

**ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA**

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E ANÁLISE BROMATOLÓGICA E  
MICROBIOLÓGICA EM HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUOS  
DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO**

Recife-PE

2013



**APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E ANÁLISE BROMATOLÓGICA E  
MICROBIOLÓGICA DO HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUOS  
DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO**

**Andreia Cybelle Marques Ferreira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura  
da Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
como pré-requisito para obtenção do grau Mestre  
em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

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

Recife-PE

2013

Ficha catalográfica

F383a Ferreira, Andreia Cybelle Marques

Aplicação de métodos de conservação e análise bromatológica e microbiológica do hidrolisado proteico obtido a partir de resíduos do processamento de tilápia *Oreochromis niloticus* em diferentes temperaturas de armazenamento / Andreia Cybelle Marques Ferreira. – Recife, 2013.

76 f. : il.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca, Recife, 2013. Inclui referências e anexo(s).

1. Hidrolisado 2. Tilápia 3. Conservação I. Bezerra, Ranilson de Souza, orientador II. Título

CDD 639.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E**  
**AQUICULTURA**

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E ANÁLISE BROMATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DO HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE TILÁPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO**

**ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura** e aprovada em 22/02/2013 pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, em sua forma final. A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA** como **APROVADA COM DISTINÇÃO**.

---

COORDENADORA DO PPG-RPAq  
Profª. Dra. Flávia Lucena Frédou

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra - Orientador  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia - Membro interno  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profª. Dra: Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – Membro externo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Helane Maria da Costa - Membro externo  
Universidade Federal de Pernambuco

## **Dedicatória**

A minha mãe, Inalva Marques Ferreira

## **Agradecimentos**

A Deus que tudo me fornece e aos anjos que me acompanham

A minha família, a base da minha vida

Ao Professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela oportunidade concedida e orientação deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa

A Professora. Dra: Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo que de imediato se disponibilizou a nos auxiliar e a otimizar este trabalho

Ao Professor Eudes Correia, que sempre esteve disponível a tirar minhas dúvidas

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia (LABENZ): Augusto, Caio, Douglas, Fábio, Flávia, Guilherme, Helane, Janilson, Juliana, Juliett (em especial, companheira de toda pesquisa curricular e extra) Karoll, Kelma, Ian, Marina, Mirella, Raquel, Renata, Robson, Paula, Suzan, Thiago, Vagne, Werlayne e em especial as meninas da iniciação, Renata, Milena, Lidiane, Nathália. Enfim, a todos que até mesmo contando uma piada me auxiliaram de alguma forma na conclusão deste trabalho.

Aos colegas da turma de Recursos Pesqueiros e Aquicultura

Aos técnicos e funcionários da UFPE e UFRPE.

## Resumo

A tilápia *Oreochromis niloticus* é uma das espécies mais amplamente cultivadas e o filé é o principal produto de venda correspondente entre 30 e 40% do peso do animal, sendo o restante considerado resíduo, quando descartado, representam um problema ambiental. Estes subprodutos são ricos em proteína e a produção do HPP (hidrolisado protéico de peixe) é uma alternativa utilizada a que se destinam estes resíduos. O presente estudo tem por objetivo investigar a eficácia de diferentes métodos de conservação na eliminação de microorganismos patogênicos e deteriorantes em hidrolisado de proteína de peixe obtido a partir dos subprodutos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os HPP foram submetidos à esterilização por calor seco, calor úmido, acidificação (ácido cítrico), irradiação gama e estudado em diferentes temperaturas de armazenamento. Análises microbiológicas foram realizadas através da contagem de microorganismos mesófilos e psicrotróficos e da pesquisa de patógenos e deteriorantes. Os hidrolisados permaneceram livres de contaminação microbiológica durante 60 dias, com exceção do controle com valores de  $3,0 \times 10^7$  UFC/ml após 24 horas e do HPP Ácido cítrico 30 °C que atingiu  $5,0 \times 10^2$  UFC/ml após 9 dias de armazenamento. Os resultados das análises microbiológicas dos hidrolisados foram negativos para coliformes a 45 °C, Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella spp*, bolores e leveduras, e *Pseudomonas aeruginosa* com exceção dos HPP ácido cítrico 4 °C, ácido cítrico 30 °C e controle que apresentaram valores para bolores e leveduras de  $9,5 \times 10^3$  UFC/mL,  $2,5 \times 10^2$  UFC/mL e  $8,7 \times 10^2$  UFC/mL respectivamente. O conteúdo proteico e lipídico, na maioria do hidrolisados, não foi comprometido mediante estocagem. Os tratamentos realizados nos hidrolisados foram eficientes quanto a presença de microorganismos patógenos, estando garantido a segurança do alimento por 60 dias.

**Palavras-chave:** hidrolisado de peixe, refrigeração; irradiação; esterilização, acidificação

## **Abstract**

Tilapia *Oreochromis niloticus* is one of the most widely cultivated species and the fillet is the main product for sale corresponding between 30 and 40% of the animal weight, the remainder being considered residue when discarded represent a serious environmental. These by-products are high in protein and production of FPH (fish protein hydrolysed) represents an alternative for these residues. The present study aims to investigate the efficacy of different conservation methods in the elimination of pathogens and spoilage microorganisms in fish protein hydrolysate obtained from the by-products of tilapia (*Oreochromis niloticus*). The FPHs were subject at dry heat sterilization, moist heat, acidification (citric acid), gamma irradiation and studied at different storage temperatures. Microbiological analyzes were performed by count of mesophilics and psychrotrophics and search of pathogens and spoilage. The hydrolysates remained free of microbial contamination for 60 days, excepting the control showed values of  $3.0 \times 10^7$  CFU/ml after 24 hours and FPH citric acid 30 °C reached  $5.0 \times 10^2$  CFU/ml after 9 storage days. The results of microbiological analyses from hydrolysates treated by conservation methods were negative for coliforms at 45 °C, Coagulase-positive *staphylococci*, *Salmonella spp*, yeast and mold, and *Pseudomonas aeruginosa*, excepting the FPH citric acid 4 °C, citric acid 30 °C and control that showed  $9.5 \times 10^3$ ,  $1.5 \times 10^2$  and  $8.7 \times 10^2$  CFU/ml for yeast and mold respectively. The content of protein and lipid, in the most of the hydrolysates was not affected during storage. The treatments performed on hydrolysates were efficient in respect to the presence of pathogens confer food security by 60 days.

**Keywords:** fish hydrolysed, cooling, irradiation, sterilization, acidification



## Lista de figuras

Página

### Revisão de literatura

Figura 1 – Resíduos da filetagem de tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Foto (Ferreira, A.C.M.....	14
---	----

## Lista de tabelas

Página

### Artigo

Table 1: Total count of mesophilic microorganisms of FPHs stored at 30 °C.....44

Table 2: Total count of psychrotrophic microorganisms of samples FPH stored at 4 °C.....44

Table 3: Microorganisms in FPH control and FPH treated by different conservation methods after storage period.....45

Table 4. Chemical composition and calorific value of hydrolysates (g/100 g dry weight) after 24 hours.....45

Table 5 Chemical composition and calorific value of hydrolysates (g/100 g dry weight) after 60 storage days.....46

### Patente

Tabela 1: Pesquisas de microrganismos nos hidrolisados submetidos aos métodos de conservação.....70

## Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimento

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	13
3. Referências bibliográficas.....	22
4. Artigo Científico.....	27
4. 1. Artigo científico.....	27
4.2. Normas da revista Food Microbiology.....	46
5. Patente.....	62

## 1.Introdução

O aumento na demanda por produtos pesqueiros para consumo humano tem resultado num constante crescimento da produção aquícola mundial. De acordo com os dados da FAO (2012), em 2010 a aquicultura forneceu 59,9 milhões de toneladas de pescado, o que correspondeu a 40,3% da produção total. Em 2010, 20,2 milhões de toneladas da produção total foram utilizadas para fins não alimentares, dos quais 75% (15 milhões de toneladas) foram reduzidos a farinha de peixe e óleo de peixe. A farinha de peixe obtida a partir dos resíduos oriundos do processamento de filés, tem registrado um aumento percentual e cerca de 36% da produção mundial da farinha foi obtida a partir de resíduos de peixe em 2010 (FAO, 2012).

De acordo com os dados da FAO (2012), em 2010, a produção da aquicultura mundial foi dominada por peixes de água doce que representaram 56,4% (33,7 milhões de toneladas), sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) uma das espécies de peixe mais cultivadas no mundo. No Brasil, em 2010, a tilápia representou na aquicultura, aproximadamente 155.000 toneladas (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2012). A proporção de peixes de água doce cresceu consideravelmente nas últimas décadas, impulsionado principalmente pelo rápido desenvolvimento da tilápia do Nilo. A tilápia é o segundo grupo mais importante de peixes de cultivo seguido apenas das carpas, sendo assim uma das espécies mais amplamente cultivada (FAO, 2005, FAO, 2012). Este extenso cultivo, se deve, dentre outras características, à excelente performance em ganho de peso e fácil adaptação às diversas condições de cultivo e regiões do País (NOGUEIRA, 2007; FIGUEIREDO e VALENTE, 2008).

No Brasil, o aumento na produção da tilápia tem sido estimulado pela demanda de mercado, por sua boa aceitação pelos consumidores e pelos piscicultores que a estão produzindo nacionalmente, especialmente pela facilidade de cultivo, despertando com isto o interesse da indústria no beneficiamento deste peixe, onde o filé é o principal produto para

comercialização e os resíduos do processamento industrial constituem de 62,5 a 66,5% da matéria-prima descartada, sendo essencial o seu processamento para diminuir os impactos causados ao ambiente (BOSCOLO et al., 2005; SIMÕES et al., 2007).

Estes resíduos são fonte rica de proteína (carcaça) e enzimas digestivas (vísceras), dentre elas as proteases, utilizadas em processos biotecnológicos como a produção de hidrolisado proteico de peixe (HPP), que é obtido através da utilização desses resíduos resultando em um produto com boa qualidade nutricional e passível de substituição às farinhas de peixe em rações para organismos aquáticos. Com isto o HPP passa a ser uma alternativa para a indústria de rações e aquicultores, além de diminuir os impactos provocados pelos resíduos de pescados aos recursos naturais. Portanto, por ser uma fonte alternativa de proteína promissora, é extremamente relevante estudos detalhados referentes à conservação e vida de prateleira do HPP, uma vez que para obtermos um alimento seguro é importante que ele esteja livre de microorganismo patogênicos e deteriorantes. Com isto, este estudo tem por objetivo, determinar o perfil temporal microbiológico e químico do hidrolisado proteico peixe obtido a partir de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e submetidos a diferentes métodos de conservação.

## **2.Revisão de Literatura**

Anualmente são produzidas de 5 a 6 milhões de toneladas de farinha de peixe e óleo de peixe em todo mundo sendo 3,72 milhões de toneladas (12,8%) de farinha de peixe, produzidas em 2008 utilizada na aquicultura. O aumento no uso de farinha de peixe na alimentação aquícola, no período de 1995 até 2008 ocorreu devido à criação de animais terrestres, principalmente de porcos e aves, a qual sua utilização vem sendo reduzida gradualmente. Há uma previsão na qual embora exista um aumento na produção da aquicultura mundial, a utilização de farinha de peixe continuará com um decréscimo, atingindo 3.630.000 toneladas em 2015, sendo motivadas dentre outros pelo aumento do uso

de substitutos para a farinha de peixe na dieta mais eficaz do ponto de vista dos custos (FAO, 2012).

Nas últimas décadas, devido a uma maior consciência da possibilidade de escassez de farinha de peixe, tanto instituições de pesquisa como a própria indústria de alimentação aquícola, realizaram estudos buscando reduzir a dependência de farinha peixe. Além disso, sua qualidade, algumas vezes, duvidosa e o custo elevado do produto promovem limitações ao uso da farinha de peixe. (FARIA et al., 2001, FAO, 2012).

O crescimento da indústria de pescado tem gerado uma grande quantidade de resíduos e subprodutos (Figura 1) que representam um desafio para os empresários do setor e para a comunidade científica especializada, em buscar estratégias para que essa atividade seja sustentável e ecologicamente viável. Dentre as alternativas a que se destinam o aproveitamento de resíduos de peixes, como fertilizantes, produtos para consumo humano, são utilizados principalmente como parte integrante para compor a ração animal (BEZERRA et al., 2001; STEVANATO et al, 2007). Os hidrolisados protéicos de peixe obtidos a partir de vísceras de peixe estão sendo utilizados na alimentação animal e indústrias de alimentos para peixes, além de representar uma excelente alternativa para o incremento da oferta de proteína animal (FAO, 2010).



Figura 1 – Resíduos da filetagem de tilápia (*Oreochromis niloticus*) Foto (Ferreira, A.C.M.)

O hidrolisado proteico de peixe (HPP) é resultado da solubilização das proteínas do pescado. Estas proteínas podem ser obtidas a partir da utilização de ácidos e solventes orgânicos, ou ainda, ser catalisada por enzimas proteolíticas endógenas, ou seja, presentes no próprio peixe e/ou por enzimas de origem vegetal, animal ou microbianas adicionadas à matéria-prima (KRISTINSSON e RASCO, 2000; MARTONE et al., 2005). O processo de catalisação de enzimas proteolíticas endógenas consiste na quebra de longas cadeias de moléculas protéicas que resulta em frações solúveis e insolúveis. As frações insolúveis contêm proteínas não hidrolisadas e outros materiais insolúveis, já a fração solúvel é rica em proteínas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres. Este produto pode atingir um percentual de 90% de proteína, além de apresentar propriedades funcionais úteis para a indústria alimentícia (FURLAN e OETTERER, 2002).

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

A maioria das pesquisas realizadas com hidrolisados protéicos tem demonstrado tratar-se de uma excelente fonte de proteína, com bom valor nutritivo, podendo ser adicionado a rações para o consumo animal (BERGE e STOREBAKKEN, 1996), bem como na elaboração de rações para alimentação de organismos aquáticos (BEZERRA et al., 2006).

Diversas propriedades são atribuídas ao HPP na nutrição animal. Dentre elas a melhoria na digestibilidade do alimento para animais muito jovens; a elevada solubilidade, alto teor protéico e baixo teor de cinza, sendo esta última de extrema importância na fabricação de

produtos destinados à aquicultura (GOLDHOR e REGENSTEIN, 1988). Em geral, o HPP é destinado à alimentação animal e é de grande importância a inocuidade do mesmo. Para a obtenção de um alimento seguro é necessário que este esteja isento de microorganismos patogênicos e deteriorantes, os quais estando presentes poderão comprometer a qualidade nutricional do produto.

Todo alimento é passível de deterioração, desde a colheita, fabricação, processamento, armazenamento até chegar ao consumidor. A conservação sob o aspecto microbiológico consiste no processo de retardar a proliferação dos microorganismos com o controle de variáveis como a temperatura, o pH e a umidade (GOULD, 1996). Os peixes são degradados com maior rapidez do que as carnes. A rancificação e a contaminação por microorganismos, durante a fabricação e estocagem do pescado e seus subprodutos reduzem a vida de prateleira do produto, podendo ocasionar efeitos desagradáveis ao alimento (FORSYTHE, 2002; SETEVANATO et al, 2007).

Na degradação e putrefação do pescado dentre as bactérias que se encontram inseridas, estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, além de outras bactérias que podem ser identificadas como coliformes, *Salmonella*, *Staphylococcus* (OETTERER, 2002). Segundo Jay (2005), a biota bacteriana da deterioração do peixe consiste de bastonetes gram-negativos não-esporulados tipo *Pseudomonas* e *Acinetobacter-Moraxella*. Se o pescado não for eviscerado imediatamente, as bactérias do intestino vão logo para as paredes e cavidades intestinais com auxílio de enzimas proteolíticas endogênas. Segundo Forsythe (2002), mofos e leveduras apresentam maior resistência a baixas atividades de água e pHs ácidos se comparados as bactérias.

A qualidade higiênico-sanitária dos alimentos é avaliada através da presença de coliformes a 35°C, a 45°C, e *E. coli*, indicando a contaminação por material fecal. Níveis



elevados podem ser significativo de matéria-prima contaminada, limpeza e sanificação deficiente de equipamentos, contaminação pós-processamento, tratamento térmico ineficiente ou multiplicação durante o processamento ou estocagem. (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A legislação estabelece limites microbiológicos, estabelecendo contagem máxima para pescado de 102 NMP/g para contagem de coliformes fecais e ausência de *Salmonella*, sendo esta última classificada como perigo de severidade moderada (APPCC, 1998; SILVA e FILHO, 1999). Microbiologistas de alimentos definem como microorganismos psicotróficos, aqueles que podem crescer em temperaturas entre 0 °C e 7 °C e produzir colônias visualizadas dentro de 7 a 10 dias (JAY, 2005).

De acordo com Gould (1996) a deterioração microbiológica pode ser evitada ou inibida através de várias de técnicas de conservação como a refrigeração, congelamento, secagem, embalagem a vácuo, embalagem de atmosfera modificada, acidificação, fermentação e adição de conservantes, esterilização, pasteurização e irradiação. Esterilização é a eliminação de todos os microorganismos podendo ser avaliada através de técnicas de plaqueamento ou contagem, sendo um dos métodos de altas temperaturas utilizados na conservação de alimentos (JAY, 2005). Acidez e temperatura de esterilização são considerados fatores determinantes no controle do crescimento de bactérias produtoras de esporos, portanto podem ser usadas para satisfazer as exigências dos consumidores na conservação dos alimentos. São utilizadas altas temperaturas como método de conservação no controle do crescimento de fungos com intuito de desnaturar esporos, além de ácidos como o sórbico. Contudo alguns fungos criaram resistência ao ácido sórbico, podendo degradá-lo e produzir odor desagradável (FORSYTE, 2002).

Alguns ácidos orgânicos utilizados nas indústrias de alimentos podem ser inclusos nos alimentos como conservantes, os quais podem atuar como agentes antimicrobianos ou antioxidantes. Os ácidos orgânicos incluem os ácidos carbônicos, previnem o crescimento de

*Pseudomonas* em níveis menores que 5%, ácido acético, inibem o crescimento de muitas espécies de bactérias e em menor extensão fungos e leveduras; ácido propiônico, atua principalmente em fungos e leveduras, porém também apresenta ação contra algumas bactérias; ácido benzóico, atua como conservante antibacteriano ou antifúngico de alimento, sórbico que funciona como antimofa, ácido fórmico que atua principalmente em leveduras e bactérias como *Bacillus spec*, *E. coli* e *Salmonella* (FIORUCCI et al, 2002; FORSYTHE, 2002; BOROSKY, 2011).

O ácido cítrico atua no sequestro de metais de transição e pode ser utilizado sem limitações como conservante antimicrobiano para alimentos (GONÇALVES, 2011; FORSYTE, 2002). De acordo com Mosqueda-Melgar et.al, (2008), o ácido cítrico é uma molécula hidrofílica e o seu acesso ao interior das bactérias ocorre através de proteínas da membrana externa de Gram-negativas, ou através da camada de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas.

Entre as funções dos ácidos orgânicos, estão a produção de acidez que age como flavorizante e retarda a degradação enzimática. Atuam como agentes quelantes ligando-se a metais, prevenindo a oxidação (ADAMS, 1999). Agem diretamente como fortes inibidores do crescimento microbiano podendo ter uso na preservação de grãos e rações, sanitização da carne e como aditivo promotor de crescimento na ração (BELLAYER e SCHEUERMANN, 2004). Segundo Metri et al. (2006), os ácidos orgânicos também podem ser usados na elaboração de hambúrguer caprino defumado, ao utilizar solução de ácidos orgânicos no tratamento da carne obtiveram ao final todos os parâmetros bacteriológicos dentro dos padrões higiênico-sanitários.

A irradiação de alimentos é baseada na exposição dos mesmos embalados ou a granel, a doses de radiação ionizante durante um tempo ocasionando com este processo a prevenção do crescimento de bactérias devido aos danos causados nos seus DNAs (FORSYTE, 2002). Há a

formação de peróxido de hidrogênio durante o processo de irradiação que causa a destruição da célula bacteriana. Sendo considerada como um dos processos mais eficientes na redução de microrganismos em alimentos, pode ser usada para melhorar a segurança dos produtos alimentares, e prolongar suas vidas de prateleira (SILVA, 2000; JAVANMARD et al, 2006). Segundo Gonçalves (2011), para o pescado o uso de radiação ionizante estende sua vida de prateleira sob refrigeração.

Dentre as fontes de radiação ionizante que podem ser utilizadas irradiação de alimentos encontram-se  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ , raio-X produzidos por aparelhos que geram um feixe de energia de até 5MeV, elétrons produzidos por aparelhos com um nível de energia de até 10MeV. Contudo as energias obtidas dessas fontes não são suficientes para tornar o alimento radioativo. (CODEX STAN 106-1983, REV.1-2003; FORSYTE, 2002). A vantagem da radiação gama é que os elementos-fonte são subprodutos de fissão atômica ou resíduos de produtos atômicos constituindo a forma mais barata de radiação na conservação de alimentos, sendo o  $^{60}\text{Co}$  usado com mais frequência que o  $^{137}\text{Cs}$ .(JAY,2005; FORSYTE, 2002).

A dose de radiação é a quantidade de energia absorvida pelo alimento quando este atravessa um campo de radiação, podendo esta ser medida em *gray* (Gy). Sendo um *gray* equivalente a um joule de energia absorvida por quilograma de alimento submetido a irradiação. A dose máxima absorvida por uma alimento submetido à irradiação não deve exceder 10 kGy, exceto quando houver necessidade de alcançar uma finalidade tecnológica. (CODEX STAN 106-1983, REV.1-2003, FORSYTE, 2002)

Existe a tendência de utilização da combinação de diferentes métodos de conservação, como alimentos cozidos e congelados que proporcionam maior vida de prateleira. Atualmente em função da melhoria de segurança e qualidade dos alimentos estão aumentando o interesse de novas combinações de métodos de conservação. Com relação a fungos, o tratamento

térmico anterior a irradiação em geral resulta em um maior efeito antimicrobiano comparado com o aquecimento posterior (FORSYTHE, 2002; FARKAS,1990).

O resfriamento é a medida de controle mais importante para a qualidade do pescado fresco, incluindo a segurança microbiológica. O maior benefício do armazenamento refrigerado é o prolongamento de sua vida útil em bom estado, pela diminuição da taxa de deterioração (GONÇALVES, 2011). Segundo Jay (2005), temperaturas de refrigeração compreendem entre 0 °C e 7 °C. O crescimento microbiano pode ser adiado por temperaturas acima da de congelamento e em geral inibido por temperaturas abaixo da de congelamento. A causa disso é que todas as reações metabólicas dos microorganismos são catalisadas por enzimas e a taxa de reação catalisada enzimaticamente depende da temperatura, acarretando com seu aumento, um crescimento na taxa de reação.

Segundo a FAO, a indústria e as autoridades oficiais recorrem a testes microbiológicos ao peixe e produtos pesqueiros a fim de detectar bactérias patogênicas e conferir se o estado microbiológico desses produtos é satisfatório (FAO, 1997). Segundo Forsythe (2002), os microorganismos comumente utilizados como indicadores de segurança alimentar são coliformes, *E.coli*, Enterobactérias e Estreptococos fecais.

Há a necessidade do controle de qualidade dos produtos e subprodutos do pescado através de métodos químicos, microbiológicos e sensoriais (STEVANATO et al, 2007). Bueno-Solano et al (2009) estudando hidrolisado proteico em pó a partir de subprodutos de camarão obteve resultados das análises microbiológicas negativos para coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, fungos e *Pseudomonas*. A presença de microorganismos em um determinado produto alimentício indica a segurança para o consumo do produto. Para tanto é necessário determinar a vida de prateleira.

A vida de prateleira pode ser definida através da soma de análises microbiológicas e químicas de amostras dos alimentos coletadas durante um tempo de prateleira estimado. A determinação da vida de prateleira pode ser feita através da determinação e monitoramento direto, no qual amostras devem ser tomadas em intervalos de 20% do tempo de vida de prateleira estipulado e estocadas até sua qualidade torna-se inaceitável (FORSYTHE , 2002).

Segundo Gram e Huss (1996) a deterioração de produtos de pescado fresco e levemente conservados é causada por microorganismos e o tempo de degradação depende principalmente da temperatura de armazenamento e da espécie de peixe. O conhecimento do processo de deterioração e os organismos específicos, é essencial para um programa de garantia de qualidade de um produto, como também se os dados microbiológicos devem ser utilizados para preconizar o período de vida útil de um produto sob condições específicas (temperatura, embalagem).

### 3. Referências Bibliográficas

ADAMS, C. A. Nutricines. **Food components in Health and Nutrition**. Nottingham. Nottingham Univ. Press. 1999.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. **Palestra apresentada na Conferencia AVISUI 2004**. Florianópolis/SC, 2004. Disponível em: < [www.cnpsa.embrapa.br](http://www.cnpsa.embrapa.br)>. Acesso em: 26/05/11.

BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M.T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 3424-3430, 1997.

BERGE, G.M.; STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, v.145, p. 205-212, 1996

BEZERRA, R. S.; VIEIRA, V. L.; CARVALHO JR., L. B. Proteases no trato digestivo de peixes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.22, p. 46-49, 2001.

BEZERRA, R.S., SOUZA, D.B.; AMARAL, I.P.G.; CASTRO, P.F.; ESPÓSITO, T.S.; SANTOS, S.D.; CARVALHO JR , L.B. Propriedades e aplicações biotecnológicas das proteases de vísceras de peixes. **Aquaciência**, cap.18, p. 262-275, 2006.

BOROSKY, J.C. O Uso de Ácidos Orgânicos e Suas Particularidades na Produção Animal. **Trouw Nutrition Brasil**. 2011. Disponível em: <[www.cnpsa.embrapa.br](http://www.cnpsa.embrapa.br)>. Acesso em 26/05/11.

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

BUENO-SOLANO, C.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCÍA, R.; ADAN-BANTE, N.P.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, v. 112, p. 671–675, 2009.

CAC Codex STAN 106-1983 Normas Gerais do Codex para Alimentos Irradiados.1983.

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

DINIZ, F. M.; E A.M. MARTIN. Hidrolisado Protéico de Pescado. In OGAWA, M.; e MAIA, E. L. Manual de Pesca: Ciência e tecnologia do pescado. São Paulo. 1999. p.360-365

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma, 2012. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em 20 janeiro 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma, 2010. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em 15 maio 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oreochromis niloticus*. Roma, 2005. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em 25 abril 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Documento Técnico sobre as Pescas. No. 334. 176p. FAO, Roma, 1997. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em 15 maio 2011.

FARIA, A.C.E.A.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E.M.; SOARES, C.M. Farinha de peixe em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem tailandesa. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 903-908, 2001.

FARKAS, J. 1990 Combination of irradiation with mild heat: treatment. **Food Control**. 223-229.

FIGUEIREDO JUNIOR, C. A.; VALENTE JUNIOR, A. S. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. SOBER, 2008. Acre.

FIORUCCI. A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E.T.G. Ácidos orgânicos. **Química nova na escola**, n.15, p.6-10, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, 1996, 182p.

FURLAN, E. F.; E M. OETTERER. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista Ciência & Tecnologia** v 10, p 79-89. 2002.

GOLDHOR, S. H.; REGENSTEIN, J.M. U.S. fisheries products: a selective update and review. **Foodstuffs**, v. 60, p.14-16, 1988.



GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado**. São Paulo, 2011. 608p.

GOULD, G. W. **Methods for preservation and extension of shelf life**. Food Microbiology, v. 33, p. 51-64, 1996.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p 121-137, 1996.

JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, 2005, 711p.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO B. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, 131-139, 2000.

METRI, J.C.; ANDRADE, S.A.C.; MACHADO, E.C.L.; SHINOHARA, N.K.S.; BISCONTINI, T.M.B. Controle bacteriológico de carne caprina para elaboração de hambúrguer caprino defumado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.58, p.427-431, 2006.

MOSQUEDA-MELGAR, J., RAYBAUDI-MASSILIA, R.M., MARTIN-BELLOSO, O. Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. **Food Microbiology**, v. 25, p.479–491, 2008.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 383-387, 2005.

MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília-DF, 129p, 2012. Disponível em: < <http://www.mpa.gov.br/> >. Acesso em 13 novembro 2012.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba, RS, 200p, 2002.

SIMÕES, M. R.; RIBEIRO, C. F. A.; RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K. J.; MURR, F. E. X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.608-613, 2007.

SILVA, F.C.; FILHO, C.J.S. Sistemas de análises de riscos e controle de pontos críticos: In: OGAWA, M.; e MAIA, E. L. **Manual de Pesca: Ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo. 1999. p.188-200

STEVANATO, F.B., SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J.V. Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação. **Pubvet**, v.1, Art. 171, 2007.

## **4. Artigo Científico**

### **4. 1. Artigo científico**

Os resultados obtidos do trabalho experimental dessa dissertação são apresentados no artigo intitulado: Microbiological and chemical profile of fish protein hydrolysates obtained from tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing waste (manuscrito), que se encontra anexado.

Artigo científico a ser encaminhado a Revista [Food Microbiology, ISSN: 0740-0020] Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pelas referidas revistas (em anexo).

Microbiological and chemical profile of fish protein hydrolysates obtained from *Oreochromis niloticus* processing waste

Ferreira, A.C.M.<sup>a</sup>; Silva, J.F.X.<sup>a</sup>; Souza, K.S.<sup>a</sup>, Nascimento, R.M.<sup>a</sup>; Carneiro da Cunha, M.G.<sup>b</sup>; Bezerra, R.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratório de Enzimologia

Universidade Federal de Pernambuco-UFPE,

Av.Prof.Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária–CEP 50.670-420, Recife, PE – Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA,

Universidade Federal de Pernambuco-UFPE,

Av.Prof.Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária–CEP 50.670-420, Recife, PE – Brazil.

### ***Abstract***

The present study investigated the efficacy of different conservation methods in the elimination of pathogens and spoilage microorganisms in fish protein hydrolysate (FPH) obtained from tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing waste. The FPH were subjected to the following treatments: heat sterilization (Heater 30 °C, Autoclave 30 °C and Autoclave 4 °C), gamma irradiation (2,5 kGy, 5 kGy, 7 kGy at 4 °C), acidification (Citric acid 30 °C, Citric acid 4 °C ) and stored at temperatures of 30 °C and 4 °C. The FPH were monitored by microbiological analysis performed during storage through the total count of mesophilic and

psychrotrophic organisms. The presence of pathogenic and spoilage microorganisms was monitored through microbiological analysis after 60 storage days. The composition of protein, lipid, ash were evaluated after 24 hours and after 60 storage days. The samples remained free of microbial contamination for 60 days excepting the control and citric acid 30 °C that showed contamination after 24 hours and 9 days, respectively. The results of microbiological analyses from hydrolysates treated by different conservation methods were negative for coliforms at 45 °C, coagulase-positive *staphylococci*, *Salmonella spp*, yeasts and molds and *Pseudomonas aeruginosa* with the exception of the citric acid 4 °C, citric acid 30 °C and control that showed values for yeasts and molds of  $9.5 \times 10^3$  CFU/ml,  $1.5 \times 10^2$  CFU/ml and  $8.7 \times 10^2$  CFU/ml respectively. The content of protein and lipid, in the most of the FPH was not affected during storage. The absence of pathogenic bacteria and low total count of mesophilic and psychrotrophic confer security of product consumption for 2 months. The conservation methods used in this work exhibited a high level of hygiene and food safety.

Keywords: tilapia waste; conservation methods; enzymatic hydrolysis

## 1. Introduction

Fish Protein Hydrolysates (FPH) is a result of the solubilization of proteins in fish in which the protein is broken by digestive enzymes (Kristinsson & Rasco, 2000). The protein hydrolysates have seen several utilities in various industries like pharmaceuticals, human nutrition, animal nutrition, cosmetics (Bueno-Solano et al., 2009) and as a nutritional source in culture medium for bacteria growth (Martone, Borla & Sanchez, 2005). One of the most enzyme used for proteins hydrolysis is Alcalase, an alkaline bacterial protease produced from *Bacillus licheniformis*.being, it has been used by several authors in the hydrolysis of fish (Bhaskar et al, 2008). Guérard, Dufossé, De La Broise, and Binet (2001) used Alcalase to

produce FPH by tuna waste, and proved to be an efficient source of nitrogen for microbial growth.

Fish processing waste has been used to produce FPH, due a large amount of protein-rich byproducts from fishery industry were discarded or processed into fish meal of low quality, mainly by-products marine, which have high protein content with high proportions of essential amino acids (Córdova-Murueta, Navarrete-del-Toro, & García-Carreño, 2007). Byproducts by Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), one of the most cultivated freshwater fish in the world, have been identified as a potential alternative source of protein to produce FPH. According Clement and Lovell (1994), in the fillet processing the yielding is next to 40% of whole fish weight, and the waste represented about 60% (meat remains, head, skin, bones, scales and viscera), which are underutilized or discarded in the environment. Thus, these wastes can be used for the production of FPH and this product can be employed in human or animal feed.

One of the techniques to keep the stability and inhibited the growth of pathogenic bacteria in FPH is the he spray-drying (Abdul-Hamid, Bakar & Bee, 2002; Bueno-Solano et al., 2009), but the temperature employed can cause some effects on the quality of the final product. On the other hands, some techniques are applied to food preservation to prevent microbiological deterioration, e.g. refrigeration, freezing, drying, acidification, fermentation, addition of preservatives, sterilizing, pasteurizing and irradiation (Gould, 1996). However, there are no reports about the sterilization and storage of fish protein hydrolysate and these techniques could be employed to keep the conservation of FPH. Thus, this work aims to evaluate different methods of preservation and storage of fish protein hydrolysate in order to make viable its use by a longer period.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Material**

Byproducts (tilapia heads, meat remains, skin and bones) were donated by Noronha Pescados Ldt., a local fishery processing in Pernambuco State, Brazil. The materials were brought immediately to the laboratory on ice and washed in distilled water for 5 minutes at 4 °C, to remove insoluble particles and after manipulated under strict hygienic conditions to obtain a initially raw material free from pathogenic and spoilage microorganisms. The commercial protease (Alcalase®) used in enzymatic hydrolysis was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

### **2.2 Fish protein hydrolysate (FPH)**

The FPH was produced through hydrolysis with a commercial enzyme Alcalase® at 0.5% (m/v) adapted from the method described by Cahú et al. (2012). The clear carcass (200 g) and either 0.5% (m/v) Alcalase, was mixed together in an industrial blender to produce the FPH. The mixture was submitted to digestion in a water bath at 45 °C for 180 min at 250 rpm. After 180 min of hydrolysis, the temperature was raised to 100° C for 10 minutes to stop the reaction. The solid and liquid fractions were separated by filtration (mesh: 1 mm<sup>2</sup>) and the filtrate was defined as FPH.

### **2.3 Conservation methods**

The FPHs (in triplicate) were stored in sterilized glasses and subjected to different conservation (acidification, sterilization heat and gamma irradiation). After, the FPH subjected at acidification were stored at 30 °C; FPH subjected at sterilization heat were stored at 4 °C and 30°C and FPH subjected at gamma irradiation were stored at 4 °C. Only the FPH control (in triplicate) was not subjected to conservation method, it was stored at room temperature (approximately 30 °C).

### **2.3.1 Acidification**

The FPHs were acidified by adding 2.5% of citric acid and were stored at 4 °C (Citric Acid 4°C) and 30 °C (Citric Acid 30 °C).

### **2.3.2 Sterilization heat**

The FPHs were subjected at dry heat sterilization (150 °C / 2 hours) in a heater (TE 394 / 1 Tecnal) and stored at 30 °C (Heater 30 °C); moister heat (120 °C / 15min) in Autoclave Vertical Phoenix Lufanco, and stored at 30 °C (Autoclave 30 °C) and 4 °C (Autoclave 4 °C). All FPHs was added 2.5% citric acid as an additive as a coadjuvants conservation factor.

### **2.3.3 Gamma irradiation**

The FPHs were irradiated with cobalt-60 gamma irradiation (fonte gamma cell de <sup>60</sup>Co) in DEN (Departamento de Energia Nuclear) of UFPE, Pernambuco, Brazil. The doses were 2.5 kGy, 5 kGy and 7 kGy. Then these FPHs were stored at 4 °C.

## **2.4 Microbiological analyses**

Analysis of total mesophilic and psychotropic from FPHs was performed according to methodology Portuguese standard NP 4405 (2002). Specific microorganisms like (yeasts and molds, coliforms at 45 °C; coagulase-positive *staphylococci*; *Salmonella* spp and *Pseudomonas aeruginosa*) from FPHs were performed at the Laboratory of Experimental and Food Analysis, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco by the methods used by AOAC (1995) 997.02, 926.24, 975.55, 967.26 and SMWW, 9213 respectively.

### **2.4.1 Count of the total mesophilic and psychotropic microorganisms**

The FPHs (Heater 30 °C, Autoclave 30 °C, Autoclave 4 °C, Citric Acid 4 °C, 2.5 kGy, 5 kGy, 7 kGy) were monitored through microbiological analyzes performed at 0, 12, 24, 36,



48 and 60 days. The FPHs (Citric Acid 30 ° C) were monitored at 0, 2, 5 and 9 days and the FPHs (Control) were monitored at 0 and 1 day.

The assay was carried out by serial dilution 500 µL of FPHs samples with 950 (0.1% peptone water in 0.9% w/v NaCl solution) and homogenized under sterile conditions in safety biological cabin (Pachane Pc 410). Aliquots from 1 mL of each diluted sample was collected and inoculated into petri dishes in triplicate. In each petri dishes was added 15 ml of plate count agar (PCA) (Standard Methods Agar Acumedia). The samples were homogenized immediately through rotations of Petri dishes in order to obtain uniform dispersion of colonies. After complete solidification the Petri dishes, the FPHs that were submitted at 30 ° C treatment were incubated at 30 ° C for 48 hours in an heater (TE 394 / 1 Tecnal) for evaluation of mesophiles and the FPHs that were submitted at 4 ° C treatment were stored at 4 ° C for 10 days for analysis of psychrotrophic microorganism.

#### **2.4.2 Specific microorganisms**

Yeast and molds; coliforms at 45 °C, coagulase-positive *staphylococci*, *Salmonella spp* and *Pseudomonas aeruginosa* were evaluated after 60 days in the FPHs (Heater 30 °C, Autoclave 30 °C , Autoclave 4 °C , Citric acid 4 °C , 2.5 kGy , 5 kGy , 7 kGy); after 9 days in the FPH citric acid 30 °C and in 2 days in the FPH control.

#### **2.5 Proximate Chemical composition**

Analyses of proximate composition from FPHs were performed at the Laboratory of Experimental and Food Analysis, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco by the methods used by AOAC (1995). The following analyses were performed: moisture, carbohydrates, crude protein, ether extract, ash, fiber, calories.

### 3. Results

#### 3.1 Microbiological analyses

The presence of certain microorganisms in a food product indicates the consumption safety of the product. The initial loads of mesophiles in the control sample (FPH 30 °C) after twenty-four hours of storage was  $3.0 \times 10^7$  CFU/mL and in the FPH (Citric Acid 30 °C) after 2 th days was 10 CFU/mL; on the 9 the mesophilics was elevated to  $5,0 \times 10^2$  CFU/mL (Table 1).

The combination of conservation methods (acidification and cooling) was applied to the FPH (Citric Acid 4°C) and FPH (Autoclave 4 °C) and the results showed higher inhibitory effect on the growth of bacteria when compared to FPHs stored at 30 °C (Citric Acid 30 °C; Heater 30 °C and Autoclave 30 °C). The total count of psychrotrophic in FPH (Citric Acid 4°C) after 60 th days was  $2.5 \times 10^2$  CFU / mL. The cooling added citric acid at 2,5% was a important factor in the FPH conservation under microbiological point view (Table 2).

After the treatments performed in FPHs through heat sterilization (dry heat and moister heat), the total count of mesophilic and psychrotrophic of FPHs (Heater 30 °C, Autoclave 30 °C and Autoclave 4 °C) was not detected CFU / mL (Table 1, Table 2). These FPHs remained acceptable under microbiological point view by 60 days. The both methods of heat sterilization used in this study were efficient for the elimination of bacteria.

The FPHs subjected to gamma irradiation at doses of 2.5 kGy, 5 kGy and 7 kGy stored at 4 °C, showed no contamination in the total count of psychrotrophic microorganisms after 60 storage days (Table 2).

The Table 3 show the results of microbiological analyses from FPHs after 60 th days were negative for coliforms, yeast and molds, coagulase-positive *staphylococci*, *Salmonella* spp and *Pseudomonas aeruginosa* in the FPHs (Heater 30 °C, Autoclave 30 °C, Autoclave 4

°C, 2.5 kGy, 5 kGy, 7 kGy). However, after the same period the FPHs (Citric Acid 4 °C) showed values for yeast and molds of  $9.5 \times 10^3$  CFU/mL and after 10 th days the FPHs (Citric acid 30 °C) showed values for yeast and molds of  $2.5 \times 10^2$  CFU/mL. The FPH control (30° C) showed  $8.7 \times 10^2$  CFU / mL for yeast and molds after 24 hours storage. The FPHs treated by different methods of conservation remained free of pathogenic microorganisms for a period of 60 days. The efficiency of the conservation methods used and their bactericidal action were evaluated by searching for pathogens and spoilage microorganisms. The analyzes were performed after storage period predetermined through monitoring by the analysis of total count of mesophilic and psychrotrophic microorganisms

### 3.3 Proximate composition

The proximate compositions of FPHs were performed after 24 hours and after 60 days of storage. The analysis results are shown in Tables 4 and 5, respectively, expressed as dry matter.

The content of protein of all FPHs (Heater 30 °C; Autoclave 30 °C; Autoclave 4 °C; Citric acid 4 °C and Citric acid 30 °C) were lower than to the FPH control (67,42%). After 60 days of storage, observed a reduction in protein levels at the FPHs (Heater 30 °C; Citric acid 4 °C and Citric acid 30 °C). This reduction in the protein level suggests a possible initial deterioration of the FPHs by spoilage microorganisms.

The lipid content in the all FPHs (Heater 30 °C; Autoclave 30 °C; Autoclave 4 °C; Citric acid 4 °C and Citric acid 30 °C) were higher than the FPH control (22,90%). After 60 days of storage, observed a increase in the lipids at the FPHs (Heater 30 °C; Citric acid 4 °C and Citric acid 30 °C), while in FPHs (Autoclave 30 °C and Autoclave 4 °C) the lipids content decreased. The ash content was maintained within the range from 1.36 to 3.77% (table 4 and 5).

## 4. Discussion

### 4.1 Microbiological analyses

The contamination occurs due to failures in the handling and processing of fish that can happen from the collection, transport, or through contact surface and utensils as polyethylene boxes used for transporting fish. Eves, Turner, Yakupitiyage, Tongdee and Ponza (1995) reported an initial increase in population counts of mesophiles in the early days of frozen storage in tilapia. The results corroborate the count of mesophilic microorganisms found in the FPH control. However, Mbarki, Miloud, Selmi., Dhib and Sadoka (2009) found mesophiles, coliforms and *Staphylococcus* in the sample of mackerel fillet control, differing with results negative to staphylococci and coliforms in the samples from the control FPH.

Cooling is a critical factor in food preservation, being extremely important its application. The FPHs Citric acid stored at 4 ° C and 30 ° C were contaminated with molds and yeasts, remaining acceptable from the view point of microbiological by 60 and 9 days of storage respectively. This demonstrates that the isolated action of citric acid with concomitant refrigeration lack may interfere in prolonging the shelf life of the product. Bermudez-Aguirre and Barbosa-Cánovas (2013), used citric acid as a disinfectant for vegetables and the results showed that citric acid was not effective for the inactivation of *E. coli*. Similarly was observed in FPH Citric acid 30 °C contaminated by group coliform bacteria. Moreover, Ravishankar, Setty and Shetty (1992) obtained results which fish sausages prepared in conjunction the use of preservatives remained acceptable at 65 days stored at low temperature ( $2 \pm 1$  ° C), similar to results obtained in FPH Citric acid stored at 4 °C.

Citric acid is considered a weak acid although its action as antimicrobial preservative and legislation permits its use in foods without restrictions, its efficiency in view of extending

the useful life within the concentration used, in this study was limited. Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia and Martin-Belloso (2008), obtained a reduction of *E. coli* O157: H7 and *Salmonella Enteritidis* and inactivation of molds and yeasts for 91 days in melon and watermelon juices processed by HIPEF containing 2.0% and 1.5% citric acid, similarly as hydrolyzed sterilized by heat added citric acid 2.5%.

For the product conforms with standards of hygiene and food safety is necessary absence of pathogenic microorganisms thereby enabling their consumption. Eves, Turner, Yakupitiyage, Tongdee and Ponza (1995) found contamination by coliforms, fecal coliforms and *Salmonella* in tilapia immediately after being collected from the tanks. This result was similar with our analysis also negative for *Salmonella* in FPH control, differing only to coliforms at 45 °C, which were also negative. Bueno-Solano et al. (2009), obtained microbiological analysis negative to coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* and fungi in shrimp hydrolysed, similar to the results found in this study with the exception of mold contamination seen in some treatments. However, the total count of mesophilic was 1730 CFU / g similar only with the FPH control group that was contaminated by mesophilic bacteria.

The combination of conservation methods are being widely used due to the rigor and demands of consumers in relation to the consumption of healthy foods, and is most often more efficient regarding the elimination of microorganism. The hydrolysates subjected to moist heat sterilization, dry heat and irradiated combined with cooling were free of psychotropic bacteria and yeasts and molds as noted by Kilinc and Cakli (2005) as the absence of these microorganisms on sardines marinated pasteurized stored at 4 °C after 6 months storage. Gokoglu, and Cengiz Yerlikaya (2004), obtained 150 days storage at 4 °C in marinades sardine treated in solutions containing 2% or 4% acetic acid and 10% NaCl. These results were similar to results obtained in FPH maintained by 2.5% citric acid stored at 4 °C

which showed shelf life of 60 days. The hydrolysates treated by irradiation were efficient in the inhibition of microorganisms in all radiation doses fees, similar to that found by Javanmard, Rokni, and Bokaie Shahhosseini, (2006) and Mbarki, Miloud, Selmi,, Dhib and Sadoka (2009) in chicken beef and mackerel fillets.

#### 4.2 Chemical composition

The FPH (Autoclave 30 °C; Autoclave 4 °C; Citric acid 4 °C and Citric acid 30 °C) protein content (table 4 and 5) analyzed was lower than the values found by Bueno-Solano et al. (2009) who obtained an average of 50.44% in shrimp protein hydrolysates in liquid form and Abdul-Hamid, Bakar and Bee (2002) that measured 49.6% protein, in tilapia hydrolysate dried at 150 °C excepting Heater 30 °C after 24 hours. However, these values were lower than those obtained in FPH control after 24 hours its manufacture (67,42%), being similar to protein content of menhaden fish meal (64, 50%), NRC (1993) and *Merluccius Gayi peruanus* (63.12%) (Gomez, Lopez-Aceves, Ponce-Palafox, Gonzalez & Figueroa, 2008), the main protein source to feed aquatic organisms. Moreover, Eves, Turner, Yakupitiyage, Tongdee and Ponza (1995) obtained protein content 19.84% in tilapia and (Kilinc and Cakli, 2005) (21.93%) in pasteurized marinades sardine differing from Heater 30 °C, Autoclave 30 °C, Autoclave 4 °C, which showed higher protein levels (table 4 and 5).

The lipid content (table 4 and 5) in FPHs was higher than those found in *Prionotus punctatus* protein hydrolyzate (4.04%) produced by Zavareze et al. (2009), and protein hydrolysates of *Litopenaeus vannamei* (6.91%) (Silva, 2004), *Cragon cragon* (9.95%) (Synowiecki et al., 2000) and in pasteurized sardine *Sardina pilchardus* (1.32% ) (Kilinc and Cakli, 2005). Similar, additionally, there records the fat found in hydrolysates *Oreochromis mossambicus* (2.8%) (Abdul-Hamid, Bakar & Bee, 2002) and tilapia *Oreochromis niloticus* (1.65%) (Eves, Turner, Yakupitiyage, Tongdee & Ponza, 1995). This high level of lipids can be attributed to the carcass of the fish itself, used in the manufacture of FPHs.

With respect to ash content, all FPHs showed lower values than menhaden fishmeal (19.0%) as well as protein hydrolysates of shrimp (Silva, 2004) (8.10%) (Bueno-Solano et al., 2009) (12.14%), fish (Zavareze et al., 2009) (8.12%) and tilapia (Abdul-Hamid, Bakar & Bee, 2002) (8.65%). However, Eves, Turner, Yakupitiyage, Tongdee and Ponza (1995) (1.76%) obtained lower levels compared with most hydrolysates performed in the study currently. The higher the ash content, the higher the inorganic residue lower and the recovery of organic matter thus indicating the quality of products produced.

### **Conclusions**

Conservation methods applied in FPH were effective in inhibiting the growth or development of pathogenic microorganisms for 60 days of storage. The absence of pathogenic bacteria and low count of the total mesophilic and psychrotrophics confer security of food consumption for 2 months without presenting a health risk. Thus, most conservation methods used in this work exhibit a high level of hygiene and food safety.

## References

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

APHA, (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; 20th edition, American Public Health Association, Washington, DC.

Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V. (2013) Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, 29, 82 - 90.

Bhaskar, N., Benila,T., Radha, C., Lalitha, R.G. 2008. 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.

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

Cordova-Murueta, J. H., Navarrete-del-Toro, M. A., & Garcia-Carreno, F. L. (2007). Concentrates of fish protein from by catch species produced by various drying processes. *Food Chemistry*, 100, 05–711.



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

Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051–1059.

Gokoglu, N., Cengiz, E., Yerlikaya, P. (2004) Determination of the shelf life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Food Control*, 15, 1-4.

Gomez, M. G. U., López-Aceves, L. A., Ponce-Palafox, J. T., González, H. R., & Figueroa, J. L. A. (2008). Growth of Fresh-Water Prawn *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) Juveniles Fed Isoproteic Diets Substituting Fish Meal by Soya Bean Meal. *Brazilian archives of biology and technology*, 51, 57-65.

Gould, W.G. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *Food Microbiology*, 33, 51-64.

Javanmard, M., Rokni, N., Bokaie, S., Shahhosseini, G. (2006). Effects of gamma irradiation and frozen storage on microbial, chemical and sensory quality of chicken meat in Iran. *Food Control*, 17, 469 – 473.

Kilinc, B., Cakli, S. (2005). Determination of the shelf life of sardine (*Sardina pilchardus*) marinades in tomato sauce stored at 4 °C. *Food Control*, 16, 639–644.

Kristinsson, H.G., B. Rasco. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131-139.

Martone, C.B., Borla, O.P., & Sánchez. J.J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology*, 96, 383-387

Mbarki, R., Miloud, B. N., Selmi, S., Dhib, S., Sadoka, S. (2009). Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiology*, 26, 821–826.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martin-Belloso, O. (2008). Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiology* 25, 479–491.

Ravishankar, C.N., Setty T.M.R., Shetty, T.S. (1992) Method for the preparation of sausages of acceptable quality from Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) and their shelf-life at different storage temperatures. *Food Control*, 13, 144-148.

Silva, C.P. Composição nutricional e análise microbiológica do hidrolisado protéico de subprodutos de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2004.

Synowiecki, J., & Al-khateeb, N.A.A.Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon Crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152.

Vidotti, R. M., Macedo-Viegas, E. M., & Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, 105, 199–2004

Zavareze, E. R., Silva, C.M., Mellado, M.S., & Prentice-Hernández, C. (2009). Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Quim. Nova*, 32, (7), 1739-1743.

Table 1: Total count of mesophilic microorganisms of FPHs stored at 30 °C

Treatments	Storage days									
	Mesophilics (CFU/ml)									
	0	1	2	5	9	12	24	36	48	60
Control	20	3,0x10 <sup>7</sup>								
Autoclave 30 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Heater 30 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Citric acid 30 °C	ND	ND	10	10	5,0x10 <sup>2</sup>					

<sup>a</sup> Colony forming units (CFU) per milliliter

(ND) Not detected by the methodology Portuguese standard NP 4405 (2002)

Table 2: Total count of psychrotrophic microorganisms of samples FPH stored at 4 °C

Treatments	Storage days					
	Psychrotrophics (CFU/ml)					
	0	12	24	36	48	60
Autoclave 4 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Citric acid 4 °C	ND	ND	ND	ND	1,3x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>
2,5 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Colony forming units (CFU) per milliliter

(ND) Not detected by methodology Portuguese standard NP 4405 (2002).

Table 3: Microorganisms in FPH control and FPH treated by different conservation methods after storage period

Treatments	Colifoms at 45 °C AOAC(926.24)	Coagulase-positive <i>staphylococci</i> AOAC(975.55)	<i>Salmonella spp</i> AOAC(967.26)	Molds and yeasts AOAC(997.02)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SMWW(9213)
Control	< 3,0	< 10	Absence	8,7 x 10 <sup>2</sup>	ND
Autoclave 30 °C	< 3,0	< 10	Absence	< 10	ND
Heater 30 °C	< 3,0	< 10	Absence	< 10	ND
Autoclave 4 °C	< 3,0	< 10	Absence	< 10	< 1,1
Citric acid 4 °C	< 3,0	< 10	Absence	9,5 x 10 <sup>3</sup>	< 1,1
Citric acid 30 °C	3,6	< 10	Absence	2,5 x 10 <sup>2</sup>	-
2,5 kGy	< 3,0	< 10	Absence	< 10	< 1,1
5 kGy	< 3,0	< 10	Absence	< 10	< 1,1
7 kGy	< 3,0	< 10	Absence	< 10	< 1,1

CFU: colony forming unit per milliliter. NMP = Número Mais Provável. Results are expressed as <10 CFU / g and <3.0 MPN / g, representing no growth considering the limits of the methods.

(ND) Not detected.

Table 4. Chemical composition and calorific value of hydrolysates (g/100 g dry weight) after 24 hours.

Treatments	Control	Heater 30 °C	Autoclave 30 °C	Autoclave 4 °C	Citric acid 4 °C	Citric acid 30 °C
Proteins	67,42	57,31	37,67	39,01	32,66	37,07
Lipids	22,90	39,20	54,15	53,63	54,18	66,24
Ashes	3,77	3,42	2,83	3,58	3,13	1,49
Carbohydrates	5,89	0,00	4,36	3,76	10,02	0,00

Table 5. Chemical composition and calorific value of hydrolysates (g/100 g dry weight) after 60 storage days.

Treatments	Heater 30 °C	Autoclave 30 °C	Autoclave 4 °C	Citric acid 4 °C	Citric acid 30 °C
Proteins	46,31	38,24	41,00	11,63	31,30
Lipids	45,56	52,34	30,93	70,89	60,72
Ashes	2,26	3,51	3,66	1,36	1,55
Carbohydrates	5,85	5,89	24,39	16,10	6,41

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq. À Noronha Pescados por fornecer o apoio necessário para realização deste trabalho.

## 4. 2. Normas da Revista (Food Microbiology ISSN 0740-0020)

### GUIDE FOR AUTHORS

#### INTRODUCTION

##### *Types of article*

Original **research papers** for *Food Microbiology* should be written in English and normally not exceed 6000 words. Short **research notes** describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. Short research notes will not normally exceed 3500 words. Short **reviews** on matters of immediate interest and longer, definitive reviews will be published; authors should discuss proposed topics with the Editor before preparing a manuscript. **Book reviews** and **letters to the editor** are welcome.

Questions regarding content of a proposed submission may be sent to the Chief Editor:

M.L. Tortorello

US Food and Drug Administration

National Center for Food Safety and Technology

6502 S. Archer Road

Summit-Argo, IL 60501, USA

Fax: +1(708) 728 4177

E-mail: [mlt@cfsan.fda.gov](mailto:mlt@cfsan.fda.gov)

***Page charges***

This journal has no page charges.

**BEFORE YOU BEGIN**

***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

***Conflict of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

***Submission declaration***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

***Changes to authorship***

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of

addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### ***Retained author rights***

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.



***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

***Open access***

This journal offers authors a choice in publishing their research:

**Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

**Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through

our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No Open Access publication fee

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of your submission.

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC-BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC-BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine

the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC-BY-NC-SA). commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

#### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

#### ***Additional information***

Nomenclature and Descriptions of Organisms

The correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

## **PREPARATION**

### *Use of wordprocessing software*

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

### *Article structure*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the

text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### ***Essential title page information***

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 200 words.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### ***Keywords***

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or

otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### ***Nomenclature and units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

### ***Database linking***

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one- click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### ***Table footnotes***

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### ***Artwork***

#### ***Electronic artwork***

#### ***General points***

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version. • Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Appropriate indications of replication and variability should be included.

#### *References*

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with



either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51-59.

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281-304). New York: E-Publishing Inc.

### ***Video data***

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

#### **AFTER ACCEPTANCE**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

***Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

## **5.PATENTE**

Parte dos resultados obtidos do trabalho experimental dessa dissertação, geraram resultados que atribuíram uma patente intitulada: Processo Para Produção Por Radiação De Um Produto Proteico E Lipídico A Partir Do Hidrolisado, que se encontra anexada e foi depositada correspondente ao Processo N°. : BR 10 2012 032931 0.

### **RELATÓRIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO**

#### **PROCESSO PARA PRODUÇÃO POR RADIAÇÃO DE UM PRODUTO PROTEICO E LIPÍDICO A PARTIR DO HIDROLISADO PROTEICO DE PEIXE**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

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

### **DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA**

O filé é o item de maior valor econômico, o seu rendimento varia de acordo com o domínio tecnológico das empresas processadoras de pescado e pode chegar entre 30 e 40% do peso do animal dependendo da espécie, a outra parcela é considerado como resíduo sendo composto por restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras. Logo, os resíduos da indústria de processamento de pescado, por exemplo, da tilápia, representam de 60 a 70% da matéria-prima. Atualmente, estes resíduos gerados são ainda subutilizados e muitas vezes

descartados de forma inadequada ocasionando danos ao meio ambiente. Diante dessa problemática, pesquisadores em todo o mundo vêm desenvolvendo diversos esforços para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos passíveis de utilização tanto na nutrição humana quanto animal (MARTONE et al., 2005).

Os resíduos gerados pela indústria de processamento de pescado podem ser utilizados na obtenção de variados produtos como biofertilizantes, biogás, farinha de peixe, couro, gelatina, óleo e hidrolisado proteico (PI0604910-9 A; PI1000529-3 A2; PI0506315-9 A; PI0804954-8 A2; PI0516797-3 A; PI1004335-8 A2).

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

A hidrólise enzimática é um método baseado na adição de enzimas para clivagem das proteínas, sendo um processo usado para aperfeiçoar ou modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína sem prejudicar o seu valor nutricional. O processo enzimático ocorre sob condições brandas, sem produzir produtos de degradação, observados nas hidrólises ácida e alcalina. Este tipo de hidrólise oferece vantagens porque permite um bom controle do processo e, conseqüentemente, das propriedades dos produtos resultantes (FONKWE e SINGH, 1996). Enquanto que, a hidrólise por autólise enzimática é um método alternativo, em que se empregam as próprias enzimas proteolíticas (proteases das vísceras do próprio peixe) para solubilização da proteína do pescado, tornando assim um método mais vantajoso em relação às enzimas comerciais, pois, reduz desta forma os custos de produção.

Os hidrolisados proteicos de carne são utilizados para modificar propriedades funcionais de alimentos e, em alimentos dietéticos, como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos. Podem ser incorporados a uma série de produtos, como fórmulas balanceadoras para atletas, regimes de emagrecimento, e utilizados na alimentação animal como, por exemplo, em porcos e bezerros, e na forma de suplementos proteicos em rações para animais. Na alimentação humana, servem como suplementos de biscoitos e produtos tipo hambúrguer, nuggets, entre outras, com possibilidade de também serem adotados para pessoas com problemas de digestão ou de má-absorção de proteínas, graças à sua elevada digestibilidade e aos aminoácidos essenciais disponíveis. Além do mais, estudos evidenciam que o hidrolisado proteico e peptídeos obtidos de organismos marinhos e seus subprodutos podem promover a saúde humana por meio da prevenção de doenças crônicas (KIM et al., 2007; KIM e WIJESSEKARA, 2010). Juntamente com isto, estudos têm demonstrado que hidrolisados proteicos de peixe, obtidos por hidrólise enzimática, podem ser utilizados como potenciais antioxidantes naturais (YOU et al., 2010; LEE, JEON E BYUN, 2011).

Durante o processo de hidrólise são gerados, não apenas, proteínas pequenas, peptídeos e aminoácidos, mais também, lipídeos que podem ser separados e removidos em uma etapa seguinte, resultando na formação de um hidrolisado proteico uniforme e com baixo teor de gordura e de um óleo de peixe concentrado. O óleo de peixe apresenta aplicações diversas, não apenas, na indústria de cosméticos, mas também na de alimentos como item na composição de nutracêuticos, como pode ser visto nas patentes: PI0901392-0 A2; PI 0414818-5 A; PI 0509878-5 A e PI 0516797-3 A.

A hidrólise dos triacilgliceróis e conseqüentemente o aumento do teor de ácidos graxos livres formados durante armazenamento e processamento, é um dos fatores que determinam a vida de prateleira e produzem características organolépticas indesejáveis ao alimento (STEVANATO, 2007). As alterações na qualidade dos alimentos frescos podem



ocorrer devido à oxidação de lipídeos e pigmentos contidos em alimentos gordurosos, resultando na liberação de sabor indesejável e na formação de compostos que possuem efeitos biológicos adversos ou que favoreçam a descoloração (FORSYTHE, 2002). VIEGAS (2000), estudando hidrolisado proteico de peixe a partir de resíduos do processamento de filés de tilápias, obteve um produto praticamente isento de lipídios, o que lhe conferiu excelente qualidade, devido ao fato de não apresentar problemas de rancidez oxidativa durante a estocagem.

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

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

Neste contexto existem patentes voltadas para produção de hidrolisado proteico de peixe utilizando enzimas comerciais no seu processo de hidrólise (WO2009/101134A1; WO2009/101146A1; PI0705220-0A2), utilização de hidrolisado proteico na composição de nutracêuticos (PI1000331-2 A2), na conservação do hidrolisado pela aplicação de sais, ácidos, ou desidratação (CN102125173 - A), e na utilização de óleos de peixes para composição de nutracêuticos e óleo diesel (PI0314100-4A; PI9611826-1A; PI0509878-5A; PI0516797-3A).

Porém, ainda não foi desenvolvido de forma conjunta um processo que envolvesse a produção e separação de um hidrolisado proteico de peixe do seu óleo de forma estéril.

### **APRESENTAÇÃO DOS PROBLEMAS EXISTENTES**

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

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

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

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

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

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

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

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

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

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

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

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

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

## **2. Obtenção por radiação de um produto proteico (hidrolisado proteico) e lipídico estéril**

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

A seguir serão expostos exemplos específicos da invenção.

Exemplo 1:

Análises microbiológicas

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

a) Contagem total de microorganismos e psicrotróficos

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

b) Análises microbiológicas de microrganismos específicos

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

Laboratório de Experimento e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

#### Exemplo 2:

A contagem total de microrganismos psicrotróficos, expressos em unidades formadora de colônia por mL (UFC/mL), dos hidrolisados proteicos de peixe irradiados foram expressos em 0 UFC/mL. Os resultados comprovam a conservação o produto sob o ponto de vista microbiológico. Desta forma os hidrolisados permaneceram livres de contaminação por microrganismos psicrotróficos e apresentaram-se conservados por 60 dias de armazenamento sob refrigeração a  $\pm 4$  °C.

Para avaliar a segurança alimentar dos hidrolisados proteicos de peixe foi realizada a pesquisa de microrganismos específicos. A presença em níveis pré-determinados de alguns microrganismos em um produto alimentício avalia seu estado de segurança alimentar e se o mesmo em sua produção obedece às normas de boas práticas de fabricação e manipulação, os princípios do HACCP, dentre outras normas que possam garantir o consumo do produto. A tabela 1 fornece os resultados das pesquisas de microrganismos nos hidrolisados submetidos aos métodos de conservação.

Tratamentos	Colifomes a 45°C AOAC(926.24)	Estafilococos coag(+) AOAC(975.55)	<i>Salmonella</i> AOAC(967.2 6	Bolores e Leveduras AOAC(997. 02)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SMWW(9213)
Controle	< 3,0	< 10	Ausência	8,7 x 10 <sup>2</sup>	-
2,5kGy	< 3,0	< 10	Ausência	< 10	< 1,1
5kGy	< 3,0	< 10	Ausência	< 10	< 1,1
7kGy	< 3,0	< 10	Ausência	< 10	< 1,1

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

Os tratamentos realizados nos hidrolisados foram eficientes quanto à presença de microrganismos patógenos e/ou deteriorantes estando livres destes mantendo-se assim conservados até o prazo de 60 dias.

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

Exemplo 3:

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

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

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

Portanto os resultados obtidos pela experimentação demonstra que o processo de autólise foi eficaz na obtenção de um hidrolisado proteico de peixe com atividades

antioxidantes, sugerindo que pode ser utilizado como um nutricêutico, alimento funcional ou como um antioxidante em alimentos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZERRA, R. S. Proteases digestivas no Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tese Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

CN102125173 A. Preparation and application of additive for reducing liver fat content of turbot, 2011.

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

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 31, p. 605, 1996.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN; M. A.; KI, K. S.; LEE, W. S.; LEE, H. J. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 4033–4042, 2007.

KRISTINSSON, H.G., B. RASCO. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131-139, 2000.

MARTONE, C.B., BORLA, O.P., & SÁNCHEZ. J.J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology*, 96, 383-387, 2005.

LEE, WOO-SHIN, JEON, JOONG-KYUN, BYUN, HEE-GUK. Characterization of a novel antioxidative peptide from the sand eel *Hypoptychus dybowskii*. *Process Biochemistry* 4, 1207–1211, 2011.

PI0705220-0 A2. Processo de obtenção de hidrolisado proteico em pó microcapsulado, 2009.

PI0314100-4 A. Composição de combustível diesel, compreendendo componentes à base de matéria-prima biológica, obtida pela hidrogenação e decomposição dos ácidos graxos, 2005.

PI 0509878-5 A. Ácidos graxos essenciais na prevenção e/ou tratamento da depressão em doentes com doença arterial ou cardíaca coronária, 2007.

PI 0516797-3 A. Processo para a fabricação de ingredientes alimentícios, processo para a fabricação de um produto alimentício para humanos, produtos alimentícios e mistura de óleo, 2008.

PI 9611826-1 A. Emulsões de lipídio otimizados quanto a hidrólise e seu uso, 1999.

PI 0506315-9 A. Processo de obtenção de farinha de cabeças de tilápia para alimentação humana, 2007.

PIO705220-A2. Processo de obtenção de hidrolisado proteico em pó microencapsulado, 2009.

PI1000331-2A2. Composição nutracêutica, processo de produção de hidrolisados de proteína de peixe e hidrolisados obtidos, 2011.

PI0604910-9A. Produto orgânico a base de peixe e processo de obtenção do produto orgânico, 2008.

PI0516797-3A. Processo para fabricação de ingredientes alimentícios, processo para fabricação de um produto alimentar para humanos, produtos alimentícios e ,mistura de óleo, 2008.

PI 1000529-3A2. Processo de produção de biofertilizante, biogás e adubo orgânico, 2011.

STEVANATO, F.B., SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J.V. Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação. Pubvet, v.1, n. 7, Ed. 6, Art. 171, 2007.

VIEGAS, E.M.M. Elaboração e caracterização de hidrolisados protéicos de peixe e sua utilização na nutrição de organismos Aquáticos. Jaboticabal: Unesp, 2000.

WO2009/101134A1. Fish protein hydrolysate having a satietogenic activity, nutraceutical and pharmacological compositions comprising such hydrolysate and method for obtaining same, 2009.

WO2009/101146A1. Fish protein hydrolysate having a bone-stimulating and maintaining activity, nutraceutical and pharmacological compositions comprising such a hydrolysate and method for obtaining same, 2009.

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

### REIVINDICAÇÃO

1. Apresente invenção é caracterizada por um processo de produção compreendendo a separação e conservação por meio da aplicação de radiação do hidrolisado proteico de peixe para produção de um produto composto por um hidrolisado proteico e óleo de peixe estéril.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por envolver uma hidrolise proteolítica por autólise utilizando as enzimas das vísceras de peixes ou enzimas comerciais como Alcalase.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo a acondicionamento do hidrolisado proteico de peixe em recipiente autoclavável seguido pelo processo de irradiação por Reator Gama Cell 220 ( $^{60}\text{Co}$ ) ou outro, nas doses entre 2 KGy a 8 KGy de 29 a 93 minutos .

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo armazenamento do referido hidrolisado irradiado sob uma refrigeração a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  com ausência de luz, para separação do óleo da parte proteica.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1 a 4, caracterizado por utilizar um equipamento antes do processo referente à reivindicação de 3 a 4 o qual aplica uma força centrífuga separando diferentes fases (sólido, hidrolisado proteico e óleo), de forma que, os sólidos são depositados no fundo, o hidrolisado proteico de peixe suba pela área externa de pratos presentes no referido equipamento e que o óleo siga para o centro do equipamento saindo do seu rotor por tubulações.

6. Produto, de acordo com a reivindicação de 1 a 5, caracterizado por um hidrolisado proteico e óleo de peixe estéril por radiação.

## **RESUMO**

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