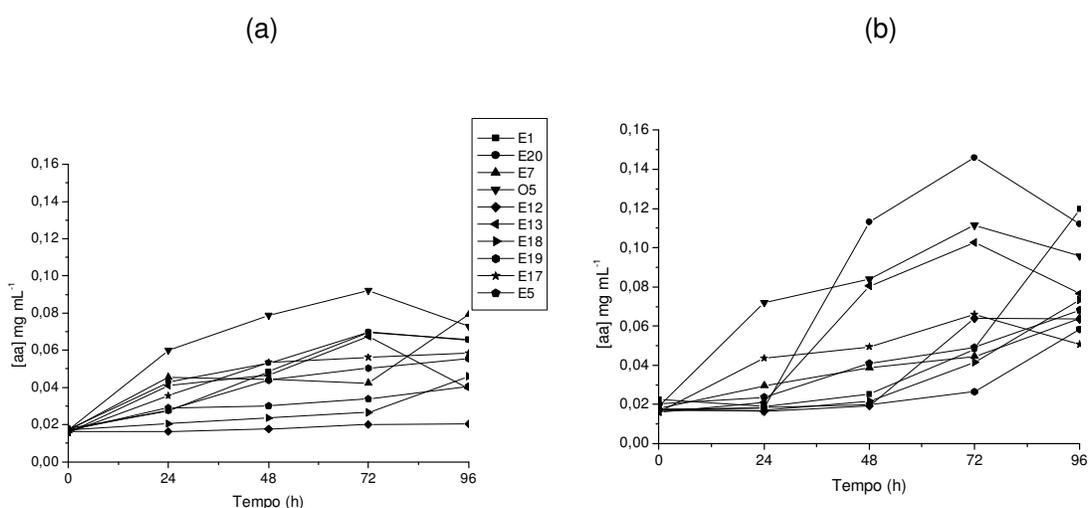


Figura 1 Concentração de aminoácidos livres ao longo do cultivo (a) Substrato Alcalino e (b) Substrato Ácido. Todos os pontos dos gráficos são valores médios de três repetições.

No substrato alcalino, o ensaio contendo o *Aspergillus* sp. (O5) apresentou a maior concentração de aminoácidos solúveis (0,092 mg mL<sup>-1</sup>) dentre os fungos analisados em 72 h de cultivo. A mínima concentração (0,018 mg mL<sup>-1</sup>) foi obtida utilizando o *Penicillium* sp. (E12) permanecendo praticamente o mesmo valor durante todo o processo. Estudo realizado por Santos et al. (1996) avaliou o fungo *Aspergillus fumigatus* em meio contendo 1% de penas de frango em diferentes valores de pH conseguindo uma concentração de aminoácidos solúveis máxima de 0,55 mg mL<sup>-1</sup>, valor esse superior ao encontrado neste estudo.

No substrato ácido foram alcançadas maiores concentrações de aminoácidos livres quando comparado com o substrato alcalino. A concentração máxima foi obtida utilizando o *Fusarium* sp. (E20) 0,146 mg mL<sup>-1</sup>, seguido do

*Aspergillus* sp. (O5) que apresentou 0,111 mg mL<sup>-1</sup> ambas obtidas no tempo de 72 h. As bactérias sobre os mesmos substratos, avaliados neste trabalho, apresentaram resultados semelhantes. A maior concentração de aminoácidos livres foi encontrada no substrato ácido com a *Bacillus velesensis* (0,178 mg mL<sup>-1</sup>), seguido da *Bacillus cereus* (0,1146 mg mL<sup>-1</sup>). No substrato alcalino o máximo foi alcançado pela *Chryseobacterium* sp. (0,1263 mg mL<sup>-1</sup>) (Martins et al., 2009b).

### 3.4 Atividade Proteolítica

A Tabela 1 mostra o comportamento dos microrganismos nos dois substratos avaliados. A maior atividade proteolítica (31,20 U mL<sup>-1</sup>) foi alcançada quando utilizado o substrato ácido, o fungo *Penicillium* sp. (E20) em 72 h de cultivo. Porém, no geral, as máximas atividades foram encontradas no substrato alcalino com os fungos *Trichoderma* sp. (E13) 28,99 U mL<sup>-1</sup>, seguido do *Aspergillus* sp. (O5) 19,30 U mL<sup>-1</sup>, *Fusarium* sp. (E1) 16,34 U mL<sup>-1</sup> e *Penicillium* sp. (E20) 14,73 U mL<sup>-1</sup>. Todos os outros apresentaram baixa atividade proteolítica. Marcondes et al. (2008) avaliou a atividade proteolítica de diversos fungos atuando em substrato composto por penas de frango e observou atividades proteolíticas de 18,4 U mL<sup>-1</sup> para o *Aspergillus terreus* e *Penicillium expansum* e 2,4 U mL<sup>-1</sup> para o *Aspergillus janus*.

No substrato ácido com exceção do E20, os outros dois fungos que alcançaram as maiores atividades foram o *Fusarium* sp. (E1) e *Aspergillus* sp. (O5), obtendo respectivamente, 5,36 e 5,90 U mL<sup>-1</sup>. Observa-se que os fungos que apresentaram as máximas atividades proteolíticas no substrato ácido também foram os que obtiveram as maiores produções no substrato alcalino.

Tabela 1 Atividade proteolítica em U mL<sup>-1</sup> ao longo do cultivo no substrato alcalino

Fungos	Substrato Alcalino				
	0	24 h	48 h	72 h	96 h
E1	1,91±0,08	2,06±0,09	6,41±0,11	7,50±0,11	16,34±0,16
E20	1,19±0,07	7,30±0,12	5,24±0,10	5,77±0,10	14,73±0,15
E7	0,90±0,05	2,34±0,09	2,43±0,08	2,03±0,08	3,17±0,11
O5	1,13±0,06	6,06±0,12	6,07±0,10	5,31±0,09	19,30±0,16
E12	0,22±0,01	0,22±0,01	1,70±0,07	2,07±0,08	2,26±0,09
E13	1,40±0,07	4,68±0,11	14,07±0,15	28,99±0,21	19,18±0,16
E18	0,27±0,01	0,97±0,04	1,67±0,07	1,28±0,06	1,68±0,08
E19	0,62±0,03	1,80±0,07	1,84±0,08	2,61±0,08	3,16±0,10

E17	0,52±0,03	1,14±0,05	1,41±0,07	2,03±0,07	2,40±0,09
E5	1,12±0,06	1,29±0,05	3,16±0,08	3,84±0,11	6,14±0,11

Tabela 2 Atividade proteolítica em U mL<sup>-1</sup> ao longo do cultivo no substrato ácido

Substrato Ácido					
Fungos	0	24 h	48 h	72 h	96 h
E1	0,80±0,04	1,45±0,07	2,40±0,09	2,83±0,10	5,64±0,09
E20	0,41±0,03	0,74±0,04	26,80±0,21	31,20±0,24	25,27±0,22
E7	0,72±0,03	0,61±0,04	0,74±0,04	0,47±0,03	1,24±0,09
O5	0,60±0,03	3,04±0,10	6,72±0,11	4,68±0,11	5,90±0,13
E12	0,51±0,04	0,31±0,02	0,41±0,03	0,51±0,03	0,55±0,06
E13	0,47±0,02	1,15±0,08	3,08±0,09	5,06±0,09	1,72±0,09
E18	0,36±0,03	0,28±0,02	0,91±0,08	2,04±0,07	3,76±0,09
E19	0,84±0,04	0,70±0,04	0,97±0,07	2,06±0,09	3,66±0,12
E17	0,74±0,04	1,08±0,08	1,72±0,11	1,83±0,10	2,05±0,08
E5	0,54±0,03	0,70±0,03	0,70±0,05	1,06±0,07	1,12±0,07

A maioria dos experimentos apresentou máxima atividade proteolítica em 96 h, isso provavelmente ocorreu devido à longa fase de adaptação dos fungos ao meio de cultivo, já que o meio de propagação não era o mesmo do meio de cultivo.

Em estudo realizado por Martins et al. (2009b) com estes substratos, porém utilizando bactérias, foi observado que o máximo de atividade proteolítica foi alcançado em 48 h, coincidindo com o final da fase exponencial, então ocorreu uma diminuição na atividade e aumentou novamente em 96 h. O mesmo resultado foi encontrado por Riffel et al. (2003) com a bactéria *Chryseobacterium* sp. (kr6) em meio com penas de frangos a pH 8 e temperatura de 30°C. Porém, nos dois casos os microrganismos cresceram em meios similares ao meio fermentativo utilizado.

Em estudo realizado por Martins et al. (2009b) utilizando os substratos ácido e alcalino, com bactérias, foi obtido como máxima atividade proteolítica para o substrato ácido na concentração de 2% com a *Bacillus velesensis* 47,56 U mL<sup>-1</sup> e para o substrato alcalino um máximo de 15,88 U mL<sup>-1</sup> com a *Chryseobacterium* sp.. A partir destes valores verificamos que os fungos avaliados apresentaram valores expressivos de atividade proteolítica, já que as bactérias testadas neste experimento possuíam potencial queratinolítico anteriormente conhecido.

Anbu et al. (2008) estudaram as queratinases produzida pelo fungo *Trichophyton* sp. e observaram que a secreção de queratinases foi melhorada quando as culturas foram suplementadas com fonte de carbono e queratina, no caso, penas de frango. Em pesquisa realizada por Sales et al. (2008) utilizando *Aspergillus carbonarius* URM 1546 no substrato de penas de frango, verificou uma atividade queratinolítica média de  $10,2 \text{ U mL}^{-1}$ , sendo esta inferior as atividades encontradas em nosso estudo.

#### 4 CONCLUSÃO

Os fungos utilizados foram capazes de solubilizar proteínas e aminoácidos, a partir de proteínas fibrosas, oriundas de escamas, ossos, peles e cartilagens, sendo estas resultantes das hidrólises ácida e alcalina, realizadas com os resíduos do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*). As proteínas, peptídeos e aminoácidos resultantes podem ser utilizados para aumentar o rendimento do processo de hidrólise, aumentando assim a quantidade de proteína recuperada. Também podem ser adicionados em outros alimentos para aumentar o teor protéico, após testes de toxicidade dos fungos.

Os fungos *Penicillium* sp. (E20), *Trichoderma* sp. (E13), *Aspergillus* sp. (O5) e o *Fusarium* sp. (E1) se mostraram os maiores produtores de enzimas, conseqüentemente foram estes que conseguiram solubilizar as maiores quantidades de proteínas e aminoácidos. Seria interessante realizar outras pesquisas envolvendo diversos substratos fibrosos e estes microrganismos, já que estes apresentaram potencial proteolítico.

#### 5 REFERÊNCIAS

Anbu, P.; Hilda, A.; Sur, H-W.; Hur, B-K.; Jayanthi, S. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 62, 287-292, 2008.

Anwar, A.; Saleemuddin, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**. 64, 175-183, 1998.

Böckle, B.; Müller, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environment Microbiology**. 63, 790-792, 1997.

Brandelli, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**. 1, 105-116, 2008.

De Toni, C. H.; Richter, M. F.; Chagas, J. R.; Henriques, J. A. P.; Termignoni, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophila* strain. **Canadian Journal of Microbiology**. 48, 342-348, 2002.

Farag, A. M.; Hassan, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**. 34, 85-93, 2004.

Ferreira, N. G.; Hultin, H. O. Liquefying cod fish frames under acidic conditions with a fungal enzyme. **Journal of Food Processing and Preservation**. 18, 87-101, 1994.

Gradisar, H.; Friedrich, J.; Krizaj, I.; Jerala, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known protease. **Applied and Environment Microbiology**. 71, 3420-3426, 2005.

Guerard, F.; Guimas, L.; Binet, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 20, 489-498, 2002.

Jones, L. N.; Simon, M.; Watts, N. R.; Booy, F. P.; Steven, A. C.; Parry, D. A. D. Intermediate filament structure: hard  $\alpha$ -keratin. *Biophysical Chemistry*. 68, 83-93, 1999.

Kaul, S.; Sumbali, G. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. **Mycopathologia**. 139, 137-140, 1997.

Kim, J. M.; Lim, W. J.; Suh, H. J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**. 37, 287-291, 2001.

Kim, J. M.; Choi, Y. M.; Suh, H. J. Preparation of feather digests as fertilizer with *B. pumilus* KHS-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 15, 472-476, 2005.

Kunert J.; Stransky, Z. Thiosulfate production from cysteine by the prokaryote *Streptomyces fradide*. **Archives of Microbiology**. 150, 600-601, 1988.

- Kunert, J. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. **Mycoses**. 35, 343-348, 1992.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193, 265-275, 1951.
- Marcondes, N. K.; Taira, C. L.; Vandresen, D. C.; Svidzinski, T. I. E.; Kadowaki, M. K.; Peralta, R. M. New feather-degrading filamentous fungi. **Microbial Ecology**. 56, 13-17, 2008.
- Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Prentice-Hernández, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**. 32, 61-66, 2009a.
- Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Silveira, S. T.; Brandelli, A.; Prentice-Hernández, C. Protein and amino acid solubilization using *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis*, and *Chryseobacterium* sp. from chemical extraction protein residue. **Food Bioprocess and Technology**. DOI 10.0007/s11947-008-0168-5, 2009b.
- Martins, V. G.; Kalil, S. J.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG**. 61 c, 721-726, 2006.
- Moore, S. Amino acid analysis: aqueous DMSO as solvent for the ninhydrin reaction. **Journal of Biological Chemistry**. 243, 6281-6283, 1968.
- Noval, J. J.; Nickerson, W. J. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. **Journal of Bacteriology**. 77, 251-263, 1959.
- Park, S-C.; Yoo, N. C.; Kim, J-Y.; Park, H. K.; Chae, B. J.; Shin, S. Y.; Cheong, H.; Park, Y.; Hahm, K-S. Isolation and characterization of an extracellular antimicrobial protein from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 9647-9652, 2008.
- Ramnani, P.; Singh, R.; Gupta, R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1 structural and biochemical mechanism of feather degradation. **Canadian Journal of Microbiology**. 51, 191-196, 2005.

Riffel, A.; Lucas, F.; Heeb, P.; Brandelli, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**. 179, 258-265, 2003.

Riffel, A.; Brandelli, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**. 37, 395-399, 2006.

Sales, M. R.; Cavalcanti, M. T. H.; Lima Filho, J. L.; Motta, C. M. S.; Porto, A. L. F. Utilização de penas de galinha para a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43, 285-288, 2008.

Sangali, S.; Brandelli, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**. 89, 735-743, 2000.

Santos, R. M. D. Firmino, A. A. P.; Sá, C. M.; Felix, C. R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**. 33, 364-370, 1996.

Thys, R. C. S.; Lucas, F. S.; Riffel, A.; Heeb, P.; Brandelli, A. Characterization of a protease of a feather degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**. 39, 181-186, 2004.

Williams, C. M.; Richter, C. S.; Mackenzie, J. M.; Shih, J. C. H. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. **Applied and Environment Microbiology**. 56, 1509-1515, 1990.

Yamamura, S.; Morita, Y.; Hasan, Q.; Yokoyama, K.; Tamiya, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 294, 1138-1143, 2002.

**5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL E CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE UM  
HIDROGEL OBTIDO A PARTIR DE ISOLADOS PROTÉICOS DE CORVINA  
(*Micropogonias furnieri*)**

**ANÁLISE ESTRUTURAL E CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE  
HIDROGEL OBTIDO A PARTIR DE ISOLADOS PROTÉICOS DE CORVINA  
(*Micropogonias furnieri*)**

**RESUMO**

A recuperação e alteração das proteínas do pescado, presentes em subprodutos e a utilização destas, é uma alternativa promissora. Para a indústria, desenvolver processos para recuperar e utilizar o resíduo do processamento do pescado se torna mais viável economicamente do que descartar os subprodutos. Do pescado inteiro, 50% ou mais é considerado resíduo após o processamento e não é utilizado para consumo direto. Aplicando tecnologia química é possível recuperar as proteínas do pescado e com isso produzir um amplo espectro de produtos. Os géis protéicos chamam a atenção, pois têm uma grande capacidade de absorção de água, porém são insolúveis na mesma, e quando a absorvem se intumescem e aumentam consideravelmente seu volume, mantém a forma e elasticidade. Este estudo teve como objetivo produzir um hidrogel, biopolímero modificado a partir de isolados protéicos provenientes de resíduos do processamento da corvina (*Micropogonias furnieri*) e avaliar a estrutura das proteínas durante o processo de produção deste biopolímero. Foram produzidos dois tipos de isolados químicos, por solubilização ácida e alcalina, que foram modificados quimicamente com dianidrido etilenodiamino tetraacético (EDTAD) em diversas concentrações. Nas proteínas modificadas foram realizadas determinações para medir a extensão da modificação dos resíduos de lisina, eletroforese e titulação eletrométrica para verificar a introdução de grupamentos carboxílicos. Para formar a rede polimérica as proteínas modificadas foram tratadas com glutaraldeído. Nos hidrogéis foram realizados ensaios de absorção de água. As proteínas modificadas com 0,5 (EDTAD/proteína, p/p) apresentaram uma modificação de 63,5 e 75,9% dos resíduos de lisina, a partir dos isolados alcalino e ácido, respectivamente. As proteínas modificadas nessa mesma proporção apresentaram 332 e 311,4 grupamentos carboxílicos, respectivamente. Os hidrogéis produzidos a partir dos isolados alcalino e ácido, apresentaram uma absorção de água máxima de 79,42 e 103,25 g <sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub> em 24 h, respectivamente. Os hidrogéis produzidos demonstraram ter elevada capacidade de absorção de água podendo ser utilizados em produtos que precisem de materiais absorventes.

Palavras-chave: Pescado, hidrogel, resíduo, biopolímero, hidrolisado protéico.

## ABSTRACT

The recovery and alteration of fish proteins from by-products and the use of these is an exciting and promising alternative. To the industry to develop processes to recover and to use the fish waste resulting of the processing is more viable economically than discard these by-products. From the whole fish, around of 50% or more is considered residue after the processing and it is not used as food. Through chemical technology is possible to recover these fish proteins and it is also possible produce a wide range of products. The polymer gels show interesting features, it has a high capacity of water uptake, however they are insoluble, when it absorbs water, swelling and increase its volume, besides it maintains the shape and also elasticity. The aim of this study is to produce a biopolymer with modified protein isolated from fish wastes of Whitecroaker (*Micropogonias furnieri*) and evaluate the protein structure during the production process of hydrogel. Were produced two kinds of chemical isolated, acid and alkaline. Then, they were modified with ethylenediaminetetraacetic dianhydride (EDTAD) in several concentrations. In the modified proteins were performed analyses of extent of modification of the lysine residues, electroforese and electrometric titration to verify the introduction of carboxyl groups. The modified proteins were treated with glutaraldehyde to form the polymer network. In the hydrogel were performed assays of swelling water. The modified proteins with 0.5 (EDTAD/protein, w/w) showed a modification of 63.5 and 75.9% of lysine residues, from alkaline and acid isolated, respectively. The modified protein in that same rate presented 332 and 311.4 carboxyl groups. The produced hydrogel from alkaline and acid isolated attained a maximum water uptake in 24 h of 79.42 and 103.25 g<sub>water</sub>/g<sub>dry gel</sub>, respectively. The produced hydrogels showed to have a high capacity of water uptake and it could be used in a wide range of absorbent materials.

Keywords: Fish, hydrogel, waste, biopolymer, protein hydrolysate

## 1 INTRODUÇÃO

O isolamento de proteína é basicamente, um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes. Os isolados protéicos podem ser obtidos de diversas matérias-primas, tais como: soja, leite, feijão, amaranto, pescado, entre outros. O preparo de isolados protéicos a partir de subprodutos da indústria processadora de pescado tem recebido mais atenção nestes últimos anos (Slizyte et al., 2005). Na intenção de valorizar os co-produtos resultantes da filetagem, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver métodos para converter estes resíduos em produtos úteis (Gebauer e Eikebrokk, 2005; Kato et al., 2004; Laufenberg et al., 2003; Guerard et al., 2002; Coello et al., 2002).

Os resíduos das indústrias de pescado são uma importante fonte de contaminação do meio ambiente. Uma redução desses resíduos é uma estratégia importante na recuperação do marketing dos co-produtos gerados pelo processamento do pescado. Os métodos mais comuns empregados para processar resíduos aquáticos estão focados na produção de óleo/alimentação animal, de silagem e de fertilizantes orgânicos. A utilização desses co-produtos é uma oportunidade importante para a indústria de tecnologias limpas, assim como pode potencializar os ganhos da empresa, diminuindo também os custos com o tratamento desse resíduo (Arvanitoyannis e Kassaveti, 2008).

Ao contrário das proteínas vegetais, tais como as de soja, as proteínas animais são ricas em lisina, um aminoácido essencial com propriedades funcionais. As proteínas de pescado tendem a ser muito grandes, com uma inerente capacidade de retenção de água. Rathna e Damodaran (2002) reportaram que, para a aplicação de hidrogéis, as propriedades físicas dos polímeros de pescado são muito superiores às das proteínas vegetais. Os grupos amino ( $-NH_2$ ) dos resíduos de lisina das proteínas podem ser modificados com grupamentos carboxílicos pela reação com dianidrido etilenodiamino tetraacético (Rathna e Damodaran, 2001).

Modificações químicas de proteínas têm sido utilizadas extensamente com os propósitos de expor grupos funcionais do interior das proteínas, determinarem grupos funcionais de enzimas e também ajudar a entender o modo de ação de drogas (Solanki et al., 2008; Kurniawan et al., 2007; Zhang e Ping, 2006; Leonard et al., 2005; Rathna e Gunasekaran, 2004).

Os polímeros sintéticos possuem propriedades estruturais e funcionais limitadas, enquanto que os polímeros naturais são únicos, possuindo várias propriedades funcionais e estruturais importantes para diferentes tipos de processos industriais (Amiya e Tanaka, 1987). As propriedades mecânicas e de intumescimento de hidrogéis elaborados a partir de polímeros naturais podem ser melhorados por modificações químicas ou físicas dos grupamentos funcionais (Rathna e Damodaran, 2002; Lu e Chen, 1999). As modificações não alteram as características de biodegradabilidade e biocompatibilidade das proteínas. Entretanto, propriedades adequadas podem ser concedidas e então, os polímeros naturais poderiam substituir alguns sintéticos potencialmente tóxicos, os quais são indesejados para muitas aplicações.

Em geral, materiais com alta capacidade de absorver água possuem um grande número de atributos que os fazem atrativos em diferentes aplicações. A propriedade básica da elevada absorção de água tem sugerido o uso de materiais absorventes em muitas outras aplicações, incluindo papel toalha, esponjas cirúrgicas, bandejas de venda de carnes por varejo, tapetes de banheiros e curativos medicinais (Hwang e Damodaran, 1996).

O hidrogel é uma classe de material leve e úmido, cujas propriedades dependem da rede polimérica construída e de seu conteúdo de água (Cheng et al., 1998). Um dos grandes desafios que confronta a ciência de materiais atualmente é o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais para reparo do organismo humano e também para combater problemas relacionados com a poluição. A permeabilidade de proteínas de diferentes pesos moleculares em um hidrogel biodegradável, um sistema-modelo para a liberação controlada de macromoléculas biologicamente ativas, tem sido largamente investigada.

A síntese de um hidrogel envolve basicamente três passos, primeiro, a dissociação e parcial desnaturação da proteína, segundo, a modificação dos resíduos de lisina com dianidrido etilenodiamino tetraacético ou outro dianidrido tetracarboxílico para proporcionar o desdobramento da proteína e realçar o caráter polianiónico da proteína, e por último, a ligação cruzada da proteína modificada com um reagente bifuncional para obter uma rede polimérica insolúvel com capacidade de absorver uma grande quantidade de água.

O presente trabalho teve como objetivo produzir um hidrogel a partir da modificação química das proteínas provenientes de subprodutos da industrialização da corvina (*Micropogonias furnieri*) e caracterizar estruturalmente as proteínas modificadas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

A matéria-prima utilizada foi o resíduo do processamento da corvina (*Micropogonias furnieri*), pescado oriundo das indústrias processadoras da cidade de Rio Grande, localizada no sul do Brasil. O pescado foi transportado em recipientes com gelo, na proporção de 1:1, para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FURG (Universidade Federal do Rio Grande), onde foi realizado processamento do isolado protéico de pescado. Primeiramente, o pescado foi filetado, após a separação do resíduo, este foi lavado com água clorada e moído em extrusor a frio, e posteriormente foi congelado em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### **2.2 Hidrolisado protéico**

Foram realizados dois tipos de processo de extração química da proteína por mudança de pH (ou *pH shifting process*) para a obtenção dos isolados protéicos, aplicando solubilização ácida e alcalina, homogeneizando a amostra com água destilada na proporção de 1:5. O processo foi realizado em um reator encamisado de vidro, associado a um banho termostatizado e acoplado a um agitador de eixo-hélice. Como agente alcalinizante foi utilizado NaOH 1M e como agente acidificante HCl 1N, o processo alcalino foi de 20 min a  $20^{\circ}\text{C}$  em pH 12 e o processo ácido foi de 20 min a  $30^{\circ}\text{C}$  em pH 2,5. Após a extração, o produto solubilizado foi centrifugado a 7500 rpm por 15 min. Nesta centrifugação a amostra ficou separada em três fases, a fase superior (lipídios neutros) e a fase inferior (proteínas insolúveis) foram descartadas, e a fase intermediária (proteínas solúveis) foi submetida à precipitação com ácido ou com álcali até atingir o ponto isoelétrico das proteínas (pH = 4,5), utilizando como agente acidificante HCl 1N e alcalinizante NaOH 1M, com um tempo de exposição de 20 min a  $30^{\circ}\text{C}$  sob agitação contínua. Após, foi realizada nova centrifugação a 7500 rpm por 15 min, descartando o sobrenadante. O precipitado obtido, denominado de isolado protéico foi armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$  até ser liofilizado (Martins et al., 2009).

### 2.3 Modificação do hidrolisado protéico

O isolado protéico de corvina foi modificado com EDTAD, segundo método descrito por Hwang e Damodaran (1997). Uma solução protéica de 1% foi ajustada para pH 12 com uma solução de NaOH 1N; aquecida a 65°C por 30 min e resfriada em banho com gelo. A proteína pré-tratada foi reagida com EDTAD sólido, nas proporções de 0,05, 0,08, 0,1, 0,2 e 0,5 para 1 g de proteína. Durante o período de reação de 2 a 3 h, a solução protéica foi homogeneizada por um agitador magnético. Quantidades incrementais de dianidrido foram adicionadas durante os primeiros 30 a 90 min, a reação foi realizada a temperatura ambiente, e o pH da solução protéica, durante a reação, foi mantido constante pela adição de NaOH 1N. A reação terminou quando o pH permaneceu constante por 30 min. O pH da solução protéica foi então ajustado para 7, e então, dialisada exaustivamente com água deionizada por 24 h a 4°C com o auxílio de membranas de peso molecular entre 6000-8000 kDa. Logo em seguida o modificado foi liofilizado em equipamento da marca Labconco, modelo 195, a uma pressão de  $121 \times 10^{-3}$  MBar e utilizando o coletor a -48°C.

### 2.4 Determinação do conteúdo protéico

A determinação de proteína dos isolados modificados foi realizada segundo o método descrito por Scopes (1974), que consistiu em medir a absorção no ultravioleta em dois comprimentos de onda (205 e 280 nm) e duas concentrações de proteínas, 5 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para leitura a 205 nm, e 50 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para leitura a 280 nm. Para isto, as amostras devem estar purificadas, geralmente dialisadas e liofilizadas. O erro deste método está estimado em menos de 2%. O conteúdo protéico foi determinado segundo a Equação 1.

$$P(\text{mg/mL}) = \frac{A_{205}}{27 + 120 \left( \frac{A_{280}}{A_{205}} \right)} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $A_{205}$  é a absorbância lida em 205 nm;  $A_{280}$  é a absorbância lida em 280 nm; 27 é o coeficiente de extinção e 120 é o resultado da média da absorbância do triptofano e tirosina (3,85) a 205 nm, multiplicado pelo coeficiente de extinção 31.

## 2.5 Extensão da modificação

Os isolados protéicos resultantes de solubilização ácida e alcalina foram modificados quimicamente pelo EDTAD nas proporções de 1 g de proteína para 0,05, 0,08, 0,1, 0,2 e 0,5 do reagente químico. Após esta etapa, os isolados modificados foram dialisados e liofilizados. A extensão da acetilação foi expressa como a porcentagem do total de lisinas residuais modificadas. O conteúdo de lisina não modificado e da proteína acetilada foi determinado pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfúrico (TNBS) como descrito por Hall et al. (1973). Para 1 mL de 4% de  $\text{NaHCO}_3$  foi adicionado 0,8 mL de uma solução contendo menos que 5 mg de proteína, seguido pela adição de 0,2 mL de uma solução de TNBS ( $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A mistura foi incubada a  $40^\circ\text{C}$  por 2 h, e foi adicionado 3,5 mL de HCl concentrado. O tubo foi tampado e mantido a  $110^\circ\text{C}$  por 3 h quando, após resfriamento, o volume foi completado até 10 mL com água deionizada. A solução foi extraída duas vezes com éter etílico. O tubo foi destampado e mantido a  $40^\circ\text{C}$  para permitir que o éter residual evaporasse. A absorvância da solução ( $\epsilon$ -TNP lisina) foi medida a 415 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. A quantidade de resíduos reativos de lisina da proteína acetilada e não acetilada foi determinada a partir de curva-padrão construída com a lisina nas concentrações de 0 a 0,3 mg.

## 2.6 Titulação eletrométrica

Todas as titulações eletrométricas foram realizadas à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) utilizando uma suspensão de 0,1% proteína em hidrocloreto de guanidina 6M como descrito por Nozaki e Tanford (1967). Os tituladores utilizados foram NaOH 0,5 N e HCl 0,5 N. Uma alíquota de 40 mL da solução protéica em hidrocloreto de guanidina 6M foi colocada em um recipiente de titulação. Esta solução foi levada até pH 2 e após conduzida até pH 9. A esta solução foi adicionada alíquotas de 0,1 mL de solução de NaOH ou HCl a cada 30 s. Após cada adição, o pH da solução protéica foi registrado utilizando um titulador (Modelo 450, Fischer Scientific Instruments) equipado com um eletrodo de pH combinado com eletrodo de referência de cloreto de prata. A curva de titulação para o hidrocloreto de guanidina (branco) também foi realizada sob condições idênticas. A curva de titulação do branco foi subtraída da curva de titulação da solução protéica para se obter apenas a curva de titulação da proteína. O número de mols de grupos carboxílicos por mol de proteína foi determinado a partir do número de mols de NaOH consumidos pelos  $10^5$  g/mol de

proteína para a titulação a partir do pH 2 até o ponto isoelétrico da proteína. O ponto isoelétrico é o pH da solução protéica após exaustiva diálise com água deionizada.

## 2.7 Eletroforese

Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacríamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) numa concentração de 12%, a determinação foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). Todas as amostras foram tratadas com 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Os géis foram passados a uma corrente de 0,02 A por 1 h e depois aumentada para 0,04 A por mais 1 h. A coloração dos géis ocorreu em uma solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 6,8% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue-R (1 mg mL<sup>-1</sup>), por aproximadamente 3 h. Os géis foram descorados em uma solução contendo ácido acético 7,5% (v/v) e metanol 5% (v/v), renovando-se a solução até a revelação nítida do gel. Os marcadores de peso molecular utilizados foram da marca Sigma.

## 2.8 Ligação Cruzada por Glutaraldeído

Uma solução de 10% do isolado de pescado modificado com EDTAD foi ajustada para pH 9 pela adição de uma solução de NaOH 1 M e homogeneizada; o volume final desta solução foi de 10 mL. Foi adicionada uma solução de glutaraldeído 25% a uma proporção de 0,02:1 (glutaraldeído/proteína, p/p). Depois da adição do agente de ligação cruzada, a solução foi homogeneizada, e deixada em repouso durante toda a noite a temperatura ambiente. A solução foi colocada em estufa a 40°C por 48 h, para a secagem e posterior trituração (Hwang e Damodaran, 1996).

## 2.9 Cinética da Absorção de Água

Uma amostra do gel de 20-30 mg foi colocada em um envelope feito a partir de nylon e um complexo de papel (Bolmet Inc.), que posteriormente foi selado a quente (40 x 60 mm). Este envelope ficou submerso em água Milli-Q por 24 h, então foi centrifugado a 214 x g por 5 min, e pesado imediatamente. Todos os estudos de absorção de água foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 2°C). A quantidade de água absorvida pelo gel foi indicada pelo peso da água absorvida dividida pelo peso do gel seco. A secagem do gel foi realizada em estufa a 105°C até peso constante (Hwang e Damodaran, 1997).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Extensão da modificação dos isolados

A concentração final de EDTAD utilizada foi definida pelo grau de modificação dos resíduos de lisina. A quantidade de proteína nos isolados modificados ficou em torno de 50-70%, não apresentando relação com a quantidade de lisina modificada.

Na Figura 1 podemos observar o grau de modificação dos resíduos de lisina, nas diferentes concentrações de EDTAD utilizadas, que mostrou crescimento linear com o aumento da concentração de EDTAD. O isolado ácido, na proporção EDTAD/g<sub>proteína</sub> (0,5) atingiu 72,4% de modificação dos resíduos de lisina, enquanto o alcalino alcançou uma modificação máxima de 63,5% na mesma condição. Em estudo similar com um isolado alcalino de filé de pescado e na mesma proporção de EDTAD/g<sub>proteína</sub> foi encontrada uma modificação de 75,9% (Hwang e Damodaran, 1997). Utilizando-se hidrolisado de proteínas de soja, foi encontrado que na proporção EDTAD/g<sub>proteína</sub> (0,5) 90% dos resíduos de lisina foram modificados, mostrando que estas proteínas são mais susceptíveis à modificação química (Hwang e Damodaran, 1996).

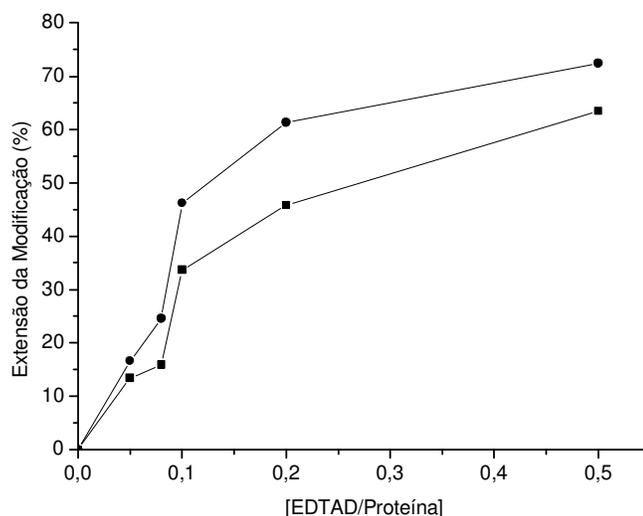


Figura 1 Extensão da modificação dos isolados protéicos (●) ácido e (■) alcalino de resíduos de corvina.

Como os resíduos de lisina são necessários para a ligação cruzada das proteínas modificadas com glutaraldeído, foram definidos como valores máximos de extensão da modificação os encontrados na concentração de 0,5 (EDTAD/proteína, p/p). Se a modificação continuasse se teria uma quantidade reduzida de lisina, portanto, sem muitos sítios para a absorção de água, o contrário também não pode acontecer, pois tendo muita lisina disponível, não existiria espaço para que a água fosse absorvida, isto fica claro quando são realizados os estudos de intumescimento.

### 3.2 Eletroforese

A Figura 2 mostra a análise de SDS-PAGE para os isolados alcalinos e ácidos não-modificados e modificados quimicamente, mostrando a polimerização ocorrida durante a modificação com o EDTAD. Um aumento na quantidade de polímeros de alto peso molecular foi indicado, pois esses polímeros não conseguiram passar pelos géis de separação. Segundo Hwang e Damodaran (1997) a polimerização deve ser primeiramente devido à formação de ligações intermoleculares realizadas pela adição do EDTAD. Também é possível a formação de outras ligações covalentes, podendo estas serem produzidas sob as condições da reação alcalina utilizada para a modificação.

Estas amostras foram tratadas com 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 10% SDS, então os polímeros de alto peso molecular apresentados na Figura 2 não podem ser resultado de ligações dissulfídicas, devem ser resultado de ligações cruzadas proporcionadas pelo agente bifuncional EDTAD. Previamente, foi demonstrado que as ligações cruzadas de proteína pelo EDTAD em baixas concentrações ocorrem somente quando as moléculas de proteínas estão em estado oligomérico ou agregado (Hwang e Damodaran, 1996). Isso nos leva a acreditar que o pH 12 e a temperatura de 65°C no pré-tratamento não são suficientemente drásticos para dissociar as proteínas miofibrilares e prevenir as ligações proteína-proteína pelo agente bifuncional EDTAD.

Foi observado que ocorre uma diminuição na intensidade das bandas das proteínas com o aumento da extensão da modificação nos SDS-PAGE (Figura 2), mas essa diminuição não é devido à perda de proteína, como resultado das hidrólises, ácida ou alcalina. Esse comportamento é atribuído a falta de capacidade que as proteínas modificadas têm de absorver a cor da solução.

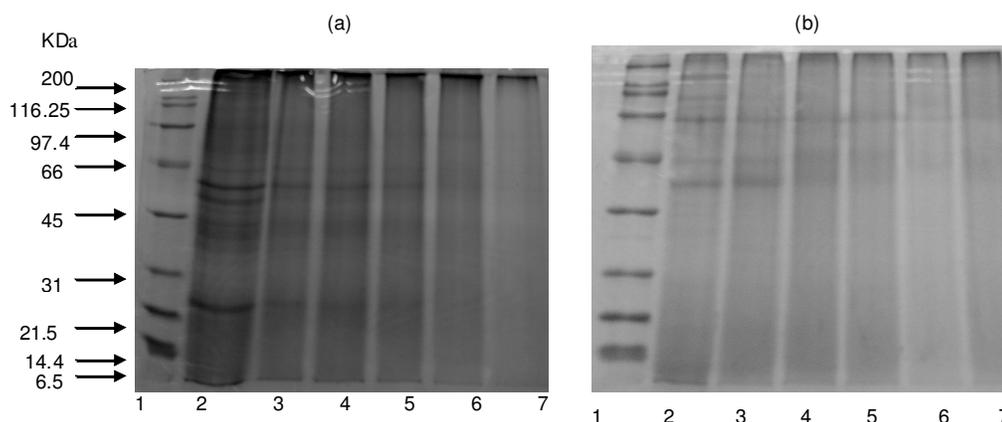


Figura 2 Eletroforese dos isolados e isolados modificados com EDTAD. Coluna 1, marcador de peso molecular; 2, hidrolisado alcalino (a) e hidrolisado ácido (b); 3, modificado 1:0,05 (proteína/EDTAD, p/p); 4, modificado 1:0,08; 5, modificado 1:0,1; 6, modificado 1:0,2; 7, modificado 1:0,5.

### 3.3 Titulação eletrométrica

Foi realizada a titulação eletrométrica para determinar se a reação do EDTAD com os isolados protéicos de pescado, sob as condições de reação utilizadas de fato modificou os resíduos de lisina e introduziu grupamentos carboxílicos. Os resultados obtidos para os isolados modificados resultantes dos processos de extração, alcalino e ácido, são apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

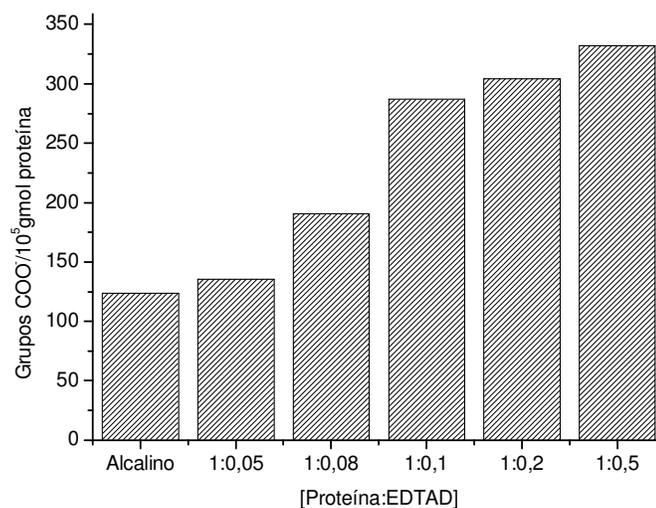


Figura 3 Grupamentos carboxílicos existentes no isolado alcalino não modificado e nos isolados modificados com EDTAD.

Foi observado na análise da extensão da modificação que quanto mais EDTAD adicionado durante o processo, maior a quantidade de resíduos de lisina modificados. Essa modificação dos resíduos de lisina tem uma ligação direta com a quantidade de grupamentos carboxílicos adicionados na molécula. Segundo Hwang e Damodaran (1996) a modificação química dos resíduos da lisina com um diantrido tetracarboxílico possibilita a introdução de um grande número de grupos carboxílicos dentro da molécula de proteína. Esta adição de grupamentos carboxílicos causa um extenso desdobramento da molécula protéica via repulsão eletrostática intramolecular, o que concede um caráter polianiónico à proteína com numerosos locais de ligação para a água.

O isolado alcalino não modificado apresentou 124 grupamentos carboxílicos e pode ser observado na Figura 3 que quanto maior o grau de modificação dos isolados, maior o número de grupamentos carboxílicos, ou seja, quanto maior a quantidade de resíduos de lisina modificados, maior o número de grupamentos carboxílicos. O isolado que obteve 63,5% da lisina modificada alcançou uma quantidade de 332 grupamentos carboxílicos.

Os isolados modificados produzidos a partir do isolado ácido (Figura 4) apresentaram quantidades de grupamentos carboxílicos menores quando comparados com os modificados a partir do isolado alcalino, sendo que o isolado modificado 1:0,5 (proteína:EDTAD, p/p) apresentou uma modificação nos resíduos de lisina (72,4%) maior que o alcalino, porém chegou a um máximo de 311,4 grupamentos carboxílicos.

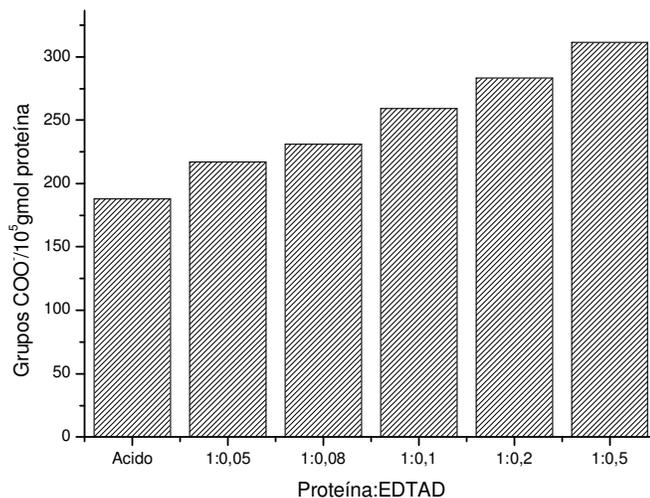


Figura 4 Grupamentos carboxílicos no isolado ácido não modificado e nos hidrolisados modificados com EDTAD, provenientes de resíduos da corvina.

A relação entre o conteúdo de resíduos de lisina e a quantidade de grupamentos carboxílicos modificados a partir do EDTAD está em função da extensão da modificação. O isolado ácido apresentou 0,494 mg de lisina e 187,98 grupamentos carboxílicos, enquanto que o isolado modificado 73,5% obteve 0,136 mg de lisina e 311,4 grupamentos carboxílicos. Assim, o isolado alcalino apresentou 0,488 mg de lisina e o modificado com 63,5% obteve 0,178 mg de lisina e 332 grupamentos carboxílicos. Hwang e Damodaran (1996) verificaram a quantidade de grupamentos carboxílicos introduzidos em isolados de soja modificados com EDTAD, foi observado que para o isolado não-modificado e EDTAD-modificado 49% e 91%, a quantidade de grupamentos carboxílicos foi de 146, 212 e 295, respectivamente.

A reação de resíduos de lisina com o EDTAD, em soluções aquosas, pode seguir duas rotas diferentes. Em uma primeira reação, uma molécula de EDTAD reage simultaneamente com dois resíduos de lisina a partir de duas moléculas de proteína ou cadeias polipeptídicas de uma proteína para formar uma ligação. Quando a reação procede segundo esta reação, o resultado é a incorporação de apenas um grupamento carboxílico por resíduo de lisina. Na segunda reação, uma molécula de EDTAD reage com um resíduo de lisina e uma molécula de água. Nesta reação três grupamentos carboxílicos por resíduo de lisina são incorporados dentro da molécula de proteína. Então, os resultados obtidos nesse trabalho, indicam que a reação

química com o EDTAD seguiu preferencialmente a segunda reação, pois foi obtido um grande aumento nos grupamentos carboxílicos enquanto a quantidade de lisina era diminuída nos isolados modificados, porém não se pode afirmar exatamente quantos grupamentos carboxílicos foram incorporados por resíduo de lisina, pois não foram identificados quantos resíduos de lisina existem em cada um dos isolados modificados.

### 3.4 Cinética de absorção de água

A capacidade de absorção de água dos biopolímeros produzidos foi avaliada através das modificações químicas dos isolados protéicos. As Figuras 5 e 6 apresentam os gráficos com o comportamento da capacidade de intumescimento dos hidrogéis com diferentes graus de modificação química ao longo de 24 h.

Quanto maior o grau de modificação química, maior a capacidade do hidrogel de absorver água. Isso ocorre porque ao aumentarmos a quantidade de EDTAD mais resíduos de lisina são modificados e, portanto, o hidrogel tem mais espaço para capturar água dentro de sua rede polimérica, pois como já foi comentado anteriormente, se a molécula possui muita lisina disponível, conseqüentemente, existem muitos locais de ligação para a água, porém não se tem muito espaço para a absorção de água dentro da estrutura polimérica formada.

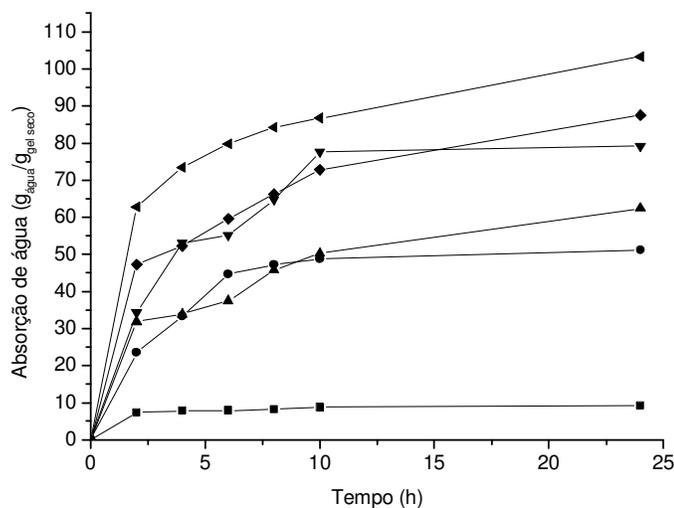


Figura 5 Cinética de absorção dos hidrogéis produzidos a partir do isolado ácido proveniente de resíduos da corvina. ■ Ácido; ● Ácido 1:0,05 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ Ácido 1:0,08; ▼ Ácido 1:0,1; ◆ Ácido 1:0,2; ◀ Ácido 1:0,5

Os hidrogéis produzidos a partir dos isolados ácido e alcalino, obtiveram uma maior absorção de água com o passar do tempo, porém, mais de 70% da capacidade de absorção de água foi demonstrada nas primeiras horas de imersão dos géis em água. A taxa de absorção de água dos hidrogéis é influenciada por diversos fatores, incluindo a troca iônica (Gehrke, 1993), a taxa de difusão de água e a proporção de relaxamento do polímero (Dave et al., 1995; Gehrke, 1993; Okuyama et al., 1993). Inicialmente, a absorção de água é governada somente pela difusão das moléculas de água dentro da matriz do gel. Observando as Figuras 5 e 6, os dados mostram que a absorção de água aumenta drasticamente nas primeiras horas. Neste estágio, as moléculas de proteína são hidratadas e interações proteína-proteína são rompidas pela absorção de água. A taxa de relaxamento do polímero durante a hidratação é geralmente mais lenta que a taxa de difusão de água dentro do gel, o processo de relaxamento do polímero geralmente é o fator limitante para a absorção de água.

Os hidrogéis formados a partir do isolado ácido apresentaram uma maior capacidade de retenção de água quando comparado com os hidrogéis produzidos a partir do isolado alcalino, isso se deve a maior extensão da modificação dos resíduos da lisina, que este apresentou.

O isolado ácido sem modificação alcançou uma absorção de água de 9,22  $\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$  em 24 h, e o isolado modificado EDTAD/ proteína (p/p) 0,05 apresentou 51,17  $\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ . Estes valores mostram que por menor que seja a modificação dos resíduos de lisina, é possível aumentar a absorção de água, nesse caso em torno de 5 vezes mais que o valor inicial. O mesmo ocorreu para os hidrogéis preparados a partir do isolado alcalino que mesmo com a menor modificação química conseguiu aumento considerável na capacidade de intumescimento dos hidrogéis. A difusão através de polímeros é principalmente influenciada por interações iônicas e a densidade da ligação cruzada durante a formação da rede polimérica. Um aumento na densidade das ligações cruzadas diminui o intumescimento e assim a difusão pelo melhoramento da estabilidade da rede (Pal et al., 2007).

O valor máximo de absorção de água para o hidrogel preparado com o isolado ácido foi de 103,25 g  $\text{água/g}_{\text{gel seco}}$  quando utilizado o isolado modificado 0,5 (EDTAD/proteína, p/p). Para o hidrogel a partir do isolado alcalino, o máximo de absorção de água foi de 79,42 g  $\text{água/g}_{\text{gel seco}}$ , nas mesmas condições.

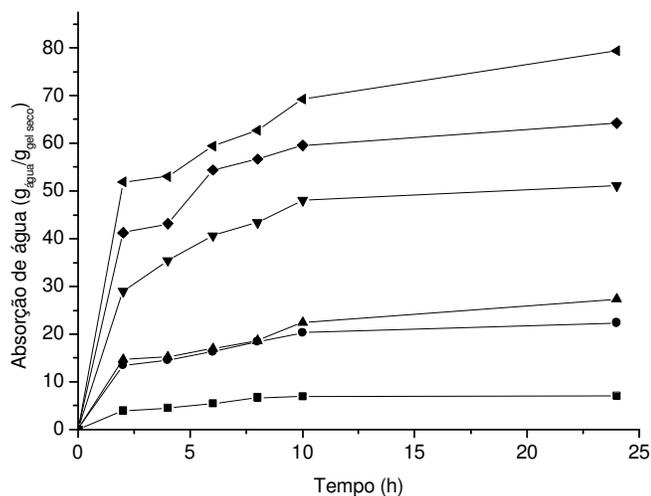


Figura 6 Cinética de absorção de água dos hidrogéis formulados a partir do isolado alcalino proveniente de resíduos da corvina. ■ Alcalino; ● Alcalino 1:0,05 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ Alcalino 1:0,08; ▼ Alcalino 1:0,1; ◆ Alcalino 1:0,2; ◄ Alcalino 1:0,5

Hwang and Damodaran (1997) produziram um hidrogel a partir de um isolado protéico obtido por solubilização alcalina de músculo de peixe e avaliaram a capacidade de absorção de água de duas maneiras. Primeiro testaram a absorção de água somente com as ligações cruzadas S-S e alcançaram um máximo de 589 g  $\text{água/g}_{\text{gel seco}}$ , depois adicionaram glutaraldeído 0,01 (glutaraldeído/proteína, p/p) a mesma proteína modificada e verificaram que a absorção de água foi muito menor em torno de 220 g  $\text{água/g}_{\text{gel seco}}$ . De qualquer maneira, o aumento nas ligações cruzadas, por causa da adição do glutaraldeído impede, parcialmente, a absorção de água dos géis. Porém, se os géis forem ser usados para absorver água sob certa pressão, a ligação cruzada com glutaraldeído é preferida em relação aos géis formados somente com ligação cruzada S-S, pois estes são bem mais frágeis.

O hidrogel produzido por Hwang e Damodaran (1997) a partir de músculo de peixe mostrou valores superiores ( $220 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ ) aos encontrados em nosso estudo ( $79,42$  e  $103,25 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ ), a partir dos isolados modificados alcalino e ácido, respectivamente. Porém deve ser ressaltado que os isolados protéicos utilizados nesse trabalho possuíam uma quantidade remanescente de gordura (7-9%) e provavelmente, por isso, não foram alcançados valores superiores de absorção de água.

#### 4 CONCLUSÃO

Foi verificada a possibilidade de formular hidrogéis, biopolímeros com grande capacidade de absorção de água a partir de isolados protéicos produzidos com resíduos de corvina. Seria uma alternativa promissora para aumentar a produtividade das indústrias de peixe, pois ao mesmo tempo em que estariam dando uma finalidade para o resíduo do processamento do peixe, estariam produzindo um novo produto.

Os hidrogéis produzidos apresentaram uma estrutura rígida, pois foram constituídos usando como agente de ligação cruzada o glutaraldeído e por isso possuem uma estrutura mais resistente a situações adversas que outros materiais semelhantes. Portanto, estes possuem um amplo espectro de aplicações em qualquer produto que precise dessas características de absorção de água.

#### 5 REFERÊNCIAS

Amiya, T.; Tanaka, T. Phase transitions in crosslinked gels of natural polymers. **Macromolecules**. 20, 1162, 1987.

Arvanitoyannis, I. S.; Kassaveti, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**. 43, 726-745, 2008.

Cheng, G. X.; Liu, J.; Zhao, R. Z.; Yao, K. D. Studies on dynamic behavior of water cross linked chitosan hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**. 67, 983-988, 1998.

Coello, N.; Montiel, E.; Concepcion, M.; Christen, P. Optimization of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**. 85, 207-211, 2002

Dave, A.; Vaishnav, U.; Desai, R.; Shah, A.; Ankleshwaria, B.; Mehta, M. On the assessment of hydrogels for fluid absorbency. **Journal of Applied Polymer Science**. 58, 853-859, 1995.

Gebauer, R.; Eikebrokk, B. Mesophilic anaerobic treatment of sludge from salmon smolt hatching. **Bioresource Technology**. 97, 2389-2401, 2005.

Gehrke, S. H. In advances in polymer science 110 – Responsive gels: volume transitions II, K. Dusek, Ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993.

Guerard, F.; Guimas, L.; Binet, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 19-20, 489-498, 2002.

Hall, R. J.; Trinder, N.; Givens, D. I. Observations on the use of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates. **Analyst**. 98, 673-686, 1973.

Hwang, D. C.; Damodaran, S. Chemical modification strategies for synthesis of protein-based hydrogel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 751-758, 1996.

Hwang, D. C.; Damodaran, S. Synthesis and properties of fish protein-based hydrogel. **Journal of the American Oil Chemical Society**. 74, 1165-1171, 1997.

Kato, S.; Kunisawa, N.; Kojima, T.; Murakami, S. Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**. 37, 863-870, 2004.

Kurniawan, L.; Qio, G. G.; Zhang, X. Q. Chemical modification of wheat protein-based natural polymers: grafting and cross-linking reactions with poly(ethylene oxide) diglycidyl ether and ethyl diamine. **Biomacromolecules**. 8, 2909-2915, 2007.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680-685, 1970.

Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M. Transformation of vegetable waste into value added products. **Bioresource Technology**. 87, 167-198, 2003.

Léonard, R.; Lhernould, S.; Carlué, M.; Fleurat, P.; Maftah, A.; Costa, G. Biochemical characterization of silene alba alpha4-fucosyltransferases and Lewis a products. **Glycoconjugate Journal**. 22, 71-78, 2005.

Lu, G. H.; Chen, T. C. Application of egg white and plasma powders as muscle food binding agents. **Journal of Food Engineering**. 42, 147-151, 1999.

Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Prentice-Hernández, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, 32, 61-66, 2009.

Nozaki, Y.; Tanford, C. Acid-base titrations in concentrated guanidine hydrochloride: dissociation constants of the guanidinium ion and of some amino acids. **Journal of the American Chemical Society**. 89, 736-749, 1967.

Okuyama, Y.; Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y. Swelling controlled zero order and sigmoidal drug release from thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-butyl methacrylate) hydrogel. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**. 4, 545-556, 1993

Pal, K.; Banthia, A. K.; Majumdar, D. K. Hydrogels for biomedical applications: a short review. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**. 2007.

Rathna, G. V. N.; Damodaran, S. Swelling behavior of protein-based superabsorbent hydrogels treated with ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**. 81, 2190-2196, 2001.

Rathna, G. V. N.; Damodaran, S. Effect of nonprotein polymers on water-uptake properties of a fish protein-based hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**. 85, 45-51, 2002.

Rathna, G. V. N.; Gunasekaran, S. Functionally-modified egg white albumen hydrogels. **Polymer International**. 53, 1994-2000, 2004.

Scopes, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**. 59, 277-282, 1974.

Slizyte, R.; Dauksas, E.; Falch, E.; Storro, I.; Rustad, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**. 40, 2021-2033, 2005.

Solanki, K.; Shah, S.; Gupta, M. N. Chemical modification of alpha-chymotrypsin for obtaining high transesterification activity in low water organic media. **Biocatalysis and Biotransformation**. 26, 258-265, 2008.

Zhang, S-P.; Ping, W. Chemical modification of enzymes – an important tool to enhance the performance of biocatalysts. **Shengwu Jiagong Guocheng**. 4, 4-8, 2006.

**5.5 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE HIDROGEL A BASE DE  
PROTEÍNAS DE PESCADO SUBMETIDO A TRATAMENTO COM ETANOL**

## CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA DE HIDROGEL A BASE DE PROTEÍNAS DE PESCADO SUBMETIDO A TRATAMENTO COM ETANOL

### RESUMO

Os polímeros hidrofílicos podem formar hidrogéis, que são capazes de absorver e reter mais de cem vezes o seu peso em água e são conhecidos como materiais superabsorventes. As propriedades destes hidrogéis têm atraído a atenção de muitos pesquisadores e têm encontrado uma ampla faixa de aplicações em diversos campos da ciência, tais como, medicina, agricultura, processos de separação, produtos de consumo e indústria de alimentos. Polímeros superabsorventes baseados em produtos naturais têm atraído a atenção por serem biocompatíveis, biodegradáveis e não serem tóxicos. O uso de fontes renováveis para a produção de materiais poliméricos está possibilitando a indústria ser menos dependente de fontes fósseis, o que tem focado a atenção para o emprego de polímeros naturais, tais como, celulose, amido, gelatina, quitosana, carragena e proteína. O objetivo deste estudo foi produzir um hidrogel superabsorvente a partir das proteínas de pescado, e verificar sua capacidade de absorção de água quando submetido a tratamento com etanol. Os hidrogéis foram produzidos a partir de isolados protéicos de resíduos da corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes de solubilização alcalina ou ácida (pH *shifting process*). Estes isolados foram modificados quimicamente com dianidrido etilenodiamino tetraacético e adicionados do agente de ligação cruzada (glutaraldeído). Para avaliar as propriedades dos biopolímeros produzidos, foi verificada a extensão da modificação dos resíduos de lisina, cinética da capacidade de retenção de água, efeito do pH e força iônica sobre a absorção de água dos hidrogéis e comportamento do biopolímero quando aplicadas sucessivas hidratações e desidratações. Os resultados mostraram que foi possível produzir hidrogéis a partir de todos os isolados protéicos avaliados. Os biopolímeros quando tratados com etanol apresentaram uma capacidade de intumescimento muito superior aos hidrogéis sem a aplicação do etanol. O modificado protéico proveniente de solubilização ácida sem o tratamento com etanol atingiu a máxima absorção de água de  $103,25 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ , enquanto que a mesma amostra tratada com etanol alcançou  $216,05 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ .

Palavras-chave: Pescado, hidrogel, isolado protéico, biopolímero, etanol, superabsorvente.

## ABSTRACT

Crosslinked hydrophilic polymers can form hydrogels that are able to absorb and retain hundreds of times their weight of water and are known as superabsorbents. The properties of these hydrogels have attracted the attention of many researchers and technologists and have found wide-spread applications in many fields, such as drug delivery systems, agriculture, separation processes, consumer products and food industries. The use of renewable resources in polymeric materials production is paving the way for a future industry less dependent on fossil resources for raw material. Natural-based superabsorbent polymers have attracted much attention because of their non-toxicity, biocompatibility and biodegradability. Recently, attention has been focused on employing natural polymers such as cellulose, starch, gelatin, chitosan, carrageenan and protein to produce hydrogels. The aim of this study was to produce a biopolymer, with superabsorbent properties, from fish proteins and verify the swelling behavior of protein-based hydrogel when treated with ethanol. The hydrogels were prepared from protein isolated, acid and alkaline, from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) wastes. These isolated were modified with ethylenediaminetetraacetic dianhydride and added of a crosslink agent (glutaraldehyde). To evaluate the biopolymers produced properties, was verified the extent of modification from lysine residues, swelling kinetics, effect of pH and ionic strength on water uptake and reversible swelling-deswelling. The results showed that it was possible the production of hydrogels from all protein isolated used. The biopolymers when treated with ethanol showed a higher capacity of swelling than without application of ethanol. The protein-modified acid without treatment with ethanol reached a maximum of 103,25  $\text{g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry gel}}$ , while the same sample with ethanol attained 216,05  $\text{g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry gel}}$ .

Keywords: Fish, protein isolate, hydrogel, biopolymer, ethanol, superabsorbent.

## 1 INTRODUÇÃO

A recuperação e alteração das proteínas do pescado presentes em subprodutos e a utilização destas, como produtos industriais é uma alternativa promissora. De qualquer forma, para a indústria desenvolver processos para recuperar e utilizar o resíduo do processamento do pescado se torna mais viável economicamente do que descartar os mesmos (Kristinsson e Rasco, 2000).

Do pescado inteiro, cerca de 50% é considerado resíduo após o processamento e não é utilizado como alimento (Mackie, 1982). Com o crescimento da população mundial e o aumento na captura de pescado atualmente, está-se a margem de exceder a estimativa do limite da sustentabilidade que sugere um valor em torno de 100 milhões ton/ano, e obviamente este aumento indica que é necessário utilizar os recursos marítimos com mais inteligência e precaução.

A hidrólise química é uma alternativa que aborda a recuperação da biomassa a partir do pescado e que resulta em um produto solúvel conhecido como isolado protéico de pescado. Esse hidrolisado solúvel é submetido à desidratação, resultando em maior estabilidade e alto conteúdo de proteína (Guerard et al., 2002).

Para a aplicação de hidrogéis, as propriedades físicas dos polímeros de pescado são muito superiores às das proteínas vegetais, pois as proteínas animais são ricas em lisina (Rathna e Damodaran, 2002). As proteínas de pescado tendem a ser muito grandes, com uma inerente capacidade de retenção de água. Os resíduos de lisina (-NH<sub>2</sub>) das proteínas podem ser modificados com grupamentos carboxílicos pela reação com dianidrido etilenodiamino tetraacético (Rathna e Damodaran, 2001). Tais modificações nos resíduos de lisina das proteínas podem conduzir a hidrogéis com alta capacidade de retenção de água e transparência.

As modificações químicas das proteínas ficaram comuns nos anos 50, as técnicas foram originalmente desenvolvidas para ajudar nas análises estruturais de moléculas de proteínas, para investigar o estado físico-químico de vários resíduos de aminoácidos em uma molécula de proteína e para identificar os resíduos de aminoácidos participantes em uma função particular da proteína. (Matsushima et al., 1996).

As modificações químicas das proteínas permitem a introdução e exposição de grupos funcionais, os quais são inacessíveis pelas técnicas convencionais de mutagenicidade (Desantis e Jones, 1999). Esta técnica também é utilizada para modificar a especificidade de enzimas, e dentro da indústria farmacêutica, ajudam a entender o modo de ação de medicamentos (Solanki et al., 2008; Kurniawan et al., 2007; Zhang et al., 2006).

As modificações não alteram as características de biodegradabilidade e biocompatibilidade das proteínas. Entretanto, podem ser geradas propriedades adequadas aos polímeros naturais que poderiam substituir alguns polímeros sintéticos potencialmente tóxicos, os quais são indesejados para muitas aplicações.

Nos últimos anos vêm crescendo o interesse na produção de polímeros biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis. Quando são desejados materiais absorventes as características mais requisitadas são hidrofiliidade e absorção de água. Além disso, polímeros elaborados a partir de produtos naturais, tais como, polissacarídeos e proteínas, representam materiais de interesse que estão disponíveis a um baixo custo (Iannace e Nicolais, 1997).

Os hidrogéis são estruturas poliméricas sólidas, as quais contêm uma fração significativa de água, regularmente acima de 90%. A estrutura polimérica tridimensional no hidrogel é usualmente feita por ligação cruzada, não somente por interações físicas, tais como, Van der Waals ou ligações de hidrogênio, mas também por ligações covalentes formadas por reagentes de ligação cruzada ou  $\gamma$ -irradiação (Kunioka e Choi, 1998).

Os hidrogéis à base de proteínas são capazes de absorver entre 80 e 300 g de água por grama de gel seco, dependendo da extensão da modificação, densidade da ligação cruzada e concentração de proteína, utilizados durante o processo. Após a etapa de adição do agente de ligação cruzada permanece uma quantidade significativa de estruturas dobradas, tais como,  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -sheet, nos polímeros protéicos, e estas estruturas podem fazer com que o hidrogel absorva uma quantidade menor de líquido, pois estas estruturas podem se opor ao relaxamento da cadeia protéica dificultando a difusão de água dentro da rede tridimensional (Hwang e Damodaran, 1996).

O desenvolvimento de novos hidrogéis com alta capacidade de absorção de água a partir de polímeros naturais tem sido de interesse nestes últimos anos devido ao amplo potencial de aplicação como material para imobilização de enzimas e grande capacidade de retenção água (Park e Hoffman, 1992; Dubrovskii et al., 1990). Esses polímeros biodegradáveis podem ser consumidos por microrganismos e são reduzidos a compostos simples, tais como, dióxido de carbono, água e amônia (Hideki, 1992).

Convertendo estas estruturas protéicas enroladas em uma cadeia mais linear é possível aumentar a capacidade de retenção de água, mas para tal é necessário desnaturar a estrutura  $\beta$  do tipo pregueada e isto pode ser realizado através da adição de solventes orgânicos (Rathna e Damodaran, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo produzir um hidrogel através da modificação química de isolados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) modificados quimicamente com solventes orgânicos, e verificar sua capacidade de absorção de água quando submetido a tratamento com etanol.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

A matéria-prima utilizada foi o resíduo do processamento da corvina (*Micropogonias furnieri*), proveniente das indústrias processadoras de pescado da cidade de Rio Grande, localizada no sul do Brasil. O pescado foi transportado em recipientes com gelo, na proporção de 1:1, para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FURG (Universidade Federal do Rio Grande), onde foi realizado o processamento do isolado protéico. Após a separação do resíduo do pescado, este foi lavado com água clorada e triturado, em seguida foi congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### **2.2 Processamento dos isolados protéicos**

Foram realizados dois tipos de processos de extração química por mudança de pH (ou *pH shifting process*) para a obtenção do isolado protéico, sendo a proteína solubilizada por meio ácido e alcalino, onde a amostra foi homogeneizada com água destilada na proporção de 1:5. O processo de hidrólise foi realizado em um reator encamisado de vidro, associado a um banho termostatizado e acoplado a um

agitador de eixo-hélice. Como agente alcalinizante foi utilizado o NaOH 1M e como agente acidificante o HCl 1N, o processo de solubilização alcalina foi de 20 min a 20°C em pH 12 e o processo de solubilização ácida foi de 20 min a 30°C em pH 2,5. Após isto, o hidrolisado foi centrifugado a 7500 rpm por 15 min. Nesta centrifugação a amostra ficou separada em três fases: a fase superior (lipídios neutros) e a fase inferior (proteínas insolúveis) foram descartadas, e a fase intermediária (proteínas solúveis) foi submetida à precipitação ácida ou alcalina até atingir o ponto isoelétrico das proteínas (pH = 4,5), onde foi utilizado como agente acidificante o HCl 1N e alcalinizante o NaOH 1M, com um tempo de exposição de 20 min a 30°C sob agitação. Após, foi realizada nova centrifugação a 7500 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e reservado o precipitado, denominado de isolado protéico, logo foi armazenado a -18°C até ser liofilizado em equipamento da marca Labconco, modelo 195 (Martins et al., 2009).

### **2.3 Modificação dos isolados protéicos**

Os isolados protéicos foram modificados com dianidrido etilenodiamino tetraacético (EDTAD), segundo método descrito por Hwang e Damodaran (1997). Uma solução protéica de 1% foi ajustada para pH 12 com uma solução de NaOH 1M, então, foi aquecida a 65°C por 30 min e resfriada rapidamente em banho com gelo para voltar a temperatura ambiente. A proteína pré-tratada foi reagida com EDTAD sólido. Durante o período de reação de 2-3 h, a solução protéica foi misturada constantemente, quantidades incrementais de anidrido foram adicionadas durante os primeiros 30-90 min, a reação foi realizada a temperatura ambiente e o pH da solução protéica, durante a reação, foi mantido constante pela adição de NaOH 1M. A reação foi terminada quando o pH permaneceu constante por 30 min. O pH da solução protéica foi então ajustado para 7, e esta foi dialisada exaustivamente com água deionizada por 24 h a 4°C em membranas de peso molecular entre 6000 e 8000 kDa. Em seguida, o modificado foi liofilizado a uma pressão de  $121 \times 10^{-3}$  MBar e utilizando o coletor a -48°C em liofilizador da marca Labconco, modelo 195.

### **2.4 Determinação do conteúdo protéico**

A determinação do conteúdo de proteína presente nos isolados modificados foi realizada segundo o método descrito por Scopes (1974), que utiliza absorção ultravioleta em dois comprimentos de onda (205 e 280 nm) e duas concentrações de proteínas (de 5 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para leitura a 205 nm, e de 50 a 1000

$\mu\text{g mL}^{-1}$  para leitura a 280 nm). Para tal as amostras devem estar purificadas, geralmente dialisadas e liofilizadas. O erro deste método está estimado em menos de 2%. O conteúdo protéico foi determinado segundo a Equação 1.

$$P(\text{mg/mL}) = \frac{A_{205}}{27 + 120 \left( \frac{A_{280}}{A_{205}} \right)} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $A_{205}$  é a absorvância lida em 205 nm;  $A_{280}$  é a absorvância lida em 280 nm; 27 é o coeficiente de extinção e 120 é o resultado da média da absorvância do triptofano e tirosina (3,85) a 205 nm, multiplicado pelo coeficiente de extinção 31.

## 2.5 Extensão da modificação

A extensão da acetilação foi expressa como a percentagem do total de lisina residual modificada. O conteúdo de lisina não modificada e de proteínas acetiladas foi determinado pelo método ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfúrico (TNBS) como descrito por Hall et al. (1973). Para 1 mL de 4% de  $\text{NaHCO}_3$  foi adicionado 0,8 mL de uma solução contendo menos que 5 mg de proteína, seguido pela adição de 0,2 mL de uma solução de TNBS ( $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A mistura foi incubada a  $40^\circ\text{C}$  por 2 h, e 3,5 mL de HCl concentrado foi adicionado. O tubo foi tampado e mantido a  $110^\circ\text{C}$  por 3 h e então, após resfriar, o volume foi completado até 10 mL com água deionizada. A solução foi extraída duas vezes com éter etílico. O tubo foi destampado e mantido a  $40^\circ\text{C}$  para permitir que o residual de éter evaporasse. A absorvância da solução de cor amarela ( $\epsilon$ -TNP lisina) foi medida a 415 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. A quantidade de resíduos reativos de lisina das proteínas acetiladas e não acetiladas foi determinada a partir da curva padrão construída utilizando a lisina nas concentrações de 0 a 0,3 mg.

## 2.6 Ligação Cruzada por Glutaraldeído

Uma solução de 10% do hidrolisado de pescado modificado com EDTAD foi ajustada para pH 9 e homogeneizada pela adição de uma solução de NaOH 1 M, o volume final desta solução foi de 10 mL. Então, foi adicionada a solução de glutaraldeído 25% a uma proporção de 0,02:1 (glutaraldeído/proteína, p/p). Depois da adição do agente de ligação cruzada, a solução foi homogeneizada, e deixada em repouso durante toda a noite a temperatura ambiente.

## **2.7 Tratamento com etanol**

Após a etapa de adição do agente de ligação, a amostra foi dividida em duas partes, uma parte foi colocada em estufa a 40°C por 48 h, para a secagem e trituração a outra parte foi suspensa em etanol por 3 h, durante este período o etanol foi trocado no mínimo duas vezes. O tratamento com etanol causa desnaturação da proteína e desidratação do gel. No final do tratamento com etanol o gel se apresentou em forma de partículas secas, porém o gel foi colocado em estufa a 40°C por 2 h para remover o residual de etanol e de umidade.

## **2.8 Cinética da absorção de água do gel**

Uma amostra do gel de 20-30 mg foi colocada em envelope feito a partir de nylon e complexo de papel (Bolmet Inc.), que posteriormente foi selado a quente (4 x 6 cm). Este envelope ficou submerso em água Milli-Q por 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h, então foi centrifugado a 214 x g por 5 min, e pesado imediatamente. Todos os estudos de absorção de água foram realizados a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A quantidade de água absorvida pelo gel foi definida como o peso da água absorvida dividida pelo peso do gel seco. A secagem do gel foi realizada em estufa a 105°C até peso constante (Hwang e Damodaran, 1997).

## **2.9 Efeito da força iônica sobre a capacidade de absorção de água do gel**

A influência da força iônica sobre a propriedade de absorção de água dos géis foi testada pela imersão das amostras em várias concentrações de NaCl, a partir de 0,01 até 0,15 M por um período de 24 h a temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Então as amostras foram centrifugadas a 214 x g por 5 min e pesadas imediatamente. A quantidade de água absorvida foi calculada pelo peso de água adquirido dividido pelo peso do gel seco. O gel foi seco em estufa a 105°C até peso constante. Também foi realizada uma amostra controle, sem adição de sal.

## **2.10 Efeito do pH sobre a capacidade de absorção de água**

A influência do pH sobre o comportamento da absorção de água do hidrogel foi determinada pela colocação de amostras de gel seco em tampões de diferentes pHs, alcançando uma faixa de 3,0 até 10,0 à temperatura ambiente por um período de 24 h. Os tampões utilizados para esses estudos foram: pH 3,0 (ácido fórmico); pH 4,0 (ácido benzóico); pH 5,0 (ácido acético); pH 6,0 (MES); pH 7,0

(tampão fosfato); pH 8,0 (tris base); pH 9,0 (tris base) e pH 10,0 (CAPS). Todos os tampões foram preparados com a mesma força iônica de 0,01 M.

### 2.11 Absorção e Reversibilidade do Gel

Para o estudo da cinética da absorção, as amostras dos géis foram imersas em água deionizada. Em intervalos de tempos regulares, as amostras foram retiradas e centrifugadas a 214 x g por 5 min e pesadas. A reversibilidade da absorção e dissolução do gel foi determinada pelo uso das mesmas amostras para sequencial absorção em água deionizada e dissolução em solução de NaCl 0,15 M (Hwang e Damodaran, 1997).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de produção dos hidrogéis vários autores (Tsai e Wang 2008; George e Abraham, 2007; Hwang e Damodaran, 1997) relataram que o aumento na quantidade de glutaraldeído interfere na absorção de água, pois os agentes de ligação cruzada ocupam os sítios de interação com a água dentro da rede tridimensional, diminuindo a capacidade de retenção de água do gel.

### 3.1 Extensão da modificação química

A modificação química dos isolados protéicos de pescado com o dianidrido etilenodiamino tetraacético (EDTAD) apresentou os melhores resultados quando foi empregado 0,2 e 0,5:1 relação EDTAD:proteína (p/p), que foram as concentrações utilizadas no restante do estudo. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para cada um dos isolados tratados com diferentes concentrações de EDTAD.

Tabela 1 Extensão da modificação nos isolados protéicos de pescado nas diversas proporções de EDTAD:proteína (p/p)

	0,05:1	0,08:1	0,1:1	0,2:1	0,5:1
Ácido (%)	16,6	24,6	46,2	61,3	72,4
Alcalino (%)	13,4	15,9	33,7	45,8	63,5

A extensão da modificação está relacionada com a quantidade de resíduos de lisina presente nos hidrolisados e a quantidade de reagente químico adicionado durante o processo de produção do hidrogel. No isolado produzido por solubilização alcalina a quantidade inicial de lisina encontrada foi de 11,7% e no isolado produzido por solubilização ácida 11,9%, o que está de acordo com a literatura, pois a proteína

de pescado apresenta entre 10 e 12% de lisina (Thiansilakul et al., 2007; Neves et al., 2004).

Durante a modificação química da proteína o ideal é parar o processo quando se atinge uma modificação entre 50 e 80%, dos resíduos de lisina, pois uma continuação no processo de modificação destes resíduos levaria a produção de um hidrogel com reduzida capacidade de retenção de água, porque uma proteína extensamente modificada apresentaria muitos sítios de ligação para água, porém teria espaço reduzido para a absorção da mesma, o oposto também não é desejado, pois se obtemos uma proteína levemente modificada teremos poucos sítios de ligação para água e conseqüentemente um hidrogel com baixa capacidade de absorção de água.

Rathna e Gunasekaran (2004) utilizaram albumina modificada com EDTAD para elaborarem um hidrogel, utilizando aquecimento para a formação dos géis. Os pesquisadores verificaram que quanto maior a extensão da modificação, maior seria a capacidade de absorção de água, porém proteínas com alto grau de modificação possuem menor densidade de ligações cruzadas e estas acabaram por se desintegrar, por exemplo, o hidrogel modificado 100% se desintegrou após 3 h, enquanto o preparado com 83% de modificação dos resíduos de lisina demorou 5 h para se desintegrar.

Segundo Hwang e Damodaran (1996) através da modificação química dos resíduos da lisina com um dianidrido tetra carboxílico é possível introduzir uma grande quantidade de grupos carboxílicos dentro da molécula protéica. Para cada resíduo da lisina modificado podem ser introduzidos até três grupamentos carboxílicos na proteína. As proteínas modificadas com EDTAD não são tóxicas, pois não existem grupos reativos, além dos grupamentos carboxílicos que são introduzidos na molécula de proteína. Durante a reação, o EDTAD reage com água e é convertido no sal de sódio EDTA, o NaEDTA é considerado um aditivo alimentar seguro, portanto não apresenta riscos à saúde humana.

### **3.2 Cinética de absorção de água**

A Figura 1 apresenta a cinética de absorção de água dos isolados protéicos de pescado modificados durante um período de 24 h.

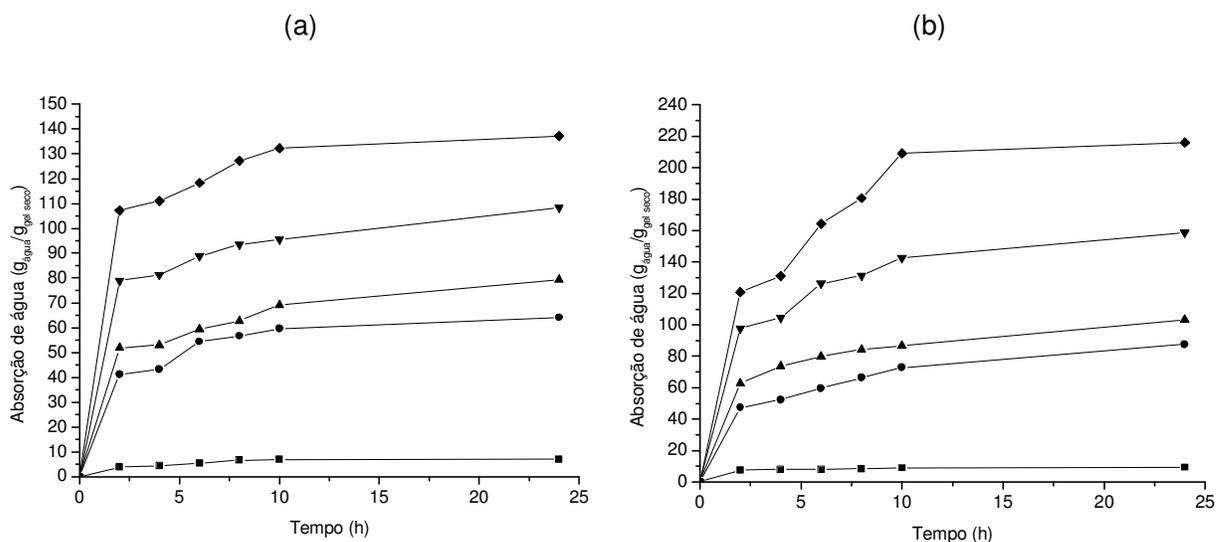


Figura 1 Cinética de absorção de água dos hidrogéis. (a) isolado protéico alcalino modificado (b) isolado protéico ácido modificado. ■ isolados protéicos alcalino e ácido sem modificação química; ● modificado 1:0,2 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ modificado 1:0,5; ▼ modificado 1:0,2 tratado com etanol; ◆ modificado 1:0,5 tratado com etanol.

Analisando a Figura 1 é possível verificar que as amostras tratadas com etanol apresentaram uma absorção de água muito maior quando comparadas às amostras tratadas somente com o glutaraldeído. As amostras controle obtiveram uma máxima absorção de água em 24 h de 7,03  $\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$  e 9,22  $\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ , para os isolados protéicos, alcalino e ácido, respectivamente. Enquanto que as amostras modificadas quimicamente alcançaram valores superiores.

A maior taxa de absorção de água ocorreu nas primeiras horas de imersão, nos modificados alcalinos é observado que após 2 h de imersão a absorção de água praticamente ficou constante até o período final de 24 h. Nos modificados ácidos, estes seguem praticamente a mesma tendência, porém os dois modificados que foram tratados com etanol apresentaram um aumento mais pronunciado entre 2 e 10 h, quando comparados as outras amostras, após este período apresentaram estabilidade até o período de 24 h.

Os modificados alcalinos apresentaram uma capacidade de retenção de água menor que os modificados ácidos, isto era esperado, pois a extensão da modificação foi maior nos modificados ácidos, ou seja, mais resíduos de lisina

modificados, mais grupamentos carboxílicos dentro da molécula protéica, o que possibilita uma maior captação de água. Os modificados 0,5:1 (EDTAD/proteína, p/p) alcalino e ácido apresentaram uma capacidade de retenção de água 11 vezes superior ao hidrolisado não modificado e o modificado 0,5:1 (EDTAD/proteína, p/p) tratado com etanol demonstrou ter uma capacidade de retenção de água 19 vezes maior para o alcalino e 23 vezes para o ácido.

Em estudo semelhante realizado por Rathna e Damodaran (2002) com isolados protéicos modificados de filé de pescado, foi demonstrado que os modificados tratados com etanol apresentaram um aumento na capacidade de retenção de água em torno de 50% quando comparados aos sem tratamento com etanol. É interessante observar que o isolado protéico que estes autores trabalharam não apresentava residual de gordura. Em nosso estudo, o aumento na taxa de absorção de água dos modificados tratados com etanol foi muito superior aos 50%, isto pode estar relacionado com a quantidade de gordura presente nos isolados protéicos (em torno de 7-9%), pois o etanol, ao mesmo tempo que promove a desnaturação das estruturas conformacionais  $\beta$ , também ajuda a remover residuais de gordura. A gordura presente nos modificados protéicos, provavelmente, impediu que os modificados sem a presença de etanol absorvessem mais água.

Para aplicações práticas, não somente uma alta capacidade de absorção de água é requerida, mas também uma alta taxa de retenção de água será necessária. Buchholz (1994) sugeriu que uma cinética de absorção de água de materiais superabsorventes é influenciada por vários fatores, tais como, capacidade de retenção de água, tamanho das partículas e composição do polímero.

É relatado que após a etapa de adição do agente de ligação cruzada durante o processo de produção do hidrogel permanece uma quantidade significativa de estruturas dobradas, tais como,  $\alpha$ -hélice e conformação  $\beta$ . Estas estruturas podem fazer com que o hidrogel absorva uma quantidade menor de líquido, pois podem se opor ao relaxamento da cadeia protéica dificultando a difusão de água dentro da rede tridimensional (Hwang e Damodaran, 1996). Uma maneira de aumentar a absorção de água é tornar estas estruturas dobradas em estruturas mais lineares, utilizando solventes orgânicos que desnaturam a rede tornando-as lineares, expondo os sítios hidrofílicos e também disponibilizando mais espaços para o intumescimento dentro da molécula protéica.

Desnaturando as cadeias polipeptídicas *in situ* na matriz protéica, é possível prevenir o redobramento destas estruturas mesmo após a remoção do reagente que promove a desnaturação, este procedimento faz com que aumente a flexibilidade das cadeias da proteína e o relaxamento da rede tridimensional do gel, tal como, a difusão de água dentro da rede polimérica (Rathna e Damodaran, 2002).

### 3.3 Efeito da força iônica sobre a capacidade de intumescimento dos géis

A taxa de absorção de água está relacionada com as características da solução externa, como por exemplo, força iônica, natureza do polímero, elasticidade da rede tridimensional, presença de grupamentos funcionais hidrofílicos e extensão da modificação. A habilidade de intumescimento de hidrogéis “aniônicos” em várias soluções salinas é diminuta quando comparada com os valores alcançados em água destilada (Pourjavadi et al., 2006). Esta perda de capacidade de retenção de água é regularmente atribuída ao “efeito de cargas” dos cátions adicionados que causam imperfeição nas repulsões eletrostáticas ânion-ânion (Peppas e Mikes, 1986).

A Figura 2 apresenta o comportamento dos isolados protéicos modificados tratados ou não com etanol quando expostos a diferentes concentrações de sal por 24 h.

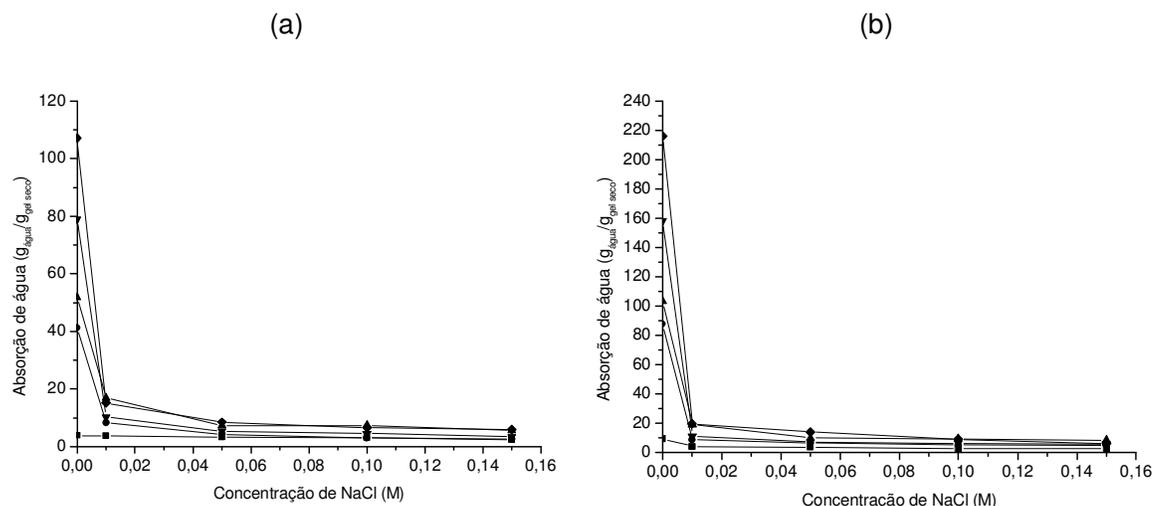


Figura 2 Efeito da força iônica sobre os hidrogéis. (a) isolado alcalino modificado (b) isolado ácido modificado. ■ isolados protéicos alcalino e ácido sem modificação química; ● modificado 1:0,2 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ modificado 1:0,5; ▼ modificado

1:0,2 tratado com etanol; ♦ modificado 1:0,5 tratado com etanol. Todos os pontos dos gráficos são valores médios de três de repetições.

Através da Figura 2 é possível verificar que os hidrogéis produzidos a partir dos isolados protéicos de pescado são muito sensíveis a soluções salinas, pois mesmo a menor concentração de NaCl (0,01 M) provocou uma queda entre 60 e 90% na absorção de água. Todos os géis imersos em solução salina 0,15 M apresentaram reduções maiores que 90% na capacidade de absorção de água quando comparados aos mesmos imersos em água destilada. Estudos semelhantes de produção de hidrogel com isolados protéicos de soja e pescado modificados por dianidrido etilenodiamino tetraacético e adicionados de glutaraldeído apresentaram o mesmo comportamento em relação à força iônica (Hwang e Damodaran, 1996; Hwang e Damodaran, 1997).

Sadeghi e Hosseinzadeh (2008) demonstraram que com hidrogel formado a partir de amido e submetido a diferentes concentrações de NaCl foi mais resistente a condições salinas que o hidrogel protéico produzido neste trabalho, pois este absorveu  $87 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$  na concentração de 0,01 M e em 0,15 M ainda conseguiu absorver  $58 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$ . Pourjavadi et al. (2006) produziu um hidrogel a partir da hidrólise do colágeno e conseguiu uma absorção de água de  $58 \text{ g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{gel seco}}$  em uma concentração de NaCl 0,15M.

### **3.4 Efeito do pH sobre a capacidade de retenção de água**

O pH afeta a capacidade de retenção de água dos hidrogéis protéicos produzidos a partir de isolados protéicos de pescado, como mostra a Figura 3. As variações de pH alteram a ionização dos grupos carboxílicos e outros grupamentos ionizáveis (Park e Hoffman, 1992).

Todas as amostras avaliadas atingiram o máximo de absorção de água em pH 8. O mesmo comportamento foi encontrado por Sadeghi e Hosseinzadeh (2008) estudando a influência do pH sobre a absorção de água por um hidrogel produzido a partir de amido. Segundo Hwang e Damodaran (1997) os valores dos  $pK_1$ ,  $pK_2$  e  $pK_3$  dos grupamentos carboxílicos do EDTA são 2,0, 2,6 e 6,2, respectivamente. Portanto, na teoria, todos os grupamentos carboxílicos devem estar plenamente ionizados em torno do pH 8, proporcionando assim a máxima absorção de água nesta condição. Porém, no trabalho realizado por estes autores com hidrogel produzido a partir do

músculo de peixe, a absorção de água pelo hidrogel apresentou um aumento contínuo desde o pH 3 até o pH 10, sendo o máximo alcançado neste último pH.

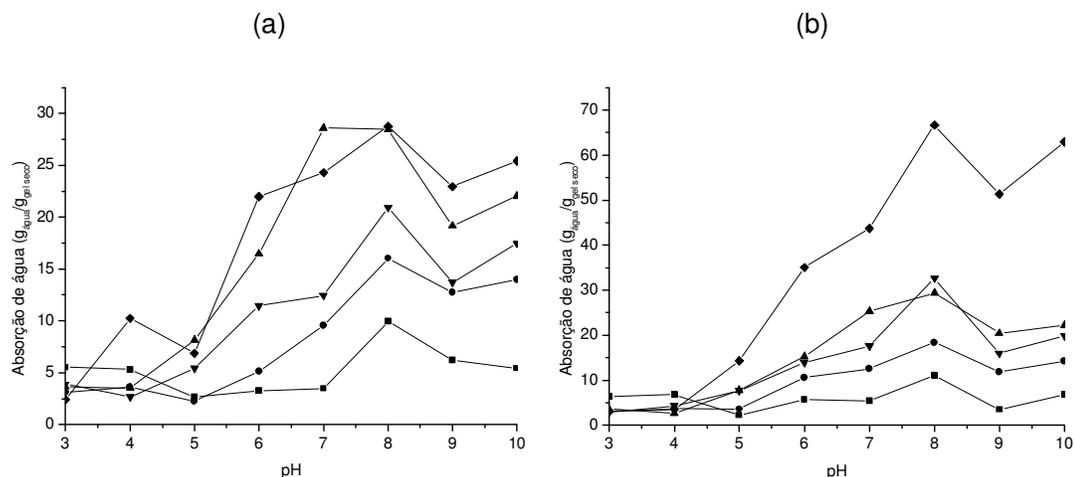


Figura 3 Efeito do pH sobre os hidrogéis. (a) isolado alcalino modificado (b) isolado ácido modificado. ■ isolados protéicos alcalino e ácido sem modificação química; ● modificado 1:0,2 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ modificado 1:0,5; ▼ modificado 1:0,2 tratado com etanol; ◆ modificado 1:0,5 tratado com etanol.

É interessante observar que os isolados protéicos não modificados apresentaram um valor maior de absorção de água no pH 3 quando comparados com os isolados protéicos modificados, provavelmente isto ocorreu devido a maior quantidade de lisina presente nos isolados protéicos não modificados, pois estas são protonadas em pH 3. Um aumento na carga positiva da proteína, devido a protonação dos grupamentos carboxílicos abaixo do pH 4, pode causar repulsões eletrostáticas dentro da matriz protéica e então permitir a retenção de água.

Em pH 3, a maioria dos grupos carboxílicos estão na forma COOH e apresentam baixos valores de retenção de água para o hidrogel; isto pode ser atribuído à presença de grupos hidrofílicos COOH e -OH não iônicos na rede polimérica do hidrogel (Sadeghi e Hosseinzadeh, 2008) e também como muitos ânions carboxil são protonados, as principais forças de repulsão ânion-ânion são eliminadas e conseqüentemente a capacidade de retenção de água diminui (Pourjavadi et al., 2006). A taxa de absorção de água aumenta rapidamente com o aumento das soluções tampões de pH entre 4 e 8. Reis et al. (2006) observaram que quanto maior

o pH maior a absorção de água, mais grupamentos COOH se dissociam para COO<sup>-</sup>, aumentando o número de grupos ionizados fixados dentro da estrutura do hidrogel. Isto gera força de repulsões eletrostáticas entre os grupos ionizados adjacentes da rede polimérica, as quais aumentam a absorção de água dos hidrogéis. Comportamentos similares sobre a absorção de água em diferentes pHs têm sido reportados em outros tipos de hidrogéis (Zhang et al., 2007; Du Toit et al., 2006; Pourjavadi et al., 2005; Park et al., 2004; Lu et al., 2001; Lee e Yuan, 2000).

A força iônica de todos os tampões utilizados no estudo de absorção de água pelos hidrogéis foi de 0,01 M, o que provavelmente causou a baixa retenção de água. O modificado ácido 0,5:1 (EDTAD:proteína, p/p) quando tratado com etanol absorveu 216,05 g<sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub> enquanto que nos estudos de pH o máximo absorvido por esta mesma amostra foi de 66,69 g<sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub> em pH 8, para o hidrogel produzido a partir do isolado protéico alcalino, também tratado com etanol, este alcançou 137,19 g<sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub> e nos estudos com pH o máximo de retenção de água foi de 28,76 g<sub>água</sub>/g<sub>gel seco</sub> no pH 8.

Em pHs superiores a 8, onde todas as amostras apresentaram um máximo de capacidade de retenção de água, ocorrendo uma leve queda, seguida de um novo aumento na absorção de água. Este aumento na capacidade de intumescimento dos géis em pH 10 segundo Hwang e Damodaran (1996) está associada a força de repulsão eletrostática que é diretamente proporcional ao quadrado da carga da rede molecular, portanto mesmo um pequeno aumento na carga da rede devido a ionização dos resíduos da tirosina ( $pK_3 = 9,6$ ) causam um aumento na repulsão eletrostática dentro da rede do gel, resultando em um aumento na expansão do gel e retenção de água.

### **3.5 Reversibilidade dos hidrogéis**

Como os hidrogéis produzidos neste estudo se mostraram sensíveis à exposição a soluções salinas, foi investigada a capacidade de reversibilidade, absorção e desidratação dos géis. Para tal foi utilizada uma solução de NaCl 0,15 M, como agente de desidratação e água deionizada para a hidratação. As Figuras 4 e 5 mostram o comportamento dos géis durante um período de 36 h, os quais os hidrogéis foram submetidos a subsequentes hidratações e desidratações.

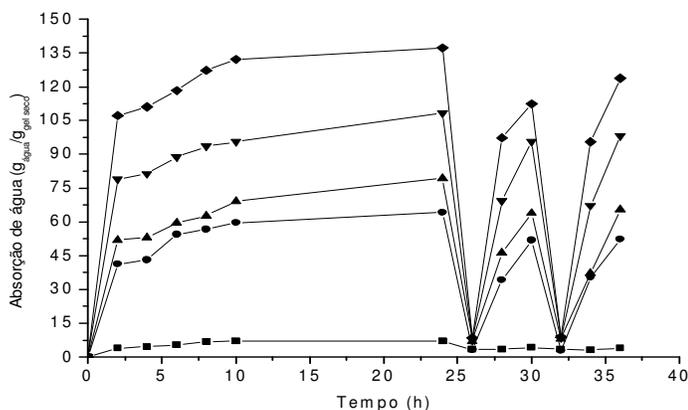


Figura 4 Cinética de absorção e desidratação dos hidrogéis produzidos a partir dos isolados protéicos de pescado alcalinos. ■ isolado alcalino sem modificação química; ● modificado 1:0,2 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ modificado 1:0,5; ▼ modificado 1:0,2 tratado com etanol; ◆ modificado 1:0,5 tratado com etanol. Todos os pontos do gráfico são valores médios de três repetições.

Quando o gel hidratado por 24 h foi exposto à solução salina de NaCl 0,15 M, por um período de 2 h, ocorreu um decréscimo de mais de 90% no conteúdo de água, isto ocorreu tanto para os hidrogéis produzidos com os modificados protéicos alcalinos, quanto com os ácidos. As amostras controles também apresentaram redução no conteúdo de água, porém esta diminuiu entre 55 e 64% da quantidade absorvida em 24 h.

Através da Figura 4 pode ser observado que os hidrogéis produzidos apresentaram uma boa capacidade de retenção de água, mesmo após a desidratação. Porém, é observado que estes têm as suas capacidades de absorção de água levemente reduzidas, após a primeira desidratação. Quando desidratado pela segunda vez, houve um aumento na capacidade de hidratação, comparado com a primeira desidratação, isto pode ser explicado, em parte, devido a um aumento na flexibilidade da matriz do gel, após repetidas desidratações e hidratações.

Hwang e Damodaran (1997) estudaram a reversibilidade de um hidrogel produzido a partir de um isolado protéico alcalino de músculo de peixe e obtiveram uma capacidade de retenção de água superior a original, quando o gel foi desidratado

e hidratado novamente, pela primeira vez, porém quando submeteram o gel pela segunda vez à desidratação e voltou a hidratar, este demorou a absorver água e obteve uma hidratação em torno de 7 vezes menor que a primeira.

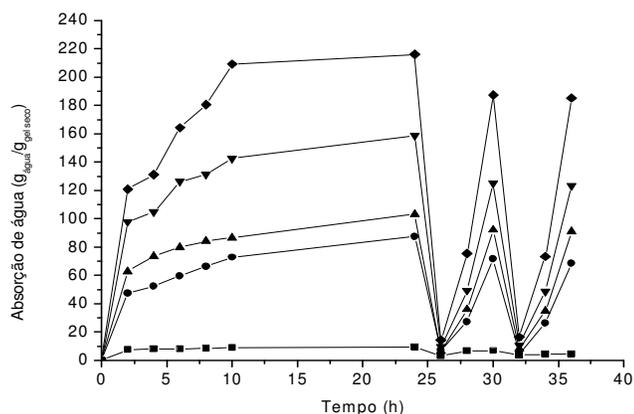


Figura 5 Cinética de absorção e desidratação dos hidrogéis produzidos a partir dos isolados protéicos ácidos. ■ isolado ácido sem modificação química; ● modificado 1:0,2 (proteína:EDTAD, p/p); ▲ modificado 1:0,5; ▼ modificado 1:0,2 tratado com etanol; ◆ modificado 1:0,5 tratado com etanol. Todos os pontos do gráfico são valores médios de três repetições.

A Figura 5 apresenta o comportamento dos modificados protéicos derivados dos isolados protéicos ácidos, estes demonstraram um comportamento muito semelhante aos modificados protéicos alcalinos. Estes hidrogéis também apresentaram boa capacidade de hidratação, após sucessivas desidratações. Outro fato a ser observado é que a desidratação em NaCl 0,15 M é mais rápida que a hidratação posterior, pois enquanto os géis perdem cerca de 90% do conteúdo de água em 2 h de imersão, estes demoram em torno de 4 h para se hidratarem novamente. Esta absorção de água mais lenta pode ser atribuída à baixa taxa de dissociação dos íons ligados a rede polimérica.

#### 4 CONCLUSÃO

Os isolados protéicos produzidos a partir de resíduos de pescado e modificados quimicamente, apresentaram capacidade de formar hidrogéis, com alta absorção de água. Os resultados deste estudo indicam que os hidrogéis protéicos produzidos com ligações cruzadas quando tratados com etanol, tem a capacidade de

retenção de água dos hidrogéis aperfeiçoada, no caso do modificado protéico ácido este obteve um aumento de 209% e o alcalino 172%, quando comparados com os modificados na proporção de 0,5:1 (EDTAD:proteína, p/p) sem adição do etanol.

A capacidade de reversibilidade de intumescimento dos hidrogéis apresentada neste estudo indicou que os hidrogéis produzidos a partir de isolados protéicos de pescado podem ser repetidamente utilizados, sem perder a capacidade de hidratação, portanto podem ser aplicados em processos de desidratação, como fonte de água para cultivo de plantas, entre outras.

Além de melhorar a capacidade de retenção de água dos hidrogéis, o tratamento com etanol ofereceu outras vantagens, tais como, desidratação do gel sem a necessidade de secagem por longo período, extração de compostos odorosos de baixo peso molecular, eliminação de qualquer residual não reativo de glutaraldeído no gel. E também, o etanol utilizado no processo, pode ser facilmente recuperado e reciclado.

## 5 REFERÊNCIAS

Buchholz, F.L. In: Superabsorbent Polymers: Science and Technology, ACS Symposium Series 573, American Chemical Society, Washington, DC, 1994.

Desantis, G.; Jones, B. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. **Current Opinion in Biotechnology**. 10, 324-330, 1999.

Du Toit, L. C.; Pillay, V.; Danckwerts, M. P. Application of synergism and variation in ionic compatibilities within a hydrophilic polymeric sodium starch glycolate-kappa-carrageenan combination: textural profiling of the suspension behavior. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 21, 107-122, 2006.

Dubrovskii, S. A.; Afanaseva, M. V.; Lagutina, M. A.; Kazanskii, K. S. Comprehensive characterization of superabsorbent polymer hydrogels. **Polymer Bulletin**. 24, 107-110, 1990.

George, M.; Abraham, T. E. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. 335, 123-129, 2007.

Guerard, F.; Guimas, L.; Binet, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 19-20, 489-498, 2002.

Hall, R. J.; Trinder, N.; Givens, D. I. Observations on the use of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates. **Analyst**. 98, 673-686, 1973.

Hideki, O. Handbook of Polymer Degradation. Marcel Dekker, New York, 1992.

Hwang, D. C.; Damodaran, S. Chemical modification strategies for synthesis of protein-based hydrogel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 751-758, 1996.

Hwang, D. C.; Damodaran, S. Synthesis and properties of fish protein-based hydrogel. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 74, 1165-1171, 1997.

Iannace, S.; Nicolais, L.; Water sorption of glycol-modified cross-linked gelatin-based hydrogels. **Journal of Materials Science**. 32, 1405-1408, 1997.

Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 40, 43-81, 2000.

Kunioka, M.; Choi, H. J. Hydrolytic degradation and mechanical properties of hydrogels prepared from microbial poly(amino acid)s. **Polymer Degradation and Stability**. 59, 33-37, 1998.

Kurniawan, L.; Qio, G. G.; Zhang, X. Q. Chemical modification of wheat protein-based natural polymers: grafting and cross-linking reactions with poly(ethylene oxide) diglycidyl ether and ethyl diamine. **Biomacromolecules**. 8, 2909-2915, 2007.

Lee, W. F.; Yuan, W. Y. Thermoreversible hydrogels X: synthesis and swelling behavior of the (N-Isopropylacrylamide-co-sodium 2-acrylamido-2-methylpropyl sulfonate) copolymeric hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**. 77, 1760-1768, 2000.

Lu, S., Duan, M. and Lin, S. Superabsorbent polymeric materials VIII: swelling behavior of crosslinked poly[sodium acrylate-co-trimethyl methacryloyloxyethyl ammonium

iodide] in aqueous salt solutions. **Journal of Applied Polymer Science**. 79, 1665-1674, 2001.

Mackie, I. M. Fish protein hydrolysates. **Process Biochemistry**. 17, 26, 1982.

Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Prentice-Hernández, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, 32, 61-66, 2009.

Matsushima, A.; Kodera, Y.; Hiroto, M.; Nishimura, H.; Inada, Y. Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2, 1-17, 1996.

Neves, R. A. M.; Mira, N. V. M.; Marquez, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24, 101-108, 2004.

Park, T. G.; Hoffman, A. S. Synthesis and characterization of pH-and/or temperature sensitive hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**. 46, 659-671, 1992.

Park, S. E.; Nho, Y. C.; Lim, Y. M.; Kim, H. Preparation of pH-sensitive poly(vinyl alcohol-g-methacrylic acid) and poly(vinyl alcohol-g-acrylic acid) hydrogels by gamma ray irradiation and their insulin release behavior. **Journal of Applied Polymer Science**. 91, 636-643, 2004.

Peppas, N. A.; Mikes, A. G. Hydrogels in Medicine and Pharmacy Vol.1, CRC Press: Boca Raton, FL, 1986.

Pourjavadi, A.; Amini-Fazl, M. S.; Hosseinzadeh, H. Partially hydrolyzed crosslinked alginate-graft-polymethacrylamide as a novel biopolymer-based superabsorbent hydrogel having pH-responsive properties. **Macromolecular Research**. 13, 45-53, 2005.

Pourjavadi, A.; Kurdtabar, M.; Mahdavinia, G. R.; Hosseinzadeh, H. Synthesis and super-swelling behavior of a novel protein-based superabsorbent hydrogel. **Polymer Bulletin**. 57, 813-824, 2006.

Rathna, G. V. N.; Damodaran, S. Swelling behavior of protein-based superabsorbent hydrogels treated with ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**. 81, 2190-2196, 2001.

Rathna, G. V. N.; Damodaran, S. Effect of nonprotein polymers on water-uptake properties of a fish protein-based hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**. 85, 45-51, 2002.

Rathna, G. V. N.; Gunasekaran, S. Functionally-modified egg white albumen hydrogels. **Polymer International**. 53, 1994-2000, 2004.

Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Cavalcanti, O. A.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Synthesis and characterization of pH-responsive hydrogels based on chemically modified Arabic gum polysaccharide. **Polymer**. 47, 2023-2029, 2006.

Sadeghi, M.; Hosseinzadeh, H. Synthesis of starch–poly(sodium acrylate-co-acrylamide) superabsorbent hydrogel with salt and pH-responsiveness properties as a drug delivery system. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 23, 381-404, 2008.

Scopes, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**. 59, 277-282, 1974.

Solanki, K.; Shah, S.; Gupta, M. N. Chemical modification of alpha-chymotrypsin for obtaining high transesterification activity in low water organic media. **Biocatalysis and Biotransformation**. 26, 258-265, 2008.

Thiansilakul, Y.; Benjakul, S.; Shahidi, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). **Food Chemistry**. 103, 1385-1394, 2007.

Tsai, H-S.; Wang, Y-Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. **Polymer Bulletin**. 60, 103-113, 2008.

Zhang, J.; Yuan, K.; Wang, Y. P.; Shen-Tang Zhang, S. T.; Zhang, J. Preparation and pH responsive behavior of poly(vinyl alcohol) – chitosan- poly(acrylic acid) full-IPN hydrogels. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 22, 207-218, 2007.

Zhang, S-P.; Ping, W. Chemical modification of enzymes – an important tool to enhance the performance of biocatalysts. **Shengwu Jiagong Guocheng**. 4, 4-8, 2006.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

A matéria-prima utilizada se mostrou adequada para a produção dos hidrolisados, porém foi mais vantajoso, tecnicamente e economicamente, o uso de resíduo do que de filé. Os hidrolisados provenientes do resíduo de corvina apresentaram um aperfeiçoamento em todas as propriedades funcionais avaliadas; sugerindo que o resíduo de pescado, que geralmente é utilizado para produzir farinha ou ração animal, poderia ser utilizado para a elaboração de um produto com maior valor agregado.

As bactérias utilizadas foram capazes de solubilizar proteínas e liberar aminoácidos contidos na parte insolúvel descartada dos processos de solubilização ácida e alcalina, dos resíduos do processamento da corvina. A porcentagem média de proteína solubilizada com estes tratamentos variaram entre 50 e 60%. A *Bacillus velesensis* foi a bactéria que apresentou melhor interação com os substratos avaliados, obteve a maior atividade proteolítica ( $47,56 \text{ U mL}^{-1}$ ), maior quantidade de proteína solubilizada ( $3,631 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e aminoácidos livres ( $0,178 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A *Chryseobacterium* sp. apresentou atividade proteolítica máxima de  $23,46 \text{ U mL}^{-1}$ ,  $2,859 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteína solúvel e  $0,126 \text{ mg mL}^{-1}$  de aminoácidos livres.

Os fungos utilizados foram capazes de solubilizar proteínas e aminoácidos presentes na porção fibrosa insolúvel dos resíduos do processamento de corvina. O fungo *Penicillium* sp. (E20) apresentou a maior atividade proteolítica ( $31,20 \text{ U mL}^{-1}$ ) e máxima liberação de aminoácidos ( $0,146 \text{ mg mL}^{-1}$ ) utilizando o substrato ácido. Os fungos que solubilizaram a maior concentração de proteína foram *Aspergillus* sp. (E7)  $5,72 \text{ mg mL}^{-1}$  e *Fusarium* sp. (E5)  $6,17 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Os hidrogéis produzidos utilizaram como agente de ligação cruzada o glutaraldeído e possuem uma estrutura mais resistente que outros materiais semelhantes, possibilitando um amplo espectro de aplicações em qualquer produto que precise dessas características de absorção de água.

Os isolados protéicos processados a partir de resíduos de pescado, após modificação química, apresentaram capacidade de formar hidrogéis com propriedades superabsorventes. Os hidrogéis produzidos com ligações cruzadas quando tratados com etanol, apresentaram a capacidade de retenção de água aperfeiçoada. No caso do modificado protéico ácido este obteve um aumento de 209% e o alcalino 172%,

quando comparados com os modificados na proporção de 0,5:1 (EDTAD:proteína, p/p) sem adição do etanol.

A capacidade de reversibilidade de intumescimento dos hidrogéis indicou que os hidrogéis produzidos a partir de isolados protéicos de pescado podem ser repetidamente utilizados, sem perder a capacidade de hidratação.

O tratamento com etanol melhorou a capacidade de retenção de água dos hidrogéis, facilitou a desidratação do gel sem a necessidade de secagem por longo período, extraiu compostos odorosos de baixo peso molecular, eliminou qualquer residual não reativo de glutaraldeído no gel e o etanol utilizado no processo, pôde ser facilmente recuperado e reciclado.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produzir hidrolisados protéicos de resíduos utilizando outras espécies de pescado;
- identificar o tipo de proteases que estão sendo produzidas durante os processos fermentativos de solubilização de proteínas fibrosas;
- estudar o perfil de aminoácidos dos solubilizados;
- estudar o comportamento da hidrólise das proteínas insolúveis resultantes do processo de produção dos isolados;
- produzir hidrogéis por indução térmica e comparar as propriedades de absorção de água com as obtidas neste trabalho;
- avaliar a influência de diferentes temperaturas e concentrações de glutaraldeído durante a produção dos hidrogéis;
- utilizar outros solventes orgânicos polares diferentes do etanol, para aperfeiçoar a capacidade de retenção de água dos hidrogéis.
- estudar diferentes aplicações para os hidrogéis obtidos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler-Nissen, J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 24, 1090-1093, 1976.

Adler-Nissen, J. A review of food hydrolysis specific areas. In Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. Copenhagen, Denmark, 57-109, 1986.

Alcantara, R.; Amores, J.; Canoira, L.; Fidaldo, E.; Franco, M. J.; Navarro, A. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil used frying oil and tallow. **Biomass and Bioenergy**. 18, 512-527, 2000.

Aldea, M. J. A. Calidad de carne em canales em canales ovinas ligeras espoñolas y de importación. Doutorado em Zootecnia. Universidad de Zaragoza. Espana, 1995.

Amiya, T.; Tanaka, T. Phase transitions in crosslinked gels of natural polymers. **Macromolecules**. 20, 1162, 1987.

Anbu, P.; Hilda, A.; Sur, H-W.; Hur, B-K.; Jayanthi, S. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 62, 287-292, 2008.

Anwar, A.; Saleemuddin, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**. 64, 175-183, 1998.

AOAC. Official Methods of Analysis of International. 16<sup>th</sup> Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

Arrascue, M. L.; Garcia, H. M.; Horna, O.; Guibal, E. Gold sorption on chitosan derivates. **Hydrometallurgy**. 71, 191-200, 2003.

Arvanitoyannis, I. Totally-and-partially biodegradable polymer blends based on natural and synthetic macromolecules: preparation and physical properties and potential as food packaging materials. **Journal of Macromolecular Science – Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics**. C39, 205-271, 1999.

Arvanitoyannis, I. S.; Kassaveti, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**. 43, 726-745, 2008.

Aspmo, S. I.; Horn, S. J.; Eijsink, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**. 40, 1957-1966, 2005.

Ayala, M. E. G. Estructura e composição química del pescado. In: Curso de Capacitación, Surimi. Callao: Instituto Tecnológico Pesquero del Peru, 2001.

Bárzana, E.; Garibay-García, M. Production of fish protein concentrates in fisheries processing: biotechnological applications. Chapman & Hall, London, 206-222, 1994.

Batista, I. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. **European Food Research and Technology**. 210, 84-89, 1999.

Batista, I.; Mendes, R.; Nelhas, R.; Pires, C. Proteins from sardine and blue whiting recovered by new extraction techniques: Solubility and gelation properties., Icelandic Fisheries Laboratories. First Joint Trans Atlantic Fisheries Technology Conference, 2003.

Batista, I.; Pires, C.; Nelhas, R.; Godinho, V. Acid and alkaline-aided protein recovery from Cape Hake by-products. In J. B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø, & J. Oehlenschläger (Eds.), *Seafood research from fish to dish*. Wageningen: Wageningen Academic Serial (Book, Monograph), 2006.

Bechtel, P. J.; Sathivel, S.; Oliveira, A. C. M. Alkali extracted protein fractions from salmon byproducts. Annual IFT Meeting 2005 New Orleans, Louisiana, 2005.

Belitz, H. D.; Grosch, W. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1997.

Benjakul, S.; Morrisey, M. T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 61, 131-138, 1997.

Beuchat, L. R. Functional and eletrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 25, 258-261, 1977.

Bhaskar, N.; Benilla, T.; Radha, C.; Lalitha, R. G. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**. 99, 335-343, 2008.

Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. Introdução à química de alimentos. Livraria Varela, São Paulo, 1992.

Böckle, B.; Müller, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environment Microbiology**. 63, 790-792, 1997.

Borderías, A. J.; Monteiro P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Revista Agropecuária de Tecnologia de Alimentos**. 28, 158-169, 1988.

Bradbury, J. H. The structure and chemistry of keratin fibers. **Advances in Protein Chemistry**. 67, 111-211, 1973.

Brandelli, A. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium* sp. **Annals of Microbiology**. 55, 47-50, 2005.

Brandelli, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**. 1, 105-116, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Municipal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Desembarque de pescado no Rio Grande do Sul. Rio Grande, IBAMA, 2007.

Brutt, E. H.; Ichida, J. M. Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. US Patent 5.877.000, 1999.

Buchholz, F.L. In: Superabsorbent Polymers: Science and Technology, ACS Symposium Series 573, American Chemical Society, Washington, DC, 1994.

Canella, M.; Castriotta, G.; Bernardi, A. Functional and physicochemical properties of succinylated and acetylated sunflower protein. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. 12, 95-101, 1979.

Casarin, F.; Cladera-Olivera, F.; Brandelli, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food Bioprocess and Technology**. 1, 301-305, 2008.

Cascone M. G.; Barbani, N.; Cristallini, C.; Giusti, P.; Ciardelli, G.; Lazzeri, L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**. 12, 267-281, 2001.

Castello, J. P. Distribucion, crecimiento y maturacion sexual de la corvina juvenil (*Micropogonias furnieri*) en el estuario de la "Lagoa dos Patos", Brasil. **Physis**. 44, 21-26, 1986.

Catsimpoolas, N.; Funk, S. K.; Meyer, E. W. Thermal aggregation of glycinin subunits. **Cereal Chemistry**. 47, 331-344, 1970.

Chapman, J. M.; Phillips, V. R.; Pain, B. F. Mesophilic anaerobic digestion of dairy cow slurry on farm scale: maintenance requirements and reliability. **Journal of Agricultural Engineering Research**. 47, 277-285, 1990.

Chatterji, P. R. Gelatin with hydrophilic hydrophobic grafts and glutaraldehyde crosslinks. **Journal of Applied Polymer Science**. 37, 2203-2212, 1989.

Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. Amino acids, peptides and proteins: In: Fennema, O. R. (Ed). Food Chemistry. New York: Marcel Dekker, Inc. 245-369, 1985.

Chen, Y. C.; Jaczynski, J. Protein recovery from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-products via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 9079-9088, 2007.

Chen, Y. C.; Tou, J. C.; Jaczynski, J. Amino acid, fatty acid, and mineral profiles of materials recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. **Journal of Food Science**. 72, C528-C536, 2007.

Cheng, G. X.; Liu, J.; Zhao, R. Z.; Yao, K. D. Studies on dynamic behavior of water cross Anked chitosan hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**. 67, 983-988, 1998.

Chiou, M. S.; Li, H, Y. Adsorption behaviour of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. **Chemosphere**. 50, 1095-1105, 2003.

- Chiou, M. S.; Ho, P. Y.; Li, H. Y. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. **Dyes Pigments**. 60, 69-84, 2004.
- Chobert, J. M.; Bertrand-Harb, C.; Nicolas, M. G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 36, 883-886, 1988.
- Choi, Y. R.; Lusas, E. W., Rhee, K. C. Effects of acylation of defatted cottonseed flour with various acid anhydrides on protein extractability and functional properties of resulting protein isolates. **Journal of Food Science**. 47, 1713-1716, 1982.
- Chothia, C. Hydrophobic bonding and accessible surface-area in proteins. **Nature**. 248, 338-339, 1974.
- Clare, D. A.; Swaisgood, H. E. Bioactive milk peptides: A prospectus. **Journal of Dairy Science**. 83, 1187-1195, 2000.
- Coello, N.; Montiel, E.; Concepcion, M.; Christen, P. Optimization of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**. 85, 207-211, 2002.
- Considine, E. A fish solution to landfills. Wisconsin Engineer Magazine. 1-3, 2002.
- Contreras-Guzmán, E. S. Bioquímica de Pescado e Derivados. Jaboticabal: Fundação Universidade Estadual Paulista, 1994.
- Costa, M. R.; Araújo, F. Use of a tropical bay in southeastern Brazil by juvenile and subadult *Micropogonias furnieri* (Perciformes, Sciaenidae). **Journal of Marine Science**. 60, 268-277, 2003.
- Costa, P. G.; Fontana, A.; Prentice, C. H. Obtención y caracterización de un aislado proteico proveniente de la matriz de exoesqueletos de camarón rosado (*Farfantepenaeus paulensis*). **Alimentaria**. 42, 82-89, 2005.
- Dave, A.; Vaishnav, U.; Desai, R.; Shah, A.; Ankleshwaria, B.; Mehta, M. On the assessment of hydrogels for fluid absorbency. **Journal of Applied Polymer Science**. 58, 853-859, 1995.

De Jong, S. J.; De Smedt, S. C.; Wahls, M. W. C.; Demeester, J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Hennink, W. E. Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran. **Macromolecules**. 33, 3680-3686, 2000.

Delval, F.; Vebrel, J.; Pont, P.; Morcellet, M.; Janus, L.; Crini, G. Sorption properties toward aromatic compounds of insoluble crosslinked polymer containing starch derivatives. **Polymer Recycling**. 5, 137-143, 2000.

Desantis, G.; Jones, B. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. **Current Opinion in Biotechnology**. 10, 324-330, 1999.

De Toni, C. H.; Richter, M. F.; Chagas, J. R.; Henriques, J. A. P.; Termignoni, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophila* strain. **Canadian Journal of Microbiology**. 48, 342-348, 2002.

Diniz, F. M. e Martin, A. M. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. **Food Science and Technology**. 30, 266-272, 1997.

Doig, A. J.; Sternberg, M. J. Side-chain conformational entropy in protein folding. **Protein Science**. 4, 247-251, 1995.

Donati, I.; Holtan, S.; Morch, Y. A.; Borgogna, M.; Dentini, M.; Skjak-Braek, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules**. 6, 1031-1040, 2005.

Dong, S. Y.; Zeng, M. Y.; Wang, D. F.; Liu, Z. Y.; Zhao, Y. H.; Yang, H. C. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**. 107, 1485-1493, 2008.

Du Toit, L. C.; Pillay, V.; Danckwerts, M. P. Application of synergism and variation in ionic compatibilities within a hydrophilic polymeric sodium starch glycolate-kappa-carrageenan combination: textural profiling of the suspension behavior. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 21, 107-122, 2006.

Dubrovskii, S. A.; Afanaseva, M. V.; Lagutina, M. A.; Kazanskii, K. S. Comprehensive characterization of superabsorbent polymer hydrogels. **Polymer Bulletin**. 24, 107-110, 1990.

Dumay, J.; Donnay-Moreno, C.; Barnathan, G.; Jaquen, P.; Bergé, J .P. Improvement of lipid and phospholipids recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**. 41, 2327-2332, 2006.

Eichler, S.; Ramon, O.; Ladyzhinski, I.; Cohen, Y.; Mizrahi, S. Collapse processes on shrinkage of hydrophilic gels during dehydration. **Food Research International**. 30, 719-726, 1998.

Elsdon, T. S.; Gillanders, B. M. Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**. 59, 1796-1808, 2002.

Esakkiraj, P.; Immanuel, G.; Sowmya, S. M.; Iyapparaj, P.; Palavesam, A. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. **Food Bioprocess and Technology**. DOI:10.1007/s11947-007-0046-6, in press, 2008.

Esteban, M. B.; Garcia, A. J.; Ramos, P.; Marquez, M. C. Evaluation of fruit–vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. **Waste Management**. 27, 193-200, 2006.

Farag, A. M.; Hassan, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**. 34, 85-93, 2004.

Feeney, R. E.; Yamasaki, R. B.; Geochegan, K. F. Chemical modification of proteins: An Review, in Modifications of Proteins. **American Chemistry Society**. 3-55, 1982.

Fennema, O. R. Química de los alimentos. Editora Acribia. Zaragoza, Espanha, 1993.

Ferreira, N. G.; Hultin, H. O. Liquefying cod fish frames under acidic conditions with a fungal enzyme. **Journal of Food Processing and Preservation**. 18, 87-101, 1994.

Fonkwe, L. G.; Singh, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**. 31, 605-616, 1996.

Franzen, K. L.; Kinsella, J. E. Functional properties of succinylated and acetylated leaf protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 24, 788-795, 1976.

Friedrich, A. B.; Antranikian, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavoraus*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. **Applied and Environmental Microbiology**. 62, 2875-2882, 1996.

Gabrielsen, B. O.; Austreng, E. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed wet feed with alginate. **Aquaculture Research**. 29, 397-401, 1998.

Garcia-Carreño, F. L.; Hernandez-Cortes, M. P.; Haard, N. F. Enzymes with peptidase and proteinase activity from digestive systems of fresh water and a marine decapod. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42, 1456-1461, 1994.

Gassesse, A.; Kaul, R. H.; Gashe, B. A.; Mattiasson, B. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**. 32, 519-524, 2003.

Gbogouri, G. A.; Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Journal of Food Science**. 69, 615-622, 2004.

Gebauer, R.; Eikebrokk, B. Mesophilic anaerobic treatment of sludge from salmon smolt hatching. **Bioresource Technology**. 97, 2389-2401, 2005.

Gehrke, S. H. In advances in polymer science 110 – Responsive gels: volume transitions II, K. Dusek, Ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993.

George, M.; Abraham, T. E. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. 335, 123-129, 2007.

Gildberg, A. Review: enzymic processing of marine raw materials. **Process Biochemistry**. 28, 1-15, 1993.

Gildberg, A.; Amesén, J. A.; Carlehög, M. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**. 38, 475-480, 2002.

Giongo, J. L.; Lucas, F. S.; Casarin, F.; Heeb, P.; Brandelli, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23, 375-382, 2007.

Girek, T.; Shin, D. H.; Lim, S. T. Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with maleic anhydride and structural characterization of the polymers. **Carbohydrate Polymers**. 42, 59-63, 2000.

Glazer, A. N.; Delange, R. J.; Sigman, D. S. Chemical modification of proteins. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (T.S. Work and E. Work, eds.) American Elsevier Publishing Co., New York, 1975.

Gliko-Kabir, I.; Yagen, B.; Penhasi, A.; Rubinstein, A. Low Swelling, Crosslinked Guar and Its Potential Use as Colon-Specific Drug Carrier. **Pharmaceutical Research**. 15, 1019-1025, 1998.

Goulet, G.; Ponnampalam, R.; Amiot, J.; Roy, A.; Brisson, G. J. Nutritional value of acylated oat protein concentrates. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. 35, 589-592, 1987.

Gowen, R. J. Aquaculture and the environment. In: Aquaculture and the Environment. **European Aquaculture Society Special Publications**. 16, 30-38, 1991.

Gradisar, H.; Kern, S.; Friedrich, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53, 196-200, 2000.

Gradisar, H.; Friedrich, J.; Krizaj, I.; Jerala, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known protease. **Applied and Environmental Microbiology**. 71, 3420-3426, 2005.

Guerard, F.; Dufossé, L.; De La Broise, D.; Binet, A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wates using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 11, 1051-1059, 2001.

Guerard, F.; Guimas, L.; Binet, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 20, 489-498, 2002.

Gupta, R.; Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 70, 21-33, 2006.

Haard, N. F.; Simpson, B. K. Protease from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In: Fisheries processing biotechnological applications. London, Chapman & Hall, 132-154, 1994.

Hall, R. J.; Trinder, N.; Givens, D. I. Observations on the use of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates. **Analyst**. 98, 673-686, 1973.

Hammoumi, A.; Faid, M.; El, Yachioui, M.; Amarouch, H. Characterization of fermented fish waste used in feeding trials with broilers. **Process Biochemistry**. 33, 423-427, 1998.

Haque, Z. U. Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: a review. **Journal of Dairy Science**. 76, 311-320, 1993.

Hideki, O. Handbook of polymer degradation. Marcel Dekker, New York, 1992.

Hovgaard, L.; Brondsted, H. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**. 36, 159-166, 1995.

Hoyle, N.; Merritt, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**. 59, 76-79, 1994.

Hultin, H. O. Characteristics of muscle tissue, in Food Chemistry, 2nd ed. Fennema, O. R. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1985.

Hultin, H. O.; Kelleher, S. D. Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition. Patent US6005073, 1999.

Hwang, D. C.; Damodaran, S. Chemical modification strategies for synthesis of protein-based hydrogel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 751-758, 1996.

Hwang, D. C.; Damodaran, S. Synthesis and properties of fish protein-based hydrogel. **Journal of the American Oil Chemical Society**. 74, 1165-1171, 1997.

Iannace, S.; Nicolais, L.; Water sorption of glycol-modified cross-linked gelatin-based hydrogels. **Journal of Materials Science**. 32, 1405-1408, 1997.

Ikada, Y.; Tabata, Y. Protein release from gelati matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 31, 287-301, 1998.

Imm, J. Y. e Lee, C. M. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47, 2360-2366, 1999.

Jacobs, M. N.; Johnston, P. A.; Wyatt, C. L.; Santillo, D.; French, M. C. Organochlorine pesticide and PCB residues on pharmaceutical industrial and food grade fish oils. **International Journal of Environment and Pollution**. 8, 74-93, 1997.

Jayasinghe, C.; Gotoh, N.; Wada, S. Variation in lipid classes and fatty acid composition of salmon shark (*Lamna ditropis*) liver with season and gender. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 134, 287-295, 2003.

Johnson, E. A. Functional properties of acylated pea protein isolates. **Dissertação de Mestrado**. Washington State University, 1982.

Jones, L. N.; Simon, M.; Watts, N. R.; Booy, F. P.; Steven, A. C.; Parry, D. A. D. Intermediate filament structure: hard  $\alpha$ -keratin. **Biophysical Chemistry**. 68, 83-93, 1999.

Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T.; Tanaka, M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chemistry**. 93, 475-484, 2005.

Jooste, P. J.; Britz, T. J. The significance of Flavobacteria as proteolytic psychrotrophs in milk. **Milchwissenschaft**. 41, 618-621, 1986.

Kato, S.; Kunisawa, N.; Kojima, T.; Murakami, S. Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**. 37, 863-870, 2004.

Kaul, S.; Sumbali, G. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. **Mycopathologia**. 139, 137-140, 1997.

Kelleher, K. Discards in the world's marine fisheries: an update. FAO Fisheries technical paper 470, 2005.

Kim, B. S.; Lim, S. T. Removal of heavy metal ions from water by cross-linked carboxymethyl corn starch. **Carbohydrate Polymers**. 39, 217-223, 1999.

Kim, J. M.; Lim, W. J.; Suh, H. J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**. 37, 287-291, 2001.

Kim, J. M.; Choi, Y. M.; Suh, H. J. Preparation of feather digests as fertilizer with *B. pumilus* KHS-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 15, 472-476, 2005.

Kinney, A. B., Scranton, A. B. Superabsorbent Polymers. ACS Symposium series 573, 1994.

Kinsella, J. E. Functional properties of proteins in foods: a survey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 8, 219-280, 1976.

Kinsella, J. E. Relationships between structure and functional properties of food proteins. Food Proteins. London: applied science, 51-103, 1982.

Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T.; Tanaka, M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**. 89, 363-372, 2005.

Klompong, V.; Benjakul, S.; Kantachote, D.; Hayes, K. D.; Shahidi, F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science and Technology**. 43, 1019-1026, 2008.

Kopeček J, Tang A, Wang C, Stewart R. De novo design of biomedical polymers: hybrids from synthetic macromolecules and genetically engineered protein domains. **Macromolecular Symposia**. 174, 31-42, 2001.

Kristinsson, H. G. Reaction kinetics, biochemical and functional properties of salmon muscle proteins hydrolyzed by different alkaline proteases. Masters thesis. University of Washington, Seattle, WA, 1998.

Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 657-666, 2000.

Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 40, 43-81, 2000.

Kristinsson, H. G. Conformational and functional changes of hemoglobin and myosin induced by pH: functional role in fish quality. Ph.D. thesis. University of Massachusetts, Amherst, MA, USA, 2001.

Kristinsson, H. G. Developments with functional fish proteins. Research Aquatic Food Products Program. Laboratory of Aquatic Food Biomolecular. Department of Food Science and Human, 2003.

Kristinsson, H.; Demir, N. Functional fish protein ingredients from fish species of warm and temperate waters: Comparison of acid- and alkali-aided processing vs. conventional surimi processing. In P. J. Bechtel (Ed.), *Advances in Seafood Byproducts 2002 Conference Proceedings* (pp. 277–295). Anchorage: Alaska Sea Grant College Program University of Alaska, 2003.

Kristinsson, H.; Hultin, H. O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 7187-7196, 2003.

Kristinsson, H.; Ingadottir, B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. **Journal of Food Science**. 71, E132-E141, 2006.

Kristinsson, H. G.; Liang, Y. Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins. **Journal of Food Science**. 71, C304-C312, 2006.

Krzynowek, J. Sterols and fatty acids in seafood. **Food Technology**. 39, 61-68, 1985.

Kumar, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. 45, 1–27, 2000.

Kunert J.; Stransky, Z. Thiosulfate production from cysteine by the prokaryote *Streptomyces fradide*. **Archives of Microbiology**. 150, 600-601, 1988.

Kunert, J. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. **Mycoses**. 35, 343-348, 1992.

Kunioka, M.; Choi, H. J. Hydrolytic degradation and mechanical properties of hydrogels prepared from microbial poly(amino acids). **Polymer Degradation and Stability**. 59, 33-37, 1998.

Kuntz, I. D. Hydration of macromolecules. III. Hydration of polipeptides. **Journal of the American Chemical Society**. 93, 514-526, 1971.

Kurniawan, L.; Qio, G. G.; Zhang, X. Q. Chemical modification of wheat protein-based natural polymers: grafting and cross-linking reactions with poly(ethylene oxide) diglycidyl ether and ethyl diamine. **Biomacromolecules**. 8, 2909-2915, 2007.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680-685, 1970.

Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M. Transformation of vegetable waste into value added products. **Bioresource Technology**. 87, 167-198, 2003.

Lederle, J. Enciclopédia moderna de higiene alimentar. São Paulo, Manole Dois, 1991.

Lee, K. P.; Choi, S. H.; Ryu, E. N.; Park, J. H.; Kim, Y. Preparation and characterization of cyclodextrin polymer and its high-performance liquid-chromatography stationary phase. **Analytical Science**. 18, 31-34, 2002.

Lee, W. F.; Yuan, W. Y. Thermoreversible hydrogels X: synthesis and swelling behavior of the (N-Isopropylacrylamide-co-sodium 2-acrylamido-2-methylpropyl sulfonate) copolymeric hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**. 77, 1760-1768, 2000.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Princípios de bioquímica. Sarvier, São Paulo, 1995.

Léonard, R.; Lhernould, S.; Carlué, M.; Fleurat, P.; Maftah, A.; Costa, G. Biochemical characterization of silene alba alpha4-fucosyltransferases and Lewis a products. **Glycoconjugate Journal**. 22, 71-78, 2005.

Li, H.; Liu, B. L.; Gao, L. Z.; Chen, H. L. Studies on bullfrog skin collagen. **Food Chemistry**. 84, 65-69, 2004.

Liaset, B.; Espe, M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**. 43, 42-48, 2008.

Liceaga-Gesualdo, A. M. e Li-Chan, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **Journal of Food Science**. 64, 1000-1004, 1999.

Lin, X.; Kelemen, D. W.; Miller, E. S.; Shih, J. C. Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. **Applied and Environmental Microbiology**. 61, 1469-1474, 1995.

Lin, X.; Inglis, G. D.; Yanke, L. J.; Cheng, K. J. Selection and characterization of feather degrading bacteria from canola meal compost. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**. 23, 149-153, 1999.

Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M.; Sergent, M.; Phan-Thau-Luu, R. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**. 60, 949-952, 1995.

Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. Functional properties of veal bone hydrolysates. **Journal of Food Science**. 61, 712-716, 1996.

Liu, J.; Chen, L.; Li, L.; Hu, X.; Cai, Y. Steady-state fluorescence study on release of camptothecin from agar hydrogel. **International Journal of Pharmaceutics**. 287, 13-19, 2004.

Lo, K. V.; Liao, P. H. Psychrophilic anaerobic digestion of screened dairy manure. **Energy in Agriculture**. 5, 339-345, 1986.

Lo, K. V.; Chen, W. Y.; Liao, P. H. Mesophilic digestion of screened dairy manure using anaerobic rotating biological contact reactor. **Biomass**. 9, 81-92, 1986.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193, 265-275, 1951.

Lu, G. H.; Chen, T. C. Application of egg white and plasma powders as muscle food binding agents. **Journal of Food Engineering**. 42, 147-151, 1999.

Lu, S., Duan, M. and Lin, S. Superabsorbent polymeric materials VIII: swelling behavior of crosslinked poly[sodium acrylate-co-trimethyl methacryloyloxyethyl ammonium iodide] in aqueous salt solutions. **Journal of Applied Polymer Science**. 79, 1665-1674, 2001.

Lucas, F. S.; Broennimann, O.; Febrabo, I.; Heeb, P. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**. 45, 282-290, 2003.

Luiten, E. E. M.; Akkerman, I.; Koulman, A.; Kamermans, P.; Reith, H.; Barbosa, M. J.; Sipkema, D.; Wijffels, R. H. Realizing the promises of marine biotechnology. **Biomolecular Engineering**. 20, 429-439, 2003.

Lundblad, R. L.; Noyes, C. M. Chemical reagents for protein modification. CRC Press, Boca Raton, FL, Vols. 1 and 2, 1984.

Luzia, L. A.; Sampaio, G. R.; Castellucci, C. M. N.; Torres, E. A. F. S. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. **Food Chemistry**. 83, 93-97, 2003.

Ma, C-Y. Functional properties of acylated oat proteins. **Journal of Food Science**. 49, 1128-1131, 1984.

Mackie, I. M. Fish protein hydrolysates. **Process biochemistry**. 17, 26-28, 1982.

Maldonado, A. S. Comparación de cuatro métodos para la recuperación de proteínas solubles eliminadas en la elaboración de surimi. Instituto Tecnológico Pesquero del Peru. Vol. 4, 1994.

Marcondes, N. K.; Taira, C. L.; Vandresen, D. C.; Svidzinski, T. I. E.; Kadowaki, M. K.; Peralta, R. M. New feather-degrading filamentous fungi. **Microbial Ecology**. 56, 13-17, 2008.

Marquez, V. M. L.; Neves, R. A. M.; Mira, N. V. M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24, 101-108, 2004.

Martin, A. M.; Porter, D. Studies on the hydrolysis of fish protein by enzymatic treatment. In: Charalambous, G. (ed), Food Flavours: Generation, **Analysis and Process Influence**. 1395-1404, 1995.

Martins, V. G.; Kalil, S. J.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V. Solid State Biosurfactant Production in a Fixed-bed Column Bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung**. 61 c, 721-726, 2006.

Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Prentice-Hernández, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**. 32, 61-66, 2009.

Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Silveira, S. T.; Brandelli, A.; Prentice-Hernández, C. Protein and amino acid solubilization using *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis*, and *Chryseobacterium* sp. from chemical extraction protein residue. **Food and Bioprocess Technology**. DOI: 10.0007/s11947-008-0168-5, 2009.

Matsushima, A.; Kodera, Y.; Hiroto, M.; Nishimura, H.; Inada, Y. Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2, 1-17, 1996.

McAfee, B. J.; Gould, W. D.; Nadeau, J. C.; Da Costa, A. C. A. Biosorption of metal ions using chitosan, chitin and biomass of *Rhizopus oryzae*. **Separation Science and Technology**. 36, 3207-3222, 2001.

Means, G. E.; Feeney, R. E. Chemical modification of proteins. Holden-Day, San Francisco, 1971.

Means, G. E.; Feeney, R. E. Chemical modifications of proteins: a review. **Journal of Food Biochemistry**. 22, 399-425, 1998.

Messinger, J. K.; Rupnow, J. H.; Zeece, M. G.; Anderson, R. L. Effect of partial proteolysis and succinylation on functionality of corn germ protein isolate. **Journal of Food Science**. 52, 1620-1624, 1987.

Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Chen, C. T.; Lai, J. Y. Adsorption of indomethacin onto chemically modified chitosan beads. **Polymer**. 43, 757-765, 2002.

Miller, A.; Parker, S. B. Collagen: the organic matrix of bone. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 304, 455-477, 1984.

Mitani, T.; Moriyama, A.; Ishii, H. Heavy metal uptake by swollen chitosan beads. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 56, 985-990, 1992.

Mocanu, G.; Vizitiu, D.; Carpov, A. Cyclodextrin polymers. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers.** 16, 315-342, 2001.

Montero, P.; Gómez-Guillén, M. C.; Borderías, A. J. Functional characterization of muscle and skin collagenous material from hake (*Merluccius merluccius L.*). **Food Chemistry.** 65, 55-59, 1999.

Montuelle, B.; Caillard, J.; Le Hy, J. B. A combined anaerobic-aerobic process for the co-treatment of effluents from a piggery and a cheese factory. **Journal of Agricultural Engineering Research.** 51, 91-100, 1992.

Moore, S. Amino acid analysis: aqueous DMSO as solvent for the ninhydrin reaction. **Journal of Biological Chemistry.** 243, 6281-6283, 1968.

Morales, J.; Montero, P.; Moral, A. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 48, 2142-2148, 2000.

Morimura, S.; Nagata, H.; Uemura, Y.; Fahmi, A.; Shigematsu, T.; Kida, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry,** 37, 1403-1412, 2002.

Morr, V.; German, B.; Kinsella, J. E.; Regenstein, J. M.; Van Buren, J. P.; Killara, A.; Lewis, B. A.; Mangino, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science.** 50, 1715, 1985.

Muniruzzaman, M.; Tabata, Y.; Ikada, Y. Complexation of basic fibroblast growth factor with gelatin. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.** 9, 459-473, 1998.

Munjeri, O.; Collett, J. H.; Fell, J. T. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery : the role of chitosan in modifying drug release. **Journal of Controlled Release.** 46, 273-278, 1997.

Muyonga, J. H.; Cole, C. G. B.; Duodu, K. G. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**. 85, 81-89, 2004.

Nagahara, S.; Matsuda, T. Hydrogel formation via hybridization of oligonucleotides derivatized in water-soluble vinyl. **Polymer Gels and Networks**. 4, 111-127, 1996.

Nagai, T.; Suzuki, N. Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fin. **Food Chemistry**. 68, 277-281, 2000.

Nagai, T.; Izumi, M.; Ishii, M. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **International Journal of Food Science and Technology**. 39, 239-244, 2004.

Nam, G. W.; Lee, D. W.; Lee, H. S.; Lee, N. J.; Kim, B. C.; Choe, E. A.; Hwang, J. K.; Suhartono, M. T.; Pyun, Y. R. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**. 178, 538-547, 2002.

Nam, K.; A. You, S. G.; Kim, S. M. Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. **Food Chemistry**. 73, C249-C255, 2008.

Narayana, K.; Rao, N. Effect of acetylation and succinylation on the functional properties of winged bean (*Prosopis carpus tetragonolobus*) flour. **Journal of Food Science**. 49, 547-550, 1984.

Neves, R. A. M.; Mira, N. V. M.; Marquez, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24, 101-108, 2004.

Ng, W. J.; Chin, K. K. Random packed anaerobic filter in piggery wastewater treatment. **Biological Wastes**. 20, 157-166, 1987.

Nielsen, P. M. Functionality of protein hydrolysates. In: Damodaran, S.; Paraf, A., editors. Food proteins and their applications. Marcel Dekker Inc., 1997.

Nielsen, P. M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**. 66, 642-646, 2001.

Nilsang, S.; Lertsiti, S.; Suphantharika, M.; Assavanig, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**. 70, 571-578, 2005.

Nolsoe, H.; Undeland, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. **Food and Bioprocess Technology**. 2, 1-27, 2008.

Normah, I.; Jamilah, B.; Saari, N.; Yaakob, B. C. M. Optimization of hydrolysis conditions for the production of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by Alcalase. **Journal of Muscle Foods**. 16, 87-102, 2005.

Noval, J. J.; Nickerson, W. J. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. **Journal of Bacteriology**. 77, 251-263, 1959.

Nozaki, Y.; Tanford, C. Acid-base titrations in concentrated guanidine hydrochloride: dissociation constants of the guanidinium ion and of some amino acids. **Journal of the American Chemical Society**. 89, 736-749, 1967.

Ogawa, M.; Maia, E. L. Manual de Pesca. São Paulo. Livraria Varela, 1999.

Ohba, R.; Deguchi, T.; Kishikawa, M.; Arsyad, F.; Morimura, S.; Kida, K. Physiological functions of enzymatic hydrolysates of collagen or keratin contained in livestock and fish waste. **Food Science and Technology Research**. 9, 91-93, 2003.

Okuyama, Y.; Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y. Swelling controlled zero order and sigmoidal drug release from thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-butyl methacrylate) hydrogel. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**. 4, 545-556, 1993.

Onifade, A. A.; Al-Sane, N. A.; Al-Musallam, A. A.; Al-Zarban, S. Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**. 66, 1-11, 1998.

Onodenaloro, A. C.; Shahidi, F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**. 5, 43-59, 1996.

Oplatka, A.; Yonath, J. Mechanochemical melting of collagen fibers. II. Diffusion-controlled contractions. **Biopolymers**. 6, 1147-1158, 1968.

Pal, K.; Banthia, A. K.; Majumdar, D. K. Hydrogels for biomedical applications: a short review. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**. 2007.

Panyukov, S.; Rabin, Y. Volume transitions, phase separation, and anisotropic surface phases in charged gels. **Macromolecules**. 29, 8530-8537, 1996.

Papadopoulos, M. C.; El-Boushy, A. R.; Roodbeen, A. E.; Ketelaars, E. H. Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Science Technology**. 14, 279-290, 1986.

Pardi, M. C.; Santos, I. F.; Pardi, H. S. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: Editora UFG, 2001.

Park, K. Enzyme-digestible swelling hydrogels as platforms for long-term oral drug delivery: synthesis and characterization. **Biomaterials**. 9, 435-441, 1988.

Park, K.; Shalaby, W. S. W.; Park, H. Biodegradable hydrogels for drug delivery, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993.

Park, S. E.; Nho, Y. C.; Lim, Y. M.; Kim, H. Preparation of pH-sensitive poly(vinyl alcohol-g-methacrylic acid) and poly(vinyl alcohol-g-acrylic acid) hydrogels by gamma ray irradiation and their insulin release behavior. **Journal of Applied Polymer Science**. 91, 636-643, 2004.

Park, T. G.; Hoffman, A. S. Synthesis and characterization of pH-and/or temperature sensitive hydrogels. **Journal of Applied Polymer and Science**. 46, 659-664, 1992.

Park, S-C.; Yoo, N. C.; Kim, J-Y.; Park, H. K.; Chae, B. J.; Shin, S. Y.; Cheong, H.; Park, Y.; Hahm, K-S. Isolation and characterization of an extracellular antimicrobial protein from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 9647-9652, 2008.

Parry, D. A. D.; North, A. C. T. Hard  $\alpha$ -keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**. 123, 67-75, 1998.

Paulson, A. T.; Tung, M. A. Emulsification properties of succinylated canola protein isolate. **Journal of Food Science**. 53, 817-820, 1988.

Peppas, N. Hydrogels in medicine. Boca Raton, FL.: CRC, Press, 1985.

Peppas, N. A.; Mikes, A. G. Hydrogels in Medicine and Pharmacy Vol.1, CRC Press: Boca Raton, FL, 1986.

Pérez-Mateos, M.; Amato, P. M.; Lanier, T. C. Gelling properties of Atlantic croaker surimi processed by acid or alkaline solubilization. **Journal of Food Science**. 69, FCT328-FCT333, 2004.

Petersen, B. R. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Technology**. 58, 96-99, 1994.

Pezoa, V. G.; Mellado, M. S. Estudo das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de extratos dos componentes do aparelho digestivo da corvina (*Micropogonias furnieri*) e da castanha (*Umbrina canosa*). Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado. Editora FURG, p. 5-38, Rio Grande, 1979.

Pfleiderer, G. Chemical modifications of proteins. In Modern Methods in Protein Chemistry (H. Tschesche, ed.) Walter de Gruyter, Berlin, 1985.

Pigott, G. M. Enzyme modifications of fishery byproducts, in Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products, AVI Publishing Company, Westport, CT, 1982.

Pillay, T. V. R. Aquaculture and the Environment. London: Blackwell Scientific Publications, 26-45, 1991.

Ponnampalam, R.; Goulet, G.; Amiot, J.; Chamberland, B.; Brisson, G. Some functional properties of acetylated and succinylated oat protein concentrates and a blend of succinylated of oat protein and whey protein concentrates. **Food Chemistry**. 29, 109-118, 1988.

Pourjavadi, A.; Amini-Fazl, M. S.; Hosseinzadeh, H. Partially hydrolyzed crosslinked alginate-graft-polymethacrylamide as a novel biopolymer-based superabsorbent hydrogel having pH-responsive properties. **Macromolecular Research**. 13, 45-53, 2005.

Pourjavadi, A.; Kurdtabar, M.; Mahdavinia, G. R.; Hosseinzadeh, H. Synthesis and super-swelling behavior of a novel protein-based superabsorbent hydrogel. **Polymer Bulletin**. 57, 813-824, 2006.

Qin, V. The chelating properties of chitosan fibers. **Journal of Applied Polymer Science**. 49, 727-731, 1993.

QMCWEB. Revista eletrônica do departamento de química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. [www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/proteinas.html](http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/proteinas.html), acessado em novembro de 2008.

Rajapopal, K.; Schneider, J. P. Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. **Current Opinion in Structural Biology**. 14, 480-486, 2004.

Ramnani, P.; Singh, R.; Gupta, R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1 structural and biochemical mechanism of feather degradation. **Canadian Journal of Microbiology**. 51, 191-196, 2005.

Rathna, G. V. N.; Damodaran, S. Swelling behavior of protein-based superabsorbent hydrogels treated with ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**. 81, 2190-2196, 2001.

Rathna, G. V. N.; Damodaran, S. Effect of nonprotein polymers on water-uptake properties of fish protein-based hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**. 85, 45-51, 2002.

Rathna, G. V. N.; Gunasekaran, S. Functionally-modified egg white albumen hydrogels. **Polymer International**. 53, 1994-2000, 2004.

Rebeca, B. D.; Pena-Vera, M. T.; Diaz-Castaneda, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value. **Journal of Food Science**. 56, 309-314, 1991.

Reeves, W. G.; Damay, E. C.; Hamilton, W. L.; Hansen, P. A.; Lindon, J. N.; Sorebo, H. A. Process for preparing superabsorbent-containing composites. Patente dos Estados Unidos 6376011, 2002.

Regenstein, J. M.; Jauregui, C. A.; Baker, R. The effect of pH, polyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscle. **Journal of Food Biochemistry**. 8, 123-131, 1984.

Reguly, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos. Pelotas. Ed. Universitária, 1983.

Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Cavalcanti, O. A.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Synthesis and characterization of pH-responsive hydrogels based on chemically modified Arabic gum polysaccharide. **Polymer**. 47, 2023-2029, 2006.

Richardson, T.; Hyslop, D. B. Enzymes, in Food Chemistry, 2nd ed. Fennema, O. R. Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1984.

Riffel, A.; Lucas, F.; Heeb, P.; Brandelli, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**. 179, 258-265, 2003.

Riffel, A.; Brandelli, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**. 37, 395-399, 2006.

Riffel, A.; Brandelli, A.; Bellato, C. M.; Souza, G. H. M. F.; Eberlin, M. N.; Tavares, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**. 128, 693-703, 2007.

Rissen, S.; Antranikian, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. Nov., a novel thermophilic anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**. 5, 399-408, 2001.

Røkaeus, S.; Undeland, I. Production of protein isolates from whole and gutted herring (*Clupea harengus*) using a pH shift method. Lisboa, Portugal, WEFTA, 2007.

Sachindra, N. M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N. S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**. 26, 1092-1098, 2006.

Sadeghi, M.; Hosseinzadeh, H. Synthesis of starch-poly(sodium acrylate-co-acrylamide) superabsorbent hydrogel with salt and pH-responsiveness properties as a drug delivery system. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 23, 381-404, 2008.

Sadowska, M.; Kolodziejska, I.; Niecikowska, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**. 81, 257-262, 2003.

Salas, A. B. Gelificación de las proteínas do pescado. In: Curso de Capacitación, Surimi. Callao: Instituto Tecnológico Pesquero del Peru, 2001.

Sales, M. R.; Cavalcanti, M. T. H.; Lima Filho, J. L.; Motta, C. M. S.; Porto, A. L. F. Utilização de penas de galinha para a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43, 285-288, 2008.

Sanchez, E. P.; Monroy, O.; Canizares, R. O.; Travieso, L.; Ramos, A. A preliminary study of piggery waste treatment by an upflow sludge bed anaerobic reactor and a packed bed anaerobic reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**. 62, 71-76, 1995.

Sangali, S.; Brandelli, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**. 89, 735-743, 2000.

Sangali, S.; Brandelli, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 87, 17-24, 2000.

Santos, R. M. D. Firmino, A. A. P.; Sá, C. M.; Felix, C. R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**. 33, 364-370, 1996.

Santos, S. D. Obtenção e avaliação de hidrolisado enzimático obtido a partir de pescado de baixo valor comercial. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

Santos, S. D.; Martins, V. G.; Salas-Melado, M.; Prentice-Hernández, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, 32, 72-77, 2009.

Sathivel, S. Functional and nutritional-enhancing protein isolates from Arrowtooth Flounder. Annual Meeting – Chicago. University of Alaska. Chicago, 2003.

Schild, H. G. Poly(n-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. **Progress in Polymer Science**. 17, 163-249, 1992.

Schmandke, N.; Maune, R.; Scuhmann, S.; Schultz, M. Contribution to the characterization of acetylated protein fractions of *Vicia faba* in view of their functional properties. **Die Nahrung**. 25, 99-109, 1981.

Schreiber, M. M.; Hickman, M. V.; Vail, G. D. Starch-encapsulated atrazine: efficacy and transport. **Journal of Environment Quality**. 22, 443-453, 1993.

Schrooyen, P. M. M.; Dijkstra, P. J.; Oberthur, R. C.; Bantjes, A.; Feijen, J. Partially carboxymethylated feather keratins. Thermal and mechanical properties of films. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 49, 221-230, 2001.

Scopes, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**. 59, 277-282, 1974.

Seidel, C.; Kulicke, W.M.; Heb, C.; Hartmann, B.; Lechner, M; D.; Lazik, W. Influence of the cross-linking agent on the gel structure of starch derivatives. **Starch/Stärke**. 53, 305-310, 2001.

Senaratne, L. S.; Park, P-J.; Kim, S-K. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**. 97, 191-197, 2006.

Sgarbieri, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações. Ed. Varela. São Paulo, 1996.

Sgarbieri, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 32, 105-126, 1998.

Shahidi, F.; Han, X-Q.; Synowiccki, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**. 53, 285-293, 1995.

Shibayama, M.; Tanaka, T. Volume phase transition and related phenomena of polymer gels. In K. Dusek (Ed.). **Advances in polymer science**. 109, 1-62, 1993.

Shibayama, M.; Morimoto, M.; Nomura, S. Phase separation induced mechanical transition of poly(n-isopropylacrylamide) water isochore gels. **Macromolecules**. 27, 5060-5066, 1994.

Shih, J. C. H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization a review. **Poultry Science**. 72, 1617-1620, 1993.

Shih, I. L.; Van, Y. T. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**. 79, 207-225, 2001.

Sikorski, Z.E. Tecnología de los productos del mar. Zaragoza: Acribia, 1990.

Silva, J. B.; Bora, P. S.; Neto, V. Q. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D. C.) modificado por acetilação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 17, 263-269, 1997.

Skanderby, M. Protein hydrolysates: their functionality and applications. **European Food Technology International**. 10, 141-144, 1994.

Slizyte, R.; Dauksas, E.; Falch, E.; Storro, I.; Rustad, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhus*) by-products. **Process Biochemistry**. 40, 2021-2033, 2005.

Solanki, K.; Shah, S.; Gupta, M. N. Chemical modification of alpha-chymotrypsin for obtaining high transesterification activity in low water organic media. **Biocatalysis and Biotransformation**. 26, 258-265, 2008.

Spinelli, J.; Koury, B.; Miller, R. Approaches to the utilization of fish for the preparation of protein isolates; enzymatic modification of myofibrillar fish proteins. **Journal of Food Science**. 37, 604-608, 1972.

Spinelli, J.; Dassow, J. A. Fish proteins: their modification and potential uses in the food industry, in Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products. AVI Publishing Company, Westport, CT, 1982.

Šubr, V.; Duncan, R.; Kopeček, J. Release of macromolecules and daunomycin from hydrophilic gels containing enzymatically degradable bonds. **Journal of Biomaterials Science Polymers**. 1, 261-278, 1990.

Suh, H. J.; Lee, H. K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. **Journal of Protein Chemistry**. 20, 165-169, 2001.

Suzuki, T. Tecnología de las proteínas de pescados y krill. Zaragoza: Acribia, 1987.

Swatschek, D.; Schatton, W.; Kellermann, J.; Muller, W. E. G.; Kreuter, J. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface—pH, moisture and sebum. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 53, 107-113, 2002.

Synowiecki, J. e Al-Khateeb, N. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**. 68, 147-152, 2000.

Tabilo-Munizaga, G.; Barboza-Canovas, G. V. Color and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white. **Food Research International**. 37, 767-775, 2004.

Takami, H.; Akiba, T.; Horikoshi, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 30, 120-124, 1989.

Tatterson, I. N.; Windsor, M. L. Fish silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 25, 369-379, 1974.

Tavares, J. F. P.; Baptista, J. A. B.; Marcone, M. F. Milkcoagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. **International Journal of Food Science and Nutrition**. 48, 169-176, 1997.

Thiansilakul, Y.; Benjakul, S.; Shahidi, F. Composition, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). **Food Chemistry**. 103, 1385-1394, 2007.

Thys, R. C. S.; Lucas, F. S.; Riffel, A.; Heeb, P.; Brandelli, A. Characterization of a protease of a feather degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**. 39, 181-186, 2004.

Tsai, H-S.; Wang, Y-Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. **Polymer Bulletin**. 60, 103-113, 2008.

Undeland, I.; Kelleher, S. D.; Hultin, H. O. Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 7371-7379, 2002.

Urry, D. W. Elastic molecular machines in metabolism and soft-tissue restoration. **Trends in Biotechnology**. 17, 249-257, 1999.

Vandermeulen, G. W.; Klok, H. A. Peptide/protein hybrid materials: enhanced control of structure and improved performance through conjugation of biological and synthetic polymers. **Macromolecular Bioscience**. 4, 383-398, 2004.

Vervoort, L.; Van den Mooter, G.; Augustijns, P.; Busson, R.; Toppet, S.; Kinget, R. Inulin Hydrogels as Carriers for Colonic Drug Targeting: I. Synthesis and Characterization of Methacrylated Inulin and Hydrogel Formation. **Pharmaceutical Research**. 14, 1730-1737, 1997.

Vezzulli, L.; Marrale, D.; Moreno, P.; Fabiano, M. Sediment organic matter and meiofauna community response in long-term fish-farm impact in the Ligurian Sea (*Western Mediterranean*). **Chemistry Ecology**. 19, 431-440, 2003.

Vieille, C.; Zeikus, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular and Biology Reviews**. 65, 1-43, 2001.

Viera, G. H. F.; Martin, A. M.; Saker-Sampaio, S.; Omar, S.; Gonçalves, R. C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 69, 61-65, 1995.

Vignardet, C.; Guillaume, Y. C.; Michel, L.; Friedrich, J.; Millet, J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**. 224, 115-122, 2001.

Voet, D.; Voet, J. G. Three-dimensional structure of proteins. In: Stietel J(ed) *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edn. Wiley. New York, 154-156, 1995.

Wang, J. C.; Kinsella, J. E. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. **Journal of Food Science**. 41, 286-292, 1976.

Wang, L.; An, X.; Yang, F.; Xin, Z.; Zhao, L.; Hu, q. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). **Food Chemistry**. 108, 616-623, 2008.

Wasswa, J.; Tang, J.; Gu, X. H.; Yuan, X. Q. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Food Chemistry**. 104, 1698-1704, 2007.

Watanabe, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63, 520-526, 2004.

Weinhold, B. J.; Sadeghi, A. M.; Gish, T. J. Organic chemicals in the environment: effect of starch encapsulation and temperature on volatilization of atrazine and alachlor. **Journal of Environment Quality**. 22, 162-166, 1993.

Werlang, P. O.; Brandelli, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 120, 71-80, 2005.

West, J. L.; Hubbell, J. A. Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration. **Macromolecules**. 32, 241-244, 1999.

Wichterle, O.; Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**. 185, 117-118, 1960.

Widder, K. J.; Green, R. Drug and enzyme targeting. Part A: Methods of Enzymology. Vol. 112. Academic Press, London, 1985.

Williams, C. M.; Richter, C. S.; Mackenzie, J. M.; Shih, J. C. H. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. **Applied and Environment Microbiology**. 56, 1509-1515, 1990.

Xu, C.; Kopecek, J. Self-assembling hydrogels. **Polymer Bulletin**. 58, 53-63, 2007.

Yamaguchi, S.; Yokoe, M. A. Novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. Nov. a newly isolated bacterium from soil. **Applied Environmental and Microbiology**. 66, 3337-3343, 2000.

Yamamura, S.; Morita, Y.; Hasan, Q.; Rao, S. R.; Murakami, Y.; Yokoyama, K.; Tamiya, E. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 93, 595-600, 2002.

Yamamura, S.; Morita, Y.; Hasan, Q.; Yokoyama, K.; Tamiya, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 294, 1138-1143, 2002.

Yeannes, M. I.; Almandos, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content. **Journal of Food Composition and Analysis**. 16, 81-92, 2003.

Yoshimura, K.; Terashima, M.; Hozan, D.; Shirai, K. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali solubilized collagen from shark skin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 48, 685-690, 2000.

Zaghloul, T. I. Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (*aprA*) gene showing high level of keratinolytic activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 70/72, 199-205, 1998.

Zhang, J.; Yuan, K.; Wang, Y. P.; Shen-Tang Zhang, S. T.; Zhang, J. Preparation and pH responsive behavior of poly(vinyl alcohol) – chitosan- poly(acrylic acid) full-IPN hydrogels. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 22, 207-218, 2007.

Zhang, R.; Tang, M.; Bowyer, A.; Eisenthal, R.; Hubble, J. A novel pH and ionic-strength sensitive carboxy methyl dextran hydrogel. **Biomaterials**. 26, 4677-4683, 2005.

Zhang, S. Emerging biological materials through molecular self-assembly. **Biotechnology Advances**. 20, 321-339, 2002.

Zhang, S-P.; Ping, W. Chemical modification of enzymes – an important tool to enhance the performance of biocatalysts. **Shengwu Jiagong Guocheng**. 4, 4-8, 2006.



## **9 ANEXOS**

### **9.1 Artigos publicados**

#### **9.1.1 Artigo 1 publicado na Revista Química Nova**













### **9.1.2 Artigo 2 publicado na Revista Food and Bioprocess Technology**

