

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA
DE HIDROLISADO DE PESCADO COMO ENRIQUECIMENTO
ALIMENTAR

Maximiano Pinheiro Dantas Neto

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de
Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Ceará como parte das exigências para a obtenção
do título de Engenheiro de Pesca.

Fortaleza - Ceará

1996

BSLCM

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D214p Dantas Neto, Maximiano Pinheiro.
Produção e avaliação química e microbiológica de hidrolisado de pescado como enriquecimento alimentar /
Maximiano Pinheiro Dantas Neto. – 1996.
44 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1996.

Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.
Coorientação: Prof. Dr. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira.

1. Pescados. 2. Alimentos - Análise. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida e me ajudar a ter sempre momentos felizes como este.

À meus pais, Dantas e Margarida, por tantos esforços despendidos para me educarem e me tornar o que sou hoje.

À Profa. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira e ao Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

À Hauston Barbosa, Hilda Pinheiro, Janaína Falcão, Luciana Tavares, Oscarina Viana, Rachel Sabry, Susy Margella e D. Zuíla, companheiros de laboratório e de Curso, pela imensa e sincera ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. José Roberto Feitosa, do departamento de Biologia da U.F.C., pelo incentivo ao interesse pelo trabalho científico.

Ao Governo do Brasil, por ter dado a oportunidade de provar que, apesar da extrema dificuldade que ele impõe ao ensino público, podemos chegar a este momento e tentar mudar a cara deste País.

Índice Geral

	Pág.
1-INTRODUÇÃO.....	10
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1- MATÉRIA-PRIMA.....	22
3.2- ENZIMAS.....	22
3.3- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	22
3.4- GRAU DE HIDRÓLISE.....	23
3.5- HIDROLISADO.....	24
3.6- ANÁLISES.....	27
3.6.1- ANÁLISE QUÍMICA.....	27
3.6.1.1- UMIDADE.....	27
3.6.1.2- GORDURA.....	27
3.6.1.3- CINZAS.....	27
3.6.1.4- PROTEÍNA.....	28
3.6.2- PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	28
3.6.2.1- ÍNDICE DE SOLUBILIDADE DO NITROGÊNIO.....	28
3.6.2.2- EMULSIFICAÇÃO.....	29
3.6.2.3- UMEDECIMENTO.....	29
3.6.3- ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	30
3.6.3.1- OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	30
3.6.3.2- DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
3.6.3.3- PESQUISA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	31

Índice de tabelas

Tabela 1- Atividades relativas de enzimas proteolíticas com uma hora de hidrólise a 40°C e pH neutro.....21

Tabela 2- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Pancreatina e o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum* como substrato.....37

Tabela 3- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Protease e o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum* como substrato.....38

Tabela 4- Composição química dos hidrolisados liofilizados do cação *Ginglymostoma cirratum*...41

Índice de figuras

Figura 1- Fluxograma mostrando as etapas para a obtenção de hidrolisado liofilizado do cação *Ginglymostoma cirratum*.....26

Figura 2- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Pancreatina e como substrato o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*.....39

Figura 3- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Protease e como substrato o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*.....40

Figura 4- Gráfico dos valores médios da solubilidade do nitrogênio no hidrolisado liofilizado do cação *Ginglymostoma cirratum*....44

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE
HIDROLISADO DE PESCADO COMO ENRIQUECIMENTO ALIMENTAR

Maximiano Pinheiro Dantas Neto

1- INTRODUÇÃO

Dados sobre o aproveitamento da produção pesqueira apontam que somente 40% de pescado são utilizados no consumo humano, parte transformada em ração e outra desperdiçada. Nos países pobres o desperdício de pescado é bastante acentuado uma vez que os seus subprodutos e espécies de baixo valor comercial são minimamente aproveitados (Vieira, 1993).

O cação *Ginglymostoma cirratum* é abundante em nosso litoral, e embora não haja dados estatísticos sobre sua captura, está sempre presente nas redes dos pescadores. Um outro exemplo de desperdício da indústria pesqueira é a pesca do camarão, onde um potencial variado de peixes que poderia ser utilizado para a obtenção de hidrolisados protéicos é desperdiçado como fauna acompanhante, soma-se a estes dados o fato de aproximadamente 4000 toneladas de cefalotórax de lagosta serem desperdiçadas por ano, originando um total de 800 toneladas de tecido muscular com alto teor de proteína descartada anualmente (Vieira et

alli, 1995 a,b). O cação sendo um peixe de baixo valor comercial e com alto teor de proteína muscular, pode ser uma boa fonte para a produção de um hidrolisado liofilizado de ótima qualidade.

A obtenção de proteína de boa qualidade a partir de fontes industriais de baixo custo tem-se constituído em grande interesse para os pesquisadores de ciências de alimentos.

A carência de proteínas de boa qualidade é uma característica da classe pobre nordestina e uma das principais causas de desnutrição nesta região. A proteína de boa qualidade, por ser o componente alimentar mais caro, é o que menos é consumido pelas crianças pobres, cuja base alimentar é o mingau de farinha. Isto resulta numa séria deficiência protéica, que se não corrigida, deixará sequelas para o resto da vida.

A Organização das Nações Unidas (ONU), em seu relatório sobre as condições nutricionais das crianças de 173 países, incluindo o Brasil, concluiu que há nesses países 192 milhões de crianças mal nutridas (Revista Veja, 1994).

Dados da "Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição" (Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição - INAN, Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada - IPEA e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE,

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 1989), mostram que a desnutrição atinge uma em cada cinco crianças menores de cinco anos e informações contidas no "Documento de Política nº 14, O Mapa da Fome", a sua maioria está no Nordeste.

Pesquisas do IPEA, divulgadas pelo Conselho Nacional de Segurança Alimentar (CONSEA - 1993), indicam que no Ceará 751 mil famílias estão em condições de miséria, correspondendo a aproximadamente 3 milhões de pessoas convivendo com a fome. Estudos realizados pela Secretaria do Trabalho e Ação Social (1991) do Governo do Ceará em crianças matriculadas em escolas públicas e na faixa entre 6 e 9 anos, demonstraram que 18% apresentavam crescimento retardado e sinais clínicos de desnutrição.

Das carências alimentares, é certamente a protéica que se apresenta de mais difícil solução, tendo em vista seu alto custo e a necessidade do organismo de ingerir grandes quantidades de alimentos protéicos. Nesta perspectiva, é de suma importância a procura de fontes protéicas de boa qualidade e baixo custo, enquadrando-se neste aspecto as matérias-primas sub-utilizadas mas potencialmente aproveitáveis, como aquelas derivadas do pescado.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A elaboração de hidrolisados protéicos destinados ao consumo humano exige cuidados especiais, tanto nas suas propriedades funcionais quanto na questão higiênica. Recomenda-se que o hidrolisado de pescado seja obtido a partir de músculo do pescado assepticamente isolado e em bom estado de conservação. Entretanto Spinelli & Koury (1970) acham viável o uso de subprodutos e restos de pescados oriundos do beneficiamento de peixes a nível industrial como matéria-prima para a produção de hidrolisado, desde que seja observado um rígido controle higiênico e avaliação da qualidade da mesma.

Dentre as várias fontes de subprodutos de origem animal que têm sido convertidos em alimentos protéicos, estão várias espécies de peixes e crustáceos (Haard *et al.*, 1982; Martin & Patel, 1991). Vieira *et al.* (1995 a,b) obtiveram hidrolisado protéico a partir do tratamento da carne do cefalotórax de lagostas com enzimas proteolíticas e observaram que o produto continha alto teor de proteína (>78%), e todos os aminoácidos essenciais em níveis bastante elevados.

Uma dieta deficiente de aminoácidos essenciais não favorece o crescimento das crianças, mas pelo contrário,

facilita a mortalidade, além de causar danos cerebrais com consequências refletidas no aprendizado.

Há pouco tempo atrás, a obtenção de concentrados protéicos era feito com solventes e produtos químicos em pH's extremos e altas temperaturas (Löffler, 1986). Entretanto, os produtos usualmente eram pobres em suas propriedades funcionais (Green & Mattick, 1979). O método utilizando hidrólise enzimática tem várias vantagens sobre os anteriores porque as enzimas têm especificidade de atividade e função, são evitados pH's e temperaturas extremos e podem ser desativadas no final da reação (Löffler, 1986).

O desenvolvimento na área de hidrólise de proteínas por via enzimática tem induzido ao uso de enzimas proteolíticas para a solubilização da proteína do peixe (Venugopal & Lewis, 1981; Quaglia & Orban, 1987), para a preparação de isolados protéicos (Rasek & Metz, 1973) e preparação de peptona para meio de crescimento bacteriano (Gilberg *et al.*, 1989; Vieira *et al.*, 1992).

O concentrado protéico de peixe (CPP) está sendo utilizado como suplemento alimentar em situações emergenciais de saúde em países como o Canadá, EUA, Chile e Peru (Meinke *et al.*, 1972). O CPP é rico em proteínas de excelente qualidade e pode ser adicionado em dietas com baixo valor nutritivo, tais como pão, mingau, farinha de

pão, sopas, biscoitos , etc., elevando substancialmente o seu valor nutricional (Windsor, 1969; Hale, 1973).

O CPP pode ser obtido de duas maneiras:

(1) pelo método químico, o qual geralmente é extraído utilizando um solvente apolar, o etil-dicloreto (EDC) ou um solvente polar, o álcool isopropil (EPA). É um produto praticamente sem odor, de coloração clara, entretanto, tem características limitadas de propriedades funcionais tais como solubilidade, dispersibilidade e emulsificação (Dubrow, 1973).

(2) pelo método biológico, cujas enzimas proteolíticas utilizadas agem como catalizadores na quebra de ligações peptídicas. Durante este processo, os lipídios são desprendidos do tecido, podendo serem separados por centrifugação. As enzimas empregadas neste processo podem ser as naturais do próprio pescado (autólise), as preparadas comercialmente de fontes biológicas (vegetais, animais ou microbiológicas) ou retiradas de culturas vivas de microorganismos (Hale, 1973). O hidrolisado é mais saboroso, e possuirá propriedades desejáveis tais como baixa viscosidade, aumento na dispersibilidade e alta solubilidade (Adler-Nissen et al., 1979).

O valor nutritivo do hidrolisado é de suma importância para a alimentação, portanto é fundamental que o produto final contenha todos os aminoácidos essenciais, bem como em

quantidades que satisfaçam as necessidades diárias do organismo. O peixe possui todos os aminoácidos essenciais, tendo basicamente a mesma composição que a carne de porco e de gado, sendo que a gordura é constituída principalmente de fosfolipídios altamente insaturados, o que favorece a sua digestão (Bligh, 1981).

A hidrólise enzimática das proteínas dos alimentos geralmente resulta em variações nas suas propriedades funcionais, as quais aumentam a incorporação da proteína na formulação dos alimentos. Entretanto, a degradação extensiva das cadeias peptídicas causam a formação de peptídios amargos, produzindo um hidrolisado inaceitável para o uso como suplemento alimentar ou ingredientes. Quaglia & Orban (1987), trabalhando com sardinha (*Sardina silchardus*), testaram diferentes graus de hidrólise obtendo produtos com variação nas propriedades funcionais. Encontraram uma solubilidade máxima acima de 90% quando o pH do hidrolisado variava entre 5,0 e 6,0, ocorrendo entretanto, uma redução da mesma na faixa de pH de 2,0 a 5,0. Segundo Hevia *et al.* (1976), a solubilidade das proteínas do peixe por certas enzimas gera oligopeptídeos, os quais causam amargor ao hidrolisado.

Ricks *et al.* (1978) sugeriram uma possível relação inversa entre o tamanho da cadeia peptídica e o gosto amargo dos hidrolisados. Arai *et al.* (1970) afirmam que tal

gosto poderá ser eliminado por tratamento com exopeptidase em um grau que não altere a composição dos seus aminoácidos (Clegg & McMillan, 1974). A média do comprimento dos peptídeos solúveis em pH 4,5 é menor que a dos peptídeos insolúveis no mesmo pH. O gosto amargo do hidrolisado não depende somente da composição dos aminoácidos do substrato, mas também da especificação do agente proteolítico (Ricks *et al.*, 1978).

Os sabores amargos são características comuns de hidrolisados de proteínas produzidos enzimaticamente. O amargor pode ser reduzido, mas não eliminado, através do controle do grau de hidrólise, uma vez que o tempo de hidrólise determinará o tamanho do peptídeo (Mackie, 1982).

A hidrólise de proteínas consiste na quebra de ligações peptídicas através de enzimas proteolíticas originando como produtos moléculas menores que as iniciais, conhecidas como peptídios. Dependendo do tempo de hidrólise e das enzimas utilizadas, é possível transformar todo o conteúdo de proteína em constituintes menores ou uma mistura de peptídios e aminoácidos.

Uma reação enzimática envolvendo uma protease e proteínas do pescado ocorre em duas etapas. Na primeira as moléculas de enzima ligam-se com proteínas do pescado formando um complexo transitório chamado enzima-substrato e

na fase seguinte esse complexo dá origem aos peptídios com regeneração da enzima (Vieira, 1993).

Logo após a adição de protease, a hidrólise experimenta uma fase inicial na qual grande quantidade de ligações peptídicas estão sendo quebradas por unidade de tempo, e em seguida, essa velocidade de hidrólise vai decrescendo até atingir uma fase estacionária onde nenhuma hidrólise parece ocorrer. Durante a hidrólise, quando estão sendo quebradas as ligações peptídicas, há formação de fração solúvel e insolúvel, podendo isto ser evidenciado através de centrifugação da mistura de reação nos primeiros estágios de hidrólise.

Vários fatores têm influência sobre a formação de produtos solúveis durante a hidrólise do pescado. Os principais fatores a considerar são o tipo de enzima, o tipo de proteína e as condições de hidrólise como pH, temperatura, tempo de reação e relação enzima-substrato.

Muitos estudos têm demonstrado diferenças na eficiência de várias proteases sobre a hidrólise das proteínas do pescado. Embora sem comprovação explícita, há uma tendência de se considerar as endopeptidases de baixa especificidade (p. ex., protease de microorganismos), como sendo mais eficazes na solubilização das proteínas do pescado do que aquelas de alta especificidade, como a tripisina. Contudo, vários estudos demonstram que muitas

Tabela 1- Atividades relativas de enzimas proteolíticas com uma hora de hidrólise a 40°C e pH neutro. (Retirado de Hale, 1972). 1- Atividade relativa é a razão de peso (grama de substrato/grama de enzima) na qual um terço do substrato é digerido em uma hora. 2- A digestão com pepsina é realizada em pH 2,0.

Enzima Comercial	Concentração da enzima (%)	Atividade Relativa ¹
Ficina	0,11	900,0
Pronase	0,29	350,0
Pepsina ²	0,39	260,0
Bromelina	0,86	116,0
Papaína	1,12	89,3
Protease bacteriana	1,23	81,0
Tripsina	1,45	69,0
Panól	1,50	67,0

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Matéria-prima

A espécie utilizada neste trabalho foi o cação *Ginglymostoma cirratum*, obtido junto à INTERFRIOS - Intercâmbio Frios S/A (Fortaleza - Ceará).

Dos espécimes foram retirados os filés, parte utilizada para a preparação do liofilizado e o restante descartado.

3.2- Enzimas

As enzimas utilizadas foram: Protease fungal (P.4755) e Pancreatina (P.1750), ambas da Sigma LST. Lowis, Missouri, EUA.

3.3- Preparação das amostras

Os filés foram cortados em pequenos pedaços, lavados três vezes por cinco minutos em água gelada acidificada com ácido acético glacial em pH 4,5 sendo então submetidos a uma última lavagem com água gelada sem ácido. As amostras foram homogeneizadas com água destilada na proporção de 1:2

(p/v) em liquidificador por 2 minutos; em seguida o pH do homogeneizado foi ajustado para o pH ótimo de atuação de cada enzima, utilizando-se um pH-metro modelo HI9025 da Hanna Instruments Inc., sendo 7,0 para a Protease fungal e 7,5 para a Pancreatina usando-se solução 0,1N de NaOH.

3.4- Grau de hidrólise

Aos homogenatos foram adicionadas as enzimas Pancreatina e Protease fungal nas concentrações 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% em relação ao substrato. A hidrólise foi realizada em triplicata, a 40°C para a Pancreatina e 37°C para a Protease fungal; em um banho-maria com agitação modelo 3540-1 da Lab-line Instruments Inc.. Nos tempos 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos de reação, os pH's foram medidos e reajustados para 7,5 e 7,0 respectivamente usando-se NaOH 0,1N. O Grau de Hidrólise foi determinado para cada enzima em cada tempo de reação segundo Adler-Nissen & Olsen (1979) mediante a fórmula:

$$GH = \frac{B \times NB}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

onde: B = volume da base adicionada (l)

NB = normalidade da base

MP = massa de proteína da reação (kg)

$1/\alpha$ e $1/h_{tot}$ = constantes disponíveis em tabela de referência.

3.5- Hidrolisado

Determinadas as condições ótimas de hidrólise (enzima, concentração da enzima e tempo de reação) foram preparadas 3 amostras de hidrolisados utilizando-se 400 g de filé e 800 ml de água destilada para cada amostra.

A enzima escolhida foi a Pancreatina, e as condições de reação foram - Temperatura 40°C, pH 7,5 e tempo de reação 60 minutos. A Pancreatina foi a enzima escolhida devido a sua maior eficiência hidrolítica.

No final da reação a temperatura da mistura foi elevada a 80°C por 15 minutos para que houvesse a desativação da enzima. Em seguida, o hidrolisado foi peneirado em malha 2mm, sendo os resíduos descartados. O filtrado foi congelado uniformemente em balões volumétricos de fundo chato usando-se um sistema refrigerado rotativo, tendo o álcool como solução de imersão (-15°C) e efetuada a liofilização.

3.6-Análises

3.6.1- Análise Química

A composição química dos hidrolisados liofilizados constituiu-se das seguintes determinações:

3.6.1.1- Umidade

Por dessecação a 100 - 105°C, até peso constante.

3.6.1.2- Gordura

Pelo extrator de Soxhlet, usando-se acetona como solvente.

3.6.1.3- Cinzas

Através de incineração em forno mufla mod. 5-AV da Eletro-Resistex Ltda. a 550°C durante 24 h.

Os métodos acima estão detalhados em AOAC (1980).

3.6.1.4- Proteína

O nitrogênio total foi determinado pelo método microKjedhal conforme citado por Baker (1961), o nitrogênio não protéico foi determinado precipitando a proteína através de TCA (ácido tricloroacético) a 10% e utilizando o método microKjedhal.

Deste modo a proteína foi quantificada a partir do nitrogênio protéico obtido através da subtração do nitrogênio total pelo nitrogênio não protéico, multiplicando-se o resultado pelo fator 6,25.

3.6.2- Propriedades Funcionais

3.6.2.1- Índice de Solubilidade do Nitrogênio (INS)

O nitrogênio solúvel foi determinado segundo Adler-Nissen & Olsen (1979). O material foi homogeneizado com NaCl 0,2 M, ajustando o pH para 2, 5, 7 e 9, utilizando solução de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N; sendo agitado por 45 minutos em agitador magnético modelo 505 P da Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, E.U.A, seguindo-se de uma centrifugação a 3000 rpm X g em centrífuga Hermle mod. Z 360 K. No sobrenadante foi determinado o nitrogênio total pelo método microkjedahl.

O INS é calculado pela seguinte relação:

$$\text{INS} = \frac{\% \text{ de nitrogênio solúvel}}{\% \text{ de nitrogênio total}} \times 100$$

3.6.2.2- Emulsificação

A capacidade de emulsificação foi medida pela adição de 0,5g do liofilizado em uma mistura de 30ml de óleo de semente de algodão e 60 ml de uma solução de NaCl a 3% com homogeneização constante através de agitador Cole-Parmer 505 P por 30 minutos, durante os quais foram adicionados gradativamente mais 30 ml do óleo de algodão. A solução foi colocada em um banho-maria a 85°C durante 15 minutos, após os quais centrifugou-se a 3.000 rpm X g por 30 minutos. O óleo foi coletado em uma proveta e a capacidade de emulsificação foi expressa em ml por 0.5g de hidrolisado (Rasek & Metz, 1973).

3.6.2.3- Umedecimento

O umedecimento foi determinado pelo método subjetivo relatado por Dubrow *et al.*, (1973). Esse método baseia-se na velocidade em que as partículas se umedecem quando em contato com a água. Se estas se tornarem úmidas dentro de

30 segundos, o hidrolisado será considerado "excelente", se for preciso uma suave agitação para umedecer as partículas em 30 segundos, é considerado "bom", se as partículas levarem até 5 minutos para umedecerem, considera-se "regular" e acima de 5 minutos terá um grau pobre quanto ao umedecimento.

3.6.3- Análise Microbiológica

3.6.3.1- Obtenção das amostras

As amostras foram analisadas antes, durante e após a hidrólise. Desse modo as amostras foram coletadas na matéria "in natura" (cação cru); após a lavagem com água e ácido contendo o material cortado em pequenos pedaços; depois da hidrólise (após a desativação da enzima) e no produto liofilizado. As análises consistiram em observar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* o qual é indício de contaminação no manuseio; contagem padrão em placas (Cpp) e determinação do número mais provável por 100 gramas do material (NMP/100g) de coliformes totais e fecais presentes em cada fase do processamento. Todas as análises foram realizadas em duplicata, obtendo-se desta forma valores médios de cada item acima mencionado.

3.6.3.2- Diluição das amostras

Para cada amostra retirada nas diferentes etapas do processamento, foi realizada uma série de diluições decimais (10^{-1} a 10^{-3}), utilizando-se como diluente uma solução salina estéril a 0,85%.

3.6.3.3- Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

No laboratório foram pesados 50 g do cação, triturados e liquidificados juntamente com 450 ml de solução salina estéril a 0,85%, durante 2 minutos. O mesmo procedimento foi utilizado homogeneizando-se 50 ml do homogenato e do hidrolisado respectivamente. Quanto ao liofilizado, foi pesado 1 grama e diluído em tubos contendo 9 ml de solução salina a 0,85%.

Foram inoculados 0,2 ml de cada diluição em duplicatas através do método "Spread plate" (uso de alça de Drigalski) em placas contendo o meio Agar Baird-Parker (ABP), o qual é seletivo para *S. aureus*.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa onde permaneceram por 48 h à temperatura de 37°C.

Foi realizada então a contagem para *S. aureus* em placas que continham entre 20 e 200 UFC (ICMSF, 1978).

3.6.3.4- Contagem padrão em placas

A contagem padrão em placas (Cpp) foi realizada depositando-se 1 ml de cada diluição em placas de Petri esterilizadas. Cobria-se o inóculo com cerca de 15 ml do meio Agar glicose-extrato de levedura-triptona (TGEA) previamente fundido e resfriado. Em seguida foi feita uma homogeneização através de movimentos circulares sobre a bancada. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por 24 h em estufa a 35°C, quando então foram escolhidas as que apresentaram entre 30 e 300 colônias para contagem em contador de colônias Phoenix modelo ZC 550. O valor médio encontrado foi multiplicado pelo inverso do fator de diluição correspondente, a fim de se obter o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml ou grama da amostra.

3.6.3.5- Coliformes

3.6.3.5.1- Prova presuntiva

Em uma série de 3 tubos de cada diluição contendo aproximadamente 10 ml de Caldo Lauril Sulfato (CLS) e tubos de Durhan invertidos, foi inoculado 1 ml de cada uma das

diluições anteriormente descritas em cada fase do processamento (figura 1), sendo feita posteriormente uma incubação em estufa a 35°C durante 24 h. Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados da estufa e considerados positivos aqueles que apresentavam bolhas nos tubos de Durhan.

3.6.3.5.2- Prova confirmatória

Dos tubos que apresentaram resultados positivos na prova presuntiva foram feitas inoculações em tubos contendo caldo Bile Verde Brilhante (BVB), contendo tubos de Durhan invertidos. O resultado foi considerado positivo quando o tubo apresentava formação de bolhas nos tubos de Durhan após incubação por 24 h a 35°C, indicando a ocorrência de coliformes totais.

3.6.3.5.3- Coliformes fecais

Dos tubos que apresentaram resultados positivos na prova presuntiva, foram retirados inóculos e adicionados a tubos contendo meio EC e tubos de Durhan invertidos, sendo considerado o resultado positivo quando apresentavam

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de graus de hidrólise referente à ação das enzimas Pancreatina e Protease fungal sobre o músculo homogeneizado do cação *Ginglymostoma cirratum* são apresentados nas tabelas 2 e 3 e nas figuras 2 e 3. Observa-se que o grau de hidrólise usando-se Pancreatina é sempre maior que aquele produzido pela Protease fungal. O grau de hidrólise, em ambos os casos, cresce com o aumento da concentração da enzima e com o tempo de reação, sendo que a taxa de aumento diminui ao longo do tempo de reação. Considerando-se o grau de hidrólise proveniente do uso da Pancreatina observa-se uma semelhança dos valores para as concentrações 0,4 e 0,5% de enzima (Tabela 2, Figura 2). A escolha da Pancreatina como a melhor enzima foi baseada no seu maior poder hidrolítico, sendo que a concentração 0,4% praticamente fornece o mesmo grau de hidrólise que na concentração de 0,5% no tempo de reação de 60 minutos.

Os hidrolisados liofilizados foram então preparados nas condições ótimas de reação, quais sejam: enzima - Pancreatina; tempo de reação - 60 minutos; e concentração de enzima - 0,4% em relação ao substrato.

A composição química dos hidrolisados liofilizados encontra-se na tabela 4. A umidade variou do mínimo de 3,70% a 4,60% com uma média de 4,03%. O percentual de

cinzas variou entre 6,90% e 8,70% com um valor médio de 7,93%. A amplitude de variação da gordura foi de 3,80% a 6,0% com uma média de 5,13%. O teor de proteína foi o que menos variou nas três amostras, alcançando um máximo de 83,30% e o mínimo de 82,50% com uma média de 82,90%. O alto teor de proteína do hidrolisado confere-lhe grande importância nutricional, sendo mais elevado do que muitos outros produtos similares (Tarky *et al.*, 1973, Rodrigues *et al.*, 1989), e semelhante ao encontrado por Gurgel (1995).

Tabela 2- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Pancreatina e o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum* como substrato.

Tempo de Reação (min)	Concentração de Pancreatina (% - enzima/substrato)					
	0,0%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
	Grau de hidrólise (%)					
5	0,12	1,09	2,50	4,25	5,50	5,69
10	0,12	1,87	4,56	7,06	9,42	11,35
15	0,12	2,17	6,36	9,22	12,26	13,63
30	0,12	3,70	9,10	11,95	15,55	16,87
60	0,38	6,69	11,17	14,91	18,71	20,22
90	0,38	8,61	15,21	17,02	21,16	22,74
120	0,38	10,16	17,36	20,85	22,88	24,86

Tabela 3- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Protease e o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum* como substrato.

Tempo de Reação (min)	Concentração de Protease (% - enzima/substrato)					
	0,0%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
	Grau de hidrólise (%)					
5	0,20	0,54	0,91	1,04	1,25	1,38
10	0,27	0,99	1,20	1,59	1,95	2,24
15	0,32	1,18	1,90	2,01	2,55	3,00
30	0,38	1,57	2,34	2,87	3,51	4,09
60	0,56	2,17	3,10	3,76	4,69	5,44
90	0,61	2,62	3,72	4,77	5,77	6,63
120	0,69	3,08	4,29	5,86	6,96	7,96

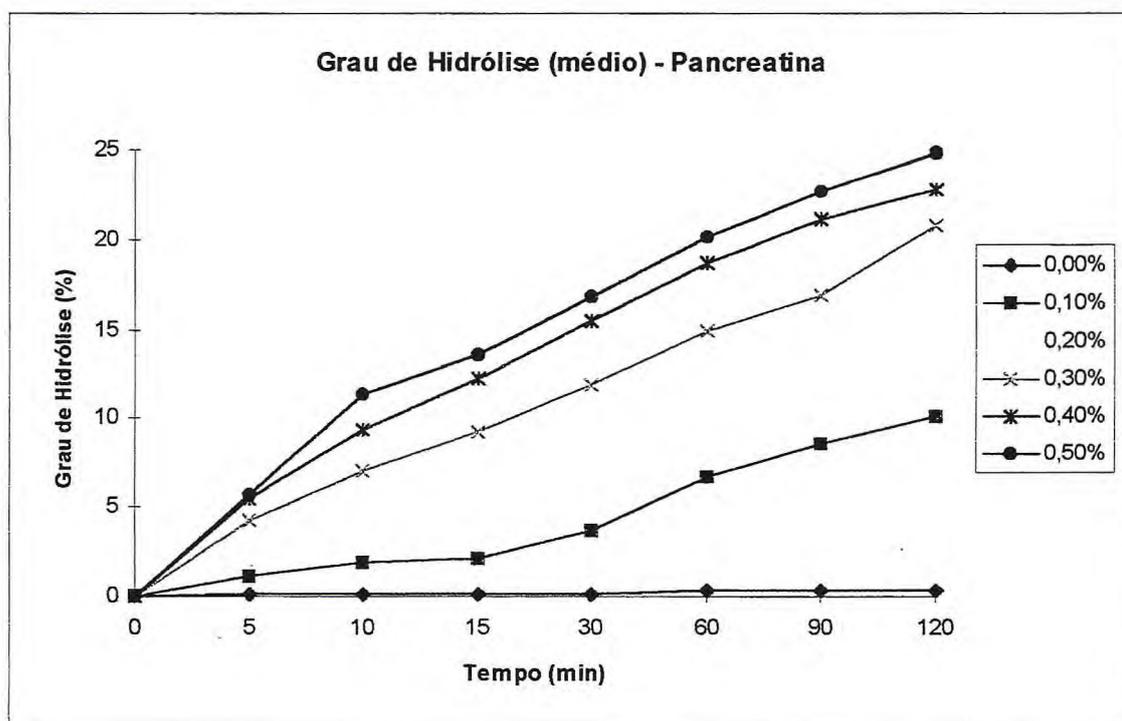


Figura 2- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Pancreatina e como substrato o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*.

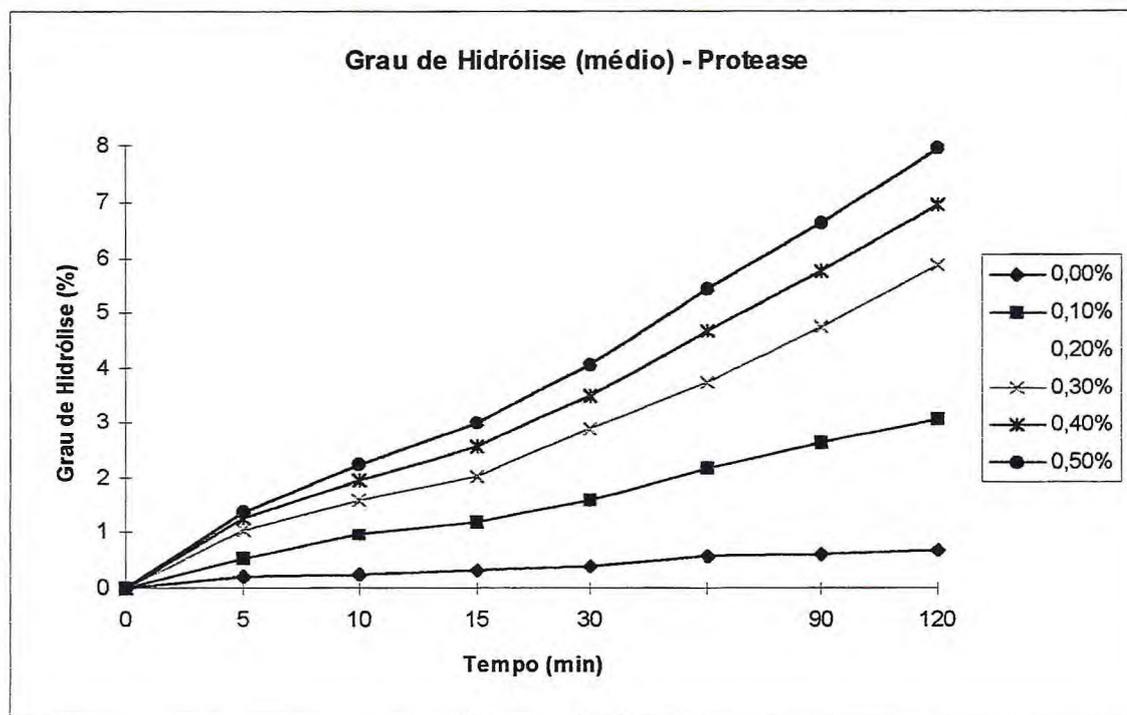


Figura 3- Valores médios do Grau de Hidrólise nos 3 experimentos utilizando como enzima Protease e como substrato o músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*.

Tabela 4- Composição química dos hidrolisados liofilizados do cação *Ginglymostoma cirratum*.

Amostra	Umidade (%)	Cinzas (%)	Gorduras (%)	Proteínas (%)
Liofilizado 1	4,60	8,70	3,80	82,90
Liofilizado 2	3,70	8,20	5,60	82,50
Liofilizado 3	3,80	6,90	6,00	83,30
Média	4,03	7,93	5,13	82,90

Os valores do índice de solubilidade do nitrogênio, capacidade de emulsificação e o umedecimento estão contidos na tabela 5. Observa-se que todas as amostras foram consideradas "excelentes" para o critério umedecimento, o qual revela que as amostras quando em contato com a água umedecem-se no tempo inferior a 30 segundos. A capacidade de emulsificação praticamente não variou entre as amostras, atingindo um valor médio de 11,3ml de óleo por 0,5g da amostra. A solubilidade do nitrogênio apresentou maior índice quando o hidrolisado liofilizado estava no pH 7,0 e menor nos pH's 2,0 e 9,0, embora as diferenças sejam mínimas (Tabela 5, Figura 4). Valores semelhantes foram encontrados por Vieira *et alli* (1995_b) em hidrolisados de carne de cabeça de lagosta.

Tabela 5- Propriedades funcionais do hidrolisado liofilizado do músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*.

Liofilizado	Índice de solubilidade do Nitrogênio (%)				Capacidade de emulsificação (ml/0,5g)	Umedecimento
	pH					
	2.0	5.0	7.0	9.0		
Amostra 1	86.8	86.8	86.8	81.1	11.0	Excelente
Amostra 2	70.0	70.0	76.0	70.0	11.0	Excelente
Amostra 3	81.1	86.8	86.8	86.8	12.0	Excelente
Média	79.3	81.2	83.2	79.3	11.3	-

Os dados relativos às análises microbiológicas estão contidos na tabela 6. Nota-se que, de uma maneira geral, os valores médios encontrados em pesquisas de *Staphylococcus aureus* e contagem padrão em placas, bem como o número mais provável de bactérias coliformes por 100g de material, apresentaram valores decrescentes à medida em que se realizam as diversas fases do processamento, atingindo níveis elevados nas etapas iniciais e valores menores no decorrer da elaboração do produto liofilizado, devido principalmente, ao processo de cocção no momento da desativação da enzima quando termina a hidrólise.

A Portaria de nº 001 de 28 de janeiro de 1987, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos não faz referência a qualquer bactéria que tenha importância na saúde pública para produtos liofilizados de pescado. Entretanto, segundo Banwart (1979) *apud* Leitão (1988), o alimento poderá provocar intoxicações no consumidor quando a população de *S. aureus* no alimento atingir um número na ordem de 10^5 a 10^6 UFC/g ou superiores a 10^6 /g (ICMSF, 1978). Em razão dos valores de UFC/g da bactéria encontrados nas amostras, já anteriormente citadas terem sido baixos, fica dificultada a formação da toxina. Entretanto o crescimento de *S. aureus* é facilitado pelo aumento da temperatura, uma vez que a bactéria é mesofílica. Sendo assim, a não observância de refrigeração

Tabela 6- Valores médios em contagens de *Staphylococcus aureus*; Contagem padrão em placas (Cpp) e Número Mais Provável (NMP) de coliformes/100g de amostra presentes em diferentes etapas do processamento do músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*. A = ausência.

	Amostras	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Cpp (UFC/g)	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
Cação	1	100	8600	NMP > 2400	0
	2	50	1160	NMP > 2400	0
	3	60	2050	NMP > 2400	0
Homogeneizado	1	50	990	NMP > 2400	0
	2	A	870	NMP > 2400	0
	3	10	170	NMP > 2400	0
Hidrolisado	1	100	890	NMP = 43	0
	2	A	30	NMP = 04	0
	3	10	170	NMP = 150	0
Liofilizado	1	A	210	NMP = 150	0
	2	20	380	NMP = 460	0
	3	10	220	NMP = 04	0

Os testes para Cpp de microorganismos aeróbios restritos e facultativos viáveis apresentaram valores que variaram entre $0,3 \times 10^2$ a 86×10^2 UFC/g. Este teste foi retirado da legislação vigente para pescados, entretanto, ainda é usado na indústria quando se quer acompanhar a qualidade e o grau de sanitização de um produto em um determinado processo industrial.

Na tabela 6 é possível se observar valores iniciais que, ao longo do processamento, foram decrescendo. Esses números foram diminuídos principalmente pelo uso de calor na etapa de hidrólise (desativação da enzima). Em duas amostras, da fase de hidrólise para a fase de liofilização, houve um ligeiro acréscimo na carga bacteriana, talvez devido a alguma contaminação que por ventura possa ter ocorrido, mas por ser tão pequena, é perfeitamente contornável quando se compara os dados iniciais e finais do processamento do produto.

Pela mesma tabela pode-se constatar que embora os coliformes totais atinjam valores acima de 2400 por 100g de material no início do processo, os obtidos para coliformes fecais foram sempre nulos. O número de coliformes totais, a exemplo das contagens de outros parâmetros microbiológicos estudados, sempre tendeu a diminuir do início para o final do processamento. Por ser *Escherichia coli* tipicamente fecal (Hagler & Hagler, 1988), esta é a bactéria que se

5- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo presente trabalho nos permite tirar as principais conclusões que se seguem:

5.1- A enzima escolhida para este estudo foi a Pancreatina devido à sua maior capacidade hidrolítica.

5.2- As condições ótimas para a hidrólise enzimática foram: temperatura 40°C; pH 7,5; tempo de reação 60 minutos e concentração da enzima 0,4%.

5.3- Os teores de proteína variaram entre um valor máximo de 83,3% e um valor mínimo de 82,5% com uma média de 82,9%, comprovando o alto valor protéico do produto.

5.4- Os teores de gordura apresentaram um valor mínimo de 3,8% e valor máximo de 6,0%, com média de 5,13%, sendo esta uma boa porcentagem para o produto final.

5.5- A umidade variou entre 3,7% e 4,6%, com um valor médio de 4,03%. O baixo conteúdo de umidade é um fator limitante para a proliferação bacteriana.

5.6- O conteúdo de cinzas teve uma variação entre 6,9% e 8,7%, apresentando um valor médio de 7,93%, o que indica uma boa presença de minerais no produto.

5.7- Os valores médios do índice de solubilidade do nitrogênio foram mais elevados em pH 7,0, atingindo 83,2%.

5.8- A capacidade de emulsificação atingiu um valor médio entre as amostras de 11,3 ml de óleo por 0,5 g de material.

5.9- O teste de umedecimento teve como resultado o conceito "excelente" para todos os produtos elaborados.

5.10- Os dados relativos à Contagem padrão em placas das amostras variaram entre $0,3 \times 10^2$ e 86×10^2 UFC/g.

5.11- O NMP de bactérias coliformes totais atingiu um valor máximo acima de 2400/100g de material analisado. Não houve ocorrência de bactérias coliformes de origem fecal em nenhuma das amostras analisadas.

6- RESUMO

Grande quantidade de material oriundo da indústria pesqueira é desperdiçada ou sub-utilizada. A partir do aproveitamento de matéria-prima disponível e não utilizável (p. ex. espécies de baixa aceitação comercial, fauna acompanhante da pesca do camarão e cefalotórax de lagosta), pode-se obter hidrolisados protéicos com vistas a utilização no enriquecimento da alimentação infantil e dietas de pessoas carentes, principalmente na nossa região nordestina, onde a carência de proteína de boa qualidade é a principal causa de desnutrição na classe pobre. A alimentação característica de crianças pobres é à base de carboidratos, o que não supre o organismo de suas necessidades protéicas. Sendo assim, o presente trabalho pretende avaliar, sob o ponto de vista químico e microbiológico, o produto obtido através da hidrólise enzimática do músculo do cação *Ginglymostoma cirratum*, para posterior utilização em dietas alimentares.

~~F~~ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Nissen, J.; Olsen, H.S., 1979: The influence of peptide chain lenght on taste and functional properties enzymatically modified soy protein. ACS Symp. Ser. 92 125-146.

- AOAC, 1980 In: Official methods of analysis of the association of Official Analitical Chemists (13 th ed.), ed. Horwitz W., Association of Official Analitical Chemists , Washington DC, USA, pp 125, 211, 858.

- Dubrow, D.L.; Kramer, A.; McPhee, A.D., 1973: Effects of temperature on lipid extractions and functional properties of fish protein concentrate (FPC). J. Food Sci. 38 1012-1015.

- Gilberg, A.; Batista, I.; Strom, E., 1989: Preparation and characterization of peptone obtained by a two-step enzymatic hidrolysis of whole fish. Biotechnol. Appl. Biochem. 11 413-423.

- Green, J. H.; Mattick, J. F., 1979: Fishery waste management. In: Food processing waste management. Eds. Green J.H. & Kramer A. AVI, Westport, CT, USA, pp 202-227.

- Gurgel, M.P.O.S. Hidrolisado protéico de pescado para enriquecimento alimentar. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 1995.

- Haard, N.F.; Feltham, L.A.W.; Helbig, N., Squires, J., 1982: Modification of proteins with proteolytic enzymes from the marine environment. In: Modification of proteins (Advances in Chemistry Series, vol. 168), eds. Feeney R.L. & Whitaker J.R. American Chemical Society, Washington DC, USA, pp 223-224.

- Hale, Using enzymes to make fish protein concentrate. Marine Fisheries. Review, v. 74, n° 2, p. 35-36, 1973.

- INAN; IPEA; IBGE. Pesquisa nacional de saúde e nutrição, 1989.

- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods. 1: Their significance and methods of enumeration. 2th. ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
- Löfler, A., 1986: Proteolytic enzymes: source and applications. Food Technol.40 (1) 63-70.
- Martin, A. M.; Patel, T., 1991: Bioconversion of waste of materials to industrial products. Ed. Martin A.M. Elsevier Applied Science, London, U.K., pp 417-440.
- Meinke, W.W., Rahman, M.A., Mattil, K.F. Some factors influencing the production of protein isolate from the whole fish. J. Food Sci., v. 37, p. 195-198, 1972.
- Moraes, M. A. C.. Métodos para a avaliação sensorial dos alimentos. UNICAMP, 6ª ed., 93 p., 1988.
- Pullin, R.S.V.; Lowe, R.H. The biology and the culture of Tilapias. In: I CLARM Conference, 7. Manilas. Proceedings. Manila, 1982.

- Quaglia, G.B.; Orban, E., 1987: Influence of degree of hidrolisis on the solubility of the protein hidrolisates from sardine (*Sardine pilchardus*). J. Sci. Food Agric. 38 271-276.

- Rasek, J.; Metz, A., 1973: Acid precipitated fish protein isolate exhibits good functional properties. Food Prod. Devel. 7 (8) 18-24.

- Rodrigues, V.G.; Fedor, A.B.; Contreras, D.R.; Flores, G.R.; Navarro, G.G.; Ezquerra, M.A.; Perez, C.L. Definicion tecnológica para a elaboracion de hidrolisado de proteína apartir de la fauna acompanante del camaron de la plataforma cubana. In: Consulta de Expertos sobre tecnologia de productos pesqueros en América Latina. 2. Montevideo, Roma, FAO, 12 pp., 1989.

- Tarky, W.; Agarwala, O. P.; Pigott, G. M. Protein hidrolisates from fish waste. J. Food Sci., v. 38, p. 917-918, 1973.

- Veja, Revista (1994). Editora abril n° 23 ano 27.

- Venugopal, V.; Alur, M. D.; Nerkar, D.P., 1989: Solubilization of fish protein using immobilized microbial cells. Biotechnol Bioengng 33 1089-1103.

- Vieira, G. H. F.; Saker-Sampaio, S.; Gonçalves, R.C.F.; Reis S.B., 1992: Preparação de peptona a partir de sub-produtos do pescado. II-Avaliação biológica. XIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, São Paulo, Brasil, p. 23.

- Vieira, G. H. F.; Saker-Sampaio, S.; Rocha, C. A. S.; Gonçalves, R. C. F.. Production of protein hidrolisate from lobster (*Panulirus* spp.). In: George Cheralambous - Food Flavors: Generation, Analysis and Process influence - Developments in Food Science. 37B, Elsevier, 1405-1415, 1995.

- Vieira, G.H.F.; Martin, A.A.; Saker-Sampaio S.; Omar, S., Gonçalves, R.C.F.. Studies on the enzymatic hidrolysis of brazilian lobster (*Panulirus* spp.) Processing wastes. J. Sci. Food Acric., 69: 1-5, 1995.

- Windsor, M.L. Fish protein concentrate. Torry advasary Ministry of Technology, n° 3, p. 3-10, 1969.