



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**HELENICE DUARTE DE HOLANDA**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DO CAMARÃO SETE-BARBAS  
(*Xiphopenaeus kroyeri*) E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS**

**Campinas  
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

H689h Holanda, Helenice Duarte de  
Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas  
(*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos /  
Helenice Duarte de Holanda. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Flávia Maria Netto  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Camarão. 2.Resíduo. 3.Hidrólise. 3.Enzimas. 4.Proteína.  
I.Netto, Flávia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**HELENICE DUARTE DE HOLANDA**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DO CAMARÃO SETE-BARBAS  
(*Xiphopenaeus kroyeri*) E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em alimentos e Nutrição.

Orientadora : **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Maria Netto**

**Campinas**

**2004**



BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Maria Netto  
(Presidente)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete M<sup>a</sup> Macedo Viegas  
(Membro)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oetterer  
(Membro)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Nunes  
(Membro)**

---

**Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
(Membro)**

---

**Prof. Dr. Jaime amaya Farfán  
(Membro Suplente)**

---

**Prof. Dr. Dalton José Carneiro  
(Membro Suplente)**



## AGRADECIMENTOS

À professora Dr<sup>a</sup> Flávia Maria Netto pela orientação constante e segura demonstrada na elaboração deste trabalho.

À técnica do laboratório e amiga Eliana pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e palavras de conforto nas horas mais difíceis.

As amigas Cristina, Patrícia, Kity, Rose, Ivonete e Isabela, pelo incansável apoio e colaboração.

À Vera Sônia pela amizade, incentivo e colaboração na realização de algumas análises.

À minha amiga Sônia pelo incentivo constante, apoio, amizade e colaboração para conclusão deste trabalho.

À funcionária do laboratório Bete pela amizade e apoio.

À FAEP pelo apoio financeiro que possibilitou a aquisição de alguns materiais.

À CAPES pela bolsa concedida

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.





## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	ix
<b>RESUMO GERAL.....</b>	xvi
<b>GENERAL SUMMARY.....</b>	xviii
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	01
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO</b>	<b>07</b>
<b>BIBLIOGRÁFICA.....</b>	
<b>1. PRODUÇÃO DO CAMARÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>2. PRODUÇÃO DE RESÍDUO DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO CAMARÃO..</b>	<b>10</b>
2.1 Componentes do resíduo do camarão.....	11
2.1.1 Proteína.....	12
2.1.2 Lipídios.....	14
2.1.3 Quitina.....	15
2.1.4 Astaxantina.....	17
<b>3. HIDRÓLISE DE PROTEÍNA.....</b>	<b>19</b>
3.1 Hidrólise química.....	20
3.2 Hidrólise enzimática.....	21
3.3 Utilização de hidrólise enzimática de resíduos.....	22
<b>4. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....</b>	<b>24</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>)</b>	<b>35</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 Material.....	35
	ix

2.2 Métodos.....	36
2.2.1 Composição química aproximada.....	40
2.2.2 Determinação de quitina.....	40
2.2.3 Extração e quantificação de astaxantina.....	40
2.2.4 Ácidos graxos.....	42
2.2.5 Aminoácidos totais e livres.....	42
2.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) das proteínas totais do resíduo e do músculo.....	43
2.2.7 Análise estatística.....	43
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
3.1 Composição química.....	43
3.2 Astaxantina.....	45
3.3 Composição dos ácidos graxos.....	46
3.4 composição de aminoácidos .....	48
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) das proteínas totais do resíduo e do músculo do camarão.....	52
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>) .....</b>	<b>57</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>59</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
2.1 Material.....	61
2.2 Métodos.....	61
2.2.1 Composição química.....	61
2.2.2 Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas.....	62
2.2.3 Recuperação de proteína.....	64
2.2.4 Composição de aminoácidos .....	64
2.2.5 Planejamento experimental das condições de hidrólise.....	65

2.2.6 Análise estatística.....	66
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

**CAPÍTULO 4: RECUPERAÇÃO DE COMPONENTES DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*) POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>83</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>86</b>
2.1 Material.....	86
2.2 Métodos.....	86
2.2.1 Composição química aproximada do resíduo.....	86
2.2.2 Etapas de desproteinização.....	87
2.2.3. Recuperação de astaxantina.....	89
2.2.4 Recuperação de quitina.....	90
2.2.5 Análise estatística.....	91
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
3.1 Hidrólise enzimática.....	91
3.2 Recuperação da astaxantina.....	95
3.3. Recuperação da quitina.....	97
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>

**CAPÍTULO 5: CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO PROTÉICO A PARTIR DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*).....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>107</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>108</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>109</b>

2.1 Material.....	109
2.2 Métodos.....	109
2.2.1 Obtenção dos hidrolisados.....	109
2.2.2 Caracterização dos hidrolisados.....	111
2.2.2.1 Composição química.....	111
2.2.2.2 Aminoácidos totais e livres.....	111
2.2.2.3 Solubilidade.....	112
2.2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE).....	112
2.2.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)	113
2.2.2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM).....	113
2.3 Análise estatística.....	114
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
3.1 Composição de aminoácidos totais e livres.....	117
3.2 Distribuição do tamanho molecular.....	120
3.3 Distribuição do peso molecular.....	122
3.4 Perfil de hidrofobicidade.....	123
3.5 Solubilidade.....	125
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>127</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>128</b>
<b>CAPÍTULO 6 :CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>131</b>
<b>CAPÍTULO 7: ANEXO.....</b>	<b>135</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura.1	Processamento médio mensal de “camarão” em toneladas para o Estado de Santa Catarina.....	10
Figura 2.	Estrutura molecular da quitina (a), quitosana (b) e celulose (c).....	16
Figura 3.	Estrutura molecular da astaxantina.....	18

### Capítulo 2

Figura 1.	Fluxograma de extração e quantificação da astaxantina do resíduo do camarão sete-barbas com óleo de soja e solvente.....	41
Figura 2.	Perfil eletroforético das proteínas totais do resíduo e do músculo ...	52

### Capítulo 3

Figura 1.	Fluxograma de recuperação da fração protéica do resíduo do camarão sete-barbas. ( <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ).....	63
Figura 2.	Curvas de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas ( <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ) com alcalase.....	68
Figura 3.	Efeitos da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) no grau de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas usando alcalase (L= linear; Q= quadrático).....	70
Figura 4.	Efeitos da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) na recuperação de proteína do resíduo do camarão sete-barbas usando Alcalase (L= linear; Q= quadrático).....	71
Figura 5.	(a) Superfície de resposta e (b) curvas de nível do efeito da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) no grau de hidrólise (GH).....	73
Figura 6.	(a) Superfície de resposta e (b) curvas de nível do efeito da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) na recuperação de proteína (RP).....	75

Figura 7. Recuperação de proteína (RP) do resíduo do camarão sete-barbas em função do grau de hidrólise (GH).....	76
---	----

#### Capítulo 4

Figura 1. Fluxograma do processo de recuperação de proteína, quitina e astaxantina do resíduo do camarão sete-barbas por hidrólise enzimática.....	88
--	----

#### Capítulo 5

Figura 1. Fluxograma de obtenção dos hidrolisados protéicos do resíduo do camarão sete-barbas. ( <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ).....	99
Figura 2. Curvas de reação de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas sem adição de enzima e com adição da alcalase e pancreatina nas condições: substrato 4%, pH 8,5, T 60°C, (E/S) 3% e T 40°C, (E/S) 1%, respectivamente.....	115
Figura 3. Perfil cromatográfico de exclusão molecular do resíduo e dos hidrolisados: (A) RCST, (B) HPRC-A GH 5%, (C) HPRC-A GH 10%, (D) HPRC-P GH 5%, (E) HPRC-P GH 10%.....	121
Figura 4. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas do músculo, do resíduo e dos hidrolisados do camarão sete-barbas.....	122
Figura 5. Perfil cromatográfico de fase reversa do resíduo e dos hidrolisados: (A) RCST, (B) HPRC-A com GH 5%, (C) HPRC-A com GH 10%, (D) HPRC-P com GH 5%, (E) HPRC-P com GH 10%.....	124
Figura 6. Solubilidade do resíduo (RCST) e dos hidrolisados com alcalase (HPRC-A) com 5 e 10% e com pancreatina ( HPRC-P) com 5 e 10%.....	126

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Variação da composição química aproximada do de camarão por espécies e por tipo de descascamento.....	12
Tabela 2. Enzimas usadas em hidrólise enzimática de proteínas.....	25

### Capítulo 2

Tabela 1. Composição química (g/100 g) do resíduo industrial do camarão sete-barbas liofilizado nas quatro coletas realizadas.....	44
Tabela 2. Concentração de astaxantina no resíduo do camarão sete-barbas utilizando óleo ou solvente como meio de extração. Valores expressos em mg de astaxantina/100 g de resíduo seco.....	46
Tabela 3. Composição dos principais ácidos graxos do resíduo do camarão sete-barbas.....	47
Tabela 4. Composição dos aminoácidos totais em (g/100 g de proteína) do resíduo do camarão sete-barbas e da referência da FAO/WHO.....	49
Tabela 5. Composição em aminoácidos livres (g /100 g de proteína) do resíduo do camarão sete-barbas.....	51

### Capítulo 3

Tabela 1. Parâmetros de hidrólise e níveis do planejamento experimental para as superfícies de respostas.....	65
Tabela 2. Matriz do planejamento experimental das variáveis independentes.....	66
Tabela 3. Composição de aminoácidos totais em (g/100 g de proteína) do resíduo do camarão sete-barbas.....	67
Tabela 4. Grau de hidrólise (GH) e recuperação de proteína (RP) após hidrólise do resíduo de camarão sete-barbas com alcalase.....	69
Tabela 5. Resultados da ANOVA para a resposta grau de hidrólise (GH).....	72
Tabela 6. Resultados da ANOVA para a resposta recuperação de proteína (RP).....	74

### Capítulo 4

Tabela 1. Recuperação de proteína do resíduo do camarão sete-barbas utilizando hidrólise enzimática.....	93
Tabela 2. Desproteínização do resíduo de camarão sete-barbas.....	94
Tabela 3. Concentração de astaxantina extraída com óleo de soja e solvente no resíduo sem tratamento (RCST) e nas frações solúvel e insolúvel, obtidas após hidrólise enzimática com alcalase e pancreatina com 5 e 10 % de grau de hidrólise (GH).....	97
Tabela 4. Composição química da quitina obtida do resíduo do camarão sete-barbas e das espécies <i>Crangon crango</i> e <i>Pandalus borealis</i> após hidrólise enzimática e alcalina.....	98



## Capítulo 5

Tabela 1. Composição química aproximada (%) do resíduo de camarão sem tratamento (RCST) e dos hidrolisados protéicos obtidos a partir do resíduo do camarão sete-barbas, produzidos com alcalase (HPRC-A) e com pancreatina (HPRC-P) com grau de hidrólise (GH) 5 e 10%.....	116
Tabela 2. Composição de aminoácidos livres (g/100 g de proteína) dos hidrolisados protéicos do resíduo do camarão sete-barbas obtido com as enzimas alcalase e pancreatina (HPRC-A, HPRC-P) nos GH 5 e 10%.....	119
Tabela 3. Perfil de hidrofobicidade das proteínas do resíduo do camarão sete-barbas e dos hidrolisados com alcalase e pancreatina.....	125



## RESUMO GERAL

O crescimento significativo do volume de resíduos de pescado representa um problema tanto para o meio ambiente como para a indústria de processamento. O aumento da industrialização de crustáceos tem contribuído para aumentar o volume desses resíduos. O resíduo do camarão processado representa aproximadamente 70% da matéria-prima, sendo composto por cefalotórax, exoesqueleto, vísceras e restos. O elevado teor de quitina, cerca de 20%, tem potencializado o aproveitamento tanto para sua própria obtenção quanto para a do seu principal derivado, a quitosana. A recuperação da fração protéica e da astaxantina, no isolamento da quitina, utilizando o processo enzimático, é uma alternativa para o aproveitamento global desse resíduo. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a recuperação dos componentes do resíduo da industrialização do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) proteína quitina e astaxantina utilizando hidrólise enzimática. O resíduo industrial do descasque do camarão sete-barbas, coletado na indústria de processamento em dezembro e julho de anos sucessivos, apresentou a seguinte composição: 30 a 48% de proteína; 20% de quitina e concentração de astaxantina entre 2,4 e 8,39 mg/100 g, quando extraída em óleo e 3,53 a 12,71 mg/100 g quando extraída com solvente. A composição dos aminoácidos totais mostrou a isoleucina, ácido glutâmico, leucina e o ácido aspártico com as maiores concentrações. Do total de aminoácidos, cerca de 45% corresponderam aos aminoácidos essenciais. A composição dos ácidos graxos apresentou uma relação de 1:2 entre os ácidos graxos saturados e insaturados e percentuais de 15,42 e 23,97% para o eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em relação ao total de ácidos graxos, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a época de coleta não apresentou uma relação direta com a concentração dos componentes estudados. O alto conteúdo protéico indicou que este resíduo pode ser uma excelente fonte de proteínas. Para otimizar a recuperação da fração protéica por hidrólise com a enzima alcalase, utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta, usando um planejamento composto  $2^2$  com relação enzima substrato E/S (0,18 a 5,83%) e temperatura (43,9 a 74,1°C). Os

resultados indicaram que o fator E/S foi o que apresentou maior efeito na recuperação de proteína. As condições ótimas para o processo foram na região de E/S na faixa de 2,5 a 5,5% e temperatura na faixa de 55 a 60°C, onde se obteve a máxima recuperação de proteína, 55,78% e máximo grau de hidrólise (GH), 12,80% . Para avaliar a recuperação da quitina e da astaxantina em conjunto com a fração protéica, o resíduo úmido foi submetido à hidrólise com as enzimas alcalase e pancreatina. A reação, para as duas enzimas, foi conduzida até obter-se 5 e 10% de GH, utilizando-se o método do pH-stat. O processo enzimático com alcalase foi mais eficiente do que com pancreatina, aumentando a recuperação de proteína e de astaxantina, em 11 e 20%, respectivamente. O aumento do grau de hidrólise resultou em um incremento de 27% e 10% na recuperação da proteína e da astaxantina. A recuperação da astaxantina com mistura de solventes foi duas vezes mais eficaz do que a extração em óleo. A hidrólise enzimática do resíduo industrial do camarão sete-barbas com alcalase permitiu a obtenção de hidrolisado protéico, além de propiciar condições adequadas para a recuperação da astaxantina e da quitina. Os hidrolisados obtidos com alcalase e com pancreatina, com GH 5 e 10%, foram caracterizados quanto à sua composição química, composição de aminoácidos totais e livres, composição de ácidos graxos, distribuição de peso molecular por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular (CLAE-EM), perfil de hidrofobicidade por cromatografia de fase reversa (CLAE-FR) e solubilidade. Os hidrolisados apresentaram teor de proteína superior a 76%, 14% de cinza e baixo conteúdo de lipídios, 1,4 a 2,2%. Os hidrolisados obtidos com alcalase apresentaram somente peptídeos com peso molecular menor que 8 kDa, enquanto os hidrolisados com pancreatina, além de apresentarem peptídeos com peso molecular menor que 8 kDa, também apresentaram fração com peso molecular na faixa de 40 kDa, indicando que a actina não foi totalmente hidrolisada. A composição de aminoácidos livres apresentou maior concentração de arginina, fenilalanina, lisina e leucina, responsáveis pelo “flavor” do camarão e potencialmente com a função de agir como quimioatrativos em rações para peixes e/ou crustáceos. Os resultados indicaram que o resíduo pode ser utilizado para recuperação não só da quitina, mas também para obtenção de hidrolisados

protéicos e de astaxantina, que são utilizados tanto na indústria de alimentos como na alimentação animal, especialmente na aquicultura.

## **GENERAL SUMMARY**

The significant increase in the volume of fish waste from processing plants represents a considerable environmental problem. Increases in the processing of crustaceans have contributed to this increase. Shrimp residue represents about 70% of the raw material and is composed of the cephalothorax, exoskeleton, viscera and other parts. The high content of chitin in this residue, approx. 20%, has led to a potential use for this residue to obtain chitin and its principal derivative, chitosan. The recovery of the protein fraction and of astaxanthin by enzymatic means, during the isolation of chitin, is an alternative for the overall use of this residue. Thus the objective of this research was to study the recovery of the following components from the residue resulting from the industrialization of “sete-barbas” shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) – protein, chitin and astaxanthin – using enzymatic hydrolysis. The specific objectives were: chemically characterize the industrial residue of “sete-barbas” shrimp; study and optimize the enzymatic hydrolysis process for the recovery of the protein fraction together with other valuable components such as chitin and astaxanthin and chemically and biochemically characterize the protein hydrolysates obtained. The residue from the industrial processing of “sete-barbas” shrimp was collected in December and July of consecutive years and presented the following composition: 30-48% protein; 20% chitin and an astaxanthin concentration between 2.4 and 8.39 mg/100g when oil extracted and between 3.53 and 12.71 mg/100g when solvent extracted. The amino acid concentration showed that isoleucine, glutamic acid, leucine and aspartic acid were present in the highest concentrations. About 45% of the total amino acids were essential amino acids. The ratio of saturated to unsaturated fatty acids was 1:2 and included 15,42 and 23,97% respectively of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids. The results obtained indicated that the season when the residues were collected had no direct effect on the concentration of the components under study. The high protein content

indicated that this residue could be an excellent protein source. Response surface methodology was used to optimize protein recovery using the enzyme Alcalase. A compost  $2^2$  experimental design was used with the enzyme substrate ratio E/S between 0.18 and 5.83 and the temperature between 43.9 and 74.1°C. The results indicated that E/S had the greatest effect on protein recovery. The optimum conditions for the process were with an E/S in the range from 2.5 to 5.5% and temperature between 55 and 60°C, giving a maximum protein recovery of 55.78% and maximum degree of hydrolysis (DH) of 12.80%. To evaluate the recovery of chitin and astaxanthin together with the protein fraction, the moist residue was submitted to hydrolysis with both Alcalase and pancreatine. For both enzymes, the reaction was allowed to continue until 5 to 10% DH was obtained, using the pH-stat method. The enzymatic process with Alcalase was more efficient than with pancreatine, increasing the recovery of protein and astaxanthin by 11 and 20% respectively. The increase in degree of hydrolysis resulted in an increase of 27% and 10% respectively in the recovery of protein and astaxanthin. Astaxanthin recovery with a solvent mixture was twice as efficient as oil extraction. The enzymatic hydrolysis of the industrial residue from “sete-barbas” shrimp with Alcalase allowed for the production of the protein hydrolysate as well as providing adequate conditions to recover the astaxanthin and chitin. The hydrolysates obtained with Alcalase and pancreatine, with DH of 5 and 10%, were characterized with respect to their chemical composition, total and free amino acid composition, fatty acid composition, molecular weight distribution using SDS-PAGE and molecular exclusion chromatography (CLAE-EM), hydrophobic profile by reverse phase chromatography (CLAE-FR) and solubility. The hydrolystes showed protein contents above 76%, 14% ash and a low lipid content of 1.4 to 2.2%. The hydrolysates obtained with Alcalase only presented peptides with molecular weights of <8 kDa, whilst those obtained with pancreatine, in addition to peptides with molecular weights <8 kDa, also presented a fraction with a molecular weight of about 40 kDa, indicating that the actin was not completely hydrolysed. The free amino acid composition showed higher concentrations of arginine, phenylalanine, lysine and leucine, responsible for the shrimp flavor, thus showing potential for use as flavoring compounds in

fish and/or crustacean feeds. The results indicated that the residue could be used to recover not only chitin but also to obtain protein hydrolysates and astaxanthin, which are used both in the food and animal feed industries, especially in aquaculture.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de camarão no ano de 2000 foi de 4.168.366 t. Da produção total, 74% representaram à produção extrativa e somente 26% foram responsáveis pela produção na aqüicultura. A produção mundial do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) foi de 34.724 t (FAO, 2000). No Brasil, o camarão sete-barbas encontra-se em toda a costa, contudo sua maior concentração está localizada nas regiões Sul (Santa Catarina) e Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo). Sua captura é predominantemente artesanal e a maioria da produção destina-se ao mercado interno. A produção desta espécie, em 1999, no Estado de São Paulo foi de 1.029 t, enquanto que em 2002, o Estado de Santa Catarina capturou 1.600 t (MAPA/DPA, 2000; SIESP, 2003).

O camarão, quando não é comercializado “in natura”, é industrializado para obtenção de produtos sem cabeça (cefalotórax) ou produtos descascados por completo (cefalotórax e exoesqueleto); juntos, esses resíduos correspondem a aproximadamente 70% do peso da matéria-prima (CCTTMAR-UNIVALI, 2000). O crescente aumento do volume desses resíduos, geralmente descartados sem nenhuma tentativa de aproveitamento, tem provocado sérios problemas para o meio ambiente. Uma alternativa para minimizar este problema é o aproveitamento desses resíduos em sua totalidade, através da recuperação de seus principais componentes: proteína, quitina e astaxantina (SIMPSON; HAARD, 1985; IBRAIM; SALAMA; EL-BANNA, 1999).

Atualmente, o aproveitamento de resíduos de crustáceos deve-se ao seu elevado conteúdo de quitina, cerca de 20%. A quitina e principalmente seu derivado, a quitosana, têm ampla utilização, não só na indústria de alimentos como nas indústrias farmacêutica, têxtil, cosméticos e na agricultura (IMERI; KNORR, 1988; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; LI et al., 1997).

Estudos têm mostrado o interesse de pesquisadores na utilização integral do resíduo de crustáceos. A hidrólise enzimática tem sido um caminho para a recuperação da fração protéica, de alto valor nutricional, que representa 40% do



resíduo, e é, em geral, descartada no processo de obtenção da quitina por desproteinização alcalina, e também do seu maior carotenóide, astaxantina (GAGNÉ; SIMPSON, 1993; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000; GILDBERG; STENERG, 2001).

A hidrólise enzimática apresenta benefícios e vantagens sobre a hidrólise química, pois não leva a reações indesejáveis, que possam resultar na formação de produtos tóxicos, além do seu processo transcorrer sob condições mais amenas. Além disso, enzimas apresentam efetividade em baixas concentrações e a hidrólise enzimática não diminui o valor nutritivo das proteínas (PHILLIPS; BEUCHAT, 1981).

Os hidrolisados protéicos além de sua utilização na nutrição clínica, alimentos para idosos e suplementos para atletas (FROKJAER, 1994), também têm sido utilizados na alimentação animal, especialmente em ração para larvas de peixes (GABAUDAN; PIGOTT; HALVER, 1980). As larvas, por possuírem baixa capacidade digestiva, não conseguem digerir dietas que contém proteína intacta (LINDER et al, 1995). Assim, o uso de proteína pré-digerida ou hidrolisada, obtida de resíduos do processamento de pescado, tem sido uma alternativa (CARVALHO et al., 1997). A incorporação de hidrolisados protéicos na ração para larvas de peixes tem sido relatada como importante para o crescimento e sobrevivência das mesmas, não só como fonte de aminoácidos, mas também por agir como eficiente quimioatrativo para várias espécies, principalmente, quando os aminoácidos livres alanina, glicina e arginina estão presentes (KOLKOVSKI et al., 1997; BERGE; STOREBAKKEN, 1996).

O significativo volume de resíduo do processamento de camarão e o seu descarte, muitas vezes de forma inadequada, contribuem para o desequilíbrio ambiental, representa um enorme desperdício de produtos de alto valor agregado, o que nos levou a estudar o aproveitamento do resíduo de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).

## REFERÊNCIAS

- BERGE, F. M.; STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, v. 145, n. p. 205 - 212, 1996.
- CARVALHO, A. P.; ESCAFFRZ, A. M.; TELES, A. O.; BERGOT, P. First feeding of common cap larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. **Aquaculture International**, v.5, n. p. 361-367, 1997.
- UNIVALI- CCTTMAR. Centro de Ciência Tecnológica da terra e do mar - Universidade do vale do Itajaí 2000. Disponível em: <[www.gep.cttmar.univali.br/sub\\_pesq/camarã0.html](http://www.gep.cttmar.univali.br/sub_pesq/camarã0.html)> Acesso em: 04 abr 2003.
- FAO–Food and Agriculture Organization 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISH-PLUS.asp>>. Acesso em: 15 jun 2003.
- FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, v.4, n.1, p. 86 - 89, 1999.
- GABAUDAN, J.; PIGOTT, F.; HALVER, J. E. The effect of processing on protein ingredients for larval diets: biological evaluation. **Process World Mariculture Society**, v. 11, p. 424 – 432, 1980.
- GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8 - 9, p. 809 - 812, 2001.
- IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v.43, n.6, p. 418 - 423, 1999.
- IMERI, A. G.; KNORR, D. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. **Journal of Food Science**, v. 53, n.6, p. 1707-1709, 1988.
- KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream (*sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, v. 155, n. p. 193 - 205, 1997.
- LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. In: **APPLICATIONS OF CHITINA AND CHITOSAN**, In: GOOSEN, F. A , edited by MATTHEUS. chapter 1, p. 336, 1997
- LINDER, M. FANNI, J.; PARMENTIER, M.; SERGENT, M.; PHAN-THAN-LUU, R. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 60, n.5, p. 49, 1995.
- MAPA/DPA – Ministério da Agricultura e pecuária e do Abastecimento/Departamento de e aquicultura 2000. Disponível em: <[www.mercadodapesca.com.br/cadeiascamarãomarinho.php?pag=prod](http://www.mercadodapesca.com.br/cadeiascamarãomarinho.php?pag=prod)> Acesso em: 19 fev 2003.

PHILLIPS, M R, D, BEUCHAT, L. R. Protein Functionality in Foods. **ACS Symposium Series**, Washington D.C., 1981, pp 275.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI , J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n.8, p. 1527-1532, 1991.

SIESPE– Sistema Integrado de Estatística Pesqueira – Univali/ccttmar-MAPA/DPA (2000). Disponível em: < [www.icepa.com.br/impres](http://www.icepa.com.br/impres)> Acesso em: 26 fev 2003.

SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 7, p. 212 – 222, 1985

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 147-152, 2000.

## **OBJETIVOS**

### **GERAL**

Este trabalho teve por objetivo estudar a recuperação dos componentes do resíduo da industrialização do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) proteína, quitina e astaxantina utilizando hidrólise enzimática.

Obter e caracterizar hidrolisados protéicos obtidos enzimaticamente a partir do resíduo de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), recuperar os componentes quitina e astaxantina

### **ESPECÍFICOS**

- Caracterizar quimicamente o resíduo industrial do camarão sete-barbas;
- Investigar as melhores condições de hidrólise enzimáticas para recuperação da fração protéica, da quitina e astaxantina a partir de resíduo industrial de camarão sete-barbas, utilizando diferentes enzimas e grau de hidrólise;
- Caracterizar os hidrolisados protéicos, com diferentes graus de hidrólise, obtidos do resíduo industrial do camarão sete-barbas após hidrólise com as enzimas alcalase e pancreatina



## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## Capítulo 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. PRODUÇÃO DO CAMARÃO

O camarão marinho ocupa lugar de destaque no contexto da economia pesqueira mundial, quer pelo volume de captura quer pela ampla distribuição geográfica ou pelo seu valor nutritivo (ABCC, 2000). Atualmente é o principal produto comercializado internacionalmente, representando cerca de 20% do mercado de pescado e de produtos pesqueiros. Empresas brasileiras utilizam como estratégia, vender mais de 90% da produção para os mercados europeus, asiático e norte-americano (CCTTMAR-UNIVALI, 2000).

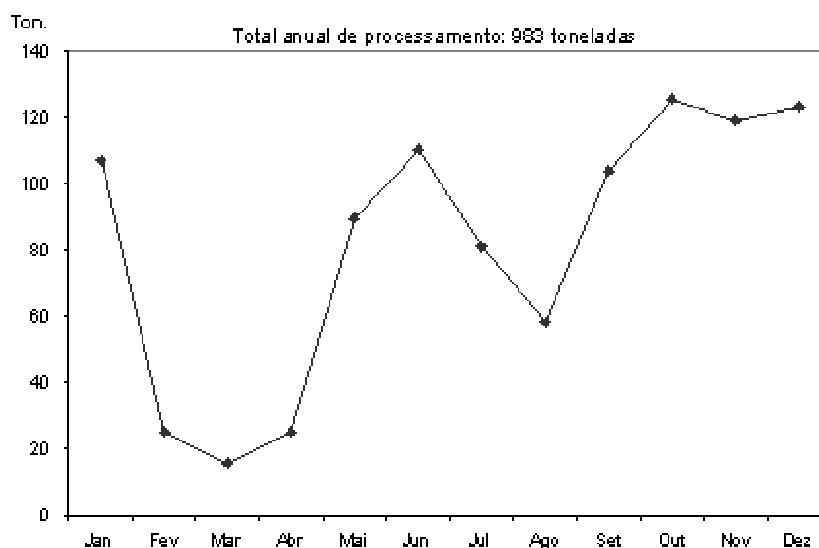
A costa marítima mundial possui 21 espécies de camarões de importância comercial, dentre elas destacam-se o *Pandalus borealis*, *Crangon crangon*, *Litopenaeus brasiliensis*, *Litopenaeus vannamei* e *Xiphopenaeus kroyeri* (FAO, 2000). A costa marítima brasileira possui 28 espécies de grande interesse econômico para a pesca, destacando-se particularmente oito delas: *Penaeus brasiliensis* (camarão rosa), *Penaeus schmittii* (camarão branco ou legitimo), *Penaeus paulensis* (camarão rosa ou camarão rosa branco), *Penaeus subtilis* (camarão vermelho), *Penaeus notialis* (camarão rosa), *Artemisia longianaris* (camarão barba vermelha), *Pleoticus kmuelleri* (camarão Santana) e *Xiphopenaeus kroyeri* (camarão sete-barbas) (NATURALSUL, 2000).

A produção mundial de camarão capturado, em 2000, foi 3.081.255 t; para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* obteve-se 34.724 t (FAO,2000). Já, a produção nacional de camarão, em 1998, foi de 35.548 t e somente a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* atingiu 13.755 t, com concentração nas regiões Nordeste (Maranhão, Sergipe e Bahia), Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Santa Catarina) (IBAMA, 2000). Em 1999, a produção de *Xiphopenaeus kroyeri* no Estado de São Paulo foi 1.029 t (MAPA/DPA, 2000) e no ano de 2002, no Estado de Santa Catarina foi de 1.600 t (SIESP, 2003).



## 2. PRODUÇÃO DE RESÍDUO DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO CAMARÃO

As empresas que industrializam o camarão encontram dificuldades em detalhar dados sobre a produção devido ao grande número de espécies existentes e sua oscilação sazonal. Na Figura 1 observa-se, ao longo do ano de 1999, a variação do volume de camarão processado no Estado de Santa Catarina. Os meses de fevereiro a abril representam as menores produções, atingindo a mínima em março. Isto se explica por ser a época de defeso dos camarões rosa, sete-barbas e santana. Nos meses subseqüentes, observa-se uma elevação acentuada da produção, que chega a atingir seu máximo no mês de outubro (CCTTMAR- UNIVALI 2000).



**FIGURA 1.** Processamento médio mensal de “camarão”, em toneladas, para o Estado de Santa Catarina.

O camarão, quando não é vendido “in natura”, é encaminhado para linhas de produção diferenciadas, sendo as mais representativas a linha de produtos sem cabeça (cefalotórax) e a linha de produtos descascados por completo (sem cefalotórax e exoesqueleto). A primeira linha de produtos indica um aproveitamento médio de 63%, enquanto a de camarões descascados 53,2% (CCTTMAR-UNIVALI, 2000). Desta forma, 34.724 t de camarão produzidas em 1998 foram responsáveis pela geração de 13.000 t de cefalotórax (relativa a 37% do peso da matéria-prima) e a 16.000 t de exoesqueleto (relativa a 46,8% do peso da matéria-prima).

Esses resíduos encontram limitações para sua utilização em produtos alimentícios, no que se refere ao seu estado higiênico - sanitário, pois se deteriora facilmente devido principalmente à alta carga microbiana do cefalotórax, onde pode existir alimento já digerido ou em processo de digestão (HALL; SILVA, 1994).

Os resíduos são definidos como subprodutos e/ou sobras do processamento de alimentos, de valor econômico relativamente baixo. O seu aproveitamento na indústria de alimentos, representa fonte potencial de ingredientes para ração e alimentos (SHOEMAKER, 1986 apud OETTERER, 1994). A necessidade de se implementar sistemas de aproveitamento de resíduos industriais é de ordem não só econômica, como ambiental. Pode-se pensar desde um melhor uso da matéria-prima ou ainda, o desenvolvimento de novos produtos que utilizem os resíduos líquidos e sólidos (ORNUM, 1992; SHOEMAKER, 1986 apud OETTERER, 1994; MANDEVILLE; YAYLAN; SIMPSON, 1992).

Segundo Meyers (1986), os subprodutos de camarão apresentam enorme potencial para serem utilizados como componentes de “flavor” em produtos processados, nas rações destinadas ao cultivo de camarão, de peixes e também como fonte natural de astaxantina, que promove coloração de truta e salmão cultivados. Diversas são as formas de recuperação e utilização de resíduos, tanto de pescados como de crustáceos, dentre elas as mais importantes são: produção de ração; extração de quitina e quitosana, produção de silagem; compostagem aeróbica e anaeróbica, produção de fertilizantes e hidrolisados protéicos (GREEN; MATTICK, 1977).

## **2.1 COMPONENTES DO RESÍDUO DO CAMARÃO**

O resíduo do camarão é basicamente constituído de proteína, quitina, minerais, e carotenóides, cujos percentuais variam conforme a espécie, partes constituintes, localização da pesca e variação sazonal (BATAILLE; BATAILLE, 1983; TENUTA FILHO, 1987; SAHIDI; SYNOWIECKI 1991; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000). As diferenças encontradas na composição do resíduo devem-se a fatores biológicos ou ambientais, onde os mais importantes são alimentação, temperatura da água, maturidade sexual e estação do ano, (CHANG; TSAI, 1997; GUILLOU, KHALL;

ADAMBOUNOU, 1995; MANDEVILLE; YAYLAN; SIMPSON, 1992; KINSELLA, 1988; GORDON; ROBERTS, 1977).

Resíduos do camarão de diferentes espécies, provenientes da industrialização, apresentaram em sua composição teor de proteína entre 34,60 a 47,75%, lipídios entre 3,78 a 10,50%, quitina entre 17 a 17,80% e cinza entre 15,75 a 41,35% (Tabela 1).

**TABELA 1.** Variação da composição química aproximada do resíduo do camarão por espécies e por tipo de descascamento.

Componentes	ESPÉCIES					
	Penaeus ssp <sup>1</sup>		Crangon <sup>2</sup>	Pandalus <sup>3</sup>	Descascamento <sup>4</sup>	
	<i>Cefalotórax</i>	<i>Exoesqueleto</i>	<i>crangon</i>	<i>borealis</i>	<i>manual</i>	<i>mecânico</i>
Proteína (%)	47,75	47,43	40,60	41,90	34,60	43,80
Lipídios (%)	10,50	3,78	9,95	10,23	nd	nd
Cinzas (%)	15,75	18,02	27,50	29,20	41,35	34,30
Quitina (%)	nd	Nd	17,80	17,00	nd	nd

<sup>1</sup> Ibraim, Salama e El-Banna (1999)

<sup>2</sup> Synowiecki e Al-Khateeb (2000)

<sup>3</sup> Shahidi e Synowiecki (1991)

<sup>4</sup> Morais e Martins (1981), espécie não identificada.

nd = não determinado

### 2.1.1 Proteína

Apesar da enorme diversidade taxonômica dos animais que compreendem a vida marinha, a composição básica dos compostos nitrogenados e os perfis de aminoácidos do músculo da maioria das espécies são muito similares (HAARD, 1995). As proteínas do músculo de pescado se dividem em três grupos: (1) sarcoplásmicas, que são solúveis em água e em solução salina de baixo potencial iônico, (2) miofibrilares, que contém a miosina e actina, os maiores componentes do filamento grosso e que são solúveis em solução salina de alto potencial iônico. A miosina compreende cerca de 50 a 60% das proteínas miofibrilares e a actina de 15 a 30% e (3) proteínas do tecido conjuntivo (HAARD, 1995; KRISTINSSON; RASCO, 2000).

As proteínas derivadas de fonte animal são consideradas nutricionalmente superiores às provenientes de plantas, pois em geral apresentam um melhor balanço aminoácido (FRIEDMAN, 1996), e isto é o que determina, em grande parte, o valor nutricional de uma proteína (SHIAU, 1994).

Uma significativa quantidade de subprodutos ricos em proteínas provenientes das plantas de processamento pescados é descartada sem nenhuma tentativa de recuperação. Diversas pesquisas realizadas com resíduos de camarão têm determinado o elevado teor de proteína presente tanto no resíduo total (cefalotórax + exoesqueleto) como nas partes em separado. Ibrahim, Salama e El-Banna (1999) encontraram valores semelhantes para a proteína do cefalotórax e do exoesqueleto de camarão (*Penaeus ssp.*), 47,75 e 47,43%, respectivamente. Já Meyers (1986) encontrou valores consideravelmente diferentes para o cefalotórax e o exoesqueleto, 53,50 e 22,80%, respectivamente. Ferrer et al., (1996), pesquisando especificamente o cefalotórax, encontraram um teor protéico de 39,60%. Vários outros pesquisadores relataram para o resíduo total de camarão de diferentes espécies teor médio de 40% da proteína (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; SYNOWIECKI, AL-KHATEEB, 2000).

De acordo com Ibrahim, Salama e El - Banna (1999), as proteínas do resíduo de camarão apresentaram os maiores concentrações dos aminoácidos: ácido glutâmico, valina, arginina, tirosina, leucina, histidina e lisina. O ácido glutâmico foi o mais abundante com 8,38 g/100 g de proteína para o cefalotórax e 10,93 g/100 g de proteína para o exoesqueleto. Cerca de 40% foram representados pelos aminoácidos essenciais. Tenuta Filho (1987), estudando o cefalotórax do camarão *Penaeus brasiliensis*, encontrou para os aminoácidos essenciais isoleucina, leucina, lisina, treonina e fenilalanina concentrações de 3,15; 4,61; 2,33; 3,88 e 8,67g/100 g de proteína, respectivamente.

Segundo Mandeville, Yaylan e Simpson (1992), os aminoácidos têm sido considerados um dos principais quimioatrativos no meio aquático e responsáveis pelo flavorizante característico dos crustáceos. Os autores encontraram em resíduo de camarão cru concentrações de aminoácidos livres iguais a 0,93; 0,37; 0,11 e 0,10g/100 g de proteína e para o resíduo cozido valores de 0,66; 0,34; 0,14 e 0,07g/100 g de proteína, respectivamente para prolina, arginina, fenilalanina e

alanina, Os aminoácidos livres presentes nos crustáceos são considerados substâncias quimioatratantes para peixes e camarão, pois estimulam o apetite do animal e direcionam-no ao alimento, mesmo quando se encontram distantes. São encontrados naturalmente em farinhas de resíduos de peixes e crustáceos (AKIYAMA, 1991).

### 2.1.2 Lipídios

Pesquisas relacionadas aos lipídios de camarão têm tratado, principalmente, do conteúdo de colesterol e do perfil do total de ácidos graxos. As pesquisas indicam que diferentes espécies geralmente apresentam perfil de ácidos graxos semelhantes com pequenas diferenças no conteúdo de colesterol. A variação sazonal no nível dessas duas classes de lipídios tem sido atribuída a fatores como temperatura da água, nutrição e estágio de desenvolvimento (JOHNSTON et al., 1983; BRAGAGNOLO; RODRIGUES-AMAYA, 2001). Embora o camarão seja uma rica fonte de proteína, é um alimento com alto nível de colesterol (JOHNSTON et al., 1983; KRZANOWEK; PANUNZIO, 1989; ESSIEN, 1995), e isto, é preocupante porque doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no Brasil, como em muitos outros países. Por outro lado, alimentos marinhos, incluindo camarão (KRZECZKOWSKI, 1970; BOTTINO; LILLY; FINNE, 1979), são ricos em ácidos graxos polinsaturados, que são considerados anticolesterolêmicos. Os ácidos graxos polinsaturados de origem marinha são provenientes de plantas marinhas, como fitoplâncton e algas, que fazem parte da cadeia alimentar e são incorporadas aos lipídios dos animais marinhos (DYEBOERG, 1986).

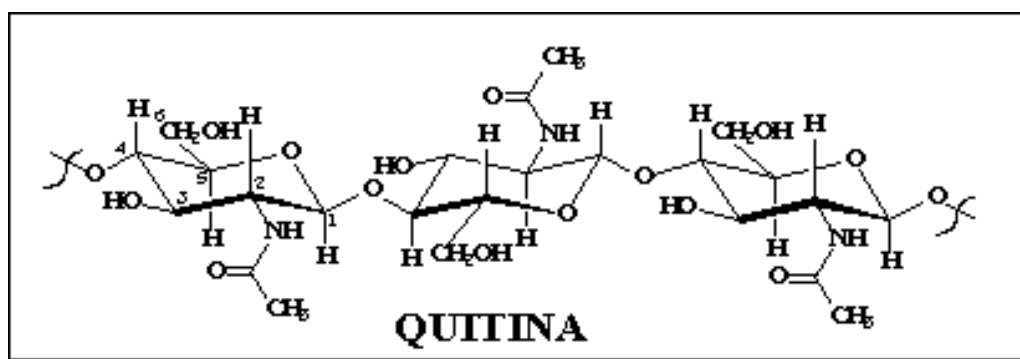
Bragagnolo e Rodrigues-Amaya (2001), analisando o conteúdo de ácidos graxos em músculos de várias espécies de camarão marinho, obtiveram para a espécie *Xiphopenaeus kroyeri* a seguinte composição: C14:0 9,0 mg/100 g, C16:0 139 mg/100 g, C18:0 51 mg/100 g, C16:1W7 60 mg/100 g, C10:1ω9 61 mg/100 g, C20:1ω9 3,6 mg/100 g, C10:2ω6 8 mg/100 g, C20:4ω6 31 mg/100 g, C20:5ω3 86 mg/100 g e C22:6ω3 97 mg/100 g, com um total de 34% de ácidos graxos saturados e 39% de polinsaturados, a soma de EPA mais DHA correspondeu a 27%. Ibrahim, Salama e El-Banna (1999), em estudo com resíduo de camarão *Penaeus ssp*, encontraram no cefalotórax 38,0 e 61,9% de ácidos graxos saturados e insaturados,

respectivamente. Já para o exoesqueleto, os percentuais obtidos de ácidos graxos saturados e insaturados foram 39,9 e 60,10%, respectivamente. Os ácidos graxos mais importantes do cefalotórax: são: C18:1 21,66%; C18:2 19,49%; C14:0 16,79%; C18:3 15,94%; C18:0 9,44% e C12:0 6,41% e para o exoesqueleto, C18:2 34,49%; C20:0 33,57%; C18:3 13,72%; C18:1 9,44%; C18:0 4,43% e C16:1 2,45%. Sahidi e Synowiecki (1991) encontraram para o resíduo de camarão *Pandalus borealis* os principais ácidos graxos: C18:1 21,82%, C20:5 (EPA) 13,16%, C16:0 11,80%, C22:6 (DHA) 10,57%, C20:1 10,00% e C22:1 7,63%, sendo o valor do EPA 13,16% superior ao do DHA 10,57%.

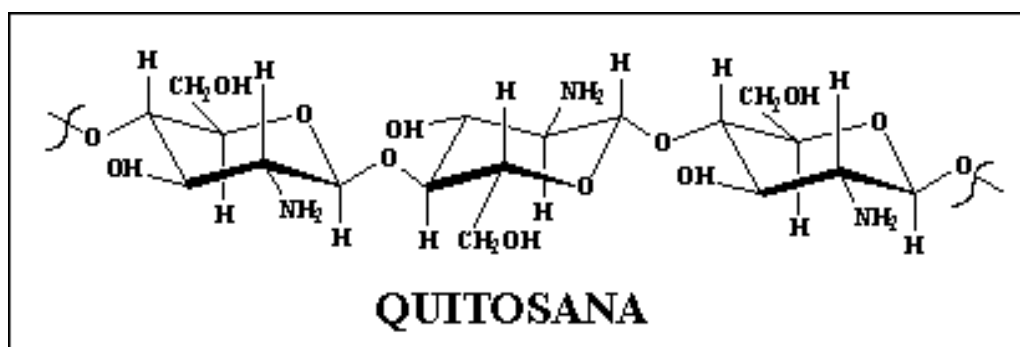
### 2.1.3 Quitina

A quitina, depois da celulose, é o polímero natural mais abundante encontrado na natureza e o mais importante componente orgânico presente no exoesqueleto dos invertebrados. Muitos organismos produzem esse polissacarídeo, mas resíduo de caranguejo, lagosta, exoesqueleto de camarão e de outros crustáceos são as principais fontes industriais (NAIR; MANDHAVAN; GOPAKUMAR, 1986). A quitina é um polímero de cadeia longa e alto peso molecular constituído por unidades de N-acetilglucosamina, unidas por ligações do tipo  $\beta$  (1- 4), sendo insolúvel em água quando o grau de acetilação está entre 40-50% (RINAUDO; MILAS; DESBRIERES; KNORR, 1991; SAAVEDRA et al., 1998). Dependendo do método de processamento do camarão, pode ser encontrado no resíduo entre 14% e 27% de quitina (ORNUM, 1992; SUBASIMGHE, 1999).

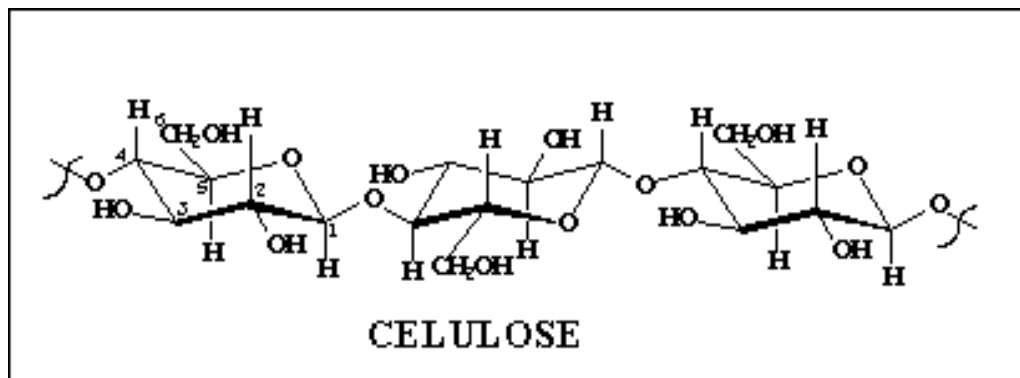
O derivado desacetilado da quitina, a quitosana, despertou interesse há poucas décadas devido à sua ampla variedade de aplicações. É quimicamente semelhante à celulose (Figura 2), sendo diferenciada pelo grupo N-acetil, amina e hidroxila. A quitosana é um polímero catiônico linear, interligada unicamente por ligações  $\beta$  (1-4), poli-2 dioxi-2 amino glucose (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999), solúvel em muitos ácidos orgânicos diluídos, mas insolúvel em solventes orgânicos e pH em torno de 6,5 (ORNUM, 1992).



(a)



(b)



(c)

**FIGURA 2.** Estrutura molecular da quitina (a), quitosana (b) e celulose (c)

Estes polímeros oferecem uma ampla variedade de aplicação na indústria alimentícia (CARROAD; TOM, 1978; REVAH-MOISEEV; CARROAD, 1981; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991). Dentre as suas propriedades destacam-se: antimicrobiana (PAPINEAU et al., 1991; CHEN; LIAU; TSAI, 1998), sua utilização na formação de filmes biodegradáveis (WONG et al., 1992), na recuperação de material

residual do processamento de alimentos (BOUGH, 1975; PINOTTI; BEVILACQUA; ZARITZKY, 1997), na purificação de água (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999) e na clarificação de sucos de fruta (IMEN; KNORR, 1988; SPAGNA et al., 1996). Além de aplicações na indústria de alimentos, a quitina e a quitosana também têm aplicações nas indústrias farmacêutica, têxtil, em cosméticos e na agricultura (IMERI; KNORR, 1988; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; LIN et al., 1997)

Diversos trabalhos têm descrito o processamento da quitina e posterior obtenção da quitosana. Sua produção tradicional envolve três etapas básicas: (1) desproteinização, com solução de base forte como NaOH e KOH, sob aquecimento; (2) desmineralização, com solução ácida de HCl a temperatura ambiente e (3) clarificação, utilizando hipoclorito de sódio para remoção dos pigmentos presentes na matriz polimérica. Para obtenção da quitosana, realiza-se uma desacetilação depois da etapa (2), com solução concentrada de NaOH sob aquecimento. (CANELLA; GARCIA, 2001; TENG et al., 2001; GAGNÉ; SIMPSON, 1993; NO et al., 1989; NO; MEYERS; LEE, 1989; BRINE; AUSTIN, 1981). Estes tratamentos criam problemas de descarte, quando seu resíduo líquido não sofre tratamento de neutralização (GAGNÉ; SIMPSON, 1993). Além disso, a proteína apresenta baixa funcionalidade e o seu valor nutritivo é afetado pela presença de hidróxido de sódio (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

O isolamento da quitina também tem sido realizado com o uso de enzimas proteolíticas, o que possibilita a concomitante recuperação da proteína, diminuindo o descarte e a poluição ambiental. Ao contrário do tratamento químico, o enzimático não provoca racemização dos aminoácidos, mantendo o valor nutricional da proteína que pode ser utilizada tanto na alimentação humana como na animal (GAGNÉ; SIMPSON, 1993; GILDBERG; STENBERG, 2001).

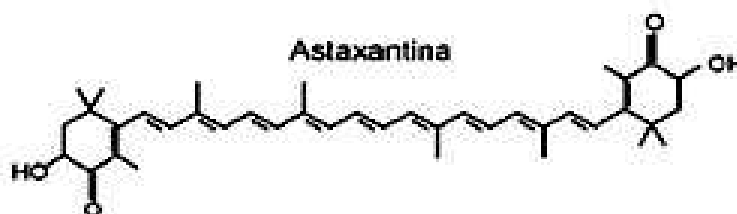
#### **2.1.4 ASTAXANTINA**

Carotenóides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em fungos, bactérias, em todos os tecidos de plantas verdes, em partes de plantas não fotossintéticas como frutas, flores, sementes, raízes e também em animais (SIMPSON; CHICHESTER, 1981). Apresentam ampla



utilidade para o homem devido ao seu poder corante, que pode variar do amarelo ao vermelho. São corantes naturais de frutas, vegetais, alguns peixes e crustáceos. Podem ser adicionados aos alimentos, conferindo ou intensificando a cor em sucos de frutas, pastas alimentícias, bebidas, doces, margarinas, queijos, salsichas e outros. Indiretamente, através da dieta, servem para intensificar a cor da gema do ovo, da pele do frango e do leite. Podem ainda ser usados para colorir cápsulas de medicamentos e cosméticos (KLAUI; BAUERNFEIND, 1981).

Como os carotenóides não são sintetizados pelos animais, pesquisas têm sido realizadas no sentido da sua incorporação à dieta de peixes e crustáceos (OMARA-ALWALA et al., 1985; GUILLOU; KHALIL; ADAMBOUNOU, 1995; WATHENE et al., 1998; PANGANTIHON-KUHLMANN; MILLAMENA; CHERN, 1998). Nos crustáceos, os carotenóides ocorrem livres ou em combinação com a proteína. São compostos por astaxantina, astancene, cantaxantina, astaxantina esterificada e zeaxantina (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991), sendo seu maior componente representado pela astaxantina esterificada. A estrutura molecular da astaxantina está apresentada na Figura 3.



**FIGURA 3.** Estrutura molecular da astaxantina

Fonte: Buchwald e Jencks (1968).

A incorporação da astaxantina em rações para a aquicultura tem se mostrado efetiva na pigmentação de salmonídeos e crustáceos, por isso, sua presença em exoesqueleto de camarão, lagosta, caranguejo e outros crustáceos tem sido investigada (GUILLOU; KHALIL; ADAMBOUNOU, 1995; SIMPSON et al., 1991; CHEN; MEYERS, 1982; MEYERS; BLIGH, 1981). Wathene et al. (1998) em sua pesquisa, observaram aumento de intensidade da coloração em salmão, utilizando

dieta contendo astaxantina. Pangantihon-Kuhlman et al. (1998), avaliando dieta para camarão suplementada com astaxantina, observaram resultados semelhante.

A determinação da concentração de astaxantina nos crustáceos varia em função do método de extração empregado e também da espécie utilizada. Óleos vegetais e solventes são utilizados para sua extração, sendo o óleo mais comumente usado por ser considerado uma boa barreira contra oxigênio, retardando a subsequente oxidação, além de ser utilizado como fonte de energia (MEYERS; BLIGH, 1981; CHEN; MEYERS, 1982; CHEN; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; NEGRO; GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2000).

Shahidi e Synowiecki (1991), Saito e Regier (1971) utilizaram resíduo de camarão *Pandalus borealis* e *Solenocera melanthera* para extração de astaxantina utilizando óleo, obtendo 14,77 e 11,11 mg de astaxantina /100 g de resíduo seco respectivamente. Gildberg e Stenberg (2001), utilizaram extração em solvente no resíduo de camarão *Pandalus borealis* e encontraram concentração de 150,0 mg de astaxantina /100 g de resíduo, sendo este valor 10 vezes maior que os valores encontrados na literatura para extração em óleo. Chen e Meyers (1982) encontraram 16,15 mg de astaxantina /100 g de resíduos de "crayfish", usando solvente, contra 8,0 mg de astaxantina /100 g, com extração com óleo.

### **3. HIDRÓLISE DE PROTEÍNA**

Na hidrólise, as proteínas são quimica ou enzimaticamente clivadas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos, obtendo-se produtos com características específicas, distribuição de aminoácidos e de peso molecular variado e certa quantidade de proteína residual intacta (LAHL; BRAUN, 1994).

Hidrolisados protéicos têm uma ampla variedade de usos na indústria de alimentos, incluindo suplementos protéicos, estabilizadores de bebidas não alcoólica e realçadores de flavorizantes em produtos de confeitaria. A utilização das proteínas de alimentos hidrolisadas para elaboração de ingredientes protéicos funcionais e suplemento nutricional é uma tecnologia mais recente quando comparada a o uso dos primeiros hidrolisados protéicos disponíveis comercialmente, que surgiram no final de 1940.

Recentes avanços têm dado condições aos pesquisadores para compreender que a ligação entre o processo e a extensão da hidrólise e os mecanismos físico-químicos são responsáveis pelas propriedades funcionais específicas da proteína hidrolisada (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Para se entender plenamente o processo de hidrólise de proteína, é importante se ter uma boa compreensão da natureza do substrato proteína e do agente hidrolisante.

### **3.1 Hidrólise química**

A hidrólise química é realizada pela clivagem de ligações peptídicas com ácido ou base. No passado, foi o método escolhido pela indústria, por ser relativamente pouco oneroso e simples de se conduzir. No entanto, existem limitações na utilização dos seus hidrolisados como ingrediente de alimentos, além da dificuldade de controle do processo, o que gera quase sempre produtos com composição química variável e propriedades funcionais distintas (SKADERBY, 1994; BLENFORD, 1994).

A hidrólise ácida pode ser realizada com uso de ácidos minerais, orgânicos ou por uma mistura de ambos. Os ácidos minerais, como o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico, embora de baixo custo, têm a desvantagem de necessitar de neutralização, antes do alimento ser consumido (OETTERER, 1994). Hidrólise ácida tem sido usada com maior frequência para hidrólise proteínas vegetais de baixo custo. Para hidrólise ácida de proteína de pescado, tem-se utilizado o ácido clorídrico ou em alguns casos o sulfúrico, onde as proteínas são completamente hidrolisadas e depois neutralizadas a pH 7,0, podendo ser concentradas até consistência de uma pasta. A hidrólise ácida resulta em uma considerável quantidade de sal nos produtos, decorrente da adição de NaOH para sua neutralização, o que pode tornar o produto não palatável e interferir em sua funcionalidade em alimentos. Outro inconveniente da hidrólise ácida, é a destruição do triptofano, que é um aminoácido essencial (THAKAR; PATEL; JOSHI, 1991).

A hidrólise alcalina é realizada com soluções de bases fortes, como NaOH e KOH, sob aquecimento e agitação, resultando em produtos com baixa funcionalidade, além de poder afetar o valor nutritivo dos hidrolisados protéicos (KRISTINSSON; RASCO, 2000). As quatro reações químicas que descrevem o que

ocorre com as proteínas quando se utiliza álcali são: (1) hidrólise da ligação peptídica, (2) destruição de alguns aminoácidos (3) cross-linking e (4) racemização de resíduos de aminoácidos do L-aminoácidos para D-aminoácidos, que não são absorvidos pelos humanos (HAYASHI; KAMEDA, 1980)

### **3.2 Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática é um método baseado na adição de enzimas para clivagem das proteínas. É um processo considerado importante, 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 (PHILLIPS; BEUCHATI, 1981; GONZALES-TELLO et al, 1994). Este tipo de hidrólise oferece vantagens porque permite um bom controle do processo e, conseqüentemente, das propriedades dos produtos resultantes (SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995). O processo de hidrólise resulta na diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos. A combinação desses efeitos provoca mudança das propriedades funcionais de uma proteína.

A reação de hidrólise depende da concentração e especificidade da enzima, temperatura e pH da reação, da extensão da desnaturação da proteína nativa, da presença de substâncias inibidoras e do grau de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986; PANYAM; KILARA, 1996; TURGEON et al., 1992).

Grau de hidrólise (GH) é a medida da extensão da degradação da hidrólise da proteína e pode ser definido como sendo o número de cadeias de peptídios clivados ou como o número dos grupos  $\alpha$ -amino livres formados durante a proteólise, expresso em hidrólise equivalente (h), em relação ao número total das cadeias de peptídios ( $h_{total}$ ). Existem vários métodos para medir o grau de hidrólise, variando em sua complexidade, precisão e exatidão, sendo eles: a medida de solubilidade em ácido tricloroacético (TCA), determinação do nitrogênio amino através da titulação com formaldeído, e reação com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e pH-stat (MAHMOUD, 1994).

Os hidrolisados compostos por peptídios de baixo peso molecular têm sido utilizados em dietas para portadores de desordens metabólicas, e, mais recentemente, em formulações destinadas ao controle de peso, para atletas e para idosos (FROKJAER, 1994; CORDLE, 1994; SCHMIDL; TAYLOR; NORDLEE, 1994). O hidrolisado tem sido usado em formulações de dieta microencapsulada para larvas de peixes e tem mostrado boa estabilidade, aceitação e desintegração em seu intestino (CAHU et al, 1998; OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999; KOLKOVSKI; CZENY; DABROWSKI; 2000; KOLKOVISK, 2001; CAHU; INFANTE, 2001).

Dentre as várias propriedades funcionais da proteína hidrolisada, a solubilidade é provavelmente a mais estável, pois algumas delas, como a emulsificação e formação de espuma, são afetadas por ela (WILDING; LILIFORD; REGENSTEIN, 1984), tornando-se um excelente indicador da funcionalidade da proteína hidrolisada (KINSELLA, 1976; MAHMOUD, 1994). Interações hidrofóbicas e iônicas são os principais fatores que influenciam as características da solubilidade das proteínas. Interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína e resultam na diminuição da solubilidade, enquanto interações iônicas promovem interações proteína - água promovendo o aumento da solubilidade. A elevada solubilidade da proteína hidrolisada se deve ao seu pequeno tamanho molecular quando comparado com o da proteína intacta, e à exposição dos grupos amino ionizáveis e carboxílicos dos aminoácidos, que aumentam a hidrofiliidade dos hidrolisados (GAUTHIER, 1993; MAHMOUD, 1994).

### **3.3.Utilização de hidrólise enzimática na recuperação de resíduos**

Resíduos do processamento industrial de origem animal, principalmente pescados e aves, contém elevado teor de proteína de alto valor biológico, que pode ser recuperada e utilizada tanto na alimentação humana como animal (KIJOWSKI; NIEWIA; ROWICZ, 1985).

O processo enzimático possibilita a recuperação da proteína de produtos e de subprodutos da indústria ou ainda de espécies subutilizadas, como: carcaça do abate de aves domésticas (FONKWE; SINGH, 1986; SUROWKA; FIK, 1994; LINDER et al, 1995), caseína (MOHMOUD; MALONE; CORDLE, 1992; LIN et al., 1997), plantas (PARRADO et al, 1993; MONTEIRO; PRAKASH, 1996), peixes (HOYLE; MERRITT, 1994; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1995; LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999), camarão e resíduos (FERRER et al, 1996; SIMPSON et al, 1998; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000; GILDBERG; STENBERG, 2001) e resíduos de lagosta e lagostin (JASWAL, 1990; VIEIRA et al, 1995; BAEK; CADWALLADER, 1995).

Simpson et al. (1998) estudaram as condições ótimas para reação da hidrólise do músculo de camarão fresco e congelado utilizando as enzimas quimotripsina e tripsina. As duas enzimas produziram hidrolisados com elevado teor dos aminoácidos alanina, prolina, glicina e arginina, considerados importantes para o flavorizante dos crustáceos. Synowiecki e Al-Khateeb (2000), produziram hidrolisado protéico de resíduo de camarão *Crangon crangon* usando alcalase e obtiveram 69,2% de recuperação de nitrogênio, após 4 horas de reação a 55°C, tendo atingido 30% de grau de GH. O hidrolisado obtido apresentou alto PER, 2,99, e o perfil de aminoácidos indicou ser uma boa fonte de aminoácidos essenciais (46,6%), podendo ser utilizado tanto para consumo humano como animal. O hidrolisado produzido apresentou 98% de solubilidade em pH<sub>s</sub> extremos (2,0 e 10,0) e a mínima solubilidade, 81,7%, foi observada no ponto isoelétrico (pH 4,0). Gildberg e Stanberg (2001) obtiveram hidrolisados de resíduo de camarão *Pandalus borealis*, utilizando alcalase com elevado teor de aminoácidos essenciais, 40,95%.

A hidrólise enzimática além de recuperar proteína também pode reduzir o volume de resíduos (água residuais) gerados em grande quantidade quando o método alcalino é utilizado, além disso, o processo é considerado simples, eficiente e transcorre em condições brandas, não destruindo as proteínas recuperadas, pela racemização e/ou outras reações químicas (LAWRENCE; JELEN, 1982). Este método não só recupera a proteína como também proporciona a obtenção de outros componentes de valor do resíduo, especialmente nos crustáceos tais como a quitina e a astaxantina. A quitina e seu derivado desacetilado poderão ser utilizados na

industria de alimentos com várias aplicações e a astaxantina como ingrediente na fabricação de rações, especialmente na aquicultura (GILDBERG; STENBERG, 2001).

#### 4. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As enzimas proteolíticas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Algumas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos, enquanto outras agem mais amplamente. De acordo com o mecanismo de ação, as enzimas classificam-se em endo ou exopeptidases. As exopeptidases são enzimas que hidrolisam a proteína nas extremidades N-terminais e as endopeptidases hidrolisam a proteína no interior da molécula, geralmente em resíduos específicos. A natureza do sítio catalítico da enzima permite outra classificação: a) serina-proteases que apresentam uma hidroxila no seu centro ativo, incluindo-se neste grupo a quimotripsina, tripsina, elastase, protrombina e a protease  $\alpha$ -lítica de *Sorangium*; b) cisteína-proteases, onde o grupamento é a sulfidril, incluindo as enzimas de origem vegetal (papaína, bromelina e ficina), de origem microbiana e de animal; c) metaloproteases que contêm um metal, geralmente o zinco; d) proteases aspárticas, cujo sítio ativo apresenta o grupo carboxila do ácido aspártico, estando entre as principais enzimas deste grupo a renina e a pepsina (LOFFLER, 1986; ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994).

Na indústria de alimentos, as proteases são usadas no processamento de diversos produtos, incluindo vinhos, cereais, leite e derivados, carne e produtos de peixe, legumes para produção de hidrolisados e obtenção de flavorizantes (EZQUERA; GARCÍA-CARREÑO, 1999). Na Tabela 2 estão listadas várias enzimas utilizadas em hidrólise protéica.

Proteases alcalinas são produzidas por bactérias e fungos, sendo as mais importantes os *Bacillus* (*licheniformes*, *amyloliquefacillus*, *firmus*, *megaterium* e *pumilis*), *Streptomyces* (*fradiae*, *griseus*, *rectos*) e fungos como *Aspergillus* (*niger*, *sojiae*, *oryzae*, *flavus*). As proteases deste grupo caracterizam-se por apresentar estabilidade em pH alcalino, na faixa de 9 a 11 e são usadas principalmente na fabricação de detergentes (CHEFTEL et al. 1989).

As proteases ácidas representam o segundo maior grupo das proteases de importância industrial. São representadas pela renina e pepsina, sendo a renina utilizada principalmente na produção de queijos. Apresentam atividade na faixa de pH 2 – 4 e a catepsina D, com atividade na faixa de pH 3 a 5 (CHEFTEL et al. 1989).

Proteases microbianas demonstram ser as mais promissoras, por apresentarem uma maior variedade de enzimas específicas quando comparadas com as plantas e animais, e também devido ao baixo custo de produção (LOFFLER, 1986; DINIZ; MARTINS, 1999).

**TABELA 2.** Enzimas usadas em hidrólise enzimática de proteínas.

PROTEASES	ORIGEM	pH de máxima atividade proteolítica	Temperatura (°C) de máxima atividade proteolítica
<b>Microbiana</b>			
Alcalase	<b>Bacillus licheniformis</b>	6,5 – 8,5	55 - 70
Neutrase	<b>Bacillus subtilis</b>	5,5 – 7,5	45 - 55
Pronase	<b>Streptomyces griseus</b>	7,0 – 9,0	37
<b>Animal</b>			
Quimotripsina	Bovina/suína	7,0 – 9,0	40
Pancreatina	Bovina/suína	7,0 – 9,0	40
Pepsina	Bovina/suína	2,0 – 4,0	40
Tripsina	Bovina/suína	7,0 – 9,0	40
<b>Planta</b>			
Bromelina	Caule do abacaxi	5,0 – 8,0	50 -60
Ficina	Látex de figos	5,0 – 8,0	30 - 50
Papaina	Mamão	5,0 – 7,0	65 - 80

Fonte: Diniz e Martin (1999)

Várias proteases comerciais são utilizadas para solubilizar proteínas de pescado, porém a alcalase, uma endopeptidase alcalina produzida pelo *Bacillus licheniformis*, tem sido usada intensivamente por muitos pesquisadores por ser uma das melhores enzimas para o preparo de hidrolisados, pois o produto apresenta gosto suave mesmo quando tem elevado grau de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986; QUAGLIA; ORBAN, 1987; SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995; DINIZ; MARTIN, 1996). Já a pancreatina, uma mistura de endo e exopeptidases, tem sido mais utilizada para produção de hidrolisados para fins nutricionais, por seguir o modelo da digestão intestinal das proteínas (PALMER, 1985).



## 5. REFERÊNCIAS

AABCC- Associação Brasileira de Criadores de CAMARÃO (2000). Disponível em: <[www.abccam.com.br/agronegocio/breve.htm](http://www.abccam.com.br/agronegocio/breve.htm)>. Acesso em 04 abr 2003.

ADLER-NISSEN, J. **Enzimic Hydrolysis of Food Proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 427p.

AKIYAMA, D. M. Soybean meal utilization by marine shrimp. AQUACULTURE FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP. Anais... Thailand, Indonésia, Singapore: American Soubean Association, p. 05-09, 1991.

BAEK, H.H.; CADWALLADER, K. R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. **Journal of Food Science**, v. 60, n.5, p. 929 - 935, 1995.

BATAILLE, M. P.; BATAILLE, P. F. Extraction of proteins from shrimp processing waste. **Journal Chemistry and Tecnology Biotechnology**, v. 33, n.2, p. 303 – 208, 1983.

BAUERNFEID, J. C.; SMITH, E. G.; BUNNELL, R. H. Coloring Fat-Base Foods with  $\beta$ -Carotene. **FoodTecnology**, v. 12, n. 10, p. 527- 535, 1958,

BLENFORD, D. E. Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. **International Food Ingredient**, v. 3, p.45, 1994.

BOTTINO, N. R.; LILLY, M. L.; FINNE, F. Fatty acid stability of gulf of Mexico brown shrimp (*Penaeus aztecus*) hold on ice and in frozen storage. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1778 -1779, 1979.

BOUGH, W. A. Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 297- 301, 1975.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA. Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergir*) and wild warine shrimp (*Penaeus brasiliensis*); *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 359 - 369, 2001.

BRINE, C. J.; AUSTIN, P. R.; Chitin isolates: species variation in residual amino acids. **Comp. Biochemistry Physiology**, v. 70B, p. 173, 1981.

BUCHWALD, M.; PENCKS, W. P. Optical properties os astaxanthin solutions and aggregates. **Journal of Biochemistry**, v. 7, n.2, p. 834 – 843, 1968.

CAHU, C.; INFANTE, J. Z. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 200, p. 161 -180, 2001.

CAHU, C.; INFANTE, J. Z.; ESCAFFRE, A. M.; BERGOT, P. KAUSHIK, S. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**, v. 169, n. p. 1-7, 1998.

CANELLA, K. M. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel- Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 13 -17, 2001.

CARROAD, P. A.; TOM, R. A. Bioconversion of shellfish chitin waste: process conception and selection of microorganisms. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1158 -1161, 1978.

CARROAD, P. A.; TOM, R. A. Bioconversion of shellfish chitin wastes: Process conception and selection of microorganisms. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1158 -1161, 1978.

UNIVALI-CCTTMAR. Centro de Ciência Tecnológica da terra e do mar -Universidade do vale do Itajaí 2000. Disponível em <[www.gep.cttm.univali.br/sub\\_pesq/camarã0.html](http://www.gep.cttm.univali.br/sub_pesq/camarã0.html)> Acesso em: 04 abr 2003.

CHANG, L. K.; TSAI, G. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocer melantho*) shell waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.5, p. 1900 -1904. 1997.

CHEFTEL, J. C; CUW, J. L; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias**. Zaragoza, Acibia, 1989, p.

CHEN, C. LIAU, W.; TSAI, G. Antibacterial effects os N-sulfonated and N-sulfobenzovi chitosan and applications to ovster preservation. **Journal of Food protection**, v.61, p. 1124 -1128, 1998.

CHEN, H.M.; MEYERS, S. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1516 –1520, 1555, 1982.

CORDLE, C. T. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Technology**, v. n.1, p. 72 -76, 1994.

DINIZ, F; M.; MARTIN,.M. A. Hidrolisado protéico de Pescado In: OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado**. Livraria Varela, , 1, p. 360-365, 1999

DINIS, F. M. MARTIN, M.A .Fish protein hydrolysates by enzymatic processing. **Agro-Food-Industry Hi-Technology**, v.8, n.3, 1997.

DYERBERG, J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of arteriosclerosis. **Nutrition Reviews**, v. 44, n.4, p. 125 -134, 1986.

DZIEZAK, J. D., Ed., Enzymes: Catalysis for food process. **Food Technology**, v.46, n.1, p. 78, 1991.

ESSIEN, E. U. Lipid content and fatty acids profiles of some lesser known Nigerian foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 19, p. 153 -159, 1995.

EZQUERA, M. J.; GARCIA-CARRENÓ, F. L. Effect of feed diet on aminopeptidase activities from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Journal of Food Biochemistry**, v.23, p. 59 -74, 1999.

FAO—Food and Agriculture Organization 2000. Disponível em <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISH-PLUS.asp>. Acesso em: 15 jun 2003.

FERRER, J.; PAEZ, F.; MARMOL, Z.; RAMONES, E.; GARCIA, H.; FORSTER, C . F. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. **Bioresource Technology**, V.57, p. 55 - 60, 1996.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31. n.6, p. 605 - 616, 1996.

FRIEDMAN, K. Nutricional value of proteins from different food sources: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.1, p. 6 -10, 1996.

FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, v.4, n.1, p. 86 - 89, 1999.

GAGNÉ, N.; SIMPSON, B. K. Use of proteolytic to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. **Food Biotechnology**, v. 7, n.3, p. 253 - 263, 1993.

GAUTHIER, S. F.; PAQUIN, P.; POULIOT, Y.; TURGEON, S. Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. **Journal Dairy Science**, v. 76, n.1, p. 321 - 327, 1993.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8 - 9, p. 809 - 812, 2001.

GONÇALES-TELO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzimatic hydrolysis of whey proteins. I Kinetic models. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, n.4, p. 523 - 527, 1994.

GORDON, D. T.; ROBERTS, G. L. Mineral and Proximate Composition of Pacific Coast Fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.25, n.6, p. 1262 -1268, 1977.

GREEN, J. H.; MATTICK, J. F. possible methods for the utilization or disposal of fishery solid wastes. **Journal of Food Quality**, v.1, p. 229 - 251, 1977

GUILLOU, A.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. **Aquaculture**, v.130, p. 351 - 360, 1995.

HAARD, N. F. Valor nutritivo y composición de las proteínas y otros compuestos nitrogenados del pescado, In: **El pescado y los productos derivados de la pesca**, ed., RUITER, A. Editora Acribia, Zaragoza, 1995.

HALL, G M.; SILVAS. Shrimp waste ensilation. **INFOFISH International**, n.2, p. 27-30, 1994.

HAYASHI, R.; KAMEDA, I. Decreased proteolysis of alkali-treated protein: consequences of racemization in food processing. **Journal of Food Science**, v. 45, n. p. 1430 -1431, 1980.

HIRANO, S. The ecological and environmental fields. In: **APPLICATION OF CHITIN AND CHITOSAN**, edited by MATTHEUS F. A. GOOSEN, chapter 2, p. 336, 1997.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n.1, p. 76 -79, 1994.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, Brasilia, p. 96, 2002.

IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v.43, n.6, p. 418 - 423, 1999.

IMEN, A. G.; KNORR, D. Effect of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1707 - 1709, 1988.

JASWAL, A. S. Amino acid hydrolysate from crab processing waste. **Journal of Food Science**, v.55. n.2 , p. 379 - 397, 1990.

JOHNSTON, J. J.; GHANBARI, H. A. ; WHEELER, W. B.; KIRK, J. R. Characterization of shrimp lipids. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 33 - 35, 1983.

KIJOWSKI, J.; NIEWIAROWICZ, A. A method of protein extraction from chicken bone residue and the chemical and electrophoretic characteristics of the extract. **Journal of Food technology**, v. 20, n.1, p. 43 – 49, 1985.

KINSELLA, J. E. Fish and seafood: nutritional implications and quality issues. **Food Technology**, v. 42, n.5, p. 146 -150, 1988.

KINSELLA, J. E. Functional properties of proteins in foods: a survey, **Critical Reviews. Food science and Nutrition**, v.8, n.4, p. 219, 1976

KLAUI, H.; BAURERNFEIND, J. C. Carotenoids as food colors. In: **Carotenoids and colorants and vitamin a precursors**. BAUERNEFEIND, J. C., Ed, Academic Press, Nova York, p. 156, 1981.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**, v. 45, n.1, p. 114 -122, Jan, 1991.

KOLKOVSKI, S. CZENY, S.; DABROWSKI, K. Use of Krill Hydrolysate as a Feed Attractant for Fish Larvae and Juveniles. **Journal of the World Aquaculture society**, v. 31, n.1, p. 81 - 88, 2000.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, n.1, p. 181 - 201, 2001.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.1, p. 43 - 81, 2000.

KRZANOWEK, J.; PANUNZIO, L. J. Cholesterol and fatty acids in several species of shrimp. **Journal of Food Science**, v. 54, n.2, p. 237 - 239, 1989.

KRZECZKOWSKI, R. A. Fatty acids in raw and processed Alaska pink shrimp. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 47, n.11, p. 451 - 452, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v.48, n.10, p. 68 - 71, 1994.

LAWRENSE, L. A.; JELEN, P. Formation of lysino-alanine in alkaline extracts of chicken proteins. **Journal of Food Protein**, v. 45, p. 923 – 934, 1982.

LI, Q., et al. In: **Applications of Chitin and Chitosan**, In: GOOSEN, F. A , edited by MATTHEUS. chapter 1, p. 336, 1997.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v.64, n.6, p. 1000 -1004, 1999.

LIN, S. B., et al. Functional and immunological properties of casein hydrolysate produced from a two-stage membrane system. **Journal of Food Science**, v. 62, n.3, p. 480 - 486, 1997.

LINDER, M. FANNI, J.; PARMENTIER, M.; SERGENT, M.; PHAN-THAN-LUU, R. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 60, n.5, p. 49, 1995.

LOFFLER, A. Proteolytic enzymes: Sources and applications. **Food Technology**, v.40, n.1, p. 63-70, 1986.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v.40,n.11,p. 89 -113, 1994.

MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T. Enzymatic hidrolisis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**, v.57, n.5, p. 1223 -1229, 1992.

MANDEVILLE, S.; YAYLAN, V.; SIMPSON, B. K. Proximate analysis, isolation and identification of amino acids and sugars from raw and cooked commercial shrimp waste. **Food Biotechnology**, v.6, n.1, p. 51 - 64, 1992.

MAPA/DPA – Ministério da Agricultura e pecuária e do Abastecimento/Departamento de e aquicultura (2000). Disponível em: <  
[www.mercadodapesca.com.br/cadeiascamarãomarinho.php?pag=prod](http://www.mercadodapesca.com.br/cadeiascamarãomarinho.php?pag=prod)>  
Acesso em: 19 fev 2003.

MEYERS, S. P.; BLIGH, D. Characterization of Astaxanthin Pigments from Heat-Processed Crawfish Waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V.29,n.3, p. 505 - 508, 1981.

MEYERS, S. P. Utilization of shrimp processing wastes. **INFOFISH Marketing Digest**. n.4, p. 18 - 21, 1986.

MONTEIRO, P. V. PRAKASH, V. Alteration of functional properties of peanut (*arachis hypogaea l.*) protein fractions by chemical and enzymatic modifications. **Journal of Food Science**, v. 33, n.1, p. 19 - 24, 1996.

MORAIS, C.; MARTINS, J. F. P. Considerações sobre o aproveitamento de sobras da industrialização de pescado na elaboração de produtos alimentícios. **Boletim do ITAL**, Campinas, v.18, p. 254 -281, 1981.

NAIR, K. G. R.; MADRAVAN, P.; GOPAKUMAR, K. Novel use of chitinous waste from crustacean processing plants. **Infomarktin Digest**, n.4, p.20, 1986.

NATURALSUL – Agência Naturalsul info-guia. camarão(2000. Disponível em: < [www.naturalsul.com.br/camarão1.htm](http://www.naturalsul.com.br/camarão1.htm)>. Acesso em: 21 jul 2003.

NEGRO, J. J.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarku*). **Comparative Biochemistry and Physiology** part B, v. 126, n. 3, p. 347 - 352, 2000.

NO, H. K.; MEYERS, S. P.; LEE, K. S. Isolation and characterization of chitin from crawfish Shell waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n.3, p. 576 – 579, 1989.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 5, p. 119 -134, 1993/94.

OLIVA-TELES, A.; CERQUEIRA, A. L.; GONÇALVES, P.The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, p. 195 - 201, 1999.

OMARA-ALWALA, T. R. HVEI-MEI CHEN; ITO, Y.; SIMPSON, K. L.; MEYERS, S. P. Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.33, n. 2, p. 260 - 263, 1985.

ORNUM, J. V. Shrimp waste-must it be wasted? **INFOFISH International** (6), p. 48 - 53, 1992.

PALMER, B. A. T. Monomeric and Oligomeric Enzymes. In:\_\_\_\_\_-. **Understanding enzymes**, 2. ed. England: Ellis Horwood Limited, 1985, Cap. 5, p. 88 -96.

PANGANTIHONKULHMANN, M. P.; MILLAMENA, O.; CHERN, Y. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. **aquatic Living Resources**, v.11, n.6, p. 403 – 4 09, 1998.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n.2, p. 120 -124, 1996.

PAPINEAU, A. M. HOOVER, D. G.; KNORR, D.; FARKAS, D. F. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v. 5, n.1, p. 45 - 57, 1991.

PARRADO, J.; MILLAN, F.; HERNANDEZ-PINZON, I.; BAUTISTA, J.; MACAHADO, <sup>a</sup> Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n.11, p. 1821 – 1826, 1993.

PHILLIPS, M R, D, BEUCHAT, L. R. Protein Functionality in Foods. **ACS Symposium Series**, Washington D.C., 1981, pp 275.

PINOTTI, A. BEVILACQUA, A.; ZARITZKY, N. Optimization of the flocculation stage in a model system of a food emulsion waste using chitosan as polyelectrolyte. **Journal of Food Engineering**, v. 32, n. 1, p. 69 - 81, 1997.

QUALIA, G. B; ORBAN, E. Enzyme solubilisation of protein of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 38, n.3, p. 263 - 269, 1987a

REVAH-MOISEEV, S.; CARROAD, A. Conversion of the enzymatic hydrolysate os shellfish waste chitin to single-cell protein. **Journal Biotechnonology and Bioenginery**, v. 23, n. p. 1067 - 1078, 1981.

RINAUDO, M.; MILAS, M. DESBRIERESM J. Characterization and Solution Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives In: Applications of Chitin and Chitosan, GOOSEN, A. F, edited Mattheus, **Company Inc.**, 1997, p.336.

SAAVEDRA, A. P.; GUILLEN, <sup>a</sup> R. T.; BRAUER, I. R. E.; SILA, A. R.L.; CIAPARA, I.H. Métodos de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón. **Archives Latino Americanos de Nutricion**. V. 48, n.1, p. 58 - 61, 1998.

SAITO, A.; REGIER, L. W. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **Journal Fish Research**, v. 28, p. 509 - 512, 1971.

SCHMIDL, M. K.; TAYLOR, S. L.; NORDLEE, J. A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technology**, p. 77 - 85, 1994.

SHAHIDI, F. ARACHCHI, J. K. V.; JEON, YOU-JIN. Food applications of chitin and chitosans, **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p.37 - 51, 1999.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n.9, p. 1527 -1532, 1991.

SHAHIDI, F.; XIAO-QING HAN; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelim (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v.53, n.2, p. 285 - 293, 1995.

SHAHIDI, F.; XIAO-QUING HAN. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p. 501 - 547, 1995

SHIAU, S. Y. Seafood protein in human and animal nutrition, in: **Seafood Protein**, ed., SIRORSKI, Z. E., PAN, B. S., SHAHIDI, F., Eds., Chapman & Hall, New York, 1994.

SIESPE– Sistema Integrado de Estatística Pesqueira – Univali/ccttmar-MAPA/DPA (2000). Disponível em: < [www.icepa.com.br/impres](http://www.icepa.com.br/impres)> Acesso em: 26 fev 2003.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V. ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hidrolysis of Shrimp meat. **Food Chemistry**, v.6, n.1/2, p. 131 -138, 1998.

SIMPSON, K. L. CHICHESTER, C. O. Metabolim and nutrional significance of carotenoids. **Annu Review Nutrition**, v. 1, p. 351 – 374, 1981.

SKANDERBY, M. Protein hydolysate: their functionality and applications. **Food Technology**, v. n.10, p. 141 - 147, 1994.

SPAGNA, G. PIFFERI, P. G.; RANGONI, C. MATTIVI, F.; NICOLINI, G. PALMONRI, R. The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. **Food Research Internatinal**, v. 29, n.2, p. 241 - 248, 1996.

SUBASINGHE, S. Chitin from shellfish waste health benefits over-shadowing industrial uses. **INFOFISH Internatinal**, n.3, p. 58 - 61, 1999.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chcken heads: II- application of pepsin to the production of protein hydrolysate. **Journal Science Food and Agriculture**, v. 65, n.2, p. 289 - 296, 1994.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 147-152, 2000.

SYNOWIECKI, J.; JAGIELKA, R; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. **Food Chemistry**, v.57. n.3, p. 435 - 439, 1996

TENG, W. L.; KHOR, E.; TAN T. K.; LIM, L. Y.; TANG; S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi, **Carbohydrate Research**, v.332, N.3, p. 305 - 316, 2001.



TENUTA-FILHO, A.; ZUCAS, S. M. Cefalotórax de camarão rosa VI caracterização Químico-Nutricional do Resíduo obtido após a Recuperação da Proteína.. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3/4, p. 163 -169, 1987.

THAKAR, P. N.; PATEL, J. R. ; JOSHI, N. S. Protein hydrolysates; a review. **Indian Journal Dairy Science**, v. 44, n.1, p. 557, 1991.

TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F.; PAQUIN, P. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p.601 - 604, 634, 1992.

VIEIRA, G. H. F.; MARINS, A .M.; SAKER-SAMPAIO, S.; OMAR, S.; GONCALVES, C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of brazilian lobster (*Panulirus spp*) processing waste. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 69, N.1, p. 61 - 65, 1995.

WATHENE, E.; BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; VIDAR, V.; ODLAND, A. B. Pigmentation of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. **Aquaculture**, v.159, p. 217-231, 1998.

WONG, D. W. S.; GASTINEAU, F. A. GRGORSKI, K. A. ; TILLIN, S.J.; PAVIATH, A. E. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 540-544, 1992.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*)**



## Capítulo 2

### CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*).

#### RESUMO

O resíduo da industrialização do camarão, que corresponde a aproximadamente 70% da matéria-prima, é, em geral, destinado aos aterros sanitários sem qualquer tratamento, acarretando sérios problemas para o meio ambiente. A recuperação de seus principais componentes é uma alternativa para sua utilização e também para agregar valor a esta matéria-prima. Neste trabalho, caracterizou-se quimicamente o resíduo do processamento do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) coletado em épocas distintas. A análise química (base seca) indicou a presença de 30 a 48% de proteína, 20% de quitina e concentração de astaxantina entre 2,4 e 8,39 mg/100 g, quando extraída com óleo de soja, e 3,53 a 12,71 mg/100 g, quando extraída com solvente. Isoleucina, ácido glutâmico, leucina e o ácido aspártico foram os aminoácidos que apresentaram maiores concentrações. Do total de aminoácidos, cerca de 45% corresponderam aos aminoácidos essenciais. Quanto à composição em ácidos graxos, observou-se uma relação em torno de 1:2 para os ácidos graxos saturados e insaturados e percentuais médio de 15,42% para o eicosapentaenóico (EPA) e 23,97% para o docosahexaenóico (DHA) em relação ao total. Os resultados obtidos indicam que a composição do resíduo não está apenas associada à época da coleta, mas condições de processo do camarão (descascamento) e armazenamento da matéria-prima podem estar influenciando sua composição. A maior diferença observada entre as coletas foi no teor de astaxantina, que depende das condições ambientais. No entanto, os teores dos componentes avaliados foram semelhantes à resíduos de outras espécies do camarão, consideradas na literatura como boas fontes de quitina, proteína e astaxantina.

**Palavras-chave:** camarão; resíduo; composição química; quitina; astaxantina; proteína.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) distribui-se por toda a costa marítima e representa uma das principais espécies comerciais entre os camarões marinhos. Sua captura, em 1998, foi de 13.755 t, concentrada nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste (IBAMA, 2000). Em 1999, o volume capturado estimado no litoral de São Paulo foi de 1.029 t (MAPA/DPA, 2000, e no ano de 2002, no Estado de Santa Catarina, 1.600 t (SIESPE, 2003).

O camarão, quando não é comercializado “in natura”, é industrializado para obtenção de produtos sem cabeça (cefalotórax) ou produtos descascados por completo (cefalotórax e exoesqueleto). O cefalotórax compreende de 35 a 45% da matéria-prima e o exoesqueleto em torno de 47%; juntos chegam a representar cerca de 70% do peso da matéria-prima (SIMPSON; HAARD, 1985; CTTMAR-UNIVALI, 2000). Esses resíduos constituídos basicamente de cefalotórax, exoesqueleto, vísceras e restos musculares contribuem para o aumento da poluição ambiental, quando descartados indevidamente, pois sua degradação se dá de forma muito lenta (FAMINO et al, 2000; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991).

O aproveitamento do resíduo do camarão, assim como do resíduos de outros crustáceos, deve-se principalmente ao seu elevado conteúdo de quitina. A quitina e seu derivado desacetilado, a quitosana, têm ampla utilização na indústria de alimentos, para clarificação de sucos (Imeri; Knorr, 1988) e na produção de embalagens na forma de filmes (WONG et al., 1992). Também é amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica, têxtil, em cosméticos, em biotecnologia e na agricultura (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; LI et al., 1997).

Existe também interesse na recuperação de outros componentes do resíduo de camarão (proteína e carotenóides) e dos componentes flavorizantes (MEYERS, 1986). Uma vez recuperadas, as proteínas podem ser utilizadas como ingredientes em formulações de alimentos ou rações, em especial para a aqüicultura (MEYERS, 1986; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991). Já a astaxantina,

principal carotenóide presente em crustáceos, pode ser incorporada em rações destinadas a salmonídeos e crustáceos para promover a pigmentação característica destas espécies (SPINELLI; LEHMAN; WIEG, 19974; CHEN; MEYERS, 1982; MEYERS, 1986; GUILLOU; KHALIL; ADAMBOUNOU, 1995).

Os crustáceos apresentam diferenças em sua composição química em função das variações entre as espécies, estágio de desenvolvimento, alimentação e outros fatores biológicos ou ambientais como temperatura da água e maturidade sexual ou região de captura (KINSELLA, 1988; CHANG; TSAI, 1997). O conteúdo de carotenóides (Shahidi; Synowiecki, 1991) e lipídios em resíduos de crustáceos está relacionado à variação da estação, espécie, condição fisiológica, alimentação e região de captura (KINSELLA, 1988; GORDON; ROBERTS, 1977). A concentração de astaxantina nos resíduos de camarão depende, além da espécie, da quantidade relativa de cefalotórax e exoesqueleto e do tratamento térmico ou do método de desidratação usado (MANDEVILLE; YAYLAN; SIMPSON, 1992).

Análise química aproximada do resíduo do camarão *Crangon crangon* indicou a presença de 40,6% de proteína, 9,9% de lipídios, 17,8% de quitina e 27,5% de cinza (base seca) (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000). Freitas et al (2002) encontraram para farinha de resíduos de camarão sete-barbas um conteúdo de 42,69% de proteína, 2,66% de lipídios e 38,29% de cinza (base seca). Não foram encontrados outros estudos sobre a composição de resíduos da industrialização do camarão no Brasil, que seriam dados de importância para avaliação de seu potencial para obtenção de componentes de alto valor agregado. Este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente o resíduo do camarão sete-barbas e avaliar sua variação em duas épocas do ano.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Foi utilizado resíduo industrial do descasque mecânico do camarão marinho sete-barbas, fornecido pela Alpha Pescados, localizada no município de Guarujá, litoral de São Paulo. O resíduo foi lavado rapidamente sob água corrente, triturado

em moinho de facas modelo MA 630, congelado e liofilizado. Para total homogeneidade das partículas, o material liofilizado foi peneirado durante 10 minutos, em peneiras vibratórias, com abertura de malha variando de 35, a 60 mesh. O resíduo liofilizado foi acondicionado em potes de vidro e armazenado a – 20°C.

Foram realizadas quatro coletas, duas no ano de 2000 e duas em 2001 nos meses de julho e dezembro, épocas de maior captura deste crustáceo.

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Composição química aproximada**

Para a determinação da composição química aproximada do resíduo, determinou-se a umidade do resíduo e, para as demais análises, utilizou-se o material liofilizado. As análises foram realizadas em triplicata.

Umidade, cinzas e proteínas (Nx6,25) foram quantificados de acordo com os métodos AOAC (1990) e os lipídios totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959).

### **2.2.2 Determinação de quitina**

O teor de quitina foi determinado de acordo com Spinelli, Lehman e Wieg (1974), em que o resíduo é submetido à desproteínização com NaOH 2%, seguido de neutralização e desmineralização com HCl 5%.

### **2.2.3 Extração e quantificação de astaxantina**

A extração dos pigmentos da família dos carotenóides, reportados como astaxantina, seguiu o procedimento metodológico descrito por Chen e Meyers (1982), conforme ilustrado na Figura 2. Foram utilizados óleo de soja e mistura de solventes, éter de petróleo, acetona e água, na proporção 15:75:10. A quantificação da astaxantina em óleo de soja foi feita por leitura de absorvância em comprimento de onda de 485nm, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU<sup>R</sup>-70. O valor do coeficiente de extinção empregado foi  $E_{1cm}^{1\%} = 2155$ . Na

quantificação em solvente, a leitura foi realizada em comprimento de onda de 470 nm, usando coeficiente de extinção de  $E_{1cm}^{1\%} = 2400$  (MEYERS; BLIGH, 1981). A concentração dos pigmentos, expressos como astaxantina, no resíduo de camarão foi calculado pela equação de Kelley e Harmon (1972):

$$[\text{Astax}] = \frac{A \times D}{100 \times G \times d \times E_{1cm}^{1\%}} \quad (1)$$

Onde:

[Astax] = concentração de astaxantina em mg/100 g de resíduo;

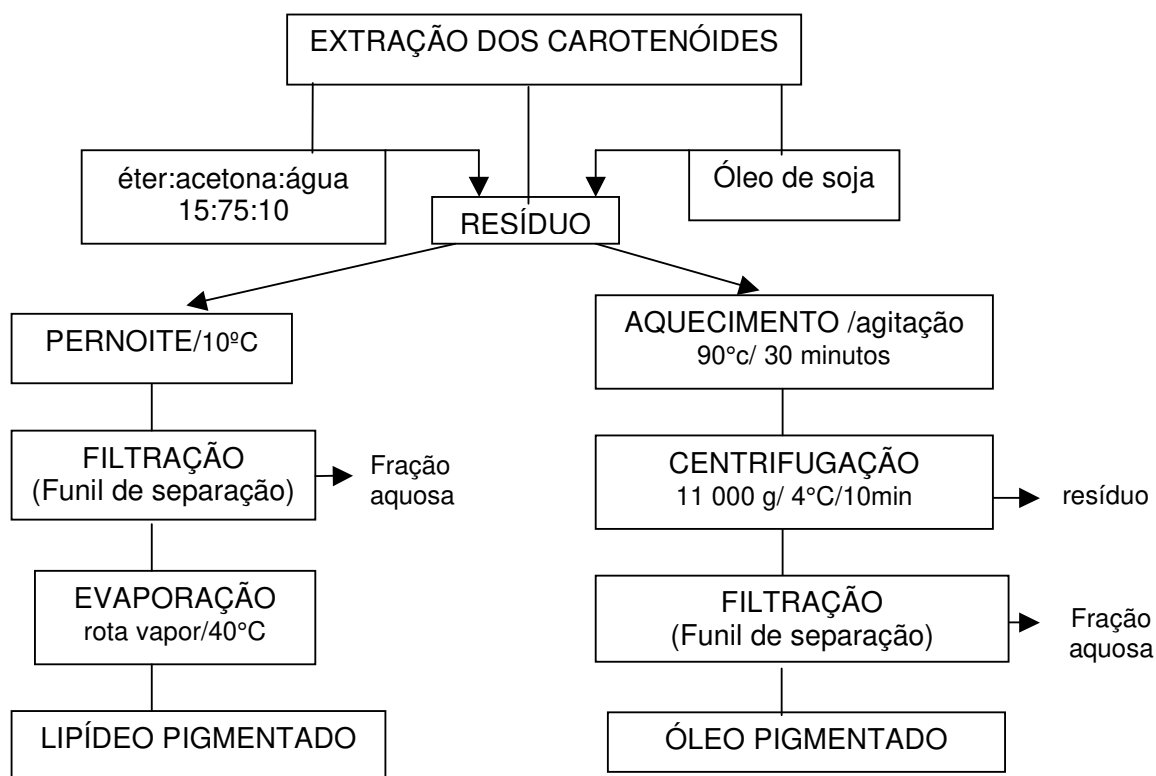
A = absorvância;

D = volume de óleo recuperado (mL) X diluição;

G = peso de amostra (g);

d = largura da cubeta (1cm);

$E_{1cm}^{1\%}$  = Coeficiente de extinção



**FIGURA 1.** Fluxograma de extração e quantificação da astaxantina do resíduo do camarão sete-barbas com óleo de soja e com solvente.



#### **2.2.4 Ácidos graxos**

Para determinação dos ácidos graxos, os lipídios foram extraídos do material liofilizado, seguindo o método de Bligh e Dyer (1959) e, em seguida, foi realizada a esterificação metílica, de acordo com o descrito por Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa em cromatógrafo Varian 3600, com detector de ionização de chama (FID) em coluna J & W Scientific. A temperatura programada da coluna foi de 170°C a 210°C, com taxa de aquecimento de 1°C por minuto, enquanto a do detector e do injetor foi de 250°C. A vazão do gás de arraste utilizada foi 1,0 mL/min. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra, utilizando uma mistura de padrões de marca Sigma Chemical Company 189-19. A quantificação foi expressa em percentagem de área dos lipídios totais.

#### **2.2.5 Aminoácidos totais e livres**

A composição dos aminoácidos totais das amostras liofilizadas foi determinada após hidrólise ácida com HCL 6N, a 110° C por 22 horas, de acordo com o método descrito por Spackman, Stein e Moore (1958). Em seguida, as amostras foram recuperadas com tampão citrato pH 2,2, para aminoácidos. Para a determinação da composição dos aminoácidos livres, pesou-se 500 mg da amostra liofilizada e a ela foram adicionados 4 mL de solução de ácido sulfossalicílico 3,5% (BECKMAN, 1977). As amostras foram agitadas e centrifugadas a 7900 g a 4°C por 15 minutos e recuperadas em tampão citrato pH 2,2, para aminoácidos. Os aminoácidos totais e livres foram quantificados em analisador automático de troca iônica (Thermo Separation Products Vacuum Membrane Degasser P4000, reactor PCX 3100; Pickering Laboratories, UK), com reação pós-coluna, utilizando ninidrina.

### **2.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais do resíduo e do músculo**

A determinação do perfil eletroforético das proteínas totais do resíduo e do músculo foi realizada segundo Laemmli (1970), utilizando-se gel de separação com 12% de acrilamida e gel de empilhamento com 4%. A análise foi realizada a 120V em um sistema Mini-protein II. Os pesos moleculares foram determinados utilizando-se o padrão de marcadores *LMW calibration kit* (Pharmacia) : fosforilase b (94 kDa); albumina bovina (67 kDa); ovalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$  lactoalbumina (14,4 kDa).

### **2.2.7 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados por análise de variância e as diferenças entre as médias das amostras, pelo teste de Tukey (Cockran; Cox,1957), utilizando-se o programa computacional Statistica 5.0.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Composição química**

O resíduo “in natura” do camarão sete-barbas apresentou nas quatro coletas realizadas teores de umidade (g/100g) de  $86,69 \pm 0,29$ ,  $88,40 \pm 1,42$ ,  $86,82 \pm 0,59$  e  $89,86 \pm 0,25$ , respectivamente.

Os resultados obtidos para composição química do resíduo liofilizado do camarão sete-barbas nas quatro coletas estão apresentados na Tabela1.

**TABELA 1.** Composição química (g/100 g) do resíduo industrial do camarão sete-barbas liofilizado nas quatro coletas realizadas.

Componentes	COLETAS				Média
	Julho/2000	dezembro/2000	Julho/2001	dezembro/2001	
Umidade <sup>2,3</sup>	7,30 ± 0,09 <sup>b</sup>	7,56 ± 0,05 <sup>b</sup>	6,84 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,45 ± 0,18 <sup>a</sup>	7,04
Proteína <sup>1,2,3</sup>	41,94 ± 0,89 <sup>b</sup>	31,28 ± 1,00 <sup>c</sup>	29,73 ± 0,16 <sup>d</sup>	48,14 ± 0,49 <sup>a</sup>	37,77
Lipídios <sup>1,2,3</sup>	3,75 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,28 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,54
Cinza <sup>1,2,3</sup>	33,03 ± 0,98 <sup>b</sup>	37,16 ± 2,20 <sup>a</sup>	39,56 ± 0,44 <sup>a</sup>	31,98 ± 1,37 <sup>b</sup>	35,43
Quitina <sup>1,2,3</sup>	19,20 ± 0,36 <sup>b</sup>	21,08 ± 0,43 <sup>a</sup>	19,44 ± 0,57 <sup>b</sup>	19,92 ± 0,37 <sup>b</sup>	19,91

<sup>1</sup> Valores em base seca.

<sup>2</sup> Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>3</sup> Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

O teor de proteína bruta das amostras liofilizadas, nas quatro coletas, variou de 30 a 48% e apresentaram diferença estatística (p< 0,05). Comparando-se com os dados da literatura, os resultados obtidos neste trabalho para as coletas um e quatro situam-se nas mesmas faixas de valores reportadas para resíduo do camarão de algumas espécies, como *Crangon crangon*, *Penaeus ssp* e *Pandalus borealis* com 40,6; 47 e 41,9%, respectivamente (IBRAHIM; SALAMA; EL-BANNA, 1999; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000). Assim como, para farinha do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) 42,69%, descrito por Freitas et al (2002).

As médias para os lipídios totais variaram de 3,3 a 3,8% e não apresentaram diferença (p>0,05) entre as coletas. Quando Comparados com a literatura, esses resultados foram superiores ao encontrado por Freitas et al (2002) em farinha do resíduo do camarão sete-barbas 2,66%, e inferiores para resíduo do camarão das espécies: *Solenocera melantho* (8,4%) e *Crangon crangon* (9,95%) (CHAN; TSAI, 1997; SYNOWIECK; AL-KHATEEB, 2000).

Os conteúdos médios encontrados para cinza situaram-se entre 32 e 39,6% e os valores encontrados nas coletas um e quatro apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) das coletas dois e três. Valor semelhante para a farinha de resíduos da mesma espécie foi reportado por Freitas et al (2002), 38,29%. Synowiecki e Al-khateeb (2000), Gildberg e Stenberg (2001) encontraram médias de cinza para o resíduo de camarão das espécies *Crangon crangon* e *Pandalus borealis*, 26 e 27,5%, respectivamente. Chang e Tsai (1997) encontraram para a espécie *Solenocera melantho*, 40% de cinzas.

Os teores de quitina variaram de 19,2 a 21,1% e foram similares aos valores obtidos para as espécies *Pandalus borealis* (17%), *Crangon crangon* (17,8%) e *Solenocera melantho* (23,3%), reportados por Chan e Tsai (1997), Shahidi e Synowiecki (1991) e Synowiecki e Al-Khateeb (2000), respectivamente.

Consideráveis diferenças na composição química de crustáceos podem ocorrer com as variações de espécie, época do ano e local da captura, temperatura da água, maturidade sexual e alimentação (KINSELLA, 1988; CHAN; TSAI, 1997). Em relação aos resíduos, o tipo de processamento utilizado também pode influir em sua composição. A variabilidade aqui observada no teor protéico pode ser atribuída a parâmetros de processo, como ajuste na máquina de descascamento, resultando em maior quantidade de músculo no resíduo.

### **3.2 Astaxantina**

A quantificação da astaxantina (Tabela 2) mostra que a extração com mistura de solventes foi de 30 a 80% mais efetiva que com óleo, apresentando concentração de 3,53 e 12,71 mg de astaxantina/100 g de resíduo (b.s), enquanto que na extração com óleo, a concentração variou entre 2,45 a 8,34 mg de astaxantina /100 g de resíduo. Não foi possível relacionar a grande diferença observada nos teores de astaxantina entre as coletas à época do ano, pois as coletas do mês de julho (inverno no hemisfério sul), apresentaram o maior e o menor valores encontrados, enquanto as coletas realizadas em dezembro

apresentaram valores semelhantes entre si. A quantidade de pigmentos depende dos carotenóides disponíveis na alimentação dos crustáceos, assim como das condições de vida e da região de captura (SHAHIDI; SYNOWIECKI 1991). Shahidi e Synowiecki (1991) obtiveram 14,8 mg de astaxantina /100 g de resíduo para resíduo do camarão *Pandalus borealis*, enquanto Saito e Regier (1971) encontraram 11,1 mg de astaxantina/100 g do resíduo, para o camarão *Solenocera melantho*. Em ambos os casos, foi utilizada extração com óleo de bacalhau.

**TABELA 2.** Concentração de astaxantina no resíduo do camarão sete-barbas utilizando óleo ou solvente como meio de extração. Valores expressos como mg de astaxantina/100 g de resíduo seco.

EXTRAÇÃO	COLETAS				média
	Julho/2000	dezembro/2000	julho/2001	dezembro/2001	
ÓLEO <sup>1,2,3</sup>	8,39 ± 3,85 <sup>a</sup>	4,37 ± 5,29 <sup>b</sup>	2,45 ± 1,76 <sup>c</sup>	4,9 ± 2,00 <sup>b</sup>	5,03
SOLVENTE <sup>1,2,3</sup>	12,71 ± 1,60 <sup>a</sup>	5,64 ± 0,23 <sup>c</sup>	3,53 ± 1,20 <sup>d</sup>	9,17 ± 8,70 <sup>b</sup>	7,76
<b>Razão de extração</b>					
SOLVENTE/ÓLEO	1,52	1,29	1,44	1,87	1,53

<sup>1</sup>Valores em base seca.

<sup>2</sup>Média de três determinações±desvio padrão

<sup>3</sup>Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

### 3.3 Composição dos ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos do resíduo da industrialização do camarão sete-barbas está apresentada na Tabela 3. Os ácidos graxos identificados que apresentaram maior concentração foram: C22:6 $\omega$ 3 (DHA) , C16:0 , C20:5 $\omega$ 3 (EPA), C18:1 $\omega$ 9 , C20:4 $\omega$ 6 e C18:0. A porcentagem dos ácidos graxos saturados em relação ao total variou de 26 a 32% e dos insaturados de 67 a 74%. Valores semelhantes foram reportados por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya (2001) para músculo da mesma espécie estudada no presente trabalho, *Xiphopenaeus kroyeri*: 34% para os saturados e 66% para os insaturados. Ibrahim, Salama e El-Banna

(1999), analisando separadamente o cefalotórax e exoesqueleto da espécie *Penaeus ssp*, encontraram 38 e 40%, de ácidos graxos saturados e 62 e 60% para os insaturados.

**TABELA 3.** Composição dos principais ácidos graxos do resíduo do camarão sete-barbas.

Ácidos Graxos <sup>1,2</sup>	COLETAS				média
	Julho/2000	dezembro/2000	julho/2001	dezembro/2001	
<b>Saturados</b>					
C14:00	0,96 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,09
C16:00	15,13 ± 0,26 <sup>b</sup>	18,48 ± 0,49 <sup>a</sup>	14,49 ± 0,30 <sup>b</sup>	13,50 ± 0,97 <sup>b</sup>	15,40
C18:00	8,38 ± 0,76 <sup>a</sup>	8,92 ± 0,24 <sup>a</sup>	8,09 ± 0,13 <sup>a</sup>	8,42 ± 0,47 <sup>a</sup>	8,45
<b>Σ</b>	<b>24,46</b>	<b>28,68</b>	<b>23,74</b>	<b>22,88</b>	
<b>Mono-insaturados</b>					
C16:1ω7	3,62 ± 0,16 <sup>c</sup>	5,95 ± 0,13 <sup>a</sup>	4,99 ± 0,11 <sup>b</sup>	4,61 ± 0,12 <sup>b</sup>	5,47
C18:1ω9	6,99 ± 0,06 <sup>b</sup>	7,73 ± 0,30 <sup>b</sup>	7,89 ± 0,03 <sup>b</sup>	11,89 ± 0,60 <sup>a</sup>	8,63
C20:1ω9	1,24 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,34
<b>Σ</b>	<b>11,85</b>	<b>14,99</b>	<b>14,13</b>	<b>18,05</b>	
<b>Polinsaturados</b>					
C18:2ω6	3,29 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,72 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,24 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,25 <sup>b</sup>	3,75
C18:3ω3	1,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,81 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,31
C20:4ω6	7,80 ± 0,18 <sup>a</sup>	7,06 ± 0,12 <sup>ab</sup>	7,09 ± 0,10 <sup>ab</sup>	6,77 ± 0,36 <sup>b</sup>	7,18
C20:5ω3	11,61 ± 0,23 <sup>c</sup>	12,01 ± 0,08 <sup>c</sup>	13,71 ± 0,40 <sup>b</sup>	15,54 ± 0,52 <sup>a</sup>	13,22
C22:6ω3	19,94 ± 1,23 <sup>ab</sup>	18,46 ± 0,12 <sup>b</sup>	22,25 ± 0,54 <sup>a</sup>	21,36 ± 1,20 <sup>ab</sup>	20,50
<b>Σ</b>	<b>44,43</b>	<b>44,83</b>	<b>47,30</b>	<b>47,23</b>	
TOTAL	80,74	88,50	85,17	88,16	
Saturados (%)	30,29	32,41	27,83	25,95	
Monoinsaturados (%)	14,68	16,94	26,59	20,47	
Polinsaturados (%)	55,03	50,66	55,54	53,57	
Insaturados (%)	69,71	67,59	72,14	74,05	
EPA (%)	14,40	13,57	16,10	17,62	
DHA (%)	24,70	20,86	26,12	24,23	
POLI/SAT (%)	1,82	1,56	1,99	2,06	

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os teores dos ácidos graxos polinsaturados, em relação ao total, encontrados para o resíduo de camarão *Xiphopenaeus kroyeri*, especialmente para EPA+DHA, variaram de 39 a 42% do total dos ácidos graxos. Analisando apenas o músculo de camarão de mesma espécie, Bragagnolo e Rodriguez-Amaya (2001) obtiveram um percentual de 27% (b.s). Shahidi e Symowiecki (1991) para o resíduo da espécie *Pandalus borealis*, 31%, enquanto Krzynowek e Panunzio (1989), obtiveram uma variação de 29 a 41%, para músculos de diferentes espécies de camarão. Segundo Sargent, Mcevoy e Bell (1997) os organismos aquáticos marinhos requerem para sua nutrição ácidos graxos  $\omega$ 3. Estes, geralmente, são fornecidos através de dieta natural ou através de dietas com incorporação de óleo de peixe ou concentrados enriquecido com esses ácidos graxos

### **3.4 Composição dos aminoácidos**

A Tabela 4 apresenta a composição dos aminoácidos totais do resíduo do camarão sete-barbas. Verificou-se que os aminoácidos isoleucina, ácido glutâmico, leucina e ácido aspártico exibem maiores concentrações, sendo o ácido glutâmico o aminoácido que apresentou maior valor, 15,52 g/100 g de proteína, seguido da isoleucina com 10,71 g/100 g de proteína. Meyers (1986) encontrou 6,20% de isoleucina para a farinha de resíduo do camarão. Synowiecki; Al-kateeb (2000) encontraram para a proteína hidrolisada do resíduo do camarão *Crangon crangon*, 13,2% de isoleucina+leucina. Os teores dos aminoácidos essenciais, mostrado na Tabela 4 para histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina+cisteína, fenilalanina+tirosina, foram superiores quando comparados ao padrão de referência da FAO/WHO de 1990 estabelecidos para adultos humanos. Shahidi e Synowiecki (1991) encontraram 40,4% de aminoácidos essenciais em resíduo de camarão da espécie *Pandalus borealis*. Ibrahim, Salama e El-Banna (1999) encontraram para a composição de aminoácidos totais do cefalotórax e do exoesqueleto de camarão *Penaeus ssp* 54,3 e 71,6%. Desse total, 39 e 38,1% representaram os aminoácidos essenciais.

**TABELA 4.** Composição dos aminoácidos totais em (g/100 g de proteína) do resíduo do camarão sete-barbas e do padrão de referência da FAO/WHO\*\*.

Aminoácidos <sup>1,2</sup>	COLETAS				média	FAO/WHO <sup>4</sup>
	Julho/2000	dezembro/2000	julho/2001	dezembro/2001		
Asp	8,16 ± 0,08 <sup>b</sup>	8,42 ± 0,23 <sup>ab</sup>	8,87 ± 0,19 <sup>a</sup>	9,41 ± 0,39 <sup>c</sup>	8,72	
Glu	12,50 ± 0,21 <sup>c</sup>	15,52 ± 0,15 <sup>a</sup>	12,53 ± 0,59 <sup>c</sup>	13,74 ± 0,50 <sup>b</sup>	13,57	
Ala	4,95 ± 0,06 <sup>b</sup>	4,81 ± 0,14 <sup>b</sup>	5,19 ± 0,25 <sup>b</sup>	5,74 ± 0,18 <sup>a</sup>	5,17	
Arg	5,93 ± 0,13 <sup>ab</sup>	6,19 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,27 ± 0,10 <sup>a</sup>	5,63 ± 0,31 <sup>b</sup>	6,01	
Phe + Tyr*	7,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,37 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,80 ± 0,23 <sup>a</sup>	7,21 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,44	1,9
Gly	5,78 ± 0,12 <sup>b</sup>	6,56 ± 0,25 <sup>b</sup>	6,41 ± 0,33 <sup>b</sup>	5,75 ± 0,21 <sup>a</sup>	6,13	
His*	1,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,08 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,66 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,04 <sup>ab</sup>	2,26	1,6
Ile*	10,31 ± 0,22 <sup>a</sup>	9,42 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,48 ± 0,37 <sup>b</sup>	10,71 ± 0,28 <sup>a</sup>	9,98	1,3
Leu*	8,59 ± 0,18 <sup>a</sup>	7,25 ± 0,53 <sup>b</sup>	7,84 ± 0,37 <sup>ab</sup>	8,58 ± 0,14 <sup>a</sup>	8,07	1,9
Lys*	4,91 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,93 ± 0,59 <sup>b</sup>	5,44 ± 0,24 <sup>b</sup>	6,46 ± 0,19 <sup>a</sup>	5,44	1,6
Met+ Cys*	3,78 ± 0,08 <sup>b</sup>	4,65 ± 0,22 <sup>a</sup>	4,39 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,22 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,26	1,7
Pro	3,47 ± 0,11 <sup>a</sup>	4,25 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,82 ± 0,18 <sup>a</sup>	4,63 ± 0,13 <sup>a</sup>	4,04	
Ser	4,19 ± 0,06 <sup>b</sup>	5,72 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,57 ± 0,23 <sup>b</sup>	4,39 ± 0,16 <sup>b</sup>	4,72	
Thr *	4,28 ± 0,08 <sup>b</sup>	4,24 ± 0,53 <sup>b</sup>	3,37 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,89	0,9
Val *	4,05 ± 0,09 <sup>b</sup>	4,79 ± 0,23 <sup>a</sup>	4,68 ± 0,28 <sup>ab</sup>	4,00 ± 0,09 <sup>b</sup>	4,38	1,3
TOTAL	90,28	96,20	93,32	96,41	94,09	
AAE/AAT <sup>3</sup> (%)	44,84	41,01	43,36	44,16	43,35	

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).

<sup>3</sup> AAE/AAT = aminoácido essencial / aminoácido total.

\* aminoácidos essenciais.

<sup>4</sup> FAO/WHO, 1990.



O total dos aminoácidos livres presentes no resíduo do camarão sete-barbas (Tabela 5) mostrou valores semelhantes para a primeira e a quarta coletas (7,60 e 6,32 g/100 g de proteína) e para a segunda e a terceira (3,54 e 4,22 g/100 g de proteína). Dentre esses aminoácidos, a arginina, glicina, lisina, alanina e leucina foram os que apresentaram quantidades mais expressivas e, juntos, foram responsáveis por 51% do total dos aminoácidos livres. Do total de aminoácidos livres, os essenciais representaram no mínimo 44,08 e no máximo 47,76%. Mandeville, Yaylaya e Simpson (1992) estudaram a composição dos aminoácidos livres de resíduos de camarão comercial, “in natura” e cozido, obtendo um total de 9,45 e 8,04 g/100 g de proteína, com os aminoácidos essenciais correspondendo a 34,67 e 42,87%, respectivamente. Os aminoácidos predominantes foram a prolina, arginina, fenilalanina, que representaram 84% do total de aminoácidos livres. A arginina foi o aminoácido que apresentou maior concentração 0,84 g/100 g de proteína, sendo este superior aos valores encontrado por Mandeville, Yaylaya e Simpson (1992) para resíduos de camarão cru e cozido, 0,39 e 0,36 g/10g de proteína, respectivamente. Segundo Cobb; Vanderzant e Kamuluddin (1974), a concentração de arginina livre é um indicador da qualidade do resíduo, já que esse aminoácido usualmente se decompõe em ornitina e uréia pela enzima arginase, como resultado das condições de um longo armazenamento.

**TABELA 5.** Composição em aminoácidos livres (g/100 g de proteína) do resíduo do camarão sete-barbas.

Aminoácidos <sup>1,2</sup>	COLETAS				Média
	Julho/2000	dezembro/2000	julho/2001	dezembro/2001	
Asp	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,05
ÁGlu	0,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,27
Ala	0,81 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,04 <sup>bc</sup>	0,66 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,56
Arg	1,05 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,93 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,84
Phe+ Tyr*	0,83 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,55
Gly	0,93 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,45 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,85 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,66
His*	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,11
Ile*	0,33 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,19
Leu*	0,71 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,47
Lys*	0,86 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,73
Met + Cys*	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16
Pro	0,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,23
Ser	0,02 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05
Thr*	0,50 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,32
Val*	0,43 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,26
TOTAL	7,60	3,54	4,22	6,32	
AAL-E/AAL-T (%) <sup>3</sup>	47,76	46,05	44,08	46,52	
AAL/AAT <sup>4</sup> (%)	8,42	3,68	4,38	6,55	
AAL-E/AAT <sup>5</sup> (%)	3,65	1,57	1,85	2,87	

<sup>1</sup>Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>3</sup>AAL-E /AAL-T= Aminoácidos livres essenciais/Aminoácidos livres totais

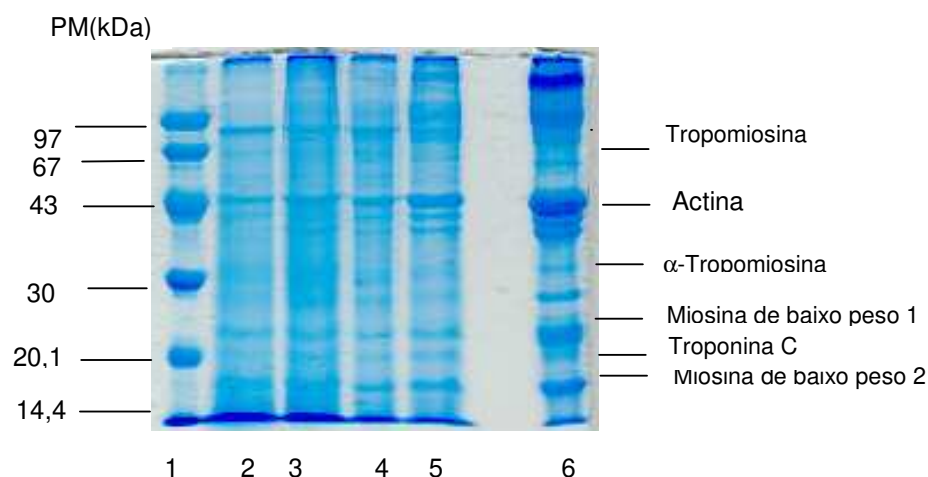
<sup>4</sup>AAL/AAT=Aminoácidos livres/Aminoácidos totais (Tabela 4).

<sup>5</sup>AAL-E/AAT= Aminoácidos livres essenciais/Aminoácidos totais (Tabela 4).

\* Aminoácidos essenciais

### 3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais do resíduo e do músculo do camarão.

Os perfis eletroforéticos das proteínas do resíduo e do músculo do camarão sete-barbas estão apresentados na Figura 2. Algumas frações do músculo (linha 6), tropomiosina, actina,  $\alpha$  - tropomiosina, miosina de baixo peso -1, troponina -C e miosina de baixo peso -2 foram identificadas a partir de seus pesos moleculares, 67, 45, 35, 25, 20 e 18 kDa, respectivamente (PORZIO; PEARSON, 1977). As proteínas do resíduo apresentaram perfil semelhante ao das proteínas do músculo. Observaram-se duas cadeias polipeptídicas de aproximadamente 87 e 43 kDa com maior intensidade de cor e outras seis bandas fracamente coradas com peso molecular entre 43 e 20 kDa. Nas linhas 2 e 3, correspondentes à primeira e segunda coletas, observa-se uma coloração mais intensa na parte inferior do gel (PM < 20,1 kDa), sugerindo a presença de peptídeos de baixo peso molecular, resultado, possivelmente, da autólise.



**FIGURA 2.** Perfil eletroforético das proteínas totais dos resíduos e do músculo. Linhas: (1) marcadores de peso molecular (Sigma Pharmacial), (2) 1ª coleta, (3) 2ª coleta, (4) 3ª coleta e (5) 4ª coleta e (6) músculo.

#### **4. CONCLUSÕES**

O resíduo da industrialização do camarão sete-barbas apresentou como principais componentes, a proteína, com variação de 30 a 48%, e a quitina, com cerca de 20%, semelhantes à composição do resíduo de outras espécies de camarão. A maior concentração de astaxantina obtida no resíduo deu-se por meio da extração em solvente, cerca de 7,8 mg de astaxantina/100 g de resíduo seco.

Os ácidos graxos polinsaturados foram predominantes, principalmente o EPA e DHA, representando em média 15 e 23%, respectivamente do total.

O perfil aminoacídico da proteína do resíduo do camarão sete-barbas apresentou um percentual de aminoácidos essenciais em torno de 45%, podendo ser considerado uma fonte de proteína de boa qualidade.

Os resultados obtidos indicam que a composição do resíduo não está apenas associada à época da coleta, mas condições de processo do camarão (descascamento) e armazenamento da matéria-prima podem estar influenciando sua composição. A maior diferença observada entre as coletas foi no teor de astaxantina, que depende das condições ambientais. Os teores dos componentes avaliados foram semelhantes à resíduos de outras espécies de camarão, consideradas na literatura como boas fontes de quitina, proteína e astaxantina.

## 5. REFERÊNCIAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 12 ed., Washington, 1990.

BECKMAN INSTRUMENTS, INC. **Beckman** 118/119 CL amino acid analyzer instruction manual. Palo Alto, 1977.

BLIGH, G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p. 911 - 917, 1959.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Total lipid, and fatty acids of farmed Freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n.4, p. 359 - 369, 2001.

CHANG, L. K.; TSAI, G. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocer melantho*) Shell Waste. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1900 - 1904. 1997.

CHEN, H.M.; MEYERS, S. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. **Journal of Food Science**, v. 47, n. p. 892 - 896, 1982.

COBB, B. F.; VANDERZANT, C.; KAMULUDDIN, H. Effect of ice storage upon the free amino acid contents of tails of white shrimp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n.6, p. 1052 – 1055, 1974.

COCKRAN, W.G.; COX, F.M. **Experimental design**. 2ed, New York: John Wiley, 1957, 611p.

FAMINO, A. O., et al. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v.72, n.1, p.185 -188, 2000.

FAO/WHO **Protein Quality Evaluation**. Report of a Join FAO/WHO Expert Consulation held in Bethesda. Md., 4-8, Rome 1989.

FREITAS et al. composição química e protéico - molecular da farinha de resíduos de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n.1, p. 111 – 120, 2002.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8-9, p. 809 - 812, 2001.

GORDON, D.T.; ROBERTS, G. L. Mineral and proximate composition of pacific coast fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.25, n.6, p. 1262 – 1268, 1977.

GUILLOU, A.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. **Aquaculture**, v.130, n.4, p. 351 - 360, 1995.

HARTMAN, L. S.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.7, p. 475 - 476, 1973.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, Brasília. Camarão do Sul e Sudeste. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/atuação/pescaqui/pesca](http://www.ibama.gov.br/atuação/pescaqui/pesca)> Acesso em: 18 jul 2000.

IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v.43, n.6, p. 418 - 423, 1999.

IMERI, A. G.; KNORR, D. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. **Journal of Food Science**, v. 53, n.6, p. 1707-1709, 1988.

KELLEY, C. E.; HARMON, A. W. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. **Fishery Bulletin of the National Oceanic and Atmospheric Administration**, v. 70, n.1, p. 111 -15, 1972.

KINSELLA, J. E. Fish and Seafoods: Nutritional implications and quality issues. **Food Technology**, v. n. p. 146 -150, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T.4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 608 - 685, 1970.

LI, Q., et al. Applications and properties of Chitosan.In: **Applications of Chitin and chitosan**, 1<sup>nd</sup>,Ed, Matheus GOOSEN, F.A., 1997, Press, Pennsylvania Chapter1, p.335.

MANDEVILLE, S.; YAYLAN, V.; SIMPSON, B. K. Proximate analysis, isolation and identification of amino acids and sugars from raw and cooked commercial shrimp waste. **Food Biotechnology**, v.6, n.1, p. 51-64, 1992.

MAPA/DPA- Ministério da Agricultura da Pesca e do Abastecimento.Disponível [http://<www.mercadodapesca.com.br/cadeias\\_camarão\\_marinho.php?pag=prod\\_bras>](http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias_camarão_marinho.php?pag=prod_bras). Acesso em: 19 fev 2003.

MEYERS, S. P.; BRIGH, D. Characterization of astaxanthin pigments form heat-processed crawfish waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n.3, p. 505 - 508, 1981.

MEYRS, S. P. Utilization of shrimp processing wastes. **INFOFISH Marketing Digest**. n.4, p. 18 -21, 1986.

PORZIO, M. A.; PEARSON, A. M. Improved Resolution of Miofibrilar Proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 490, n.1, p. 27- 34, 1977.

SAITO, A.; REGIER, L. W. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **Journal Fish Research**, v. 28, n. 4, p. 509 -512, 1971.

SARGENT, J. R.; MCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, p. 117-127, 1997.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI , J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from snow Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrim (*Pandalus borealis*) Processing Discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n.8, p. 1527-1532, 1991.

SIESPE – UNIVALI/CTTMar-MAPA/DPA 2000 - Sistema Integrado de Estatística Pesqueira-Universidade do Vale do Itajaí. Disponível em: <<http://www.icepa.com.br/impres>>. Acesso em: 26 fev 2003.

SIMPSON, B. K., HAARD, N. F. The use of proteolytic enzymes to extract carotenproteins from shrimp wastes. **Journal of Applied Biochemistry**, v.7, p. 212 – 222, 1985.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v.30, n.7, p. 1190-1206, 1958.

SPINELLI, J.; LEHMAN, L.; WIEG, D. Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. **Journal Fisheries Research Board of Canada**, v.31, n.6, p.1025 -1029, 1974.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp crangon crangon processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n.2, p. 147-152, 2000.

UNIVALI-CCTTMAR-. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do mar – Universidade do Vale do Itajaí. 2000. Disponível em: [www.gep.ccttmar.univali.br/sub\\_pesq/camarao](http://www.gep.ccttmar.univali.br/sub_pesq/camarao) Acesso em: 04 abr 2003.

## **CAPÍTULO 3**

# **OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*)**





## CAPÍTULO 3

### OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA DO RESÍDUO DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*)

#### Resumo

Este trabalho teve por objetivo otimizar o processo de hidrólise enzimática para recuperação da fração protéica do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. Foi utilizado um planejamento experimental composto  $2^2$  para estudar os efeitos da relação enzima/substrato E/S (0,18 a 5,83%) e da temperatura (45,9°C a 74,1°C) na recuperação da proteína (RP) e no grau de hidrólise (GH). O fator que apresentou maior efeito na recuperação de proteína foi a relação enzima/substrato (E/S). As melhores condições para o processo ocorreram na região de E/S na faixa de 2,5 a 5,5% e temperatura na faixa de 55° a 60°C, em que se obteve maior recuperação de proteína e máximo grau de hidrólise. Os coeficientes de determinação foram de 0,96 para o grau de hidrólise e 0,85 para a recuperação de proteína, sendo o modelo obtido estatisticamente significativo para ambas as respostas e adequado, portanto, para verificação de tendências tanto para a recuperação da proteína como para o grau de hidrólise.

**Palavras chaves:** camarão, resíduo, proteína, alcalase, superfície de resposta.

#### 1. INTRODUÇÃO

O aumento significativo de resíduos gerados pelo processamento de crustáceos proveniente da captura e da aquicultura tem se tornado um problema ambiental devido ao seu acúmulo e descarte inadequado, de modo que sua melhor utilização diminuiria esse transtorno. Esses resíduos contêm proteína, quitina, astaxantina, entre outros componentes de considerável potencial econômico. Mundialmente, cerca de 45% dos pescados processados são constituídos por camarão e, conseqüentemente, a maior fração do resíduo é composta de exoesqueleto e cefalotórax. (IBRAHIM; SALAMA; EL-BANNA, 1999).

A análise aproximada do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) indicou a presença de 41,3% de proteína (HOLANDA; NETTO, 2001). Para o resíduo do camarão *Crangon crangon*, Synowiecki e Al-Khateeb (2000) obtiveram 40,0% de proteína e para as espécies *Penaeus ssp* e *Pandalus borealis* foram encontrados 47% e 41,9% de proteína, respectivamente (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; IBRAHIM, SALAMA; EL-BANNA, 1999).

O elevado teor protéico dos resíduos de camarão tem despertado grande interesse em sua recuperação. Enzimas proteolíticas têm sido utilizadas para a recuperação da proteína na forma de hidrolisados protéicos, que têm uma ampla possibilidade de utilização tanto na alimentação humana como na animal, particularmente na aquicultura. A fração protéica obtida de resíduos de crustáceos apresenta um bom balanceamento em sua composição de aminoácidos, com alto teor de aminoácidos essenciais (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; LAHL, BRAUN, 1994; VENUGOPAL, 1994; IBRAHIM; SALAMA; EL-BANNA, 1999; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000; GILDBERG; STENBERG, 2001).

Estudos reportaram resultados positivos no crescimento e ganho de peso de larvas juvenis de peixe e com a utilização de hidrolisados de peixe na dieta. Esse efeito positivo pode ser atribuído ao aumento da digestibilidade protéica devido à hidrólise e também devido aos aminoácidos livres liberados durante o processo de hidrólise, que agem como atrativo para algumas espécies (BERGE; STOREBAKKEN, 1996; CAHU et al., 1998; TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999; KOLKOVSKI; CZENY; DABROWSKI, 2000).

A busca pela otimização da reação de hidrólise em resíduos tem levado pesquisadores a utilizarem a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para investigar a influência das variáveis na reação (GAGNÉ; SIMPSON, 1993; SURÓWKA; FIK, 1994; BAEK; CADWALLADER, 1995; CHANG; TSAI, 1997; SIMPSON et al. 1998). A MSR consiste em um grupo de procedimentos matemáticos e estatísticos que são usados para estudar relações entre uma ou

mais respostas (variáveis dependentes) e um número de fatores (variáveis independentes) (DINIZ; MARTIN, 1996).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) define o efeito das variáveis independentes, sozinho e em combinações no processo. Mediante o uso sistemático das variáveis, essa metodologia experimental oferece um modelo matemático que descreve precisamente o processo total (DINIZ; MARTIN, 1996).

O objetivo deste estudo foi investigar, através da (MSR), as melhores condições para recuperação de proteína do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), usando a enzima proteolítica alcalase.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Foi utilizado o resíduo do descasque mecânico do camarão marinho sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), proveniente da indústria de processamento Alpha Pescados, localizada no Guarujá, litoral de São Paulo. O resíduo foi lavado sob água corrente, triturado em moinho de facas (modelo MA 630), embalado em sacos plásticos e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Utilizou-se alcalase 2,4 L (Novo Nordik), com atividade declarada de 2,4 Anson unidades por grama (AU/g), temperatura ótima entre 55 e  $70^{\circ}\text{C}$  e pH ótimo entre 8,0 e 8,5, fornecida gentilmente pela Prozyn (São Paulo-Brasil). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

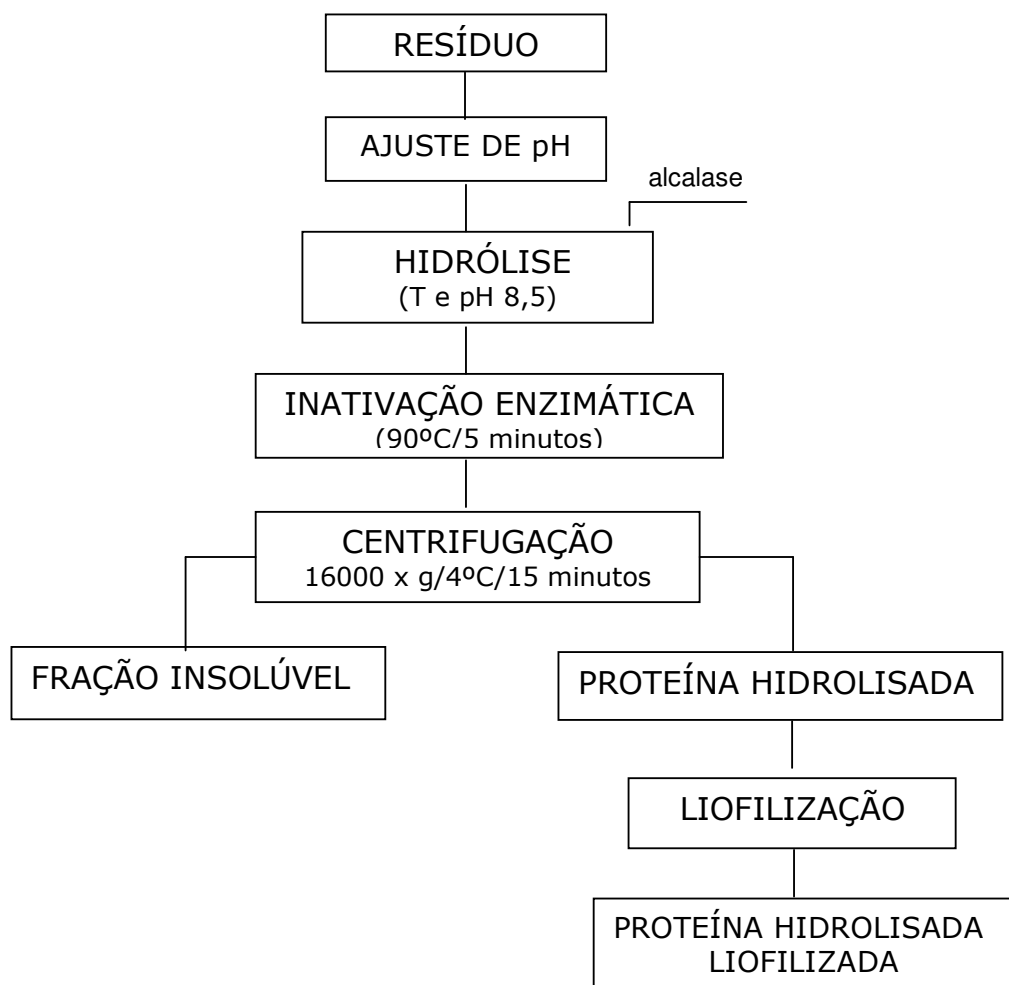
### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Composição centesimal**

Umidade, cinzas e proteína (Nx6,25) foram quantificados segundo AOAC (1990) e os lipídeos totais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959).

### **2.2.2 Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas**

O resíduo foi diluído em água destilada na proporção 1:1 (p/v), em um reator de vidro encamisado. A mistura foi aquecida para cada condição do experimento e o pH equilibrado a 8,5 pela adição de solução de NaOH 1N. Em seguida, a enzima foi adicionada e a reação monitorada, utilizando-se o método do pH-stat, com uso do titulador automático Metler modelo DL 25, com sistema de agitação. A reação de hidrólise foi conduzida até a estabilização do grau de hidrólise (GH), considerado GH máximo, que foi calculado segundo a equação 1 (ADLER-NISSEN,1986). Finalizada a hidrólise, a enzima foi inativada por aquecimento da mistura de reação a 90°C, por 5 minutos, seguida de resfriamento até temperatura ambiente. A fração insolúvel foi separada por centrifugação a 16000 x g, a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante, contendo hidrolisado protéico, foi congelado a -20°C e posteriormente foi utilizado um liofilizador (marca Edwards, série 771). O fluxograma da hidrólise enzimática está apresentado na Figura 1.



**FIGURA 1.** Fluxograma de recuperação da fração protéica do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).

O grau de hidrólise (GH) foi definido por Adler-Nissen (1986) como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas expresso em equivalentes de hidrólise ( $h$ ), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da hidrólise ( $h_{total}$ ). O  $h_{total}$  é equivalente a composição de aminoácidos da proteína, expressado em mmol/g de proteína e determinado utilizando-se a equação 1:

$$GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100 = \frac{B \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad (1)$$

onde B é o volume de álcali consumido para manter o pH constante durante a reação (mL); N<sub>b</sub> é a normalidade da solução de álcali (N); MP é a massa de substrato (g de proteína, determinada em N<sub>x</sub>6,25) e α, a média dos grupos α-NH<sub>2</sub> liberados durante a hidrólise, determinado pela (equação 2):

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (2)$$

onde pH é constante e pK varia com a temperatura na qual a reação é conduzida. O valor de pK, de acordo com Steinhart; Beychok (1964, *apud* DINIZ; MARTIN, 1996), pode ser estimado para uma faixa de temperatura (K) usada nos experimentos de hidrólise pela equação (3):

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{298 \times T} \times 2400 \quad (3)$$

onde T é a temperatura em graus Kelvin.

### 2.2.3 Recuperação de proteína

A recuperação de proteína foi definida como:

$$RP(\%) = \frac{\text{mg de proteína no sobrenadante}}{\text{mg de proteína no resíduo}} \times 100 \quad (4)$$

A proteína foi determinada no sobrenadante e no resíduo pelo método semi-micro Kjeldhal (AOAC, 1990).

### 2.2.4 Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos foi determinada após hidrólise ácida com HCl 6N, a 110° C por 22 horas, de acordo com Spackman, Stein e Moore (1958). As amostras foram recuperadas em tampão citrato pH 2,2 para aminoácidos (Marca Pickering) e analisadas em analisador automático de troca iônica (Thermo Separation Products Vacuum Membrane Degasser P 4000, reactor PCX 3100; Pickering Laboratories, UK), com reação pós-coluna, utilizando ninidrina.

### 2.2.5 Planejamento experimental das condições de hidrólise

A Metodologia de Superfície de Resposta foi usada para estudar a influência das variáveis temperatura (T) e da relação enzima /substrato (E/S) no grau máximo de hidrólise (GH) e na recuperação de proteína (RP) do resíduo de camarão usando a protease microbiana alcalase. As condições da reação de hidrólise utilizadas estão apresentadas na Tabela 1. Os valores dos pontos axiais  $-\alpha$  e  $+\alpha$  foram obtidos pela equação 5 utilizando-se o valor do  $\alpha$  (1,41) e os valores dos níveis codificados  $-1$  e  $+1$ . Foi realizado um planejamento experimental composto  $2^2$  com três repetições do ponto central (Tabela 2).

$$\pm \alpha = \left[ X_i - \left( \frac{X_{-1} + X_{+1}}{2} \right) \right] / \left( \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right) \quad (5)$$

**TABELA 1.** Parâmetros de hidrólise e níveis do planejamento experimental para as superfícies de resposta.

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$
(E/S) %	0,18	1	3	5	5,83
Temperatura (°C)	45,9	50	60	70	74,1

$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,41$ , onde n= número de variáveis independentes.



**TABELA 2.** Matriz do planejamento experimental das variáveis independentes.

Ensaio	E/S (%)	T(°C)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	$-\alpha$	0
9	$+\alpha$	0
10	0	$-\alpha$
11	0	$+\alpha$

Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as determinações analíticas em triplicata.

### **2.2.6 Análise estatística**

As equações da superfície de resposta foram obtidas usando o software STATISTICA 5.0 (Statsoft).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A composição química do resíduo (base seca) apresentou  $48,14\% \pm 0,49$  de proteína,  $3,79\% \pm 0,08$  de lipídios e  $31,98\% \pm 1,37$  de cinza.

O valor de  $h_{total}$  utilizado para o cálculo do grau de hidrólise foi estimado a partir da composição de aminoácidos das proteínas do resíduo do camarão sete-barbas (Tabela 3), obtendo-se o valor de 7,65 meq/g de proteína (Nx6,25) (ADLER-NISSEN, 1986).

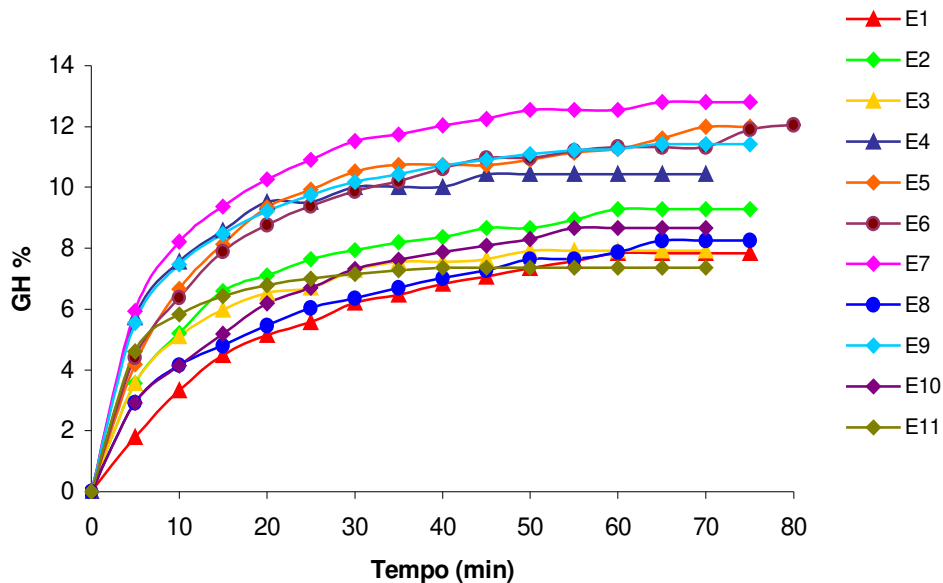
**Tabela 3.** Composição de aminoácidos totais em (g/100 g de proteína) de resíduo do camarão sete-barbas\*.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Composição (g/100 g de proteína)</b>
Asp	9,41 ± 0,39
Glu	13,74 ± 0,50
Ala	5,74 ± 0,18
Arg	5,63 ± 0,31
Cys	1,43 ± 0,06
Phe	4,09 ± 0,12
Gly	5,75 ± 0,21
His	2,29 ± 0,04
Ile	10,71 ± 0,28
Leu	8,58 ± 0,14
Lys	6,46 ± 0,19
Met	2,79 ± 0,17
Pro	4,63 ± 0,13
Ser	4,39 ± 0,16
Tyr	3,12 ± 0,11
Thr	3,65 ± 0,12
Val	4,00 ± 0,09

\* Média de três determinações ± desvio padrão.

Na Figura 2, estão apresentadas as curvas de hidrólise do resíduo de camarão com alcalase dos 11 ensaios realizados. Observou-se, nos primeiros 20 minutos, altas velocidades de reação, seguidas de redução, atingindo um patamar onde não mais foi observado aumento do grau de hidrólise. Verificou-se também que após os 10 primeiros minutos, os ensaios 1, 2, 3, 8, 10 e 11 apresentaram menor aumento do GH, quando comparados aos ensaios 4, 5, 6, 7 e 9, o que pode estar relacionado com as condições de hidrólise utilizadas, E/S e temperaturas baixas ou elevadas. Curvas de hidrólise similares têm sido reportadas para hidrólise de proteínas de peixe (MACKIE, 1982; YU; FAZIDAH,

1994; SHAHIDI et al., 1995; BENJAKUL; MORRISSEY, 1997; GESUALDO-LICEAGA; CHAN-LI, 1999), hidrólises do resíduo de lagostin (BAEK; CADWALLADER, 1995), de resíduo de lagosta (VIEIRA et al., 1995), de resíduo de peru (FONKWE; SINGH, 1996) e para caseína (MOHMOUD; MALONE; CORDLEI, 1992).



**FIGURA 2.** Curvas de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) com alcalase (para condições de cada ensaio, ver Tabela 2).

Existem várias explicações possíveis para este tipo de progresso das curvas. De acordo com Adler-Nissen (1986), a diminuição da velocidade é resultado da competição entre o substrato original e os peptídeos produzidos durante a hidrólise. Para O'Meara e Munro (1984), este tipo de curva é resultado da rápida clivagem das ligações peptídicas durante o estágio inicial da reação de hidrólise e redução da velocidade da clivagem das ligações menos susceptíveis. Archer et al. (1973) consideraram que o perfil da curva era devido à rápida adsorção da enzima na superfície do substrato, levando à solubilização da proteína pela rápida clivagem das cadeias polipeptídicas. A adsorção da enzima

no interior do substrato é mais lenta, desacelerando a reação no final do processo de hidrólise.

A Tabela 4 mostra os valores obtidos para as variáveis dependentes GH e RP do resíduo do camarão sete-barbas, utilizando alcalase. Para GH, o valor mínimo foi 7,36% e máximo 12,80%, referentes aos ensaios 11 e 7, com relação E/S 3% e temperaturas 74,1°C e 60°C, respectivamente. Para a RP, obtive-se os valores de 55,78% para o ensaio 11 e 42,70% para o ensaio 6, ambos com relação E/S 3% e temperatura 60°C. A recuperação de proteína solúvel e o rendimento do hidrolisado dependem de vários fatores: concentração e especificidade da enzima, temperatura e pH da reação, presença de substâncias inibidoras, extensão da desnaturação da proteína nativa e do grau de hidrólise. No entanto, o tipo de enzima usada é o fator que mais afeta o rendimento e as propriedades do produto final (ADLER-NISSEN, 1986; HOYLE; MERRITT, 1994; SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000).

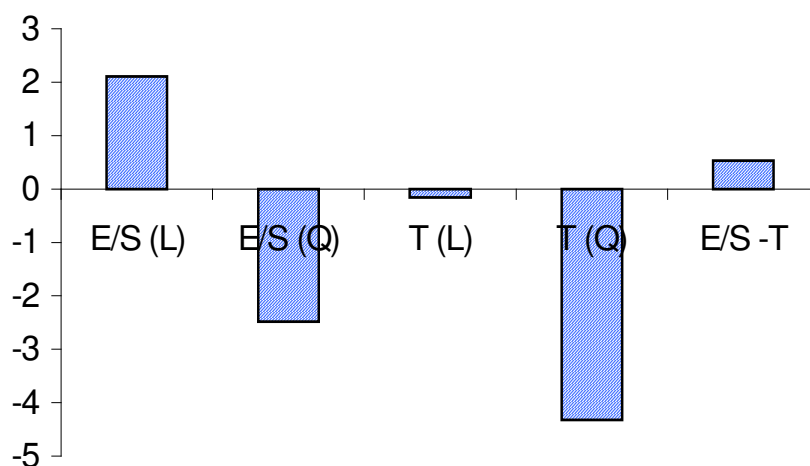
**TABELA 4.** Grau de hidrólise (GH) e recuperação de proteína (RP) após hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas com alcalase.

Ensaio	GH obtido	GH previsto	Desvio (%)	RP% obtido	RP% previsto	Desvio (%)
1	7,84	8,18	-0,34	44,39	47,20	-2,81
2	9,28	9,74	-0,47	53,26	54,29	-1,03
3	7,92	7,49	0,43	45,56	44,36	1,20
4	10,43	10,13	0,30	54,40	51,43	2,97
5*	12,00	12,28	-0,28	55,68	55,62	0,06
6*	12,05	12,28	-0,23	55,78	55,62	0,16
7*	12,80	12,28	0,52	55,41	55,62	-0,21
8	8,26	8,33	-0,07	47,26	46,08	1,17
9	11,41	11,30	0,11	54,73	56,07	-1,34
10	8,66	8,10	0,56	52,40	49,64	2,76
11	7,36	7,89	-0,53	42,70	45,62	-2,92

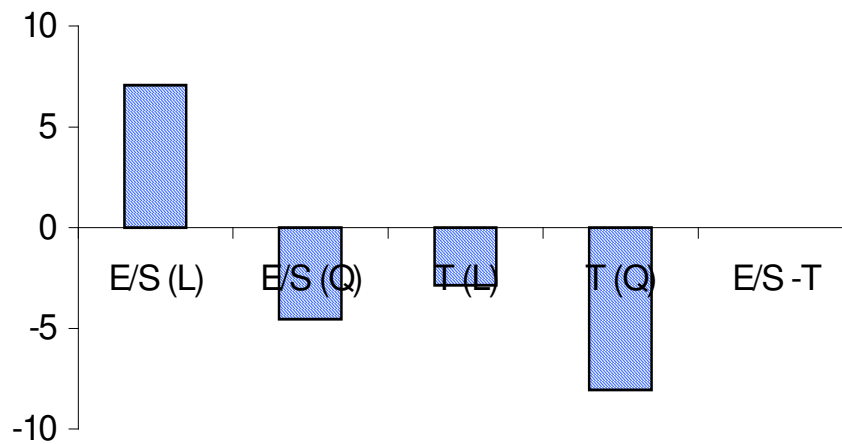
\*Ponto central.

A recuperação de proteína e o grau de hidrólise máximos obtidos neste estudo foram inferiores aos valores obtidos para hidrólise do resíduo desmineralizado do camarão *Crangon crangon*, que foi de 69%, com grau de hidrólise de 30%, utilizando 1% de alcalase e o método pH-stat (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000).

A análise dos efeitos das variáveis independentes, relação enzima/substrato (E/S), temperatura e de suas interações nas variáveis dependentes GH (Figura 3) e RP (Figura 4), mostrou que o parâmetro temperatura linear (T(L)) e a interação (E/S) x T influenciaram muito pouco o processo. Observou-se que, com a diminuição da temperatura e aumento da relação enzima/substrato (E/S), há um aumento no GH e na RP. O teste t de Student para os efeitos T(L) e a interação (E/S) x T revelou que esses parâmetros não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) o GH e a RP, exceto o parâmetro T(L) para RP. A análise estatística também indicou que o fator E/S foi o que apresentou maior influência no grau de hidrólise. Os cálculos estão descritos no anexo 1.



**FIGURA 3.** Efeitos da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) no grau de hidrólise do resíduo do camarão sete barbas usando alcalase (L= linear; Q=quadrático)



**FIGURA 4.** Efeitos da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) na recuperação de proteína do resíduo do camarão sete-barbas usando alcalase (L= linear; Q=quadrático).

Análise de variância (ANOVA) para a resposta GH está apresentada na Tabela 5. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indicou que 96% da variação total em torno da média pode ser explicada pelo modelo. O valor encontrado para a relação  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{tabelado}}$  de 4,65 ( $p < 0,05$ ) demonstra que o modelo obtido foi estatisticamente significativo, mas não preditivo, podendo ser usado para verificar as tendências do GH.

A equação encontrada para determinar o grau de hidrólise na região estudada foi:

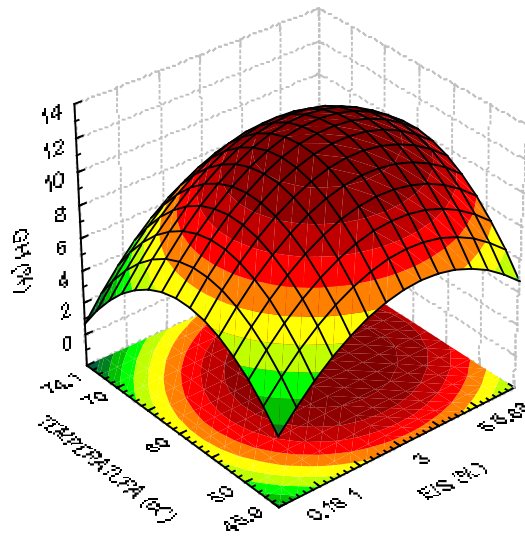
$$\text{GH (\%)} = 12,8 + 1,05\text{E/S} - 1,2 (\text{E/S})^2 - 0,08\text{T} - 2,16\text{T}^2 + 0,27(\text{E/S}) \times \text{T}, \quad (6)$$

onde os valores da temperatura e relação enzima/substrato (E/S) devem ser usados em valores codificados.

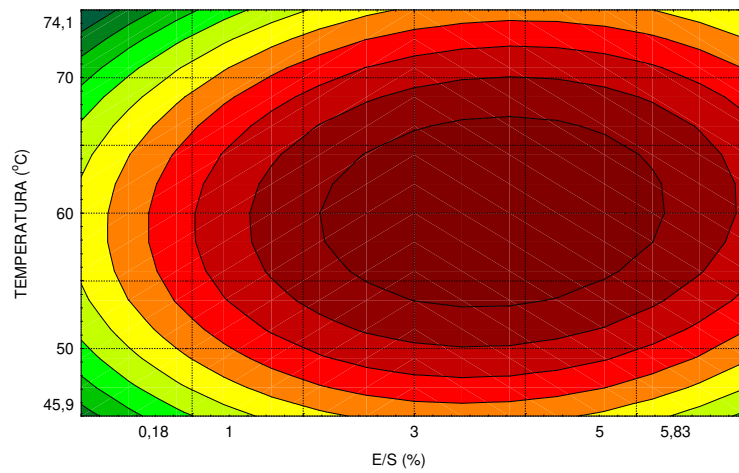
**TABELA 5.** Resultados da ANOVA para resposta do grau de hidrólise (GH).

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabela</sub></b>	<b>F<sub>cal</sub>/F<sub>tabela</sub></b>
Regressão	37,55	5	7,51	23,43	5,05	4,65
Resíduos	1,61	5	0,32			
F. Ajuste	1,21	3	0,40			
Erro puro	0,40	2	0,20			
Total	39,16	10				

Na Figura 5 (a) e (b), estão ilustradas as superfícies de resposta e suas curvas de nível para a equação do modelo obtido para o GH, considerando a interação dos dois fatores avaliados: relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T). Dentro da faixa estudada, o GH obtido foi maior quando a E/S utilizada estava na faixa de 2,5 a 5,5% e a temperatura na faixa de 5°C e 66°C.



(a)



(b)

**FIGURA 5.** (a) Superfície de resposta e (b) curvas de nível do efeito da relação enzima /substrato (E/S) e temperatura (T) no grau de hidrólise.



A análise de variância (ANOVA) para a resposta RP está apresentada na Tabela 6. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indicou que 85% da variação pode ser explicada pelo modelo. Assim como para a resposta GH, o modelo matemático

obtido também foi estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ), mas não preditivo, podendo ser usado para verificar as tendências da RP. O fator E/S foi o que apresentou maior influência na recuperação de proteína.

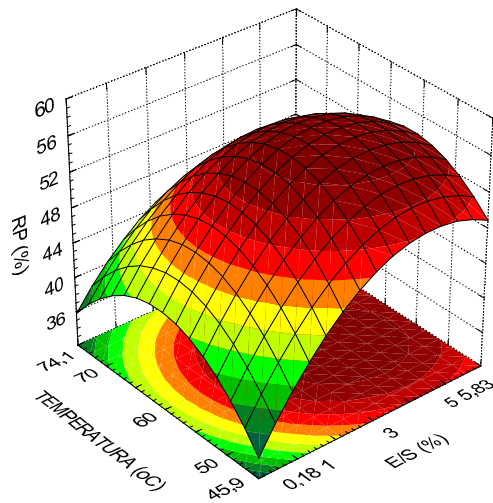
A equação encontrada para determinar a recuperação de proteína na região estudada foi:

$$RP = 55,62 + 3,4E/S - 2,28(E/S)^2 - 1,43T - 4,01T^2 - 0,007(E/S) \times T \quad (7)$$

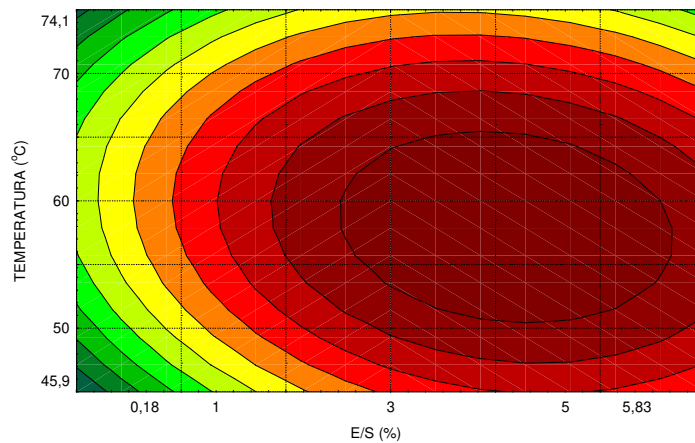
**TABELA 6.** Resultados da ANOVA para a resposta Recuperação de proteína.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$	$F_{cal}/F_{tabela}$
Regressão	214,26	5	42,85	5,55	5,05	1,01
Resíduos	38,61	5	7,72			
F. Ajuste	38,54	3	12,85			
Erro puro	0,07	2	0,04			
Total	252,87	10				

A superfície de resposta e suas curvas de nível, para o modelo obtido para a resposta recuperação de proteína, considerando a interação dos dois fatores avaliados: E/S e temperatura (T), são apresentadas na Figura 6 (a) e (b). Observou-se que, dentro da faixa estudada, a RP foi maior quando E/S se encontrava na faixa de 2,5 a 6,0% e a temperatura na faixa de 50 e 65°C. O ponto ótimo da reação encontra-se em uma ampla região, o que possibilita a utilização de E/S menores, sem perder a eficiência da hidrólise.



(a)

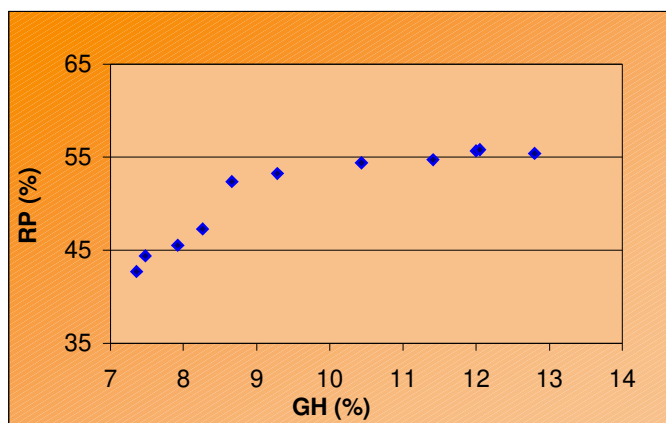


(b)

**FIGURA 6.** (a) Superfície de resposta e (b) curvas de nível do efeito da relação enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) na recuperação de proteína (RP).

A Figura 7 mostra a relação entre a recuperação de proteína e grau de hidrólise máximo. Observa-se que, para os GH 7% e 9%, a RP foi de 42 e 53%, correspondendo a um aumento de 20%. No entanto, a partir de 10% de GH não se obteve aumento da RP com o aumento do GH, indicando que não ocorre mais

solubilização da proteína ligada ao exoesqueleto e sim uma hidrólise maior dos peptídeos já solubilizados.



**FIGURA 7.** Recuperação de proteína (RP) do resíduo do camarão sete-barbas em função do grau de hidrólise (GH).

#### 4. CONCLUSÕES

Na região estudada, o fator de maior influência para recuperação de proteína e grau de hidrólise máximo foi a relação enzima /substrato (E/S). Os valores máximos de recuperação de proteína, 55,78%, e grau de hidrólise, 12,80%, foram obtidos no ponto central com enzima/substrato (E/S) 3% e temperatura de 60°C. O ponto ótimo para a região estudada encontra-se na faixa de relação enzima/substrato de 2,5 a 6,0% e temperatura na faixa de 50°C a 65°C.

Os modelos obtidos foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) tanto, para o grau de hidrólise como para a recuperação de proteína. As equações obtidas são úteis para indicar tendências do GH e da RP, enquanto as superfícies de respostas são úteis para a escolha de zonas de operação que se encontram na região de ótimo, dentro das faixas de temperatura e relação enzima/substrato (E/S) para o material estudado.

## 5. REFERÊNCIAS

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official Methods of Analysis**, Washington, 12 ed., 1990.

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of Food proteins. London: **Elsevier Applied Science**, 1986. 427p.

ARCHER, M. C. et al. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: Process and Kinetic Considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, n., p. 188 –196, 1973.

BAEK, H. H.; CADWALLADER, K. R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 929 - 935, 1995.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3425 -3430, 1997.

BERGE, G. M.; STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, v. 145, n. 1-4, p. 205 -212, 1996.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

CAHU, C., et al. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**, v. 169, n.1-2, p.1-7, 1998.

CHANG, L. K.; TSAI, G. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from Pink Shrimp (*Solenocer melanthero*) Shell Waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p.1900 -1904, 1997.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n.3, p. 419 - 426, 1996.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

GAGNÉ, N.; SIMPSON, B. K. Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of Chitin from Shrimp waste. **Food Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 253 - 263, 1993.

GESUALDO-LICIEGA, A. M.; CHAN-LI, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1000 -1004, 1999.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8-9, p. 809 - 812, 2001.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n.1, p. 76 -79, 1994.

HOLANDA, D. H.; NETTO, F. M. Caracterização de nutrientes e componentes de valor agregado do resíduo de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).In:4º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2001, Campinas. **Anais...**, São Paulo:Universidade Estadual de Campinas, 2001, CD.

IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F. EL-BANNA, H. A. Shrimp waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v. 43, n. 6, p. 418 - 423, 1999.

KOLKOVSKI, S.; CZENY, S.; DABROWSKI, K. Use of krill hydrolysate as a feed attractant for fish larvae and juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 1, p. 81 - 88, 2000.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v. 48, n.10, p. 68 -71, 1994.

MACKIE, I. M. Fish protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 17, n. 31, p. 26 -28, 1982.

MOHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLEI, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**, v.57, n.5, p. 1223 – 1229, 1992.

O'MERA, F. M; NUNRO, P. A. Effects of ration variables on hydrolysis of lean beef tissue by Alaclase. **Meat Science**, v.11 , p. 227 – 238. 1984.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1527-1532, 1991.

SHAHIDI, F.; XIAO-QING, HAN.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelim (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, Great Britain, v. 53, n. 8, p. 285 -293, 1995.

SIMPSON, B. K., et al. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 6, n. 1 -2, p. 131-138, 1998.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1190 -1206, 1958.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 64, n. 3, p. 289 - 296, 1994.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 147-152, 2000.

TELES, A. O.; CERQUEIRA, A. L.; GONÇALVES, P. The utilisation of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, p. 195 - 201, 1999.

VENUGOPAL, V. Production of fish protein hydrolysates by microorganismis. In: MARTIN, A. M. **Fisheries Processing: Biotechnological applications**. London, Chapman & Hall, 1994, cap 10: p. 223 - 243.

VIEIRA, G. H. F., et al. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus spp*) processing waste. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 69, n. 1, p. 61-65, 1995.

YU, Y.S; FAZIDAH, S. Enzimatic hydrolysis of proteins from *Aristichthys nobilis* by protease P 'Amano ' 3. **Tropical Science**, v. 34, n. 3, p. 381 - 386, 1994.



## **CAPÍTULO 4**

### **RECUPERAÇÃO DE COMPONENTES DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*) POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**





## CAPÍTULO 4

### RECUPERAÇÃO DE COMPONENTES DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*) POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

#### RESUMO

Resíduos da industrialização de camarão são, em geral, descartados sem nenhuma tentativa de aproveitamento, contribuindo para o aumento da poluição ambiental. Este trabalho teve como objetivo estudar a recuperação dos principais componentes do resíduo industrial de camarão; proteína, quitina e astaxantina com as enzimas alcalase e pancreatina. O processo enzimático com alcalase foi mais eficiente do que com pancreatina, aumentando a recuperação de proteína e de astaxantina, em 11 e 20%, respectivamente. O aumento do grau de hidrólise resultou em um incremento de 27% e 10% na recuperação da proteína e da astaxantina. A recuperação da astaxantina com mistura de solventes foi duas vezes mais eficaz do que a extração em óleo. A hidrólise enzimática do resíduo industrial do camarão sete-barbas com as enzimas alcalase permitiu a obtenção de hidrolisado protéico, além de propiciar condições adequadas para a recuperação da astaxantina e da quitina.

**Palavras chaves:** resíduo de camarão, proteína, astaxantina, quitina, hidrólise enzimática.

#### 1. INTRODUÇÃO

O aumento significativo da quantidade de resíduos gerados pelo processamento industrial de pescados tem se tornado um problema, tanto para o ambiente como para as plantas processadoras. Cerca de 45% dos pescados processados consistem de camarão, cujos resíduos são compostos pelo exoesqueleto e o cefalotórax (VENUGOPAL, 1995 apud IBRAHIM; SALAMA; EL-BANNA, 1999). Esses resíduos chegam a representar de 50 a 70% do peso da

matéria-prima e contêm componentes de valor como proteína, quitina e astaxantina, cujos teores variam de acordo com a espécie (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; BATAILLE; BATAILLE, 1993; IBRAHIM; SALAMA; EL-BANNA, 1999; FAMINO et al., 2000)

O elevado teor de quitina, cerca de 20%, tem sido a principal razão do aproveitamento do resíduo de camarão para sua obtenção e do seu derivado desacetilado, a quitosana, que tem ampla utilização, não só na indústria de alimentos como nas indústrias farmacêutica, têxtil, em cosméticos e na agricultura (LI et al., 1997; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; IMERI; KNORR, 1988).

Para a recuperação da quitina, o método mais freqüentemente utilizado é a hidrólise alcalina (GILDBERG; STENBERG, 2001), que envolve três etapas: (1) desproteinização - realizada pela solubilização da proteína com bases fortes, NaOH ou KOH; (2) desmineralização - retirada do carbonato de cálcio por um ácido forte, em geral, HCl; e (3) despigmentação, onde se utiliza, geralmente, uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), para remoção dos pigmentos.

Estes reagentes causam a desacetilação parcial da quitina e hidrólise do polímero, obtendo-se um produto final de baixo peso molecular com propriedades físico-químicas variáveis (NO; MEYERS; LEE, 1989; GAGNÉ; SIMPSON, 1993; OH YI-SU, 2000; CANELLA; GARCIA, 2001). A desproteinização alcalina gera problema, pois há necessidade de tratamento do resíduo líquido antes do descarte. Além disso, a proteína não apresenta utilidade, pois reações indesejáveis entre aminoácidos e racemização ocorrem em meio fortemente alcalino (GAGNÉ; SIMPSON, 1993; NASHEF et al., 1977).

A astaxantina, principal carotenóide encontrado em crustáceos, tem se mostrado agente efetivo de pigmentação quando incorporada em rações de salmonídeos e crustáceos (OMARA-ALWALA et al., 1985; GUILLOU; KHALIL; ADAMBOUNOU, 1995; WATHENE et al., 1998). Para a recuperação desses pigmentos, podem ser utilizados óleos vegetais ou solventes. A extração em óleo vegetal é o método mais comumente utilizado, pois o óleo é considerado uma boa

barreira contra o oxigênio, retardando a oxidação. Além disso, poder ser utilizado como fonte de energia (MEYERS; BLIGH, 1981; CHEN; MEYERS, 1982; CHEN; MEYERS, 1983; CHEN et al, 1985; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; NEGRO; GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2000).

Estudos de processamentos alternativos para a recuperação da quitina que permitam, em paralelo, a recuperação de outro componente do resíduo de crustáceos, têm sido realizados por diversos autores. A recuperação da fração protéica, cerca de 40% do resíduo de camarão (DINIZ; MARTIN, 1997) por hidrólise enzimática, tem sido amplamente estudada, utilizando uma grande variedade de enzimas de origem vegetal (papaína, bromelina, ficina (GAGNÉ; SIMPSON, 1993, VIEIRA et al, 1995, FONKWE; SINGH, 1996)), animal (pancreatina, quimotripsina, pepsina (GAGNÉ; SIMPSON, 1993, SURÓWKA; FIK, 1994, VIEIRA et al, 1995, SIMPSON, et al., 1998)) ou microbiana (alcalase, neutrase, pronase (GILDBERG; STENBERG, 2001, LINDER, FANNI; PARMENTIER, 1996, SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000)).

A proteína, recuperada na forma de hidrolisados, pode ser utilizada como aromatizante e incorporada em alimentos à base de pescados ou na aquicultura, onde é adicionada em rações (GILDBERG; STENBERG, 2001; SYNOWIECKI; AL-KATHEEB, 2000; SIMPSON et al., 1998; GAGNÉ; SIMPSON, 1993). Além disso, hidrolisados são fontes de peptídeos biologicamente ativos, com grande potencial farmacológico e/ou agente estimulador de crescimento em rações animais (GILDBERG; STENBERG, 2001). A hidrólise enzimática tem sido considerada, ainda, um método viável para a recuperação da astaxantina (CHEN; MEYERS, 1985; GILDBERG; STENBERG, 2001).

Embora diversos métodos enzimáticos tenham sido descritos para a recuperação dos componentes do resíduo de crustáceos, ainda são poucos os trabalhos que têm como foco um processo que propicie a recuperação dos três principais componentes do resíduo: quitina, proteína e os pigmentos carotenos.

O resíduo industrial do camarão sete-barbas, obtido em quatro coletas realizadas em dois anos consecutivos, apresentou, em média, 38% de proteína e 20% de quitina, indicando ser boa fonte desses compostos, além de 5,03 mg de astaxantina/100 g de resíduo (HOLANDA, NETTO, 2002). Tendo em vista o potencial de utilização do resíduo do camarão, este trabalho teve por objetivo estudar a recuperação dos principais componentes do resíduo do processamento do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*); proteína, quitina e astaxantina, utilizando o processo de hidrólise enzimática.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Foi utilizado o resíduo do descasque mecânico do camarão marinho sete-barbas, proveniente da indústria de processamento Alpha Pescados, localizada em Guarujá, litoral de São Paulo. O resíduo foi lavado sob água corrente e triturado em moinho de facas (modelo MA 630). Cerca de 1000 g do resíduo úmido foram liofilizados e separados em uma série de peneiras de 35 a 60 mesh para realização da composição química. O material restante foi embalado em sacos plásticos e congelado a -20°C até sua utilização.

Foram utilizadas duas enzimas: alcalase 2,4L (Novo Nordisk) , que é uma serina protease proveniente do *Bacillus Licheniformis*, gentilmente fornecida pela Prozyn (São Paulo-Brasil); e a pancreatina suína, mistura de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase, proveniente de pâncreas suíno (EC 232.468-9 – Sigma Chemical).

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Composição química aproximada do resíduo**

Umidade, cinzas e proteínas (Nx6,25) foram quantificadas segundo AOAC (1990) e o total de lipídeos foi determinado de acordo com Bligh e Dyer (1959).

O fluxograma do processo de recuperação da fração protéica - quitina e astaxantina - está apresentado na Figura 1. Para a etapa de desproteinização, foram utilizados tratamentos enzimáticos (alcalase e pancreatina) e alcalino (NaOH e KOH). Para recuperação da quitina e da astaxantina, utilizou-se a fração insolúvel, obtida após o tratamento enzimático.

## 2.2.2 Etapa de desproteinização

### **Método Enzimático**

**Alcalase:** As condições da reação de hidrólise relação enzima/substrato (E/S) de 3% e temperatura de 60°C, utilizadas neste processo foram definidas a partir do estudo prévio com o uso da Metodologia de Superfície de Resposta, onde se obteve a máxima recuperação de proteína e máximo grau de hidrólise (HOLANDA; NETTO, 2002). O resíduo de camarão previamente descongelado foi diluído em água destilada na proporção 1:1 (p/v) em um reator de vidro encamisado, onde a temperatura foi ajustada, adicionado-se a enzima. A reação de hidrólise foi monitorada pelo método do pH-stat, com uso de titulador automático Metler DL 25, com sistema de agitação e o pH foi mantido em 8,5 com NaOH 1N. A reação de hidrólise foi conduzida até se obter os graus de hidrólise (GH) de 5 e 10%, quando a reação foi interrompida por aquecimento a 90°C por 5 minutos, seguida de resfriamento. A fração insolúvel foi separada por centrifugação a 16000 x g à 4°C por 15 minutos, para posterior extração da astaxantina e quitina (Figura 1). O teor de proteína bruta do sobrenadante, que contém o hidrolisado, foi determinada pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990). O grau de hidrólise (GH) foi definido por Adler-Nissen (1986), segundo equação 1.

$$GH(\%) = \frac{h \times 100}{h_{total}} = \frac{B \times N_b}{M_p \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad (1)$$

onde:

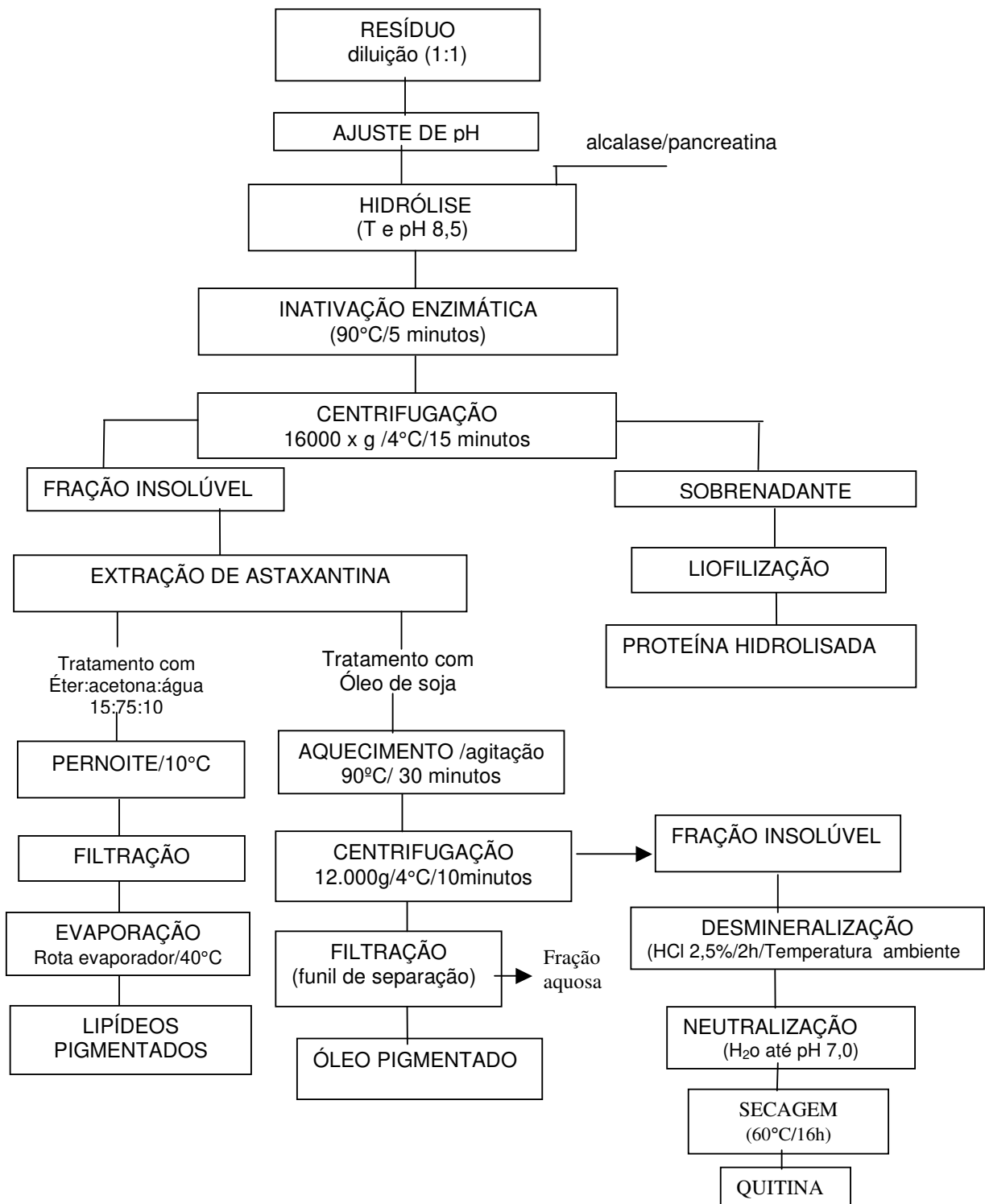
B = consumo de base (mL);

N<sub>b</sub> = normalidade da base (N);

M<sub>p</sub> = massa de proteína (g) (N×6,25)

h<sub>total</sub> = número de ligações peptídicas em meq/ g de proteína

α = grau de dissociação = 1/ 1+10<sup>pk-pH</sup>



**FIGURA 1.** Fluxograma do processo de recuperação de proteína, quitina e astaxantina do resíduo do camarão sete-barbas por hidrólise enzimática.

**Pancreatina:** Testes preliminares mostraram baixa atividade da pancreatina em temperaturas inferiores a 40°C. De acordo com alguns autores, sua atividade ótima se encontra na temperatura de 40°C (HALE; 1969; LALASIDIS; BOSTROM; SJOBERG, 1978; DINIZ; MARTIN, 1996). Para determinação das condições de hidrólise com a pancreatina, foram realizados experimentos em que o único fator variável foi a relação enzima/substrato (E/S), mantendo-se a temperatura a 40° C e pH em 8,5. A relação enzima/substrato (E/S) de 1% foi suficiente para alcançar os GH pré-determinados de 5 e 10%. Por isso, optou-se por esta concentração para a realização das hidrólises subseqüentes. O procedimento da reação foi o mesmo descrito para a reação de hidrólise com alcalase.

### **Método Alcalino**

Para desproteinização alcalina, foram usadas duas bases fortes, NaOH e KOH nas concentrações de 1, 3 e 5%. O resíduo foi diluído na proporção 1:10 com as soluções de álcalis e aquecido em três temperaturas 50, 70 ou 90° C, sob agitação por 1, 2 ou 3 horas. Após aquecimento, cada solução foi centrifugada a 12000 x g à 4°C por 15 minutos e a proteína do sobrenadante foi determinada, utilizando o método semi-micro Kjeldahl (AOAC ,1990).

Para quantificar a proteína removida do resíduo após as hidrólises enzimática e alcalina, foi utilizado o teor protéico dos sobrenadantes de cada tratamento e o conteúdo protéico do resíduo sem tratamento. A percentagem de recuperação de proteína foi definida como:

$$RP(\%) = \frac{\text{mg de proteína no sobrenadante}}{\text{mg de proteína no resíduo}} \times 100 \quad (2)$$

### **2.2.3 Recuperação de astaxantina**

A extração de astaxantina foi realizada seguindo o procedimento descrito por Chen e Meyers (1982) que está ilustrado na Figura 1. Foram utilizados dois meios de extração, óleo de soja e solvente. Na extração com solvente, foi utilizada



uma mistura de éter de petróleo, acetona e água, na proporção de 15:75:10. A quantificação da astaxantina em óleo de soja foi feita por leitura de absorvância (triplicata) do óleo pigmentado em comprimento de onda de 485 nm, utilizando espectrofotômetro marca–Beckman, modelo DU –70. O valor do coeficiente de extinção utilizado foi  $E_{1cm}^{1\%}=2155$ . Para a quantificação da astaxantina obtida com solvente, a leitura de absorvância foi realizada em comprimento de onda de 470 nm e o coeficiente de extinção utilizado foi  $E_{1cm}^{1\%} = 2400$  (MEYERS; BLIGH, 1981). A astaxantina extraída do resíduo de camarão foi quantificada pela equação de Kelley e Harmon (1972).

$$AST = \frac{A \times D}{100 \times G \times d \times E_{1cm}^{1\%}} \quad (3)$$

Onde:

AST= concentração de astaxantina expressa em  $\mu\text{g/g}$  de resíduo;

A = absorvância;

D = volume de óleo recuperado (mL) X diluição;

G = peso de amostra (g);

d = largura da cubeta (1cm);

$E_{1cm}^{1\%}$  = Coeficiente de extinção.

#### 2.2.4 Recuperação de quitina

A quitina foi recuperada tanto a partir da fração insolúvel obtida após a hidrólise enzimática e a extração de astaxantina, como após a desproteínização alcalina (Figura 1). A desmineralização da fração insolúvel foi realizada de acordo com Shahidi e Synowiecki (1991). A secagem foi realizada em estufa a 60°C por 16 horas.

Umidade e cinzas foram determinadas segundo metodologia da AOAC (1990). A proteína residual foi determinada pelo procedimento descrito por Synowiecki e Al-Khateeb (2000): amostras contendo de 2 a 3 g de quitina foram desproteínizadas com solução de NaOH 10% na proporção 1:10 (p/v) por 2 horas a 90°C. Após extração, a solução foi diluída e centrifugada a 12000 x g por 15 minutos, separando-se a fase insolúvel. O teor de proteína no sobrenadante foi determinado utilizando-se o método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990).

### **2.2.5 Análise estatística**

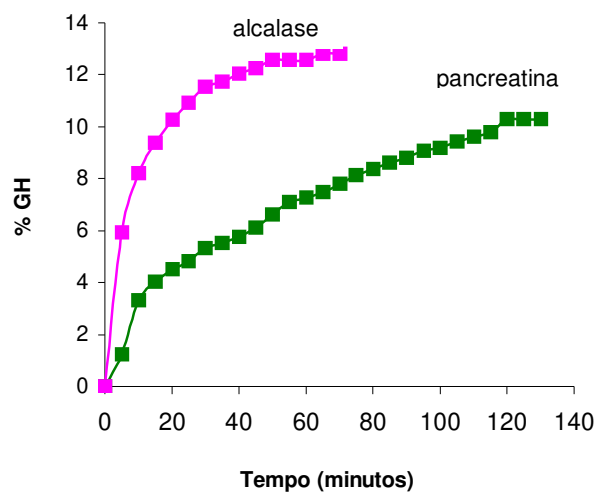
Os resultados foram avaliados por análise de variância e as diferenças entre as médias pelo Teste de Tukey (COCKRAN; COX, 1957), utilizando-se o programa computacional Statistica 5.0.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A composição química (base seca) do resíduo do camarão sem tratamento (RCST) apresentou  $48,14\% \pm 0,49$  de proteína,  $3,79\% \pm 0,08$  de lipídeos e  $31,98\% \pm 1,37$  de cinzas.

### **3.1 Hidrólise enzimática**

As curvas da reação de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas utilizando as enzimas alcalase e pancreatina, estão ilustradas na Figura 2. As curvas se caracterizaram por apresentarem uma alta velocidade na fase inicial da reação, depois essa taxa de hidrólise diminuiu e alcançou uma fase estacionária, onde aparentemente a hidrólise não mais ocorria. Este perfil pode estar associado com à inibição de produtos formados durante a hidrólise e à ação dos peptídeos solúveis que agem como efetivo substrato competidor para as proteínas não hidrolisadas (REBECA; PENA-VERA; DIAZ-CASTANEDA, 1991).



**FIGURA 2.** Curvas de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas utilizando alcalase e pancreatina.

Os resultados da recuperação de proteína (RP) pelo método enzimático estão apresentados na Tabela 1. A maior RP foi obtida com alcalase, 11% superior aos valores obtidos para as hidrólises com pancreatina, para os dois GH estudados. O aumento do GH de 5 para 10%, resultou em um acréscimo em torno de 20% da RP para ambas as enzimas. Synowiecki e Al-khateeb (2000) obtiveram 69,2% de proteína recuperada no resíduo do camarão *Crangon crangon*, previamente desmineralizado, sendo que a reação de hidrólise foi conduzida até 30% GH. Fonkwe e Singh (1996), em estudos com resíduo de peru utilizando hidrólise com pancreatina, obtiveram uma recuperação protéica de 46% e atingiram GH de 70%. Vieira et al (1995) recuperaram 45, 62 e 70% de proteína do resíduo de lagosta utilizando as enzimas papaína, pepsina e protease fúngica. Maior recuperação da proteína é, em geral, obtida com hidrólise mais extensa (SYNOWIECKI et al., 2000; BAEK; CADWALLADER, 1995). Segundo diversos autores, a alcalase, quando comparada com outras enzimas proteolíticas, recupera maior quantidade de proteína, além dos hidrolisados apresentarem boas propriedades funcionais e gosto amargo menos acentuado (ADLER-NISSEN,

1986; QUALIA; ORBAN, 1987; SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995; BENJAKUL; MORRISSEY, 1997; KRISTINSON; RASCO, 2000).

**TABELA 1.** Recuperação de proteína (RP) do resíduo do camarão sete-barbas utilizando hidrólise enzimática<sup>1,2</sup>

ENZIMAS	GH (%)	RP (%)
alcalase	5	42,53 ± 0,06 <sup>c</sup>
	10	53,94 ± 0,55 <sup>a</sup>
pancreatina	5	37,47 ± 0,13 <sup>d</sup>
	10	47,96 ± 0,07 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio padrão

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes em coluna são significativamente diferente (p<0,05) pelo teste deTukey.

Os valores obtidos para a desproteínização alcalina com NaOH e KOH estão apresentados na Tabela 2. A desproteínização ficou entre 31 e 80%, sendo, em geral, favorecida pelo aumento da temperatura, concentração do álcali e, nas menores concentrações, pelo tempo de reação. O KOH promoveu desproteínização mais eficiente que o NaOH nas concentrações 1 e 3% e temperaturas 50 e 90°C, atingindo valores até duas vezes superiores, quando comparados nas mesmas condições de processo. Desproteínização acima de 70% foi obtida com KOH 1%/70°C enquanto que com NaOH, a condição mínima para atingir valores similares foi 3%/70°C. Shahidi e Synowiecki (1991) obtiveram desproteínização acima de 90% do resíduo do camarão *Pandalus borealis* usando KOH nas concentrações de 1 e 2%, em temperatura de 90°C, por duas horas. Chang e Tsai (1997) obtiveram recuperação de 68% no resíduo camarão rosa (*Solenocera melantho*) utilizando solução de NaOH com concentração de 10% e temperatura de 75°C, em seis horas de reação. A eficiência da remoção de proteína tem como fatores principais a concentração da solução e a temperatura, além da espécie do crustáceo (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; SYNOWIECKI; AL-KATEEB, 2000).

**TABELA 2.** Desproteínização alcalina do resíduo do camarão sete-barbas <sup>1,2</sup>.

T (°C)	t (h)	Desproteínização em NaOH (%)			Desproteínização em KOH (%)		
		1%	3%	5%	1%	3%	5%
50	1	31,33 ± 0,48 <sup>g</sup>	38,17 ± 0,89 <sup>f</sup>	72,35 ± 0,23 <sup>a</sup>	50,52 ± 0,0 <sup>d</sup>	64,86 ± 0,46 <sup>b</sup>	73,76 ± 0,22 <sup>a</sup>
	2	39,97 ± 0,72 <sup>f</sup>	59,60 ± 0,55 <sup>c</sup>	72,48 ± 0,23 <sup>a</sup>	50,39 ± 0,23 <sup>d</sup>	76,83 ± 0,80 <sup>a</sup>	73,02 ± 0,40 <sup>a</sup>
	3	43,58 ± 0,56 <sup>e</sup>	66,15 ± 0,36 <sup>b</sup>	73,02 ± 0,20 <sup>a</sup>	45,13 ± 0,67 <sup>e</sup>	76,96 ± 0,01 <sup>a</sup>	75,83 ± 0,43 <sup>a</sup>
70	1	31,33 ± 0,48 <sup>i</sup>	46,67 ± 0,39 <sup>h</sup>	71,31 ± 0,19 <sup>e</sup>	70,60 ± 0,85 <sup>e</sup>	77,49 ± 0,23 <sup>b</sup>	80,64 ± 0,23 <sup>a</sup>
	2	51,32 ± 0,01 <sup>g</sup>	52,28 ± 0,50 <sup>g</sup>	75,40 ± 0,30 <sup>c</sup>	73,68 ± 1,14 <sup>d</sup>	78,81 ± 0,00 <sup>b</sup>	78,15 ± 0,16 <sup>b</sup>
	3	51,64 ± 0,52 <sup>g</sup>	63,06 ± 0,47 <sup>f</sup>	71,16 ± 0,37 <sup>e</sup>	71,44 ± 0,40 <sup>e</sup>	78,94 ± 0,00 <sup>b</sup>	77,49 ± 0,82 <sup>b</sup>
90	1	37,27 ± 0,37 <sup>i</sup>	50,03 ± 0,0 <sup>g</sup>	72,76 ± 0,44 <sup>d</sup>	74,73 ± 0,09 <sup>d</sup>	77,50 ± 0,47 <sup>a</sup>	76,57 ± 0,20 <sup>ab</sup>
	2	42,81 ± 0,17 <sup>h</sup>	69,09 ± 1,17 <sup>e</sup>	74,07 ± 0,61 <sup>d</sup>	73,81 ± 0,0 <sup>d</sup>	76,59 ± 0,21 <sup>ab</sup>	75,25 ± 0,28 <sup>bcd</sup>
	3	38,96 ± 0,26 <sup>i</sup>	65,57 ± 0,50 <sup>f</sup>	72,89 ± 0,23 <sup>d</sup>	74,47 ± 0,45 <sup>d</sup>	73,76 ± 0,21 <sup>d</sup>	74,60 ± 0,17 <sup>cd</sup>

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes em linha e coluna na mesma condição de temperatura, são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Comparando-se os métodos alcalino e enzimático para recuperação de proteína do resíduo do camarão sete-barbas, observou-se que a hidrólise alcalina apresentou maior recuperação, 80%, contra 54% da hidrólise enzimática. Deve-se salientar, no entanto, que a hidrólise alcalina não é indicada quando se quer recuperar a fração protéica, pois ocorre perda de alguns aminoácidos, diminuindo a qualidade nutricional e tecnológica. Em geral, a desproteínização alcalina é utilizada no processo de recuperação da quitina. Quando a recuperação é feita por hidrólise enzimática, a proteína removida conserva seu valor nutricional e freqüentemente apresenta melhora de algumas características como solubilidade e melhor absorção pelo organismo (MASTERS; FRIEDMAN, 1979; HAYASHI; KAMEDA, 1980; KRISTINSSON; RASCO, 2000).

### 3.2 Recuperação da astaxantina

Os resultados da extração de astaxantina com óleo e solvente, do resíduo não tratado e após a hidrólise enzimática com alcalase e pancreatina, estão apresentados na Tabela 3. Do resíduo total, sem tratamento, obteve-se 4,9 mg de astaxantina/100 g de resíduo seco, quando utilizado o óleo, e 9,17 mg de astaxantina/100 g de resíduo seco, quando utilizado o solvente. Estes valores são inferiores aos reportados na literatura para resíduos de crustáceos.

Shahidi e Synowiecki (1991) e Saito e Regier (1971) obtiveram, em resíduo do camarão *Pandalus borealis* e do camarão rosa (*Solenocera melantho*), concentrações de 14,77 mg e 11,1 mg de astaxantina/ 100 g de resíduo seco, utilizando, respectivamente, óleo bacalhau na extração. Meyers e Bligh (1981) e No, Meyers e Lee (1989), por sua vez, em resíduos de “crayfish” com extração em solvente, obtiveram concentração de 15,3 mg e 10,8 mg de astaxantina/100 g de resíduo respectivamente.

As diferenças devem-se geralmente a quantidades de carotenóides disponíveis na alimentação, condições ambientais e espécie (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991), bem como ao método utilizado para extração e quantificação da astaxantina. Variáveis como a granulometria do resíduo, temperatura e relação resíduo/óleo podem levar a diferenças na extração. A extração com solvente, tanto no resíduo sem tratamento como nas frações solúvel e insolúvel obtidas após hidrólise, foi cerca de duas vezes mais eficiente que a extração realizada com óleo.

Após o tratamento enzimático do resíduo, observou-se um aumento da recuperação da astaxantina, considerando-se o total obtido das frações solúvel e insolúvel, para a extração realizada com óleo, e apenas o da fração insolúvel, para a extração com solvente. Para a extração com solvente, a recuperação foi entre 17 e 31% maior, após a hidrólise enzimática. O melhor resultado obtido, 12,01 mg astaxantina/100 g de resíduo seco, foi com a hidrólise com alcalase, 10% de GH. Para a extração com óleo, o total obtido situou-se entre 6,27 e 7,4 mg de

astaxantina/100 g de resíduo seco. A maior parte da astaxantina, cerca de 70%, foi proveniente da fração insolúvel. A coloração alaranjada ainda presente na quitina mostrou que tanto o óleo como a mistura de solventes utilizada não foram capazes de extrair toda a astaxantina presente na fração insolúvel. Fox (1973 apud GUILLOU et al., 1995) só conseguiu extrair todos os pigmentos carotenóides da casca de caranguejo com acetona ou metanol, após descalcificação da casca com ácido acético. Omara-Alwala et al. (1985) reportaram que o uso do ácido propiônico aumentou em 35% a recuperação da astaxantina do resíduo de lagostim.

Observou-se um aumento de cerca de 10% na extração, com o aumento do GH de 5 para 10%, tanto na fração solúvel como na insolúvel, embora os valores não apresentem diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Chen e Meyers (1982) observaram um pequeno aumento, de 3 a 5%, na extração da astaxantina, com o aumento do tempo de hidrólise do resíduo de camarão *Solenocera melantho* com diversas proteases comerciais. Guillou, Khalil e Adambounou (1995) obtiveram uma extração 15% maior de astaxantina no resíduo de camarão *Pandalus borealis*, submetido a silagem ácida, quando comparado com a extração no resíduo "in natura".

O tratamento com alcalase mostrou-se mais eficiente que o com pancreatina, aumentando a extração em até 20%, tanto com óleo como com solvente. Chen e Meyers (1982) também observaram diferenças de extração quando foram utilizadas diferentes enzimas proteolíticas. O aumento da extração, observado com o aumento da extensão da hidrólise e com a enzima utilizada, deve-se talvez, à quebra da ligação proteína-carotenóide, que permitiria a sua recuperação com óleo ou solvente (CHEN; MEYERS, 1982).

**TABELA 3.** Concentração de astaxantina extraída com óleo de soja e solvente no resíduo do camarão sete-barbas sem tratamento (RCST) e nas frações solúvel e insolúvel, obtidas após hidrólise enzimática com alcalase e pancreatina com 5 e 10% de grau de hidrólise (GH).

Amostra		Concentração de astaxantina (mg/100 g de resíduo seco) <sup>1,2</sup>		
Enzima	GH(%)		Óleo	Solvente
		Resíduo sem tratamento	4,90 ± 2,00 <sup>ef</sup>	9,17 ± 8,70 <sup>d</sup>
Alcalase	5	Fração insolúvel	5,15 ± 1,64 <sup>ef</sup>	11,38 ± 4,48 <sup>ab</sup>
		Fração solúvel	1,58 ± 0,33 <sup>hi</sup>	n.d <sup>3</sup>
Alcalase	10	Fração insolúvel	5,67 ± 5,91 <sup>e</sup>	12,10 ± 0,53 <sup>a</sup>
		Fração solúvel	1,71 ± 0,33 <sup>gh</sup>	n.d
Pancreatina	5	Fração insolúvel	4,32 ± 0,70 <sup>f</sup>	10,21 ± 0,79 <sup>c</sup>
		Fração solúvel	1,48 ± 0,68 <sup>i</sup>	n.d
Pancreatina	10	Fração insolúvel	4,71 ± 0,95 <sup>f</sup>	10,81 ± 1,58 <sup>bc</sup>
		Fração solúvel	1,56 ± 0,91 <sup>g</sup>	n.d

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes em linha e coluna são significativamente diferentes (p<0,05) pelo teste de Tukey.

n.d = não determinado.

### 3.3 Recuperação da quitina

A composição química aproximada da quitina isolada de resíduo do camarão sete-barbas após a desproteínização, enzimática ou alcalina, e extração da astaxantina, está apresentada na Tabela 4. A pureza da quitina depende da eficiência do processo de desproteínização e desmineralização do resíduo bruto (NO; MEYERS, 1989). O teor de nitrogênio presente na quitina foi de 6,47 a 7,77% para o processo enzimático e 5,81% para o processo alcalino. O processo de desproteínização com alcalase foi mais eficiente do que com pancreatina, resultando em menor teor de nitrogênio na quitina, independentemente do GH



alcançado na hidrólise. Os maiores teores de nitrogênio encontrados na quitina, após o processo enzimático, devem-se, possivelmente, às proteínas do músculo que permaneceram ligadas à quitina, devido à desproteíntização incompleta promovida pelas enzimas.

Esses resultados são confirmados pela análise de proteína residual, que variou entre 3,99% para o processo alcalino e 9,1% para o processo enzimático. Segundo No, Meyers e Lee (1989), a proteína está ligada covalentemente à quitina, formando complexo estável, sendo improvável que quitina seja preparada sem proteína residual. Synowiecki e Al-Khateeb (2000) encontraram 4,45% e 7,9% de proteína residual na quitina isolada do resíduo do camarão *Crangon crangon* desproteíntizado com alcalase para GH de 30% e 19% respectivamente, e 2,44% utilizando tratamento alcalino com NaOH a 10%. Shahidi e Synowiecki (1991) obtiveram 2,07% de proteína residual na quitina do resíduo do camarão *Pandalus borealis* desproteíntizado pelo tratamento alcalino com KOH 2%.

**TABELA 4.** Composição química da quitina obtida do resíduo do camarão sete-barbas e das espécies *Crangon crangon* e *Pandalus borealis* após hidrólise enzimática e alcalina.

	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>					<i>Crangon<sup>a</sup> crangon</i>	<i>Crangon<sup>a</sup> crangon</i>	<i>Pandalus<sup>b</sup> borealis</i>
	alcalase GH (%)		pancreatina GH (%)		KOH Conc. (%)	alcalase GH (%)	NaOH Conc. (%)	KOH Conc. (%)
	5	10	5	10	5	30	10	2
Umidade (%) <sup>2,3</sup>	2,60±0,04 <sup>b</sup>	1,49±0,04 <sup>d</sup>	3,55±0,04 <sup>a</sup>	3,45±0,05 <sup>a</sup>	2,37±0,05 <sup>c</sup>	4,92±0,19	6,17±0,31	2,47±0,32
Cinza (%) <sup>1,2,3</sup>	2,44±0,10 <sup>b</sup>	2,59±0,08 <sup>a</sup>	2,39±0,11 <sup>b</sup>	2,14±0,05 <sup>c</sup>	1,57±0,04 <sup>d</sup>	1,56±0,48	0,31±0,07	0,09±0,02
Nitrogênio (%) <sup>1,2,3</sup>	6,59±0,03 <sup>c</sup>	6,47±0,03 <sup>d</sup>	7,77±0,02 <sup>a</sup>	7,45±0,01 <sup>b</sup>	5,81±0,06 <sup>e</sup>	6,89±0,06	6,58±0,05	6,24±0,06
Proteína residual (%) <sup>1,2,3</sup>	9,19±0,10 <sup>a</sup>	9,06±0,09 <sup>a</sup>	9,31±0,08 <sup>a</sup>	9,01±0,19 <sup>a</sup>	3,99±0,06 <sup>b</sup>	4,45±0,53	2,44±0,81	2,07±0,03

<sup>1</sup> Valores em base seca.

<sup>2</sup> Médias de três determinações ± desvio padrão

<sup>3</sup> Valores com letras diferentes em linha são significativamente diferentes (p<0,05) pelo teste de Tukey.

<sup>a</sup> SYNOWIECKI e AL-KHATEEB (2000)

<sup>b</sup> SHAHIDI e SYNOWIECKI (1991)

O teor de cinzas da quitina determinado após a hidrólise enzimática, variou entre 2,14 e 2,95% e após a hidrólise alcalina foi 1,57%, indicando um processo de desmineralização eficiente. Synowiecki e Al-Khateeb (2000) encontraram 1,56% no resíduo de camarão *Crangon crangon*, após desproteíntização por hidrólise enzimática. Shahidi e Synowiecki (1991) e Saavedra et al.(1998), obtiveram após hidrólise alcalina, 0,09% e 0,41% nos resíduos de camarão *Pandalus borealis* e no gênero *Penaeus*, respectivamente. Alterações em algumas variáveis do processo de desmineralização, como o tamanho das partículas (NO; MEYERS; LEE, 1989), podem levar a diferenças no teor de cinzas da quitina isolada.

#### **4. CONCLUSÕES**

O processo enzimático com alcalase foi mais eficiente que com pancreatina, favorecendo a recuperação de proteína e de astaxantina, com aumento de 11 e 20%. O aumento do GH, de 5 para 10%, resultou em um incremento de 27% e 10%, na recuperação da proteína e da astaxantina, respectivamente. Cerca de 70% da astaxantina recuperada após a reação de hidrólise foi proveniente da fração insolúvel, obtida após a hidrólise, onde também permanece a quitina.

A recuperação com mistura de solventes foi mais eficaz do que a extração em óleo, apresentando concentração de astaxantina duas vezes maior. No entanto, a extração com óleo tem sido sugerida, pois favorece a utilização do carotenóide em rações de crustáceos e salmonídeos, ao contrário da extração com solvente, onde há a necessidade da remoção do éter de petróleo dificultando sua utilização. A quitina obtida após o processo enzimático apresentou teor de nitrogênio e cinzas superiores aos da quitina obtida por desproteíntização alcalina, mas ainda com características semelhantes às reportadas na literatura para quitina recuperada por processos tradicionais. A hidrólise enzimática do resíduo industrial do camarão sete-barbas resultou na recuperação entre 37,47 e 53,94% do conteúdo protéico da matéria-prima, além de propiciar condições adequadas para a recuperação da astaxantina e da quitina.

## 5. REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Enzimic Hydrolysis of Food Proteins. London: **Elsevier Applied Science**. 1986. 427p.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington, 12 ed., 1990.

BAEK, H. H.; CADWALLADER, K. R. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 929 - 935, 1995.

BATAILLE, M. P.; BATAILLE, P. F. Extraction of proteins from shrimp processing waste. **Journal Chemistry and Technology Biotechnology**, v. 33, n.2, p. 203-208, 1983.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3425 -3430, 1997.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n. p. 911 - 917, 1959.

CANELLA, K. M. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel-influência do método de preparação e do solvente. **Química nova**, v. 24, n.1, p. 13-17, 2001.

CHANG, L. K.; TSAI, G. Response surface optimization and kinetics of isolating chintin from pink shrimp (*Solenocer melantho*) shell waste. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1900-1904,1997.

CHEN, H. M.; MEYERES, S. P.; HARDY, R. W.; BIEDE, S. L. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 9, p. 1337-1340, 1985.

CHEN, H.; MEYERS, S. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 6, p. 1516-1555, 1983.

CHEN, H.; MEYERS, S. P. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 892-900, 1982.

COCKRAN, W. G.; COX, F. M. **Experimental Design**. 2 ed., New York: John Wiley, 1957.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A .Use of Response Surface Methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish

(*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 419-426, 1996.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Fish protein hydrolysates by enzymatic processing. **Agro-Food-Industry Hi-Technology**, v. 8, n. 1, p. 9-12, 1997.

FAMINO, A. O. et al. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 1, p. 85-188, 2000.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

GAGNÉ, N.; SIMPSON, B. K. Use of Proteolytic enzymes to Facilitate the Recovery of Chitin from Shrimp waste. **Food Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 253-263, 1993.

GILDBER, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8-9, p. 809-812, 2001.

GUILLOU, A.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. **Aquaculture**, v. 130, n. 4, p. 351-360, 1995.

HALE, M. B. Relative activities of commercially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. **Food Technology**, v. 23, n. 1, p. 107-110, 1969.

HAYASHI, R.; KAMEDA, I. Decreased proteolysis of alkali-treated protein: consequences of racemization in food processing. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 5 p.1430 -1431, 1980.

IBRAHIM, H. M; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimps waste: Chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v. 43, n. 6, p. 418-423, 1999.

IMERI, A. G.; KNORR, D. Effects of chitosan on yeld and comositional data of carrot and apple juice. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 6, p. 1707-1709, 1988.

KELLEY, C. E.; HARMON, A. W. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. **Fishery Bull.**, v. 70, p. 11 – 117, 1972.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43 -81, 2000.

LALASIDIS, G.; BOSTROM, S.; SJOBERG, LARS-BORJE. Low molecular weight enzymatic protein hydrolysates: chemical composition and nutritive value. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.3, p. 751 – 756, 1978.

LI, W. et al. In: **Application of Chitin and Chitosan**. In: GOOSEN, M. F. A., chapter 1, p. 336, 1997.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Functional properties of veal bone hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 712 -720, 1996.

MASTERS, P. M.; FRIEDMAN, M. Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 507-511, 1979.

MEYERS, S. P.; BLIGH, D. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 505-508, 1981.

NASHEF, A. S.; OSUGA, D. T.; LEE, H. S.; AHMED, A. I.; WHITAKER, J. R.; FEENEY, R. E. Effects of alkali on proteins. Disulfides and their products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 245-251, 1977.

NEGRO, J. J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of White storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 126, n. 3, p. 347-352, 2000.

NO, H. K.; MEYERS, S. P.; LEE, K. S. Isolation and characterization of chitin from Crawfish shell waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 575-579, May/June, 1989.

OH, YI-SU; et al. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 3-10, 2000.

OMARA, T. R. et al. Carotenoid Pigment and Fatty Acid Analyses of Crawfish Oil Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 260-263, 1985.

QUALIA, F. B.; ORBAN, E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of Science of Food Agricultural**, v. 38, n. 3, p. 271-276, 1987.

REBECA, B.; PENA-VERA, M. T.; DIAZ-CASTANEDA, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases: yield and nutritional value. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 309-314, 1991.

SAAVEDA, A. P. et al. Métodos de extração de quitina a partir de cáscara de camarón, **Archivos Latino Americano de Nutricion**, v. 48, n.1, p. 58 61, 1998.

SAITO, A.; REGIER, L. W. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **Journal Fishers Research**, v. 28, n. 4, p. 509-512, 1971.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-added Products from snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1527-1532, 1991.

SHAHIDI, F.; XIAO-QING HAN; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 285-293, 1995.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, F.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I. N. A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 6, n. 1-2, p. 131-138, 1998.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: II- Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 3, p.289-296, 1994.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 47-152, 2000.

VENUGOPAL, V. SHAHIDI, F. Value-added products from underutilized fish species. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n. p. 431-453, 1995.

VIEIRA, G. H. F.; MARTIN, A. M.; SAKER-SAMPAIO, S.; OMAR, S.; GONÇALVES, C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of brazilian lobster (*Panulirus spp*) processing waste. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 69, n. 1, p. 61-65, 1995.

WATHNE, E. et al. Pigmentation of atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. **Aquaculture**, v. 159, n. 3-4, p. 217-231, 1998.



## **CAPÍTULO 5**

### **CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO PROTÉICO ELABORADO A PARTIR DO RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*)**





## Capítulo 5

### CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO PROTÉICO ELABORADO A PARTIR DE RESÍDUO INDUSTRIAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*)

#### Resumo

O resíduo do processamento industrial do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) foi hidrolisado com as enzimas alcalase e pancreatina. Os hidrolisados obtidos, com 5 e 10% de grau de hidrólise (GH), foram caracterizados por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão molecular (CLAE-EM), cromatografia de fase reversa (CLAE-FR), composição dos aminoácidos livres e solubilidade. Os hidrolisados com alcalase apresentaram pequenos peptídeos, com peso molecular menor que 8 kDa, enquanto os hidrolisados com pancreatina apresentaram fração com PM na faixa de 40 kDa, indicando que a actina não foi totalmente hidrolisada, além de peptídeos com PM menor que 8 kDa. A composição dos aminoácidos livres mostrou maior concentração de arginina, fenilalanina, lisina, leucina, potencialmente responsáveis pelo “flavor” do camarão e que atuam como quimioatrativos em rações para peixes ou crustáceos. A proporção de peptídeos hidrofílicos aumentou em função do aumento do GH, e os hidrolisados com pancreatina apresentaram maior proporção de peptídeos hidrofílicos. Todos os hidrolisados apresentaram alta solubilidade em água, acima de 97%, em ampla faixa de pH (2 – 10). O elevado teor de proteína, o perfil aminoacídico e a excelente solubilidade dos hidrolisados destacam o valor potencial desses produtos para aplicações na indústria de alimentos e em rações para aquicultura.

**Palavras chaves:** resíduo de camarão, hidrolisado protéico, solubilidade, caracterização.

## 1. INTRODUÇÃO

Hidrolisados protéicos têm sido utilizados em formulações para uso em nutrição clínica, alimentos para idosos e suplementos para atletas (FROKJAER, 1994). Os hidrolisados também têm sido aplicados na nutrição animal, especialmente na aquicultura, como fonte protéica na alimentação de larvas de peixes e crustáceos. (GABAUDAN; PIGOTT; HALVER, 1980). Larvas possuem baixa capacidade digestiva, o que dificulta a digestão de dietas que contêm proteína intacta (LINDER et al, 1995). O uso de proteína hidrolisada obtida de resíduos do processamento de pescados tem sido uma opção (CARVALHO et al., 1997). A incorporação de hidrolisados na ração para larvas de peixes tem sido indicada como fator determinante para o seu crescimento e sua sobrevivência, não só como fonte de aminoácidos, mas também por agir como eficiente quimioatratante para várias espécies. Os aminoácidos livres; alanina, glicina e arginina, são os que apresentam poder de atração (KOLKOVSKI; KOVEN; TANDLER, 1997; BERGE; STOREBAKKEN, 1996).

Várias enzimas proteolíticas podem ser usadas para produção de hidrolisados, incluindo proteases vegetais (papaína, ficina, bromelina), animais (pepsina, tripsina, renina, quimotripsina, pancreatina) e microbianas (neutrase, alcalase) (BACA; PENA-VER; DÍAZ-CASTAÑEDA, 1991; VENUGOPAL; SHAHIDI, 1995).

Enzimas têm sido utilizadas para modificar ou melhorar propriedades funcionais das proteínas como solubilidade, emulsificação e textura (LAHL; BRAUN, 1994). A solubilidade é uma das propriedades funcionais mais importantes da proteína hidrolisada, tornando-se um indicador de aplicação dos hidrolisados (KINSELLA, 1976; MAHMOUD, 1994). Geralment, os hidrolisados apresentam elevada solubilidade, principalmente no ponto isoelétrico, o que permite uma ampla utilização, tanto na área clínica como na industrialização de alimentos (MAHMOUD, 1994).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar hidrolisados protéicos elaborados a partir do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), utilizando diferentes enzimas proteolíticas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

Utilizou-se resíduo do descasque mecânico do camarão sete-barbas, proveniente da indústria de processamento Alpha Pescados, localizada em Guarujá, litoral de São Paulo. O resíduo foi lavado sob água corrente, triturado em moinho de facas (modelo MA 630). Cerca de 1000 g do resíduo úmido foram liofilizados e separados em uma série de peneiras (35 a 60 mesh), para realização da composição química. O material restante foi embalado em sacos plásticos e mantido sob congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

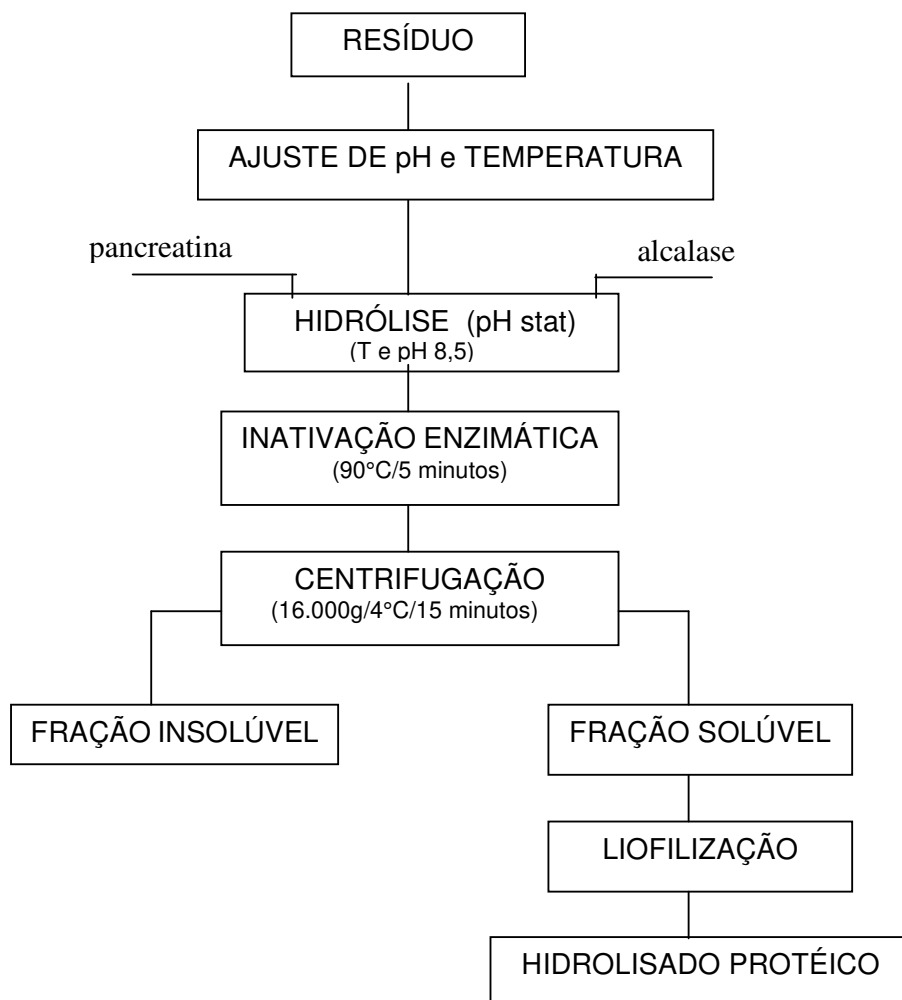
Foram utilizadas as enzimas alcalase 2,4L (Novo Nordik), gentilmente fornecida pela Prozyn (São Paulo-Brasil) e a pancreatina suína, composta de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase (Sigma EC-232.468-9). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a).

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1 Obtenção dos Hidrolisados**

O resíduo de camarão foi submetido ao processo de hidrólise (Figura 1), utilizando as enzimas alcalase e pancreatina. Para a reação de hidrólise com alcalase, foram utilizadas as seguintes condições: (E/S) 3%, temperatura  $60^{\circ}\text{C}$ , e pH 8,5, (HOLANDA; NETTO, 2002). A reação com pancreatina foi realizada nas condições: relação enzima/substrato (E/S) 1%, temperatura  $40^{\circ}\text{C}$  e pH 8,5. Estas condições foram determinadas a partir de experimentos em que o único fator variável foi a E/S. A hidrólise foi realizada em um reator de vidro com aquecimento e capacidade para dois litros, onde o resíduo foi diluído em água destilada na proporção 1:1 (p/v) e ajustados a temperatura e o pH para cada enzima. Em seguida, adicionou-se a enzima e a reação foi monitorada pelo método do pH-stat com uso de titulador automático Metler DL 25, mantendo-se constante o pH 8,5

com adição de NaOH 0,1N. A reação foi interrompida quando se atingiu os graus de hidrólise (GH), 5 e 10%, calculado pela equação 1 (Adler-Nissen, 1986).



**FIGURA 1.** Fluxograma de obtenção dos hidrolisados protéicos enzimáticos do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).

Finalizada a hidrólise, a enzima foi inativada pelo aquecimento da mistura a 90°C por 5 minutos, seguida de resfriamento. O material foi centrifugado a 16000 x g, a 4°C, por 15 minutos para separação da proteína hidrolisada (sobrenadante), que foi congelada e liofilizada. Foram obtidos quatro hidrolisados, dois para a alcalase (HPRCA) e dois para a pancreatina (HPRCP) com GH 5 e 10% para cada um.

$$GH(\%) = \frac{hx100}{h_{total}} = \frac{BxN_b}{M_p \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad (1)$$

onde:

B = consumo de base (mL);

N<sub>b</sub> = normalidade da base (N);

M<sub>p</sub> = massa de proteína (g) (Nx6,25)

h<sub>total</sub> = número de ligações peptídicas em equivalente por g de proteína

α = grau de dissociação = 1/ 1+10<sup>pk-pH</sup>

## 2.2.2. Caracterização dos Hidrolisados

### 2.2.2.1 Composição centesimal

Os teores de umidade, cinza e proteína (Nx6,25) foram determinados segundo AOAC (1990) e o total de lipídeos de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.2.2.2 Aminoácidos totais e livres

A composição dos aminoácidos totais das amostras liofilizadas foi determinada após hidrólise ácida com HCL 6N, a 110° C por 22 horas, de acordo com o método descrito por Spackman, Stein e Moore (1958). Em seguida, as amostras foram recuperadas com diluente-pH 2,2, para aminoácidos. Para a composição de aminoácidos livres, pesou-se 500 mg da amostra liofilizada e a ela foram adicionados 4 mL da solução de ácido sulfossalicílico a 3,5% (BECKMAN, 1977). Em seguida, as amostras foram agitadas e centrifugadas a 7900 g a 4°C por 15 minutos e recuperadas em diluente-pH 2,2, para aminoácidos. Os aminoácidos totais e livres foram quantificados em um analisador automático de troca iônica (Thermo Separation Products Vacuum Membrane Degasser P4000, reactor PCX 3100; Pickering Laboratories, UK), com reação pós-coluna, utilizando ninidrina.

### 2.2.2.3 Solubilidade

A solubilidade protéica foi determinada, em triplicata, de acordo com Synowiecki e Al-khateeb (2000). Foi preparada uma dispersão de 2 g do hidrolisado liofilizado em água deionizada. Em seguida, ajustou-se o pH a 2; 4; 6; 8 ou 10 com NaOH ou HCl 0,1N, a cada 10 minutos, durante 30 minutos. A dispersão foi diluída para 50mL com água e centrifugada a 12.000 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado e alíquotas foram tomadas para dosar o conteúdo de proteína solúvel pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990). A solubilidade protéica (%SP) foi expressa em:

$$\%SP = \frac{Ax50}{[WxS/100]x100} \quad (2)$$

onde:

A = concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)

W = peso da amostra (mg)

S = concentração de proteína na amostra (%)

### 2.2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A determinação do perfil eletroforético da proteína hidrolisada foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Schagger e Jagow (1987), utilizando-se gel de separação com 15%, e de empilhamento, com 4% de acrilamida. Para a proteína intacta, o perfil eletroforético foi determinado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970), utilizando-se gel de separação com 12% e de empilhamento com 4% de acrilamida. As análises foram realizadas a 120V em um sistema Mini-protein II. O perfil de peso molecular da proteína intacta foi determinado utilizando-se os padrões de marcadores de peso molecular, *LMW calibration kit* (Pharmacia): fosforilase b (94kDa); albumina bovina (67kDa); ovalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa) e  $\infty$  labtoalbumina (14,4 kDa) e para as proteínas hidrolisadas, o *kit MW para peptídeos* (Pharmacia 80-1129-83): globulina (16,9 kDa); globulina I + II (14,4 kDa); globulina I + III (10,0 kDa); globulina I (8,1 kDa); globulina II (6,2 kDa) e globulina III (2,5 kDa).

### **2.2.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)**

Amostras dos hidrolisados (1% de proteína) foram dissolvidas em água deionizada e filtrada em membrana Millipore Aacrodisc 0,45  $\mu\text{m}$ . A CLAE-FR foi realizada em cromatógrafo Varian 9012, com detector UV e coluna C-18 (4,6x250mm), utilizando-se água com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) como o solvente A e solução de acetonitrila e água (60:40) com 0,1% de TFA como o solvente B (OOMAH et al., 1994). As condições de corrida seguiram um gradiente linear de 45 minutos do solvente A para o solvente B. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, com detecção a 280nm. Ao final de cada corrida, a coluna foi retornada às condições iniciais através de um gradiente linear (0 a 100% solvente A) por 15 minutos.

Baseando-se na classificação feita por Legay et al. (1997), os cromatogramas foram divididos em 4 zonas e integrados. Os peptídeos foram classificados como: (I) hidrofílicos, os que eluíram entre 1 e 10 minutos, correspondentes a um percentual de 20% da solução B; (II) baixa hidrofobicidade, os que eluíram entre 10 e 15 minutos com 20 a 40% da solução B; (III) média hidrofobicidade, os que eluíram entre 15 e 20 minutos com 40 a 60% da solução B e (IV) alta hidrofobicidade, os que eluíram entre 20 e 40 minutos com 60 a 100% da solução B. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### **2.2.2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)**

CLAE-EM foi realizada em cromatógrafo Varian 9012 com detector UV/VIS empregando coluna Res-Elut Séc 3000 stell (300x7.75mm). As amostras foram dissolvidas no tampão de corrida e foram filtradas em membrana Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ . Em seguida, foram isocraticamente eluídas em tampão composto de fosfato de sódio hidrogênio hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0,05M, cloreto de sódio (NaCl) 0,15M, e azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 0,02% e pH 7,0 (CAMP et al., 1997). O fluxo foi de 1,0 mL/min e detecção a 280nm. O peso molecular foi estimado utilizando-se o padrão de marcadores de proteína com os seguintes pesos moleculares:



tiroglobulina bovina (670 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B-12 (1,35 kDa). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

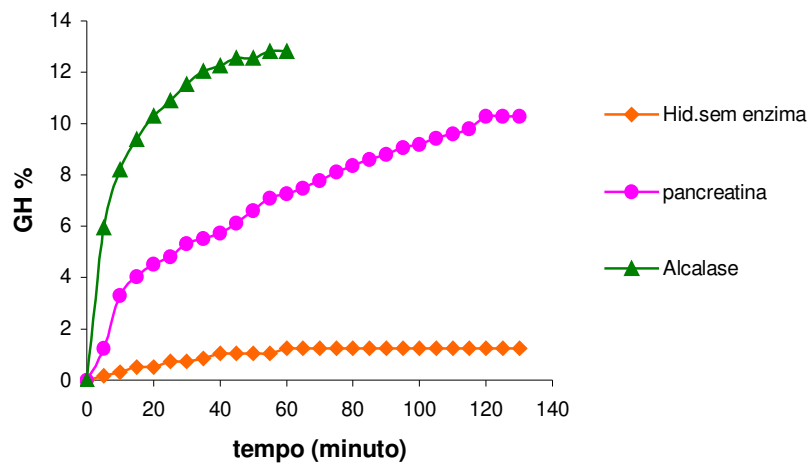
### **2.3 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados por análise de variância e as diferenças entre as médias pelo teste de Tukey (COCKRAN; COX, 1957), utilizando-se o programa computacional, Statistica 5.0.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As curvas de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas com as enzimas alcalase e pancreatina estão apresentadas na Figura 2. Observou-se comportamentos semelhantes para as hidrólises com ambas as enzimas, que se caracterizaram por uma rápida reação na fase inicial, seguida por um período de reação mais lenta, até alcançar uma fase estacionária, quando aparentemente a hidrólise não mais ocorria. Quando não houve adição de enzima, não foi observado aumento do GH, indicando que o processo de autólise não ocorreu nas condições de hidrólise utilizadas.

De acordo com Adler-Nissen (1986), o progresso das curvas com enzima pode ser resultado da competição entre o substrato original e os peptídeos produzidos durante a hidrólise. Para Omeara e Munro, (1984) este tipo de curva é originado de uma rápida clivagem das ligações peptídicas durante o estágio inicial da reação de hidrólise e redução da velocidade da clivagem das ligações menos susceptíveis no estágio final. Para Archer et al. (1973), entretanto, o perfil da curva se deve à imediata adsorção da enzima na superfície do substrato, levando à solubilização da proteína pela rápida clivagem das cadeias polipeptídicas. A adsorção da enzima no interior do substrato é mais lenta, desacelerando a reação no final do processo de hidrólise.



**FIGURA 2.** Curvas de reação de hidrólise do resíduo do camarão sete-barbas sem adição de enzima e com adição da alcalase e pancreatina nas condições: concentração de substrato 4%, pH 8,5, T 60°C, E/S 3% e concentração de substrato 4%, pH 8,5, T 40°C, E/S 1%, respectivamente.

A composição química dos hidrolisados protéicos do resíduo de camarão com GH 5 e 10%, obtidos com a alcalase (HPRC-A) e com a pancreatina (HPRC-P) e do resíduo de camarão sem tratamento (RCST), está apresentada na Tabela 1.

**TABELA 1.** Composição química aproximada (%) do resíduo do camarão sem tratamento (RCST) e dos hidrolisados protéicos obtidos a partir do resíduo do camarão sete-barba, produzidos com a alcalase (HPCR-A) e com a pancreatina (HPCR-P) com grau de hidrólise (GH) 5 e 10%.

Amostra	GH (%)	COMPOSIÇÃO			
		Umidade <sup>2</sup>	Proteína (%) <sup>1,2,3</sup>	Lipídeos (%) <sup>1,2,3</sup>	Cinza (%) <sup>1,2,3</sup>
HPCR-A	5	8,66 ± 0,14 <sup>a</sup>	77,58 ± 0,43 <sup>c</sup>	1,79 ± 0,08 <sup>b</sup>	13,64 ± 0,34 <sup>b</sup>
HPCR-A	10	7,16 ± 0,03 <sup>b</sup>	76,86 ± 0,19 <sup>d</sup>	2,23 ± 0,05 <sup>a</sup>	14,36 ± 0,21 <sup>a</sup>
HPCR-P	5	5,73 ± 0,07 <sup>c</sup>	81,58 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,08 <sup>b</sup>	13,53 ± 0,23 <sup>b</sup>
HPCR-P	10	6,84 ± 0,06 <sup>d</sup>	80,81 ± 0,22 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,08 <sup>c</sup>	14,13 ± 0,08 <sup>ab</sup>
RCST		6,45 ± 0,18	48,14 ± 0,49	3,79 ± 0,08	31,98 ± 1,37

<sup>1</sup> Valores em base seca.

<sup>2</sup> Média de três determinações ± desvio padrão.

<sup>3</sup> Valores com letras diferentes em coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

O resíduo utilizado na hidrólise continha 48% de proteína (base seca), obtendo-se hidrolisados com teor protéico entre 76,9 e 82,6%. Os hidrolisados produzidos com pancreatina apresentaram valores um pouco maiores que os hidrolisados obtidos com alcalase. Os valores encontrados estão em concordância com os apresentados em estudos com hidrolisados de pescado. Synowiecki e Al-khateeb (2000) e Gildberg e Stenberg (2001) encontraram teor protéico de 64% e 85% para hidrolisados dos resíduos do camarão *Crangon crangon* e *Pandalus borealis*, respectivamente. Vieira et al. (1995) reportaram, para hidrolisado do resíduo de lagosta, 77% de proteína, enquanto Shahidi et al. (1995) e Gesualdo-Liceaga; Li-Chan (1999) obtiveram para hidrolisados de peixe 70 e 77% de proteína, respectivamente.

O teor de cinza dos hidrolisados variou entre 13,5 e 14,4%. Synowiecki e Al-Khateeb (2000) obtiveram 23,9% em hidrolisado do resíduo do camarão *Crangon crangon*, e Gildberg e Stenberg (2001), 10% em hidrolisado de resíduo

do camarão *Pandalus borealis*. Já Gesualdo-Liceaga; Li-Chan (1999) relataram 21,3% para hidrolisado do peixe *Clupea harengus*. Além da adição de NaOH para o ajuste de pH durante a hidrólise, tratamentos adicionais para a neutralização do hidrolisado podem ter sido responsáveis pelos elevados teores obtidos nas pesquisas.

O conteúdo de lipídios nos hidrolisados protéicos variou de 1,7 a 2,2%, mostrando-se inferior ao encontrado no resíduo, 3,8%. Essa redução se deve a uma tendência dos lipídios de se unirem e formarem vesículas durante a hidrólise, permitindo, assim, sua remoção após centrifugação (SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995). A retenção dos lipídios no hidrolisado é indesejável, pois pode alterar sua estabilidade ao armazenamento e impedir seu uso na aplicação de alguns alimentos (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000). O teor de lipídeos no hidrolisado pode estar relacionado ao método de separação da fração solúvel após a hidrólise e também ao teor na matéria-prima. Hidrolisado do resíduo do camarão *Crangon crangon* apresentou 6,4% de lipídeos, o que correspondeu a 50% do teor da matéria-prima inicial (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000). Vieira et al. (1995) reportaram 10,8% de lipídeos em hidrolisado de resíduo de lagosta.

### **3.1 Composição dos aminoácidos totais e livres**

A Tabela 2 apresenta os resultados da composição dos aminoácidos totais do resíduo e dos aminoácidos livres dos hidrolisados. Entre os aminoácidos totais do resíduo, a isoleucina, ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina exibiram as maiores concentrações, sendo o ácido glutâmico o aminoácido que apresentou maior valor, 12,50 g/100g de proteína, seguido da isoleucina com 10,31 g/100g de proteína. Meyers (1986) encontrou 6,20% de isoleucina para a farinha do resíduo de camarão. Já Synowiecki; Al-kateeb (2000) encontraram para a proteína hidrolisada do resíduo de camarão *Crangon crangon*, 13,2% de isoleucina+leucina.

Dentre os aminoácidos livres, a arginina, fenilalanina, lisina, leucina, ácido glutâmico e glicina apresentaram as maiores concentrações. Os aminoácidos arginina, alanina, glicina e ácido glutâmico na forma livre são importantes para o “flavor” de camarão. A arginina e glicina são considerados os principais aminoácidos com ação atrativa para peixes e crustáceos (MANDEVILLE; YAYLYAN; SIMPSON, 1992). Os valores encontrados neste estudo para os referidos aminoácidos relacionados ao “flavor” e atratividade, estão entre os aminoácidos que apresentaram as maiores concentrações.

O total de aminoácidos livres obtidos com pancreatina foi de 15 a 20% superior ao total encontrado nos hidrolisados com alcalase. A alcalase é uma endopeptidase, enquanto a pancreatina, além das endopeptidases, contém exopeptidases, carboxipeptidase A e B, o que explica a maior liberação de aminoácidos livres pela pancreatina (ADLER-NISSEN, 1986; TURGEON; GAUTHIER, 1990; LAHL; BRAUN, 1994). O aumento do grau de hidrólise resultou em maior conteúdo de aminoácidos livres.

Simpson et al. (1998), utilizando as enzimas tripsina e quimotripsina bovina, encontraram para hidrolisado do músculo do camarão *Pandalus borealis*, maior concentração dos aminoácidos livres: glicina, alanina, arginina, prolina e valina 0,31; 0,20; 0,67; 0,37 e 0,10 g/100 g de proteína, para a enzima tripsina e 0,42; 0,14; 0,48; 0,55 e 0,14 g/100 g de proteína, para a quimotripsina. Esses valores foram inferiores aos obtidos neste estudo.

**TABELA 2.** Composição dos aminoácidos totais do resíduo do camarão sete-barbas liofilizado e dos aminoácidos livres (g/100 g de proteína) dos hidrolisados protéicos do resíduo do camarão sete-barbas, obtidos com as enzimas alcalase e pancreatina (HPCR-A, HPCR-P), com graus de hidrólise 5 e 10%.

Aminoácidos <sup>1,2</sup>	HIDROLISADOS				
	AA Totais Resíduo	Aminoácidos livres			
		HPCR-A		HPCR-P	
		GH 5%	GH 10%	GH 5%	GH 10%
Asp	9,41 ± 0,39	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,00 <sup>a</sup>
glu	13,74 ± 0,50	1,39 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,93 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,63 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
Ala	5,74 ± 0,18	1,30 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,47 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,61 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,88 ± 0,01 <sup>a</sup>
Arg	5,63 ± 0,31	2,16 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,89 ± 0,06 <sup>b</sup>	3,08 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,01 <sup>b</sup>
Cys	1,43 ± 0,06	0,71 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,92 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>a</sup>
Phe*	4,09 ± 0,12	1,93 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,55 ± 0,11 <sup>ab</sup>	2,02 ± 0,05 <sup>bc</sup>	2,70 ± 0,02 <sup>c</sup>
Gly	5,75 ± 0,21	1,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,31 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,01 <sup>a</sup>
His*	2,29 ± 0,04	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>
Ile*	10,71 ± 0,28	0,98 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,01 <sup>a</sup>
Leu*	8,58 ± 0,14	1,59 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,70 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,15 ± 0,04 <sup>b</sup>	2,46 ± 0,01 <sup>a</sup>
Lys*	6,46 ± 0,19	2,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,04 <sup>a</sup>
Met*	2,79 ± 0,17	1,10 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,43 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,13 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,63 ± 0,02 <sup>a</sup>
Pro	4,63 ± 0,13	0,49 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,01 <sup>a</sup>
Ser	4,39 ± 0,16	0,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,05 <sup>a</sup>
Tyr	3,12 ± 0,11	0,54 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,10 <sup>ab</sup>	1,46 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,83 ± 0,03 <sup>a</sup>
Thr*	3,65 ± 0,12	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>
Val*	4,00 ± 0,09	1,04 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,31 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,63 ± 0,01 <sup>a</sup>
TOTAL	96,41	17,89	21,79	22,66	25,85
AAE (%)	44,16				
AAL-E/AAL-totais (%) <sup>3</sup>		51,76	49,20	46,78	47,27

\* Aminoácidos essenciais

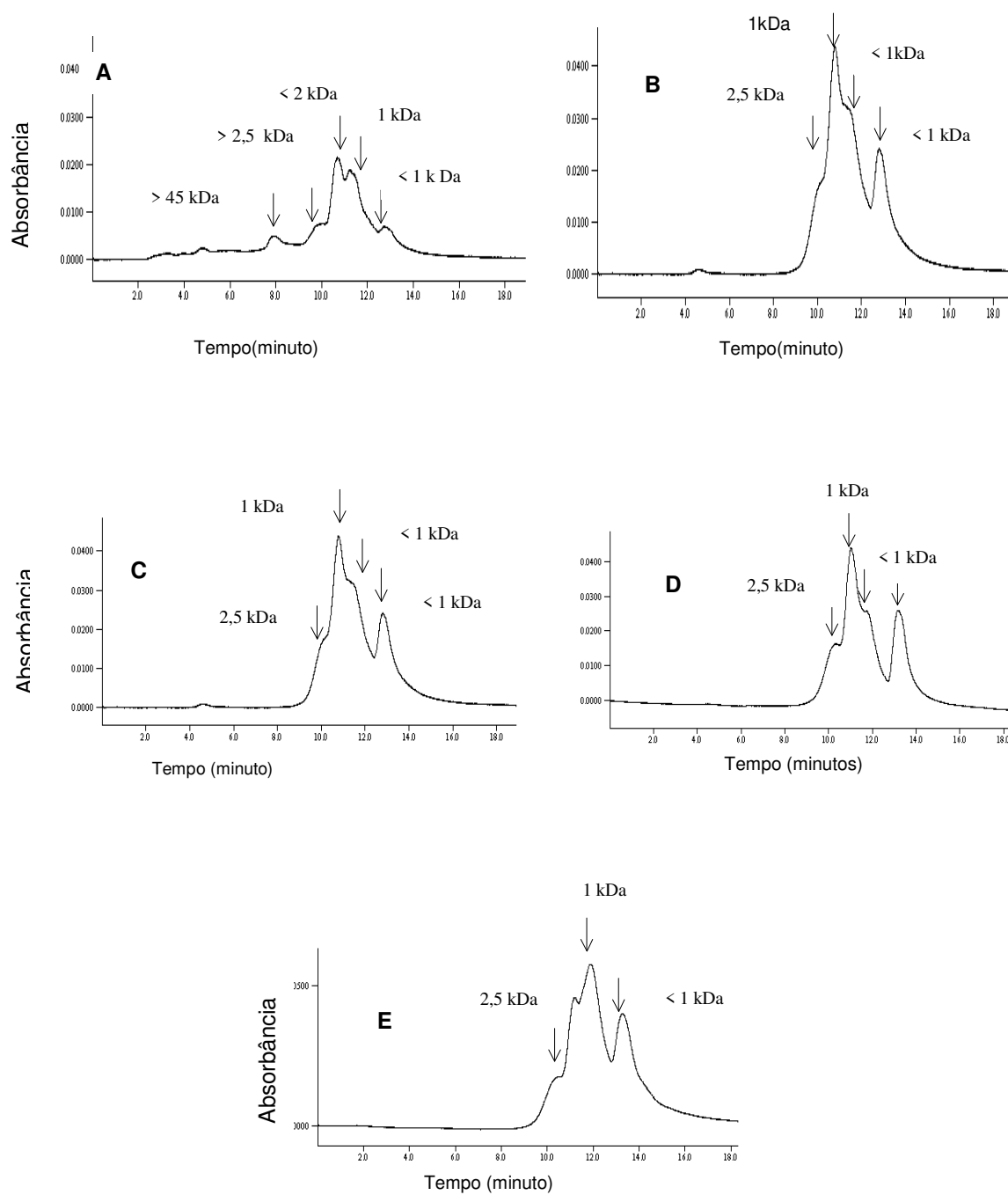
<sup>1</sup> Média três determinações ± desvio padrão

<sup>2</sup> Valores com letras diferentes em linha para os aminoácidos livres são significativamente diferentes (p<0,05) pelo teste de Tukey.

<sup>3</sup> AAL-E/AAL-totais= Aminoácidos livres essenciais/Aminoácidos livres totais.

### **3. 2 Distribuição do tamanho molecular**

A distribuição do tamanho molecular das proteínas do resíduo e dos hidrolisados está apresentado na Figura 3. O resultado obtido para as proteínas do resíduo apresentou cinco picos na região relativa à 45 kDa (Figura 3A). A Figura 3 mostra apenas as proteínas solúveis e frações parcialmente autolisadas do músculo, pois as proteínas fibrilares não são solubilizadas nas condições utilizadas na cromatografia. Nos cromatogramas dos hidrolisados (Figura 3 B-C-D-E), observou-se o desaparecimento do pico na região equivalente a 45 kDa e o aumento das áreas dos picos na região de menor tamanho molecular, entre 9,9 e 14 minutos de eluição, que equivale ao peso molecular entre 1 e 2,5 kDa.

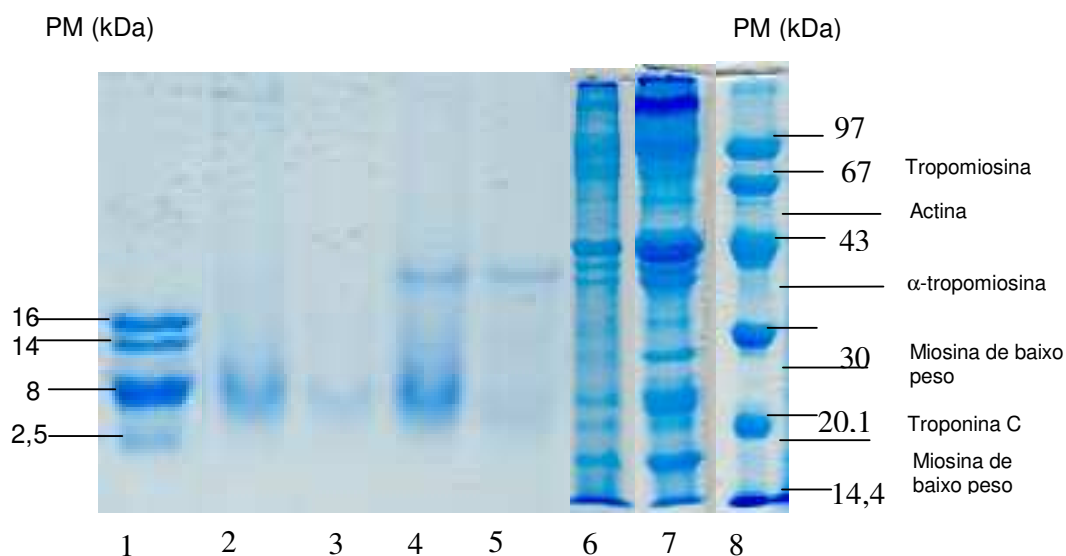


**FIGURA 3.** Perfil cromatográfico de exclusão molecular do resíduo e dos hidrolisados: (A) RCST, (B) HPC-A GH 5%, (C) HPCR-A GH 10%, (A) HPCR-P GH 5%, (A) HPCR-P GH 10%.



### .3 Distribuição do peso molecular

A Figura 4 apresenta o perfil eletroforético dos hidrolisados e das proteínas totais do resíduo e do músculo do camarão sete-barbas. Observou-se para os hidrolisados com alcalase (HPRC-A), com 5 e 10% de GH, uma única banda difusa, com peso molecular menor que 8 kDa. Comparando-se estes resultados com o perfil das proteínas do resíduo e do músculo (colunas 6 e 7), observou-se o desaparecimento de todas as frações, clivadas pela alcalase. Os perfis dos hidrolisados com pancreatina (HPRC-P), com 5 e 10% de GH, apresentaram duas bandas, uma difusa, com peso molecular menor que 8 kDa e a outra definida com peso molecular aproximadamente de 40 kDa. Esta fração, possivelmente a actina, foi totalmente hidrolisada pela alcalase e apenas parcialmente hidrolisada pela pancreatina. Gesualdo-Liceaga e Li-Chan (1999) encontraram peso molecular inferior a 6,5 kDa para hidrolisados de arenque (*Clupea haregus*) com alcalase.



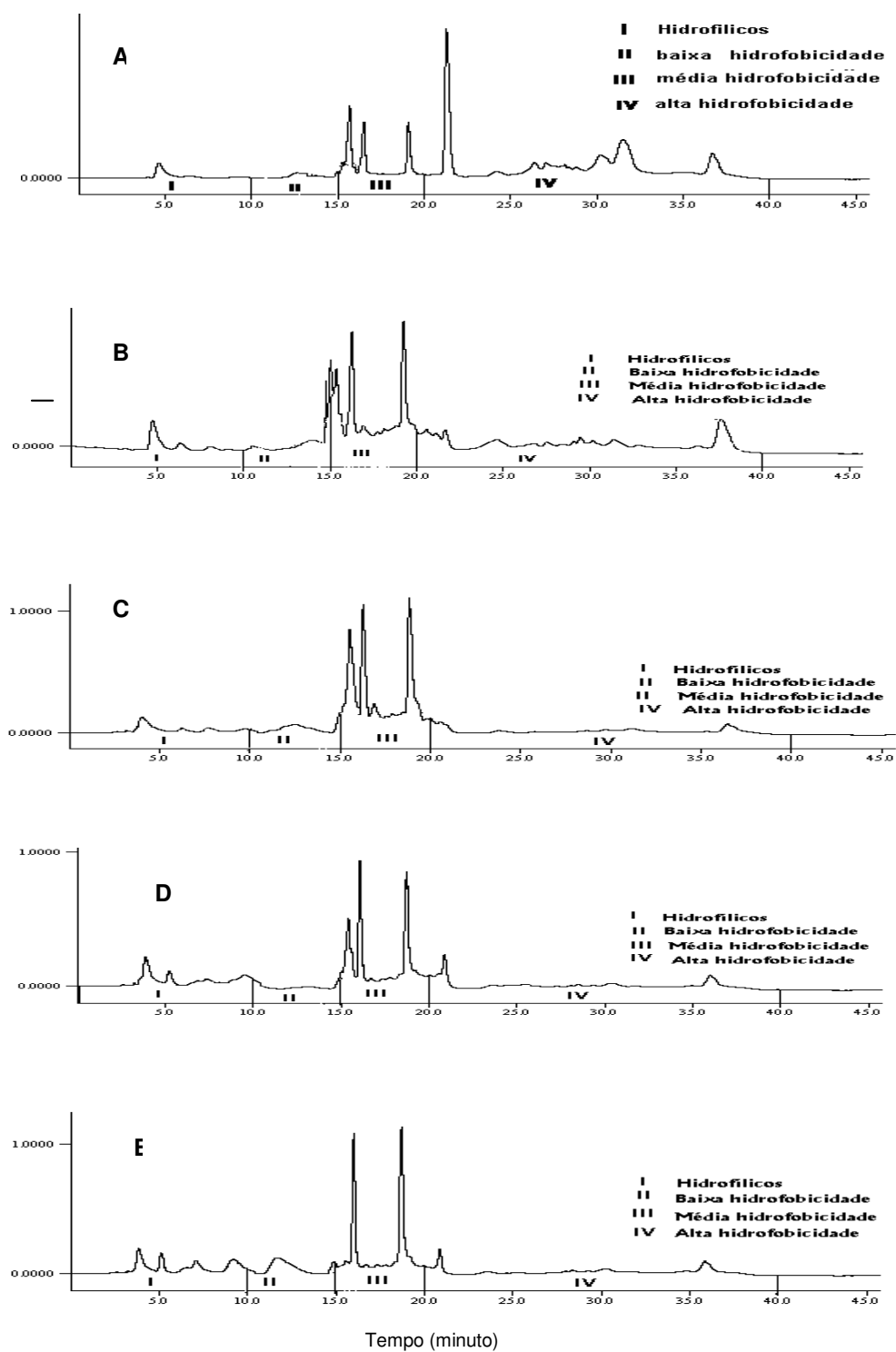
**FIGURA 4.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE): (2) HPRC-A com 5% de GH; (3) HPRC-A com 10% de GH; (4) HPRC-P com 5% de GH; (5) HPRC-P com 10% de GH; (6) resíduo (RCST); (7) músculo de camarão; (1) e (8) marcadores de peso molecular (Pharmacia).

### 3.4 Perfil de hidrofobicidade

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) tem sido considerada eficiente para separação de peptídeos de hidrolisados protéicos, além de indicar o seu caráter hidrofílico e hidrofóbico (LEMIEUX et al., 1990). É também a técnica mais amplamente utilizada no mapeamento de peptídeos em amostras biológicas e de alimentos (HERRAIZ, 1997).

O perfil cromatográfico de fase reversa do resíduo do camarão sete-barbas sem tratamento (RCST) e dos hidrolisados protéicos produzidos com alcalase e pancreatina (HPRC-A, HPRC-P) estão apresentados na Figura 5. O perfil de eluição foi dividido em quatro categorias, de acordo com a hidrofobicidade dos peptídeos eluídos e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que a relação de hidrofobicidade/hidrofilicidade dos peptídeos, expressa como  $[\text{área de hidrofílicos} + \text{área de baixa hidrofobicidade}] / [\text{área de média hidrofobicidade} + \text{área de alta hidrofobicidade}]$ , diminuiu de 15,8 para valores entre 2 e 4,5, após a hidrólise enzimática. Os hidrolisados com GH 5% apresentaram uma relação hidrofóbicos/ hidrofílicos de 4,6 para a alcalase e 4 para a pancreatina e para aqueles com GH 10%. Estes valores foram reduzidos para 2,1 e 2,4. A pancreatina produziu o maior percentual de peptídeos hidrofílicos, possivelmente devido à formação de peptídeos menores. Os peptídeos de média hidrofobicidade mostraram-se constantes, entre 41,4 e 48,8%, independente do GH e tipo de enzima utilizado para a produção do hidrolisado.





**FIGURA 5.** Perfil cromatográfico de fase reversa do resíduo e dos hidrolisados: (A) RCST, (B) HPRC-A com GH 5%, (C), HPRC-A com GH 10%, (D) HPRC-P com GH 5% e (E) HPRC-P com GH 10%

**TABELA 3.** Perfil de hidrofobicidade das proteínas do resíduo do camarão sete-barbas e dos hidrolisados com alcalase e pancreatina.<sup>1</sup>

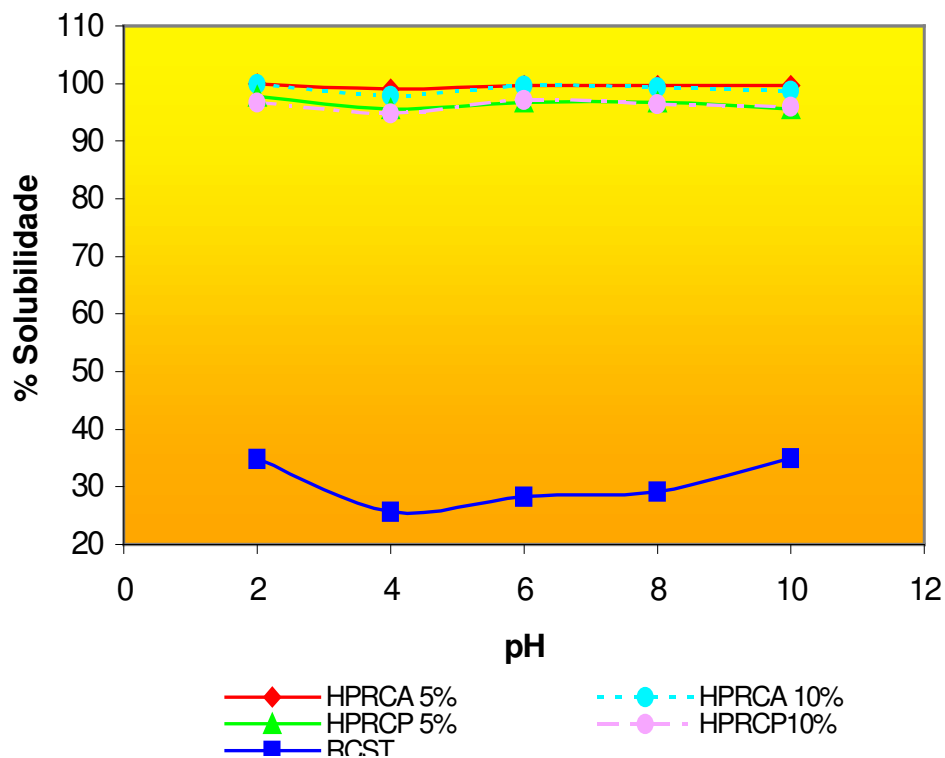
		Baixa	Média	Alta
		Hidrofílico	hidrofobicidade	hidrofobicidade
		hidrofobicidade	hidrofobicidade	hidrofobicidade
<b>Hidrolisados GH</b>				
HPRC-A	5%	5,54	12,38	41,37
HPRC-A	10%	8,01	24,74	48,78
HPRC-P	5%	16,80	3,14	48,75
HPRC-P	10%	18,02	11,16	45,78
RCST		2,78	3,15	22,90
				71,01

<sup>1</sup> Valores da distribuição de hidrofobicidade e hidrofobicidade relativa, expresso em % de área total do cromatograma.

### 3.5 Solubilidade

A solubilidade é uma das propriedades físico-químicas e funcionais mais importantes de hidrolisados protéicos, pela importância que exerce sobre as outras propriedades funcionais de proteínas. É influenciada pelo pH, temperatura, concentração e força iônica (MAHMOUD, 1994). Pode ser definida como a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente. Os principais fatores que influenciam na solubilidade das proteínas são as interações hidrofóbicas e as de natureza iônica. Interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína e resultam na diminuição da solubilidade, enquanto as interações iônicas promovem interações proteína-água e resultam no aumento da solubilidade (MOOR et al., 1985; DAMODARAN, 1996).

A solubilidade dos hidrolisados e das proteínas do resíduo está apresentada na Figura 6. Os hidrolisados apresentaram valores elevados de solubilidade em todos os índices de pH estudados (2-10), diferindo estatisticamente ( $P < 0,05$ ) da solubilidade das proteínas do resíduo (RCST). A solubilidade foi multiplicada por um fator 4 após a hidrólise enzimática. Para os hidrolisados, a menor solubilidade foi de  $97,93\% \pm 1,44$ , em pH próximo ao ponto isoelétrico, e aumentado em pH<sub>s</sub> acima e abaixo deste valor.



**FIGURA 6.** Solubilidade do resíduo (RCST) e dos hidrolisados com alcalase (HPRCA) com 5 e 10% e com pancreatina (HPRCP) com 5 e 10% de GH.

A solubilidade mínima na região do ponto isoelétrico também foi observada por Synowiecki e Al-Khateeb (2000) para hidrolisados do resíduo do camarão *Crangon crangon* (81,7%), e Shahidi, Xiao-Qing Han e Synowiecki (1995) em hidrolisados do músculo de peixe (93%).

O aumento da solubilidade da proteína hidrolisada pode ser atribuído à diminuição do tamanho das cadeias de polipeptídeos e o aumento da hidrofiliabilidade devido a uma maior exposição de aminoácidos hidrofílicos ionizáveis (ácido aspártico, ácido glutâmico, tirosina, arginina, histidina e lisina) e grupos carboxílicos (FONKWE; SINGH, 1996). Alta solubilidade em ampla faixa de pH é uma propriedade útil, sugerindo que a proteína hidrolisada pode ser usada em várias aplicações em alimentos e rações (ADLER-NISSEN, 1986).

#### **4. CONCLUSÕES**

A hidrólise do resíduo de camarão com as enzimas alcalase e pancreatina resultou em hidrolisados com teor de proteína acima de 76%. O perfil eletroforético dos hidrolisados mostrou ser a alcalase mais eficaz na clivagem nas proteínas do resíduo, apresentando peptídeos com peso molecular menor que 8 kDa, enquanto os hidrolisados com pancreatina ainda apresentaram a fração actina não totalmente hidrolisada. O aumento do GH resultou na diminuição da hidrofobicidade dos peptídeos formados, tendo a pancreatina produzido maior quantidade de peptídeos hidrofílicos.

Os elevados teores de proteína e de aminoácidos essenciais, encontrados com a alcalase e a pancreatina, indicam que os hidrolisados são produtos com grande potencial de utilização na indústria de alimentos e de rações destinadas à aquicultura. A presença dos aminoácidos livres; arginina, glicina, alanina e ácido glutâmico, considerados importantes para produção de flavorizantes e como quimioatrativo para várias espécies de peixe e crustáceos, destaca o valor e o potencial do uso desses hidrolisados em rações para aquicultura.

## 5. REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 12 ed., Washington, 1990.

ADLER-NISSEN, J. **Enzimic Hydrolysis of Food Proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 427p.

ARCHER, M. C.; RAGNARSSON, J. O.; TANNENBAUM, S. R.; WANG, D. I.C. Enzymatic solubilization of and insoluble substrate, fish protein concentrate process and kinetic considerations . **Biotechnology Bioengineering**, v. 15, p. 181 – 196, 1973.

BACA, D. R.; PENA-VER, M. T.; DÍAZ-CASTAÑEDA, M. Production of Fish protein Hydrolysates with bacterial Proteases; Yied and Nutritional Value. **Journal of Food Science**, v. 56, n.2, p. 309 - 314, 1991.

BECKMAN INSTRUMENTS, **INC. Beckman 118/119** CL amino acid analyzer instruction manual. Palo Alto, 1977.

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n. p. 911 - 917, 1959.

CAMP, J. V., et al, A. Influence of pH and calcium chloride on the high-pressure-induced aggregation of a whey protein concentrate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n. p.1600 -1607, 1997.

CARVALHO, A. P., et al. Frist feeding of common cap larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. **Aquaculture International**, v.5, n. p. 361-367, 1997.

COCKRAN, W. G.; COX, F. M. **Experimental desingn**.2 Ed, New York: John Wiley, 1957, 611p.

DAMODARAN, S. Aminoacids, peptides, and protein. In: **Food Chemistry**, 3<sup>rd</sup>. Ed; Fennema, O. R; New york: Marcel Dekker Inc., 1996; Chapter 5, p. 373.

FRONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31. n.6, p. 605 - 616, 1996.

GABAUDAN, J.; PIGOTT, F.; HALVER, J. E. The effect of processing on protein ingredients for larval diets: biological evaluation. **Process World Mariculture Society**, v. 11, p. 424 – 432, 1980.



GESUALDO-LICEAGA, A.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1000 -1004, 1999.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 809 - 812, 2001.

HERRAIZ, T. Samples preparation and reversed phase-high performance liquid chromatography analysis of food-derived peptides. **Analytica Chimica Acta**, 352, p. 119-139, 1997.

HOLANDA, H. D. NETTO, F. M. Optimization of the conditions for the enzyme hydrolysis of shrimp residue, using response surface methodology (RSM) In: 2002 **IFT ANNUAL MEETING**, Anaheim, CA USA, 2002, Book of Abstracts, p. 194.

KINSELLA, J. E. Functional properties of proteins in foods: a survey, **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v.8, n.4, p. 219, 1976.

KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream (*sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, v. 155, n. p. 193 - 205, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 685 – 689, 1970.

LAHL, E. J. BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v. 48, n.10, p. 68 – 71, 1994.

LEGAY, C.; POPINEAU, Y.; BÉROT, S.; GUÉGUEN, J. Comparative study of enzymatic hydrolysis of  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ - gliadins. **Nahrung**, v. 41, p. 201 – 207, 1997.

LEMIEUX, L. & AMIOT, J. Efficiency of five chromatographic systems for the separation of casein digest. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v.13 (20), p. 4023 -4035, 1990.

LINDER, P., et al. Proteolysis by juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) gastrointestinal enzymes as a method for the evaluation of feed proteins. **Fish Physiology Biochemistry**, v.14, n. p.399 - 407, 1995.

MANDEVILLE, S.; YAYLAYAN, V.; SIMPSON. Proximate Analysis, isolation and identification of amino acids and sugars from raw and cooked commercial shrimp waste, **Food Biotechnology**, v. 6, n.1, p. 51 – 64, 1992.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v. 58, n. 10, p. 89 -95, 1994.

MOOR, C. V., et al. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v.50, n. p. 1715 -1718, 1985.

O'MEARA, G. M.; MUNRO, P. A. Effects of reaction Variables on the Hydrolysis of Lean Beef Tissue by Alcalase. **Meat Science**, v. 11, n. p. 227 - 238, 1984.

OOMAH, B. D.; VOLDENG, H.; FREGEAU-REID, J. A. Characterization of soybean proteins by HPLC. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 45, n. p. 251 - 263, 1994.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, n. p. 368-379, 1987.

SHAHIDI, F.; XIAO-QING HAN; SYNOWIECKIM, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelim (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 285 -293, 1995.

SIMPSON, B.K., et al. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**, v.61, n.1/2, p. 131 -138, 1998.

SPACKMAN, D. M.; STEIN, V. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v.30, n.7, p. 1190 – 1206, 1958.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp crangon crangon processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 147 -152, 2000.

TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F.; PAQUIN, P. Emulsifying property of whey peptide fractions as function of pH and ionic strength. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p. 601 – 604, 1992.

VENUGOPAL, V. SHAHIDI, F. Value-added products from underutilized fish species. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n. p. 431-453, 1995.

VIEIRA, G. H. F., et al. Studies on the enzymatic hydrolysis of brazilian lobster (*Panulirus spp*) processing waste. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 69, n. 1, p. 61 - 65, 1995.

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSÕES GERAIS**



## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSÕES GERAIS**

O resíduo do camarão sete-barbas apresentou 40 a 48% de proteína, 20% de quitina e 2,45 a 8,39 mg/100 g de astaxantina na extração com óleo. Não foi possível estabelecer relação entre época da coleta e composição do resíduo. A maior variação observada foi do teor de proteína, que pode estar relacionada às condições do processamento que deram origem ao resíduo. Foram observadas, também variações no teor de astaxantina que podem estar associadas às condições ambientais. O perfil eletroforético das proteínas do resíduo foi semelhante ao músculo, apresentando predominância dos aminoácidos: ácido glutâmico, isoleucina, ácido aspártico e leucina e um percentual de aminoácidos essenciais de 45%.

A otimização do processo de recuperação de proteínas por hidrólise com alcalase, empregando a Metodologia de Superfície de Resposta, mostrou que a relação enzima/substrato (E/S) foi o fator mais importante. A máxima recuperação da fração protéica do resíduo pela hidrólise foi 55,78%. Os modelos obtidos para as duas respostas grau de hidrólise (GH) e recuperação de proteína (RP), utilizando as condições de reação: E/S 3%, temperatura de 60°C e pH 8,5 foram estatisticamente significativos. Assim, as equações matemáticas obtidas são úteis para indicar tendências e as superfícies de resposta para escolha de zonas de operação.

Na recuperação dos principais componentes do resíduo, a hidrólise enzimática com alcalase foi mais eficiente do que com pancreatina, favorecendo a recuperação de proteína e astaxantina, em torno de 11 e 20% maior, enquanto o aumento do GH proporcionou um incremento de 27 e 10%, respectivamente. Aproximadamente 70% da astaxantina recuperada após hidrólise foi proveniente da fração insolúvel. A quitina obtida após processo enzimático apresentou teores de nitrogênio e cinzas superiores aos da quitina obtida por desproteínização

alcalina. No entanto, manteve características semelhantes à quitina recuperada tradicionalmente.

Os hidrolisados obtidos com alcalase e pancreatina apresentaram teores protéicos acima de 76%. O perfil eletroforético dos hidrolisados mostrou ser a Alcalase mais eficaz na clivagem das proteínas do resíduo, apresentando apenas peptídeos de baixo peso molecular, menor que 8kDa, enquanto os hidrolisados com pancreatina ainda apresentaram a fração actina não hidrolisada, com peso molecular aproximado de 40 kDa.

Os hidrolisados apresentaram solubilidade em água acima de 97% em faixa de pH de 2 a 10, superiores à encontrada no resíduo.

Os hidrolisados do resíduo do camarão sete-barbas apresentaram em sua composição, na forma livre, os aminoácidos arginina, glicina, alanina e ácido glutâmico, que são considerados responsáveis pela produção de flavorizantes e da ação quimioatrativa para várias espécies de peixes e crustáceos.

É possível obter hidrolisados protéicos a partir do resíduo industrial do camarão sete-barbas, com características que permitem a sua utilização como ingrediente de rações para a aquicultura.

## **CAPÍTULO 7**

### **ANEXO**





## CAPÍTULO 7

### ANEXO DO CAPÍTULO 3

Planejamento experimental composto 2<sup>2</sup> – alcalase  
Cálculos dos Efeitos da E/S e temperatura  
Planilha gerada pelo software STATISTICA

Effect Estimates; Var.:GH; R-sqr=,95875; Adj:,91751 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,2008333 DV: GH										
	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	<b>12,28347</b>	<b>0,258733</b>	<b>47,47544</b>	<b>0,000443</b>	<b>11,17023</b>	<b>13,39671</b>	<b>12,28347</b>	<b>0,258733</b>	<b>11,17023</b>	<b>13,39671</b>
(1)E_S (L)	<b>2,104135</b>	<b>0,317358</b>	<b>6,630155</b>	<b>0,022001</b>	<b>0,738652</b>	<b>3,469617</b>	<b>1,052067</b>	<b>0,158679</b>	<b>0,369326</b>	<b>1,734809</b>
E_S (Q)	<b>-2,48067</b>	<b>0,378691</b>	<b>-6,55065</b>	<b>0,02252</b>	<b>-4,11005</b>	<b>-0,8513</b>	<b>-1,24034</b>	<b>0,189346</b>	<b>-2,05502</b>	<b>-0,42565</b>
(2)TEMP (L)	-0,1512	0,317358	-0,47643	0,680742	-1,51668	1,214283	-0,0756	0,158679	-0,75834	0,607141
TEMP (Q)	<b>-4,3166</b>	<b>0,378691</b>	<b>-11,3987</b>	<b>0,007609</b>	<b>-5,94597</b>	<b>-2,68722</b>	<b>-2,1583</b>	<b>0,189346</b>	<b>-2,97299</b>	<b>-1,34361</b>
1L by 2L	0,535	0,448144	1,193812	0,354949	-1,39321	2,463209	0,2675	0,224072	-0,6966	1,231605

Effect Estimates; Var.:RP; R-sqr=,84729; Adj:,69458 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0366333 DV: RP										
	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	<b>55,62267</b>	<b>0,110503</b>	<b>503,3608</b>	<b>3,95E-06</b>	<b>55,14721</b>	<b>56,09812</b>	<b>55,62267</b>	<b>0,110503</b>	<b>55,14721</b>	<b>56,09812</b>
(1)E_S (L)	<b>7,081743</b>	<b>0,135541</b>	<b>52,24804</b>	<b>0,000366</b>	<b>6,498558</b>	<b>7,664928</b>	<b>3,540872</b>	<b>0,06777</b>	<b>3,249279</b>	<b>3,832464</b>
E_S (Q)	<b>-4,57086</b>	<b>0,161736</b>	<b>-28,2613</b>	<b>0,00125</b>	<b>-5,26675</b>	<b>-3,87497</b>	<b>-2,28543</b>	<b>0,080868</b>	<b>-2,63338</b>	<b>-1,93748</b>
(2)TEMP (L)	<b>-2,85023</b>	<b>0,135541</b>	<b>-21,0286</b>	<b>0,002254</b>	<b>-3,43341</b>	<b>-2,26704</b>	<b>-1,42511</b>	<b>0,06777</b>	<b>-1,71671</b>	<b>-1,13352</b>
TEMP (Q)	<b>-8,03648</b>	<b>0,161736</b>	<b>-49,689</b>	<b>0,000405</b>	<b>-8,73237</b>	<b>-7,34059</b>	<b>-4,01824</b>	<b>0,080868</b>	<b>-4,36619</b>	<b>-3,67029</b>
1L by 2L	-0,015	0,191398	-0,07837	0,944669	-0,83852	0,808521	-0,0075	0,095699	-0,41926	0,40426

