

Gisele Kirchner Alves

**USO DE PAPAÍNA E BROMELINA PARA OBTENÇÃO DE
HIDROLISADOS PROTEÍCOS DE FÍGADO SUÍNO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Ciência dos
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de mestre em Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cleide Rosana
Werneck Vieira.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alves, Gisele Kirchner

Uso de Papaína e Bromelina para Obtenção de Hidrolisados Proteicos de Fígado Suíno / Gisele Kirchner Alves ; orientadora, Cleide Rosana Werneck Vieira - Florianópolis, SC, 2015.

91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de PósGraduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Hidrólise parcial. 3. Peptidases cisteínicas. 4. Fígado Suíno

I. Vieira, Cleide Rosana Werneck. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Gisele Kirchner Alves

USO DE PAPAÍNA E BROMELINA PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEÍCOS DE FÍGADO SUÍNO

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 15 de abril de 2015.

Prof.^a Roseane Fett, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Cleide Rosana Werneck Vieira, Dr.^a
Orientadora
Universidade UFSC

Prof. Carlos Silva Peres, Dr.
Universidade UFSC

Prof.^a Ana Carolina Costa Oliveira, Dr.^a
Universidade UFSC

Prof. Cesar Damian, Dr.
Universidade UFSC

À memória de minha irmã, Rosimere Alves,
fervorosa e principal entusiasta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me manter perseverante no decorrer deste caminho.

À minha mãe pelo constante apoio e ao Diego por estar ao meu lado e pacientemente aguardar o final desse processo de aprendizado.

A minha orientadora Profa. Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira, pela orientação, pelo incentivo e pelos ensinamentos não apenas relacionados com a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Cesar Peres, pelo acolhimento, incentivo e por todo apoio técnico nas etapas iniciais do trabalho.

Ao Prof. Dr. Cesar Damian, por trazer ao meu interesse o assunto de hidrolisados proteicos funcionais, base do meu projeto.

A todos dos laboratórios de biotecnologia e de reologia, no auxílio e paciência para utilizar suas dependências.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

A todos do Laboratório de Pesquisa e Extensão de Microbiologia pela ajuda e companhia durante esse período.

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas considerações.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A CAPES pela bolsa de estudo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelo apoio financeiro.

À empresa BR Foods, planta Herval D'Oeste, em principal a bioquímica Ramona Prado Freibeger pela doação dos fígados suínos.

À empresa Tovani Benzaquem, pela doação da enzima microbiana Alcalase AF2.4L.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

USO DE PAPAÍNA E BROMELINA PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEÍCOS DE FÍGADO SUÍNO

Neste estudo as atividades enzimáticas das peptidases cisteínicas, papaína e bromelina da Prozin[®] foram comparadas com a peptidase papaína analítica e subtilisina alcalase, essa amplamente empregada na indústria *petfood* e fórmulas infantis. No ensaio com caseína 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7, a alcalase mostrou mais efetividade com valor 100 vezes maior que as enzimas da Prozin[®]. As modificações na estrutura dos substratos derivados de ρ -nitroanilida, revelaram distinção entre as peptidases industriais, em presença de N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida a papaína apresentou maior ação, e quando em N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida a bromelina mostrou maior atividade proteolítica, identificando a hidrofobicidade na região de substituição P1 como regulador de ação entre as peptidases. O planejamento experimental se deu com hidrólises de fígado suíno, como fonte proteica, empregando as enzimas papaína e bromelina, separadamente, contemplando três variáveis em três níveis: relação enzima/substrato (1, 2 e 4 %), temperatura (40, 60 e 80 °C) e tempo (60, 120 e 240 minutos). Após considerações dos melhores resultados somadas as condições possíveis de reprodutibilidade industrial, a hidrólise escolhida estabeleceu como temperatura 60 °C, com relação enzima/substrato de 2% por 4 horas, seguidas de liofilização. Os hidrolisados advindos das reações com papaína e bromelina resultaram liofilizados com valores menores de 10% em umidade, com uma baixa redução no teor de proteínas (~2%). A amostra apresentou um excelente perfil microbiológico e no teste de inserção de inóculo conhecido, a etapa de paralização da reação enzimática por calor (100 °C / 15min) mostrou eficiência na redução da carga microbiana pelo processo.

Palavras-chave: Hidrólise parcial. Peptidases cisteínicas. Fígado Suíno.

ABSTRACT

USE OF PAPAIN AND BROMELAIN TO OBTAIN HYDROLYZED PROTEINS FROM PIG LIVER

In this study the enzymatic activity of cysteine peptidase, papain and bromelain Prozin[®] were compared with peptidase analytical papain and subtilisin alcalase, being the last one widely used on the petfood industry and infant formulas. On the test with 1% casein phosphate buffer 0,1 M pH 7, the alcalase showed more effectiveness with value a hundred times greater than the enzymes of Prozin[®]. The changes in the structure of the derivative of ρ -nitroanilide substrates revealed distinction between the industrial peptidases. In the presence of N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- ρ -nitroanilide papain showed the highest activity, and when N-succinyl-Ala Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilide bromelain showed higher proteolytic activity, identifying the hydrophobicity in P1 replacement region as action regulator between peptidases. The experimental design was made with pig liver hydrolysis, as a protein source, using the enzymes papain and bromelain, separately, covering three variables at three levels: relationship enzyme / substrate (1, 2 and 4%), temperature (40, 60 and 80 °C) and time (60, 120, and 240 minutos). After considering not only the best possible results but also industrial reproducibility, the choosen hydrolysis established the temperature at 60 ° C with relationship enzyme / substrate 2% for 4 hours, followed by lyophilization. The hydrolysates obtained from reactions with papain and bromelain resulted lyophilized under 10% in humidity values, with a low reduction in the protein content (~ 2%).The sample showed an excellent microbiological profile and at the known inoculum insertion test. The paralysis stage of stop the enzymatic reaction by heat (100 °C / 15 min) showed effectiveness in reducing microbial load by the process.

Keywords: Partial hydrolysis. Cysteine peptidases. Porcine liver

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura do Ferro-Heme, um ferro quelado encontrado em muitas proteínas como hemoglobina, mioglobina, citocromos e peroxidases.....	26
Figura 02. Fluxograma experimental da obtenção e caracterização do hidrolisado protéico de fígado suíno.....	46
Figura 03. Sistema com erlenmeyers em placa aquecedora com agitação magnética para obtenção de hidrolisados proteicos, a 60°C, 80°C e 40°C (sentido esquerda para direita).....	47
Figura 04. Sistema Frasco tipo “shott” de 1 L em <i>shaker</i> termostatizado a 60°C, a 200 rpm.....	48
Figura 05. Liofilizador de bancada JJ Científica, modelo LJJ02.....	49
Figura 06. Gráfico Abs 750 nm X Tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato caseína 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5.....	54
Figura 07. Gráfico Abs 410 nm x Tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e promelina Prozin, com substrato N-Benzoil-DL-Arginina p-nitroanilida.....	57
Figura 08. Gráfico Abs 410 nm x Tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida.....	58
Figura 09. Gráfico Abs 410 nm x tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilida.....	60
Figura 10. Diagrama de Pareto, análise das variáveis do ensaio com papaína Prozin®.....	66
Figura 11. Diagrama de Pareto, análise das variáveis do ensaio com bromelina Prozin®.....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Composição química do fígado suíno por 100 g de amostra.....	27
Quadro 02. Variáveis reais e codificadas do planejamento experimental para hidrólise enzimática de fígado suíno.....	46
Quadro 03. Equações de reta, R^2 , UAP por quantidade de enzima no ensaio e UAP por mL ou grama de enzima, ensaio com caseína 1% como substrato.....	54
Quadro 04. Equações de reta, R^2 , mmoles/min por quantidade de enzima no ensaio e mmoles/min por grama de enzima, ensaio com N-Benzoil-DL-Arginina ρ -nitroanilida como substrato.....	57
Quadro 05. Equações de reta, R^2 , mmoles/min por quantidade de enzima no ensaio e mmoles/min por mL ou grama de enzima, ensaio com N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida.....	59
Quadro 06. Equações de reta, R^2 , mmoles/min por quantidade de enzima no ensaio e mmoles/min por mL ou grama de enzima, ensaio com N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida.....	60
Quadro 07. Composição química da amostra de fígado suíno congelada.....	61
Quadro 08. Resultados da microbiologia das amostras de fígado suíno conservadas a $-8 \pm 1^\circ\text{C}$	62
Quadro 09. Valores de grau de hidrólise (GH) utilizando fígado suíno como substrato nos ensaios de hidrólise com a enzima papaína Prozin [®]	63
Quadro 10. Teste de Significância ANOVA, com as relações lineares e quadráticas de todas as variáveis para enzima papaína Prozin [®]	65
Quadro 11. Teste de Significância ANOVA, somente com as variáveis significativas para enzima papaína Prozin [®]	67
Quadro 12 . Valores de grau de hidrólise (GH) utilizando fígado suíno como substrato nos ensaios de hidrólise com a enzima bromelina Prozin [®]	68
Quadro 13. Teste de Significância ANOVA para enzima bromelina Prozin [®]	69
Quadro 14. Teste de Significância ANOVA, somente com as variáveis significativas para enzima bromelina Prozin [®]	71
Quadro 15. Valores de proteínas, lipídeos, umidade e voláteis, resíduo mineral fixo das amostras hidrolisadas e liofilizadas de fígado suíno.....	72
Quadro 16. Valores da concentração de hematina ($\mu\text{g/mL}$) em fígado suíno, hidrolisados e liofilizados de cada enzima.....	73

Quadro 17. Valores de ferro-total e ferro-heme das amostras.....	74
Quadro 18. Valores de Unidade Formadoras de Colônia por 100 g de amostra, no ensaio de segurança microbiológica do processo com inserção de inóculo conhecido.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemist
ATP – Adenosina Tri-fosfato
Aw – Atividade de água
DH – Degree of Hydrolysis
EC – Enzyme Commission
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
DMSO - Dimetilsulfóxido
DPPH- 2,2 Diphenyl – 1 Picrylhydrazyl
FRAP- Ferric Reducing Antioxidant Power
GH – Grau de Hidrólise
IAE – Índice de Atividade Emulsificante
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OTA – Ocratoxina
PCA – Plat Cout Agar
QP - Quimopapaína
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
TPA – Texture Profile Analysis (Análise de Perfil de Textura)
UFC – Unidade Formadora de Colônia
Z-R- ρ NA – N-Benzoil-DL-Arginina ρ -nitroanilida
Z-SAAPF- ρ NA - N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida
Z-SAAPL- ρ NA - N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.1 Objetivo geral.....	22
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 MERCADO DE CARNE SUÍNA.....	23
2.2 FÍGADO.....	24
2.2.1 Funções fisiológicas hepáticas.....	24
2.2.2 Conteúdo nutricional.....	26
2.2.3 Oxidação.....	27
2.2.4 Segurança alimentar.....	28
2.3 PEPTIDASES CISTEÍNICAS.....	32
2.3.1 Papaína.....	34
2.3.2 Bromelina.....	35
2.4 HIDROLISADOS PROTEÍCOS.....	35
2.4.1 Grau de hidrólise.....	36
2.4.2 Alergenicidade.....	37
2.4.3 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteícos.....	37
2.4.4 Características sensoriais.....	38
2.4.5 Aplicações dos hidrolisados proteícos parciais.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 MATERIAL.....	43
3.1.1 Matéria-prima.....	43
3.1.2 Enzimas.....	43
3.2 MÉTODOS.....	43
3.2.1 Avaliação das enzimas comerciais.....	43
3.2.2 Determinações físico-químicas da matéria-prima.....	44
3.2.3 Delineamento experimental.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

4.1 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS COMERCIAIS.....	53
4.1.1 Determinação da atividade proteolítica pela reação de Folin-Lowry.....	53
4.1.2 Determinação da atividade proteolítica sobre derivados de p-nitroanilida.....	55
4.2 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA MATÉRIA-PRIMA.....	61
4.2.1 Composição química.....	61
4.2.2 Determinação de pH.....	62
4.2.3 Análise microbiológica.....	62
4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	63
4.3.1 Análise do Delineamento Experimental.....	63
4.4 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS.....	72
4.4.1 Composição química das amostras liofilizadas.....	72
4.4.2 Determinação de ferro total e ferro-heme.....	73
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO PROCESSO.....	74
5 CONCLUSÃO.....	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7 REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos em resposta a um mercado competitivo composto por consumidores mais informados e com necessidades específicas vem elaborando novas tecnologias de processos e insumos que resultam em uma maior quantidade de produtos com qualidade nutricional e funcional.

Neste contexto, os hidrolisados proteicos são utilizados como ingredientes em vários alimentos, com o objetivo de conferir sabor característico, alterar textura, emulsificar, produzir espuma ou aumentar o valor nutricional (KOBBLITZ, 2008). A sua presença em aplicações clínicas, tais como produtos geriátricos, suplementos energéticos, bebidas para esportistas, dietas entéricas ou para controle de peso e terapêuticas destinados a crianças alérgicas à proteína do leite de vaca e extrato de soja. (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). Ocorrendo, a partir dos anos 70, a produção e comercialização de produtos contendo hidrolisados pancreáticos de caseína e ovoalbumina (SGANBIERI, 1996).

Atualmente, as indústrias farmacêuticas e alimentícias mostram interesse em peptídeos bioativos originados a partir de caseína, glúten, soja, ovoalbumina (KOBBLITZ, 2008); E sendo alvo de pesquisa as proteínas de frango (CUI et al., 2008; SCHMIDT, 2008; ROSSI, 2007), pescado (SLIZYTE; RUSTAD; STORRO, 2005; HIMONIDES; TAYLOR; MORRIS, 2011), e suíno (CHANG; WU; CHIANG, 2007; SAIGA; TANABE; NISHIMURA, 2003).

A clivagem das ligações peptídicas podem ser realizadas por hidrólises químicas (ácida ou alcalina) ou enzimáticas. As condições ácidas convencionais de hidrólise para a determinação de aminoácidos, utilizam HCl 6 M a 110°C durante mais de 24 horas, oxidando o triptofano. A hidrólise alcalina pode reduzir quimicamente o teor de cistina, arginina, treonina, serina, isoleucina, e/ou lisina e formar resíduos de aminoácidos não usuais, tais como lisinoalanina ou lantionina (TAVANO, 2013). A hidrólise enzimática, por sua vez, é mais simples, eficiente e envolvem condições alcalinas suaves, desta forma evitam reações secundárias e não diminuem o valor nutricional da fonte de proteínas. Além disso, as enzimas apresentam especificidade para o substrato, que permite o desenvolvimento de hidrolisados proteicos com melhor definição química e características nutricionais (TAVANO, 2013; FONKWE; SINGH, 1996).

Segundo Koblitz (2008), as características do produto final são determinadas pelas condições de hidrólise, pela especificidade da

enzima utilizada e pela fonte de proteína. Porém o custo de fabricação destes hidrolisados ainda é alto e a maior parte importada, tornando-os matéria-prima de valor elevado para grande parte da indústria alimentícia. Por isso, o desenvolvimento de hidrolisados a partir de fontes proteicas de baixo valor agregado é uma alternativa para minimizar os custos de produção e aumentar o valor funcional deste tipo de produto. Assim, a utilização de vísceras como matéria-prima para produtos de alimentação humana agrega a filosofia do aproveitamento integral de tecnologias limpas no processamento de alimentos para oferecer fontes importantes de nutrientes.

Nessa categoria de subprodutos cárneos, observa-se o potencial nutritivo do fígado, como fonte de vitamina B₁₂ e A, limitado a processamentos térmicos regulados para não comprometer sua ação fisiológica (NOLLET; TOLDRÁ, 2011).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho possui como objetivo principal avaliar a viabilidade de produção de hidrolisados parciais proteicos provindos de fígado suíno utilizando no processo as enzimas papaína e bromelina, garantindo a qualidade através de avaliação das suas composições.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Análise comparativa entre as atividades enzimáticas das peptidases cisteínicas e a subtilisina, tendo como substrato a caseína e os derivados de p-nitroanilida;
- ✓ Otimizar a reação de hidrólise, em questão de tempo, concentração de enzima e condições reacionais;
- ✓ Analisar as composições químicas entre amostra inicial e os produtos de hidrólise liofilizados;
- ✓ Avaliar parâmetros de segurança microbiana nas amostras durante o processo de hidrólise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MERCADO DE CARNE SUÍNA

O Brasil está em quarto lugar mundial em produção e exportação de carne suína, isso se deve aos estudos e investimentos de grandes empresas localizadas principalmente na região sul do país. Elementos como sanidade, nutrição, bom manejo de granja, produção integrada, aprimoramento gerencial dos produtores somados à evolução genética da espécie desenvolvida por especialistas durante esses últimos 20 anos conduziram a um aumento de 4% ao ano na produção de uma carne com teores reduzidos de gordura (31%), do colesterol (10%) e de calorias (14%) (BRASIL, 2014).

Ainda de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, chegando a lucrar mais de US\$ 1 bilhão por ano. Estimando que a produção de carne suína atinja média anual de 2,84%, no período de 2008/2009 a 2018/2019, e o seu consumo, 1,79%, e em relação às exportações, a representatividade do mercado brasileiro de carne suína aumentará de 10,1%, em 2008, para 21% em 2018/2019.

Observando esse mercado e em conformidade com Toldrá et al. (2012) percebe-se que a parte muscular é a porção do animal mais comumente consumida, e a utilização dos subprodutos tais como entranhas e órgãos internos possui forte ligação com o país e cultura estudada, podendo ser considerados iguarias de altos preços ou material residual a ser eliminado.

Em algumas partes da Europa, escroto, cérebro, tripa (intestino grosso do porco ou estômago), pés, coração, cabeça, rins, fígado, pulmão, língua, focinho de vários mamíferos são itens comuns de menus. Na China, diversos órgãos e outras partes de animais são usadas como alimento e medicina tradicional, sendo a carne suína a mais consumida; Nas Filipinas, a população utiliza praticamente todas as partes do suíno, incluindo focinho, intestinos, orelhas e entranhas. Dinuguan é um tipo específico de ensopado com sangue usando intestinos de porco, carne de porco e às vezes orelhas e bochechas. A rega é um prato picante com pulmões de porco e coração. Isaw é outro prato na Índia, sendo um kebab feito com partes do intestino grosso de uma carne de porco assada (NOLLET; TOLDRÁ, 2011).

Segundo os mesmos autores o rendimento dos subprodutos comestíveis depende da espécie, sexo, idade e peso do animal, sendo de 10 a 30% em bovinos, suínos e ovinos, e de 5 a 6 % em frangos. Assim,

desenvolver técnicas para garantia da qualidade e adequação de produtos para ampliar mercado é uma das metas essenciais para estabilização e crescimento de empresas alimentícias.

2.2 FÍGADO

Glândula mista, variando um pouco em número de lobos e na localização intra-abdominal exata de uma espécie para outra. Entretanto sempre está situado imediatamente caudal ao diafragma e tendendo ao lado direito (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2005; D'ACRE; FLECHTMANN, 1980). O fígado suíno corresponde em média de 1,1 a 2,4% do massa total do animal (NOLLET; TOLDRÁ, 2011).

O fígado recebe dois suprimentos sanguíneos, um chamado de sangue nutricional, rico em oxigênio e nutrientes, que provem da artéria hepática (ramificação da artéria celíaca), e o outro de sangue funcional, enviado pelo estômago, baço, pâncreas e intestino, que entra através da veia porta para então realizar funções metabólicas e imunológicas, retornando destoxificado ao organismo pelas veias hepáticas curtas (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2005). Desta maneira, ele é órgão-chave, e seu bom estado é fundamental para um melhor sistema de vigilância e homeostase garantida.

No setor de alimentos, o fígado é um subproduto comestível pouco manuseado comparado aos outros. Sendo principalmente feito em fatias finas e cozidas ou fritas. Também pode ser picado e incorporado em muitas preparações, por exemplo, *braunschweiger* (salsicha de fígado de porco alemã), *foie gras* (patê de fígado de ganso francês), *liverwurst* (salsicha de fígado de porco alemã). No Reino Unido, encontra-se o faggot das terras médias, são feitos a partir de miúdos de porco picados (principalmente fígado e bochechas), pão, ervas, cebola e envoltos em tripa de porco. Um prato similar é a almôndega, tradicional em Portugal (NOLLET; TOLDRÁ, 2011).

2.2.1 Funções fisiológicas hepáticas

No processo endócrino metabólico, o fígado tem suas ações anabólicas e catabólicas reguladas por hormônios, os quais oscilam de acordo com o nível sanguíneo de glicose. No estado absorptivo, onde esse nível está elevado, a secreção de insulina pelo pâncreas estimula o acúmulo de glicose pelos hepatócitos na forma de glicogênio e a síntese proteica com os aminoácidos da ingesta, sendo o seu excesso transformado em triglicerídeos, como resultado da desaminação na via

metabólica que pode ser armazenado ou secretado na corrente sanguínea como lipoproteína. Essa desaminação dos aminoácidos também é parte de uma via metabólica estimulada pelo glucagon, na qual as células hepáticas utilizam esses aminoácidos para produzir glicose, a gliconeogênese, que também tem como substrato os íons lactato produzidos nos músculos esqueléticos quando em anaerobiose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006) e o glicerol, que é um produto do metabolismo do tecido adiposo (MURRAY et al., 1994). Na etapa pós-absortiva, há uma hipoglicemia, o que reduz a liberação de insulina e aumenta a concentração de glucagon, este por sua vez, estimula a degradação do glicogênio (glicogenólise) no fígado, restabelecendo a glicemia. Para a conservação de reserva de glicose, o fígado metaboliza os ácidos graxos circulantes para a formação de corpos cetônicos (acetona, acetoacetato e β -hidroxiburato), situação recorrente em pacientes diabéticos e em gado bovino leiteiro (REECE, 2008; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2005).

A bile, solução salina verde-amarelada produzida pelos hepatócitos, consiste em sais biliares (sintetizados a partir do colesterol), colesterol, fosfolipídeos (lecitina) e pigmentos biliares (bilirrubina). Desta maneira a formação e secreção da bile, entre as muitas funções desempenhadas pelo fígado, são essenciais ao sistema digestório. Esclarecendo o processo, caso o quimo duodenal fosse uma solução aquosa, os lipídeos tenderiam a acumular e formar grandes gotículas, apresentando pequena área de superfície para ação das lípases pancreáticas. Os ácidos biliares agem como emulsificantes, reduzindo o tamanho de partícula, facilitando a ação enzimática. É importante ressaltar, que esses sais permanecem misturados ao quilo até a parte terminal do intestino delgado, onde os enterócitos reabsorvem e são transportados novamente ao fígado pela veia porta hepática, podendo ser reutilizados, a esse processo se denomina circulação enterohepática (REECE, 2008; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2005).

O fígado possui papel importante no ciclo do colesterol, também sendo capaz de sintetizar ou eliminar quando em excesso na dieta pela bile. O colesterol é insolúvel em água, os sais biliares e a lecitina o alteram para uma forma solúvel de modo a existir na bile. Quando ocorre sua precipitação na vesícula biliar ou nos ductos biliares, evolui para o quadro de cálculos biliares (REECE, 2008; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2005).

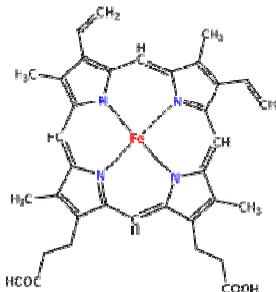
2.2.2 Conteúdo nutricional

A maior parte dos subprodutos diferem no metabolismo do pós-morte de tecido muscular, tanto que o processo *rigor mortis* tão característico por modificar estrutura proteica não possui importância no fígado após abate, permanecendo inalterado (HONIKEL, 2011).

De um modo geral, os subprodutos comestíveis de animais possuem um bom valor nutricional, devido a um elevado teor de proteínas e baixo teor de gorduras, bem como um bom conteúdo de vitaminas e minerais. Particularmente o fígado é um dos componentes mais nutritivos e constitui uma fonte rica de vitamina B₁₂ e A (NOLLET; TOLDRÁ, 2011). Além dessas, de acordo com Anderson (1988) contém grande quantidade de cobre e manganês, nutrientes essenciais para manutenção dos sistemas imunológico e nervoso, com especial atenção em crianças, gestantes e idosos.

As principais fonte de ferro são as carnes vermelhas e as vísceras, em especial o fígado (MARTÍNEZ et al., 1999). É preciso elucidar que entre as formas de ferro encontradas nos alimentos estão o ferro-heme e o ferro-não-heme, sendo o primeiro mais biodisponível e presente na carne, podendo ser assimilado na proporção de 25% do total de ferro do alimento (COTRAN; KUMAN; ROBBINS, 1996). No entanto, o ferro-não-heme é considerado o maior oxidante de sistemas cárneos e proporciona formas químicas de ferro de grande importância. Assim, a quebra da molécula heme, demonstrada na figura 01, durante o processo de cozimento ou estocagem aumenta a concentração da forma não-heme em carnes, reduzindo o valor nutricional (ESTÉVEZ; CAVA, 2004). Neste estudo, foi contemplado a análise das duas formas.

Figura 01. Estrutura do Ferro-Heme, um ferro quelado encontrado em muitas proteínas como hemoglobina, mioglobina, citocromos e peroxidases.



Fonte: Fennema, 2010.

Por outro lado, o teor de colesterol no fígado é maior do que na carne. (HONIKEL,2011). Os processos de cozimento aumentam mais ainda esses níveis, devido aos efeitos de concentração e subsequente perda de umidade. Apesar de ser limitado os estudos com introdução de agentes redutores de colesterol como suplemento na alimentação animal, foram observadas reduções de até 28% dos níveis de colesterol, quando alho e cobre foram somados a ingesta de frangos (BRAGAGNOLO, 2011).

Apesar dos estudos de avaliação de composição centesimal fornecerem resultados díspares, Honikel (2011), conseguiu compilar os dados através da apresentação de intervalo ou de valor “médio”, visualizados no Quadro 01.

Quadro 01. Composição química do fígado suíno por 100 g de amostra.

Componente	Quantidade	Componente	Quantidade
Proteína (g)	18,9-21,6	Tiamina (mg)	0,28-0,31
Gordura (g)	2,4-6,8	Riboflavina (mg)	3,00
Ca (mg)	6-10	Niacina (mg)	14,8-16,4
P (mg)	356-370	Vit. B6 (mg)	0,68-0,69
Fe (mg)	19,2-21,0	Pantotenato (mg)	0,9
Na (mg)	73-87	Biotina (µg)	27,0
K (mg)	271-320	Folacina (µg)	110-212
Mg (mg)	18	Vit B12 (µg)	25,0-26,0
Zn (mg)	5,76	Vit A (IU)	Traços-10900
Cu (mg)	0,68	Ácido ascórbico (mg)	13,0-25,3
Mn (mg)	0,34	Colesterol (mg)	301

Fonte: HONIKEL, 2011; NOLLET; TOLDRÁ, 2011.

As variações encontradas nos macro e micronutrientes são explicadas pelo fato dos dados compilados em *handbooks* provirem de diversas pesquisas, sem padronização de idade, sexo, raça, ração oferecida e método de análise (HONIKEL, 2011).

2.2.3 Oxidação

A degradação oxidativa de biomoléculas envolve diversos mecanismos moleculares que conduzem a geração de espécie reativas de oxigênio, propagando a cadeia de radicais livres, que em reações subsequentes levam a degradação das espécies reativas de oxigênio

(ROS), formados nas fases iniciais, obtendo uma grande variedade de produtos finais de oxidação (ESTEVEZ et al., 2011; MCCLEMENTS; DECKER.,2010).

As reações oxidativas ocorrem no tecido animal vivo como resultado do equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes endógenos, sendo aceleradas após o abate devido ao colapso parcial do mecanismo de defesa e a exposição dos tecidos ao oxigênio e outros fatores pró-oxidantes (ESTEVEZ et al., 2011; ORDÓÑEZ et al., 2005a).

Outra molécula, além dos lipídeos, está relacionada a deterioração por oxidação: as proteínas. Os mecanismos de reação são complexos, e o conhecimento sobre os vários produtos derivados das proteínas oxidadas faz-se relevante, já que os subprodutos são fontes proteicas significativas com interessantes propriedades tecnológicas (ESTEVEZ et al., 2011).

A rancificação auto-oxidativa é uma das principais reações de deterioração dos alimentos, já que implica no aparecimento de sabores e odores anômalos, conhecidos como “ranço”. Também provoca redução do valor nutritivo e do tempo de conservação de muitos alimentos, esses efeitos podem ser minimizados com refrigeração, acondicionamento e armazenamento corretos (ORDÓÑEZ et al., 2005a).

O tecido hepático é altamente suscetível devido ao seu elevado teor de ácidos graxos insaturados e alta quantidade de metais de transição e outros promotores de oxidação. Somados a esses fatores, as perações de tratamento aumentam a oxidação por facilitar a reação entre oxigênio e lipídeos insaturados (mistura, redução de tamanho) e por acelerar devido a altas temperaturas: por meio de cozimento, pasteurização e esterilização (ESTEVEZ et al., 2011).

2.2.4 Segurança alimentar

Após abate, evisceração, limpeza e divisão da carcaça vários processos complexos relacionados com a mudança inicial de músculo a carne iniciam e junto com eles as enzimas endógenas permanecem ativas, agindo sobre os tecidos promovendo a decomposição química através da lipólise e da proteólise. Mas outro mecanismo de deterioração deve-se a contaminação microbiológica, a qual depende principalmente as microfloras dominantes e produção de metabólitos por parte dessas (GUERRERO-LEGARRETA, 2011; FORSYTHE, 2002).

A deterioração microbiana depende de vários parâmetros intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores internos estão carga microbiana inicial e disponibilidade do substrato, lembrando que o fígado é um alimento altamente nutritivo, com elevado nível de proteína (18,9-21,6%), gordura (2,4-6,8%, desses 60 a 62% ácidos graxos insaturados e 15% de saturados), vitaminas (B₁₂ e ácido fólico), minerais e que a glicose é a principal fonte que determina o tipo e a taxa de crescimento, torna-se meio apropriado para uma gama de microrganismos. Grande parte dos deteriorantes é originária dos intestinos, pele e gânglios, e por problemas no manuseio como contato com as roupas dos trabalhadores, pisos, paredes, e instrumentos ocorrem as chamadas contaminações cruzadas. As toxinas geradas *in vivo* que provocam o mau funcionamento dos órgãos e o acúmulo nas vísceras tornam a deterioração destes órgãos internos mais rápida que a ocorrida em músculos estriados, devido a disponibilidade de compostos facilmente metabolizados pela microbiota nativa (GUERRERO-LEGARRETA, 2011; JAY, 2005).

Esses mesmos autores relatam que os fatores externos envolvidos na deterioração dos subprodutos são os mesmos que afetam qualquer alimento rico em proteínas: (1) a disponibilidade de oxigênio, que independente se ausente ou presente, ora privilegia as bactérias anaeróbias, outra as aeróbias respectivamente, ressalta-se também a existência das aeróbias facultativas; (2) atividade de água (a_w) é fator de controle já que a maioria das bactérias necessita de uma a_w igual a 0,90, com exceção as halófilas (denitrificantes, reductoras de sulfato, metanogênicas) que por crescer em ambientes com alta concentração de sal, são encontradas em meio com a_w igual a 0,75, e bolores e leveduras crescem na faixa de atividade de água entre 0,80 a 0,88; (3) temperatura - lembrando que as bactérias são agrupadas conforme faixa de temperatura de crescimento e quanto mais próximo de 0°C mais lenta será a taxa de multiplicação e maior a vida de prateleira – uma vez que a carne geralmente é mantida sob-refrigeração a deterioração ocorre devido aos psicrófilos (0 a 28°C), mas como os subprodutos são freqüentemente expostos a manipulação descuidada, falha na refrigeração, armazenamento e transporte, ocorre a deterioração pelos mesófilos; (4) pH, os órgãos internos, diferentemente do músculo esquelético, não sofrem uma grande queda no pH, por exemplo no fígado *in vivo* são encontrados valores de 6,99 e *postmortem* de 6,3, permitindo maior crescimento microbiano, assim reduzindo a vida útil; a redução do pH é indicador de deterioração devido a contaminação de bactérias lácticas.

Os principais microrganismos envolvidos na decomposição dos subprodutos cárneos são *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido-lácticas (GUERRERO-LEGARRETA; TAYLOR, 1994). Na dinâmica do crescimento microbiano, os primeiros utilizam os substratos de baixa massa molar tais como a glicose, glicose-6-fosfato, ribose, glicerol, aminoácidos e lactato, compostos encontrados com alto teor no fígado, que sob condições anaeróbicas tem potencial de degradação baixo, mas quando exposto ao oxigênio produz compostos altamente odoríferos como acetoína, ácidos acético, isobutírico, isovalérico e seus aldeídos e alcoóis, responsáveis pelo forte odor (GILL, 1995; GREER, 1989). *Pseudomonas* e bactérias ácido-lácticas são as principais deteriorantes, modificando os aminoácidos, produzindo odor pútrido, ésteres e ácidos (MASANA; RODRÍGUEZ, 2006; GREER, 1989); sendo que as primeiras podem utilizar como fonte de carbono os produtos finais do metabolismo da *B. thermosphacta* como diacetil, acetóina, propileno, butileno e glicóis (GILL, 1995; DAINTY; HIBBARD, 1983).

A microbiota encontrada no fígado, quando estocado a 5°C, é formada por cocos gram-positivos, cromógenos ou não, esporulados, coliformes presuntivos, e bastonetes gram-negativos, quando a contagem desses passar de 10⁷UFC/g após 7-10 dias o alimento torna-se sensorialmente inaceitável (SHELEF, 1975). Já em armazenagem a 10°C, ocorre a dominância na parte interna dos microrganismos anaeróbios e facultativos: *Lactobacillus*, *Enterobacter* e *Aeromonas*, e na superfície os estritamente aeróbios: *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Sendo o *Enterobacter* o anaeróbio facultativo predominante no gotejamento (GILL; DELACY, 1982).

Em relação as micotoxinas, suínos tendem a acumular ocratoxina A (OTA), por causa de uma meia vida sérica bastante longa de 72-120 hs, e ter alta incidência na alimentação desse animal. Contaminação por OTA é potencialmente elevada nos países do norte da Europa, devido ao clima prover melhor ambiente para o crescimento do fungo (GUERRERO-LEGARRETA, 2011).

Conforme SCUSSEL (1998), outras toxinas estão relacionadas a ração geralmente fornecidas ao rebanho, que são aflatoxinas e zearalenona. Da primeira, pode-se destacar o subtipo Aflatoxina B1, a qual possui em quadro agudo uma dose letal de 50% para porcos de 0,62 a 2,00 mg/Kg peso corporal, e em estado crônico ocasionando câncer hepático. Já a zearalenona, é conhecida por seus efeitos estrogênicos, debilitando o processo reprodutivo da criação. Os limites dessas

micotoxinas estão delimitados na Resolução da ANVISA RDC 7, 18.02.2011, a qual não contempla produtos cárneos.

O fígado por ser órgão principal de biotransformação de drogas, sua análise serve de monitorização para uso indevido de promotores de crescimento, alguns deles são permitidos com fins terapêuticos ou profiláticos específicos prescritos por veterinário, como melhora a eficiência da utilização da ração, com aumento da deposição de proteínas e redução teor de gordura, elevando o percentual de carne magra. Estes compostos são normalmente oferecidos como *cocktails* pela alimentação ou água de consumo (REIG; TOLDRÁ, 2011). Entre elas estão:

- Hormônios sexuais naturais e sintéticos: 17 β -estradiol, testosterona, zeranol, acetato de trembolone e acetato de melengestrol, que através de sua ação secundária ocorre um aumento de músculo esquelético quando masculino, ou produção de somatotropina se feminino (LE BIZEC; PINEL; ANTIGNAC, 2009).

- Agentes anti-tireoidianos: diminuição da taxa do metabolismo basal, com retenção de água e aumento de peso (De BRABANDER, 2005).

Ambas classes possuem propriedade teratogênica e/ou cancerígena, e a segunda provoca hipotireoidismo, muitos estudos relacionam essas ações com achados em humanos (REIG; TOLDRÁ, 2011).

- β – agonistas - clenbuterol, salbutamol, mabuterol - são utilizados como agente terapêutico em doenças respiratórias, além disso, contribuem com o amaciamento da carne por reduzir a proteólise e tendem aumentar a síntese de proteínas e lipólise (BARBOSA et al., 2005).

- Sedativos – carazololo, clorpromazina, xilazina – empregadas para reduzir o estresse do animal, também promovem o crescimento devido a redistribuição de gordura para o tecido muscular após várias semanas de sua aplicação (REIG; TOLDRÁ, 2011).

- Corticóides – dexametasona, betametasona, prednisolona, cortisona – agente anti-inflamatório, mas que somados a um hormônio ou β – agonista, exerce promoção de crescimento (REIG; TOLDRÁ, 2010).

- Antibióticos – macrolídeos, aminoglicosídeos, nitrofuranos, tetraciclina, fluoroquinolonas, β – lactâmicos, sulfonamidas – em princípio usados para prevenção e tratamento, tornaram-se problema de saúde pública, devido às dosagens subterapêuticas aplicadas para reduzir

a competição bacteriana pelo alimento, provocou um forte movimento de resistência microbiana, tanto nos animais quanto em humanos (BERRADA; FONT, 2011).

- Ractopamina – é uma feniletilamina β -adrenérgica, utilizada como suplemento alimentar o qual reparticiona os nutrientes do depósito de gordura para aumentar a síntese proteica e ter uma deposição de proteína muscular sem deteriorar a qualidade da carne suína (APPLE et al. 2007)

Outros compostos que podem vir a ser alvo de análise nos hepatócitos, são os pesticidas (VAZQUEZ-ROIG; PICÓ, 2011) e os metais pesados (FORTE; BOCCA, 2011) geralmente provindos de acidentes ecológicos, é de extrema importância sua pesquisa devido a ação sob as via metabólicas e o tempo de permanência no organismo, causando até a inviabilidade do animal inteiro.

2.3 PEPTIDASES CISTEÍNICAS

As peptidases cisteínicas são um grupo diverso com mais de 130 enzimas conhecidas presentes em animais, plantas e microrganismos. Apresentam massa de 24 a 35 kDa, têm atividade ótima em pH 6,0 a 7,5 e podem suportar temperaturas de até 60 a 80°C, em parte pelas três pontes dissulfeto (PARKIN, 2010). São ativadas na presença de agentes redutores e inativadas por agentes oxidantes e substâncias como sulfidril, como *p*-cloromercuriobenzoato, PCMB (KOBBLITZ, 2010).

Essas peptidases cisteínicas compreendem uma família de enzimas, consistindo de papaína e afins, tais como as protease vegetais quimopapaína (EC 3.4.22.6) e suas múltiplas isoformas, e a caricaína (EC 3.4.22.30) do látex de *Carica papaya*; a actinidina (EC 3.4.22.14) do kiwi e da groselha; a ficina (EC 3.4.22.3) do látex do figo; a bromalaína (EC 3.4.22.4) do abacaxi; bem como as catepsinas lisossomais – B, H, L, S, C e K - de tecidos animais. E um sistema único de cisteína-protease do músculo, a calpaína e suas isoformas, formada por duas subunidades ativadas por cálcio e com grande importância no amaciamento pós-morte no músculo (GONZÁLEZ-RÁBADE, 2011; PARKIN, 2010).

Nas plantas, as peptidases cisteínicas estão envolvidas em processos anabólicos e catabólicos presentes na maturação, degradação e reconstrução de proteínas em resposta a diversos estímulos externos e papel de limpeza ao destruir proteínas anômalas. Também

desempenham função no processo de acúmulo de proteínas de armazenamento pela semente e na mobilização dessas (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). Além disso, alguns estudos demonstraram relação dessas enzimas com o sistema de defesa contra pragas – insetos e larvas – Van der Hoorn e Jones (2004) relacionaram a superexpressão dessas peptidases cisteínicas com o desenvolvimento de plantas com maior resistência a uma certa de praga de insetos (lepidópteros), sendo pela percepção do invasor, ativação dos mecanismos metabólicos e execução de uma resposta de defesa. Koono et al. (2004) demonstrou em sua pesquisa que a papaína, ficina e bromelina, como constituintes do látex das suas respectivas plantas de origem, protegiam as árvores do ataque de insetos herbívoros por exalar em suas folhas substâncias tóxicas.

As peptidases cisteínicas possuem um grande potencial nas indústrias alimentícia, biotecnologia e farmacêutica por apresentar atividade em uma vasta gama de temperatura e pH; ocorrendo em vários tecidos das plantas, em alguns casos, em quantidade excessiva, desta forma oferece uma alternativa atraente para a sua extração e purificação (GONZÁLEZ-RÁBADE, 2011).

Comumente comercializadas como amaciantes de carne, a papaína e outras peptidases cisteínicas (bromaleína e ficina) são aplicadas ao músculo ou às carnes que não se tornam suficientemente macias durante a maturação pós-morte. A eficiência está no fato dessas enzimas hidrolisarem colágeno e elastina, proteínas do tecido conjuntivo responsáveis pela rigidez na carne. Apesar de obterem bons resultados apresentam alguns inconvenientes, em relação a concentração utilizada, pois não podem ser “superdosadas” e o padrão de amaciamento não é o mesmo que ocorre na carne maturada/amaciada de maneira natural (PARKIN, 2010).

Conforme esse mesmo autores essas enzimas podem ser aplicadas diretamente na carne, na forma pulverizada com sal ou outro carreador, ou na forma diluída, sendo injetada ou por imersão. Em alguns abatedouros, ocorre a aplicação *antemortem*, por via intravenosa de uma solução salina quase pura nos animais 2 a 10 minutos antes do abate, dessa maneira há uma melhor distribuição da enzima através dos tecidos musculares. A injeção de papaína desativada (forma dissulfídica) evita qualquer desconforto aos animais, uma vez que para ativá-la são necessárias as condições redutoras que rapidamente prevalecem no pós morte.

Em cervejas, o defeito chamado de turvação por resfriamento pode ser causado pela associação de taninos a proteínas. Nesse caso as

endopeptidases – papaína, bromelina e ficina - são adicionadas após a fermentação e antes da filtragem final, sendo destruída pela pasteurização da cerveja, lembrando que sua ação excessiva pode levar a perda da estabilidade da espuma (PARKIN, 2010).

A bromelina possui espaço na indústria de panificação, devido a sua utilização para melhorar o manuseio de massas de pizza e produzir *waffles*, panquecas e biscoitos tipo *wafer* (FELLOWS, 2006).

Este trabalho tem como foco a pesquisa das seguintes enzimas: papaína e bromelina.

2.3.1 Papaína

Extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*). Geralmente é comercializada na forma de extrato bruto com diferentes proteases, sendo as mais importantes a papaína e a quimopapaína (QP-A e QP-B), com características bastante semelhantes e que variam ligeiramente com a variedade plantada, o clima e o manejo, além do processo de extração/concentração utilizado. Sua atividade proteolítica encontra-se em valores de pH de 5,0 a 9,0, e especificamente para os substratos caseína e albumina, seu pH ótimo de atuação é 7,0. Sua temperatura de atividade ótima está na faixa de 60 a 70°C; permanecendo estável em temperaturas até 90°C (KOBBLITZ, 2010).

A papaína apresenta ainda atividade sobre ligações éster e amida e tem boa atuação na síntese de peptídeos. Apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa preferencialmente, ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina (KOBBLITZ, 2010; PARKIN, 2010).

Peptidases cisteínicas como a papaína foram identificadas como as enzimas-chave nas atividades proteolíticas em sistema imune relacionados a distúrbios degenerativos invasivos (BRÖMME; KALETA, 2002; LECAILLE et al., 2002). A indústria farmacêutica tem interesse nessa família de peptidases como potencial droga para doenças caracterizadas por degradação de matriz extracelular excessiva, tais como a osteoporose, a artrite, as doenças vasculares e câncer. Eles também têm sido identificados como componentes críticos da diferenciação celular, crescimento, de sinalização, de ação hospedeira de diversos patógenos humanos causadores de malária, doença de Chagas e esquistossomose, bem como os principais alergênicos (LECAILLE; KALETA; BRÖMME, 2002, McKERROW et al, 2006).

2.3.2 Bromelina

Bromelinas são um complexo de peptidases cisteínicas naturais extraídas do pedúnculo do abacaxi (*Ananas comosus*), com atividade ótima em pH de 6,0 a 8,0 e é menos termoestável que a papaína, perdendo rapidamente estabilidade em temperaturas superiores a 70°C (KOBBLITZ, 2010).

Muitos estudos, datados da década passada, tiveram como objetivo a purificação e identificação de muitas peptidases cisteínicas vegetais, sendo sua origem perceptivelmente concentrada na família *Bromeliaceae* e devido as suas propriedades fibrinolítica, antiinflamatória e cicatrizante, é utilizada em tratamento de doenças relacionadas à coagulação sanguínea, angina, indigestão e problemas respiratórios (GONZÁLEZ-RÁBADE, 2011). Além disso, foram capazes de inibir a ação da toxina colérica (MYNOTT et al., 1997), com atividade anti-tumoral, através de estimulação da citotoxicidade de monócitos deficientes e indução de citocinas específicas em pacientes com tumor (ECKERT et al., 1999). Adicionado a todos os seus efeitos, mostrou ser segura, sem efeitos secundários indesejados após a administração oral (MAURER, 2001).

2.4 HIDROLISADOS PROTEÍCOS

Os hidrolisados proteícos são produzidos tanto com objetivo de melhoria das propriedades funcionais. Peptídeos e aminoácidos que atuam como flavorizantes quantoua forma desidratada como fonte proteica, com alta digestibilidade, alta solubilidade em água e longa vida de prateleira (PEDERSEN, 1994).

A reação de hidrólise, independente se por via química ou enzimática, produz peptídeos de vários tamanhos, em consequência produtos com propriedades funcionais diferentes. A hidrólise química pode ser tanto ácida quanto alcali, existindo muitas limitações dos ingredientes para emprego alimentício, pois os procedimentos envolvem reagentes químicos fortes em temperatura e pH extremos, sendo difícil de controlar e geralmente são obtidos produtos com qualidade nutricional reduzida e funcionalidade prejudicada (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

A hidrólise por via enzimática é a mais indicada para a indústria de alimentos, já que as condições de temperatura e pH são mais brandas para a melhor atividade da protease. Tornando-se uma das estratégias

para melhorar as propriedades de solubilidade, dispersibilidade, formação de espuma e emulsificação (DAMODARAN, 2010). Ressaltando que os hidrolisados produzidos pelas endoproteínases possuem perfil de peptídeos bem definidos, enquanto que as hidrólises ácida e alcalina podem destruir L-aminoácidos, produzindo D-aminoácidos e substâncias tóxicas como a lisina-alanina, reduzindo valor nutricional do hidrolisado, pois as proporções de aminoácidos, di e tripeptídeos são importantes para a absorção (LAHL; BRAUN, 1994).

2.4.1 Grau de hidrólise

Na proteólise para cada ligação peptídica clivada pela enzima, libera-se um mol de grupo carboxila e um mol de grupo amino, quando a reação é completa o resultado é uma mistura de todos os aminoácidos presentes na proteína. Caso incompleta, há uma mistura de polipeptídeos de diversos tamanhos que podem ser regulados pelas condições reacionais (pH, temperatura, atividade de água), sendo possível selecionar os que possuem as propriedades desejadas (PARKIN, 2010).

As características funcionais dependem do grau de hidrólise – GH (*degree of hydrolysis* DH), uma medida da extensão da degradação hidrolítica da proteína, e é muito utilizado como indicador comparativo entre diferentes produtos finais (NEVEZ; MIRA; MARQUEZ, 2004; CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

Parkin (2010) definiu o grau de hidrólise como sendo a fração de ligações peptídicas clivadas, geralmente expressa como percentual:

$$GH\% = (h/ht) \times 100 \quad (1)$$

Onde h é o número de mols de ligações peptídicas clivadas por mol de proteínas e ht é o número total de moles de ligações peptídicas presentes em um mol de proteínas. Quando a massa molar da proteína não for conhecida ou se for uma mistura de proteínas, h e ht são expressos como o número de ligações peptídicas por grama de proteínas.

Várias metodologias são utilizadas para determinar o grau de hidrólise, incluem a técnica do pH-stat, osmometria, solubilidade em ácido tricloacético (TCA), determinação de nitrogênio-amino por titulação com formol e pelo método que utiliza ácido trinitrobenzenosulfúrico (TNBS). (NIELSEN; PETERSEN; DAMBMAN, 2001; KRISTINSSON; RASCO, 2000).

A aplicação de hidrólise enzimática às proteínas tem sido amplamente utilizada para melhorar ou ampliar as suas funcionalidades, esta área conduz muitos estudos com diferentes tipos de enzimas e substratos que pesquisam as condições de reação através do grau de

hidrólise somadas às características funcionais dos hidrolisados, havendo maior aceitabilidade a hidrólise branda, à medida que a extensiva é considerada prejudicial, posto que um alto grau de hidrólise possa levar a uma alta solubilidade, inviabilizando o produto como matéria-prima para muitos processos tecnológicos (FURTADO et al., 2001; MULLALLY et al., 1995).

2.4.2 Alergenicidade

Várias proteínas alimentares, tanto de origem animal (leite de vaca, ovo) quanto vegetal (soja, glúten, amendoim) provocam reações alérgicas em humanos. A alergenidade das proteínas intactas origina-se da presença de sítios antigênicos (epítopos) que se ligam à imunoglobulina E (IgE). Quando hidrolisados, esses sítios são destruídos pela clivagem proteolítica, reduzindo a formação do complexo antígeno-anticorpo. Para uma maior redução líquida é indicado o uso de proteases inespecíficas ou uma mistura de proteases e um grau de hidrólise alto (DAMODARAN, 2010; AAS, 1988).

2.4.3 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos

A funcionalidade das proteínas é modulada por vários fatores físicos e químicos; entre eles, tamanho, composição e sequência de aminoácidos e conformação, carga líquida e distribuição das proteínas, capacidade de reação com outros componentes. Somados a esses, existe o fato de a estrutura inicial da proteína se modificar quando presente no complexo alimentício final (ORDÓÑEZ, et al., 2005a). E quando purificadas as propriedades funcionais das proteínas podem ser modificadas nos processos de obtenção ou isolamento, dependendo do tipo de extração empregado, a temperatura, o pH, a força iônica, e as condições de secagem e estocagem da proteína isolada (SGARBIERI, 1996).

Por efeito, as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem das proteínas encontradas no substrato e da enzima utilizada, pois as diferenças de tamanho e as outras propriedades físico-químicas dos polipeptídeos liberados durante a reação refletem diretamente na solubilidade e capacidade de retenção de água. Ressalta-se que os hidrolisados proteicos não costumam formar géis termoinduzidos, a exceção disso é o hidrolisado ácido ou alcalino de colágeno, a gelatina (DAMODARAN, 2010).

2.4.3.1 Propriedades funcionais hidrofílicas

As propriedades de hidratação das proteínas estão diretamente relacionadas com a composição aminoacídica e sua conformação. Definindo a afinidade da proteína pela água através de pontes de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo ou interação com os grupos ionizados e as cadeias laterais de aminoácidos (ORDÓÑEZ et al.2005a).

2.4.3.2 Propriedades de superfície

As emulsões e espumas alimentícias são sistemas de duas fases imiscíveis entre si e instáveis, necessitando de substâncias anfifílicas na interface para diminuir a tensão superficial e assim evitar a coalescência das gotas dispersas (ORDÓÑEZ et al., 2005a).

Caso o intuito seja uma matéria-prima com boa formação de espuma e emulsificante, a hidrólise precisa ser controlada e a enzima inativada no momento que as proteínas estejam parcialmente hidrolisadas, pois polipeptídeos pequenos são incapazes de formar película viscoelástica coesiva nas interfaces ar-água e óleo-água (DAMODARAN, 2010).

2.4.4 Características sensoriais

A textura na carne íntegra está relacionada com a quantidade de feixes de fibras envolvidas por tecido conjuntivo, e como respondem às rupturas das ligações intramoleculares e estabilização dessas cadeias estiradas mediante a criação de ligações intermoleculares ocorridas durante processamento (ORDÓÑEZ et al. 2005a). Nos produtos cárneos a reprodutibilidade da textura é um problema para avaliação, sendo categorizados em: pastas ou líquidos viscosos, particulados, sólidos homogêneos, sólidos não homogêneos e sólidos fibrosos, como músculo integral (GÁRCIA-SEKOVA, MORENO, MONZÓ, 2014).

Ordóñez et al. (2005b) contextualiza a percepção da dureza como a sensação tátil quando a carne entra em contato com as paredes da cavidade bucal e com a língua; resistência a pressão dental, facilidade de fragmentação, adesão entre as fibras e quantidade de resíduos ou restos de mastigação.

Outro fator intrínseco a qualidade de preparações proteicas, tornando-as aceitáveis de um ponto de vista nutricional e funcional, é a fixação de aromas. Ordóñez et al. (2005a), define como a interação dos compostos apolares voláteis (aldeídos, cetonas, alcoóis, fenóis) e o

interior hidrófobo da proteína, substituindo a interação proteína-proteína, desestabilizando a molécula ou modificando sua solubilidade. Por isso, alguns fatores como quantidade de água, temperatura, desnaturação e proteólise alteram o sabor, podendo este ser amargo ou adstringente, ou melhor, com efeito agradável ao paladar.

2.4.4.1 Peptídeos amargos

A parte indesejável da hidrólise está na liberação de peptídeos que possuem sabor amargo, muito relacionados a hidrofobicidade. Sendo que os polipeptídeos com hidrofobicidade residual média maior que 1,4 kcal/mol são os mais amargos. A ocorrência desses produtos está relacionado com a composição e sequência de aminoácidos e da enzima usada, sendo citadas como as mais hidrofóbicas aquelas originadas da caseína, proteínas de soja e do milho, pode ser evitado utilizando-se endo e exopeptidases, dessa forma resultará fragmentos com hidrofobicidade residual menor que 1,3 kcal/mol (DAMODARAN, 2010, ADLER-NISSEN, 1986).

2.4.5 Aplicações dos hidrolisados proteícos parciais

Na indústria de alimentos, as enzimas proteolíticas possuem um vasto campo de ação: nos queijos, as proteases das culturas *starters* contribuem para manutenção da proteólise de desenvolvimento de sabor durante a maturação; no processo de amaciamento da carne além do sistema de calpaínas endógeno, tanto na forma pulverizada adicionada no momento do preparo ou injetável sendo aplicada antes do abate; no processamento de bebidas minimiza o efeito de turvação por resfriamento causado pela complexação das proteínas com tanino; na panificação, as proteases modificam e otimizam a força da massa para um determinado produto, reduzindo o tempo de mistura a obter a viscoelasticidade adequada (PARKIN, 2010).

Muitos estudos vêm demonstrando que além de uma ferramenta industrial, a hidrólise proteica agrega valor aos produtos, tanto comercial quanto nutricional. De forma a tornar o material de descarte uma matéria-prima rica, base de uma indústria com processamentos limpos.

Além disso, a hidrólise enzimática controlada para a obtenção de produtos com diferentes graus de hidrólise tem recebido muita atenção por parte da área da saúde, já que oligopeptídeos de baixa massa molar

demonstram ser absorvidos pelo organismo humano tão ou mais eficientes que os aminoácidos livres (SGANBIERI, 1996).

A utilização dos hidrolisados parciais demonstrou uma boa eficiência metabólica em ensaios clínicos que compararam dietas com proteína intacta, hidrolisados parciais e totais, sendo mantida constante a composição de aminoácidos, foi percebido que indivíduos normais absorvem igualmente os três tipos de dieta, mas em indivíduos com problemas digestivos ou de absorção (pacientes com fístulas gastro-intestinais, doenças inflamatórias do intestino, síndrome do intestino curto, doenças de Chron, portadores de metabolismo como mucovicidose e fenilcetonúria ou ainda no pré e pós-operatório de cirurgias de cólon, reto, pescoço e cabeça) responderam com melhor resultado com a dieta de hidrolisados parciais, esse efeito pode ser explicado pela alta osmolaridade existente na dieta de aminoácidos livres, dificultando sua absorção; já as proteínas intactas são mal digeridas nesses indivíduos (SBANGIERI, 1996). Muitas iniciativas para utilizar subprodutos cárneos na alimentação para criança e pessoas com hipersensibilidade estão sendo realizadas, Bhaskar e coautores (2006) conseguiram polipeptídeos de tamanho entre 8 e 16 kDa de vísceras de ovelhas, através de tratamento com proteases fúngicas.

De acordo com Nasri e colaboradores (2012) a hidrólise parcial produz inúmeros polipeptídeos bioativos, que além de um excelente valor nutricional possuem atividades biológicas dependentes da sequência dos aminoácidos constituintes que inibem fatores-chave em alguns processos em cobaias, como melhora do funcionamento do sistema digestório; na defesa do organismo com ação antimicrobiana e imunomodulatória; no sistema cardiovascular agindo como antitrombóticos e antihipertensivo; e possui mesmo efeito que opióide no sistema nervoso, isto é, tem efeito sedativo e analgésico.

Muitos estudos recentes têm como objetivo comum avaliação da atividade antitrombótica de polipeptídeos de diversas origens. Nasri e seu grupo de pesquisa (2012) observaram, através de cromatografia em gel-permeação em Sephadex-G-25 somado com HPLC de fase reversa, a atividade anticoagulante de hidrolisados proteicos de músculo de goby (pescado) com a seguinte sequência específica de aminoácidos: LEU-CYS-ARG; HIS-CYS-PHE e CYS-LEU-CYS-ARG, tendo intenção de desenvolver alimento funcional para auxiliar dieta de cardiopatas.

Outro exemplo, os pesquisadores Jung e Kim (2009), isolaram polipeptídeo anticoagulante de mexilhão (*Mytilus edulis*) com peso médio de 2,5 kDa, que prolongou tempo de protrombina e atividade

parcial em tempo de tromboplastina, com interações específicas com fatores coagulantes IX, X e II.

Continuando com a ação no sistema cardiovascular, muitas pesquisas procuram polipeptídeos de origem natural com atividade inibitória de enzima conservadora da angiotensina (ECA), comparando-os com a classe de medicamentos de inibidores da ECA – captopril, enalapril, entre outros – utilizados para hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, normalmente essa atividade vem acompanhada com ação anti hiperlipidêmica, o que foi justamente encontrado em hidrolisados proteicos de uma espécie de água viva (*Rhopilema esculentum*) nos estudos de Liu e colaboradores (2012). Resultados similares na pesquisa de Bernardini e coautores com polipeptídeos provindos de proteínas sarcoplasmáticas hidrolisadas do músculo do peito bovino com papaína somados a atividade antioxidante. Essa mesma equipe, em 2010, isolou, purificou e caracterizou oligopeptídeos formados a partir de proteínas sarcoplasmáticas de fígado bovino com a enzima termolisina, com resposta positiva para ação antioxidante nas técnicas DPPH, FRAP e quelante de ferro.

Os ensaios para atividade antioxidante de proteínas purificadas de peito de frango hidrolisadas com papaína (SUN et al., 2012) seguiram para análises *in vivo*, onde se pode observar em ratos mais velhos com D-galactose induzida que receberam frações desses polipeptídeos apresentaram um aumento significativo das enzimas antioxidantes, com redução no nível de malonaldeído no soro e no fígado, como também foi visualizado em microscopia eletrônica de transmissão que inibiu o estresse oxidativo nos hepatócitos.

Shimizu e coautores (2009) obtiveram polipeptídeos de tamanho 2.5 kDa de carne suína tratada com papaína, com atividade antitrombótica comprovada em ratos com a dose diária de 210 mg/Kg.

Em relação a atividade antimicrobiana, Chen e copesquisadores (2013) desenvolveram estudo combinando a lactoferrina bovina ou seus hidrolisados com probióticos resistentes a lactoferrina contra agentes patogênicos, obtendo resposta positiva para o conjugado para *Escherichia coli*, *Salmonella Thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria-prima

✓ Fígados suínos coletados na etapa de evisceração de animais com abate programado no período de 143 a 150 dias de vida; doados pela empresa BRFoods, planta Herval D'Oeste/SC.

3.1.2 Enzimas

As enzimas-teste escolhidas para a hidrólise parcial foram a papaína (lote I-54687-0913) e bromelina (lote J-5521-0413), fabricante Prozyn e comercializadas por Viafarma.

As atividades dessas proteases foram aferidas, através de ensaios de hidrólise de substratos sintéticos, com a subtilisina alcalase AF 2.4L, produzida pela Novozymes e doada pela empresa Tovani Benzaquen, e a enzima analítica papaína P4762 Sigma Aldrich.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação das enzimas comerciais

3.2.1.1 Determinação da Atividade Proteolítica pela Reação de Folin-Lowry.

O princípio deste ensaio se baseia na clivagem de uma proteína intacta, no caso uma solução de caseína 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 aquecida em banho -maria a 80°C por 30 minutos. Os sistemas substrato-enzima (amostras: papaína Prozin 5×10^{-4} g/mL, bromelina Prozin 5×10^{-4} g/mL, papaína Sigma-Aldrich 5×10^{-5} g/mL e alcalase 5×10^{-5} mL/mL) foram submetidos em banho-maria a 30°C. Após tempo pré-determinado (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) interrompeu-se a reação com solução de tricloroacético 30% em banho de gelo por 10 minutos, cujos ânions derivados combinam-se com as proteínas não hidrolisadas formando um precipitado insolúvel, foram centrifugados a 7000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Os peptídeos solúveis em TCA 30% foram determinados por reação de Folin-Lowry, através das leituras de absorbância em 750 nm em placas de ELISA no aparelho TECAN (infinite), com curva padrão tirosina.

Sendo que unidade de atividade proteásica (UAP) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

3.2.1.2 Determinação de Atividade Enzimática sobre derivados de ρ -nitroanilida (ERLANGER et al, 1961).

Os ensaios com substratos sintéticos derivados de ρ -nitroanilida foram realizados adicionando 100 μ L dos substratos somados 100 μ L da solução de amostra enzimática diretamente em placas de 96 poços transparentes no aparelho TECAN (infinite) com auxílio do programa MAGELAN, com temperatura regulada a 30°C, e leituras de absorbância em 410 nm nos tempos pré-programados. Para a determinação da atividade enzimática foi construída uma curva de padronização com ρ -nitroanilina de 0 a 0,4 mM, diluídos em solução tampão fosfato 0,2M, pH 7,0.

Os substratos sintéticos derivados de ρ -nitroanilida foram: Cloridrato de N-Benzoil-DL-Arginina ρ -nitroanilida(Z-R- ρ NA) 8 mM dissolvidos em solução 1:1 água MilliQ e DMSO (dimetilsulfóxido); N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida (Z-SAAPF- ρ NA) e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida (Z-SAAPL- ρ NA), esses dois últimos substratos na concentração de 4 mM em DMSO.

3.2.2 Determinações físico-químicas da matéria-prima

3.2.2.1 Composição Química

O fígado suíno e seus hidrolisados parciais liofilizados obtiveram sua composição química determinada de acordo com a metodologia recomendada pela Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999(BRASIL,1999):

- ✓ Proteína: utilizando método de Kjeldahl;
- ✓ Lipídeos: método gravimétrico de extração a quente de lipídeos utilizando extrator de Soxhlet;
- ✓ Cinzas: método gravimétrico em mufla (550 - 600°C);
- ✓ Umidade: método gravimétrico em estufa (105°C).

Todas as determinações realizadas em triplicata.

3.2.2.2 Determinação de pH

A determinação do pH da matéria-prima, das soluções-tampão e dos hidrolisados foram realizadas utilizando-se um potenciômetro de bancada digital. Para a matéria-prima, a amostra refrigerada (5 a 10°C) foi homogeneizada com água destilada na proporção 1:1, em liquidificador.

3.2.3 Delineamento experimental

3.2.3.1 Análises preliminares

Com o intuito de obter melhores resultados em quantidade de experimentos suficientes em tempo delimitado, de acordo com Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010), o planejamento fatorial completo 2^3 , em triplicata, onde serão considerados três aspectos variáveis: temperatura, tempo de reação e concentração de enzima/substrato.

O pH e as temperaturas a serem empregadas contemplaram a faixa de melhor atividade das enzimas (HA et al., 2012), e como citado o pH permaneceu próximo ao da matéria-prima, desta forma manteve-se o pH em 7,0 com tampão McIlvane 0,1 M. Em relação a temperatura, por se tratar de alimento rico em vitamina A e de ferro, será mais elevada que ambiente com o propósito de viabilizar a ação catalítica, mas sem prejudicar a qualidade nutricional do produto final.

Os tempos de reação foram selecionados a partir da análise dos estudos de Ha e colaboradores (2012) e, Ketnawa, Chaiwut e Rawdkuen (2012), compreendendo o período que as enzimas mais atuam.

A concentração de enzimas está diretamente relacionada com a quantidade de proteína do substrato, essa foi extraída por solubilidade em solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 e solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 com NaCl 0,6 M (NUCKELS et al, 1990) e determinada pelo método de Lowry (1951), o qual se baseia numa mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Folin-Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador Cu^{+2} , produz composto em absorção máxima em 750 nm, os aminoácidos cromógenos são a tirosina e triptofano (POMORY, 2008).

Desta maneira, as enzimas papaína e bromelina da empresa Prozin foram testadas em triplicata, totalizando 81 hidrólises para cada, de acordo com as variáveis designadas no quadro 02. A influência dos fatores foram avaliados estatisticamente submetendo os resultados de

grau de hidrólise obtidos a análise de efeitos e verificação dos modelos empíricos através dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) utilizando o programa STATISTICA 7.0.

Quadro 02. Variáveis reais e codificadas do planejamento experimental para hidrólise enzimática de fígado suíno.

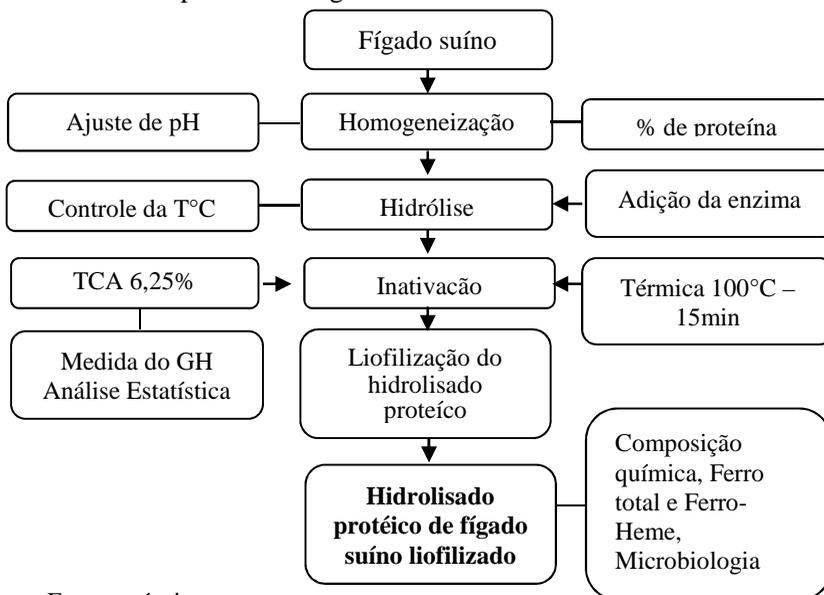
Variáveis Reais	Variáveis codificadas		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40±5	60±5	80±5
Tempo (minutos)	60	120	240
Relação enzima/substrato %	1	2	4

Fonte: próprio autor

3.2.3.2 Processo de obtenção do hidrolisado protéico

O processo de obtenção do hidrolisado protéico seguirá pelas etapas apresentadas na figura 02.

Figura 02. Fluxograma experimental da obtenção e caracterização do hidrolisado protéico de fígado suíno.



Fonte: próprio autor.

3.2.3.2.1 Preparo da amostra

O fígado suíno foi descongelado sob refrigeração (5-10°C) por 12 horas e pesado conforme a quantidade necessária para cada ensaio.

A amostra foi homogeneizada em liquidificador, averiguado pH e quando necessário adicionou-se solução tampão de McIlvaine 0,1 M (solução de Na_2HPO_4 0,2 M + solução de ácido cítrico 0,1 M) para o ajuste do pH 7,0.

3.2.3.2.2 Hidrólise enzimática

As enzimas foram adicionadas ao meio variando sua quantidade em relação à massa total de proteínas na amostra de fígado no volume total de suspensão. O volume do homogeneizado foi padronizado em 100 mL, numa proporção amostra: tampão McIlvane 0,1 M pH 7,0 de 1:4, para o estudo do grau de hidrólise, realizadas em erlenmeyers sobre placa aquecedora com agitação magnética, como demonstrado na figura 03.

Figura 03. Sistema com erlenmeyers em placa aquecedora com agitação magnética para obtenção de hidrolisados proteicos, a 60°C, 80°C e 40°C (sentido esquerda para direita)



Fonte: próprio autor.

Para a obtenção dos hidrolisados proteicos foram fixadas a relação enzima/[proteína]substrato de 2% em 250 g de fígado suíno liquidificado, condicionados em frasco tipo “shott” de 1 L, em *shaker* termostatzado a 60°C, a 200 rpm por 4 horas, conforme figura 04.

Figura 04. Sistema Frasco tipo “shott” de 1 L em *shaker* termostatzado a 60°C, a 200 rpm.



Fonte: próprio autor

3.2.3.2.3 Inativação enzimática

A inativação enzimática ocorreu por duas formas, com ácido tricloroacético (TCA 30%) para medida do grau de hidrólise e por via térmica (aquecimento a 100°C por 15 minutos) para a produção do hidrolisado protéico final.

3.2.3.2.4 Liofilização do hidrolisado protéico

Essa etapa foi realizada somente com os produtos da hidrólise parcial com os parâmetros fixados após análises preliminares. As amostras foram mantidas sob congelamento ($-10 \pm 2^\circ\text{C}$) por 12 horas e

postas em liofilizador de bancada da empresa JJ científica modelo LJJ02 por 24 horas (Figura 05).

Figura 05. Liofilizador de bancada JJ Científica, modelo LJJ02.



Fonte: próprio autor

3.2.3.2.5 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado segundo o método descrito por Pezoa e Mellado (1979). Transcorrido o tempo de hidrólise, alíquotas dos hidrolisados foram tomadas, inativando a reação com uma solução de TCA 6,25% e após filtração, o teor de proteínas solúveis no filtrado foi determinado pelo método de Folin-Lowry descrito por Plummer (1978) e expresso em mg de albumina (de acordo com a curva padrão: $Y=2,47.X$; X em mg albumina/mL). O grau de hidrólise (%GH) foi determinado como a porcentagem de proteínas solúveis em relação à quantidade de proteína inicial total, conforme Equação (1).

$$GH\% = (h/ht) \times 100 \quad (1)$$

3.2.3.2.6 *Análise Estatística*

Os dados obtidos de Grau de Hidrólise foram tratados no programa Statistic 7.0, com análise de variância e teste de Pareto.

3.2.3.3 Determinação de ferro total e ferro-heme

Foram determinados a quantidade de ferro total (AOAC 944.12) com os hidrolisados liofilizados e de ferro-heme pelo método de Hornsey (1956) modificado por Lombardi-Boccia e colaboradores (2002), com a amostra inicial e com os hidrolisados liofilizados. Dissolveu-se 1 grama de amostra em 5 mL de acetona acidificada, sendo homogeneizadas em vórtex por 1 minuto, permanecendo em tubo fechado e protegido da luz por 01 hora. As soluções resultantes seguiram para centrifugação a 400 g por 10 minutos, filtração em papel Whatmann nº1, medição do volume do filtrado e a leitura em absorbância 640 nm e comparadas com curva de hematina porcina (Sigma-Aldrich) de 0 a 50 µg/mL.

A concentração de ferro-heme (HFe) nas amostras foi calculada através de uma curva de calibração, 0 a 50 µg/mL e após relacionado a quantidade de ferro heme, como se segue:

$$\text{HFe } (\mu\text{g/g}) = \text{conteúdo de Hematina } (\mu\text{g/mL}) \times (\text{AW/MW})$$

Onde AW é igual a massa atômica do ferro e MW a massa molar da hematina. A relação entre o ferro presente na hematina é considerado como 0,0882µg HFe/ µg de hematina.

3.2.3.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas contemplaram as exigências requeridas para produtos cárneos pela RDC 12 (BRASIL, 2001), sendo elas: coliformes totais e termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, clostridium sulfito-redutor, mesófilos totais e Salmonella. Os estudos foram realizados em laboratório licenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para averiguação de segurança do processo, foi realizado hidrólise da amostra de fígado suíno com as enzimas-teste na concentração de 2% (enzima/proteína da amostra), em shaker na temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$, com inoculação de *Escherichia coli* na concentração de 10^7 , cepa reativada e diluída conforme escala de McFarland. Realizando as leituras das alíquotas iniciais, após o tempo de hidrólise (4 horas) e após inativação da enzima (100°C / 15 minutos)

utilizou-se o meio de cultura ágar padrão de contagem (PCA), sendo que cada reação e diluição foi feita em triplicata e incubadas a 35°C por 48 horas. As unidades formadoras de colônias foram contadas nas placas de mesma diluição que apresentaram entre 25 e 250 colônias. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS COMERCIAIS

As enzimas em foco para a produção do hidrolisado parcial de fígado suíno são as peptidases cisteínicas papaína e bromelina da empresa Prozin[®], que já são utilizadas pela indústria alimentícia como amaciante de carne, clareador de cervejas e aprimoradores de massa na área de panificação. A primeira abordagem foi compará-las com a papaína de pureza analítica da empresa Sigma Aldrich[®] P3375 do látex da papaia e com a subtilisina alcalase AF 2.4L, já presente na produção de alimentos infantis hipoalergênicos e *whey protein*.

4.1.1 Determinação da atividade proteolítica pela reação de Folin-Lowry.

Através da curva padrão de tirosina de 0 a 0,4 μ moles obteve-se o fator de conversão (F) de $7,26 \cdot 10^{-1}$ μ moles/Absorbância.

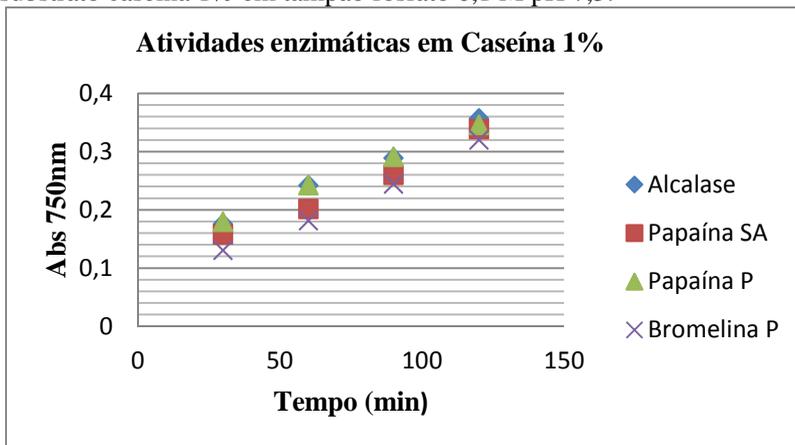
Com os tempos de ensaios estabelecidos de 30, 60, 90 e 120 minutos, as enzimas foram diluídas para suas leituras se encontrarem em valores abaixo de 0,5 para maior segurança e confiabilidade.

As diluições para esse ensaio de atividade enzimática sobre caseína 1% foram:

- Alcalase AF 2.4L : $0,5 \cdot 10^{-4}$ μ L/mL
- Papaína Sigma Aldrich (SA): $0,5 \cdot 10^{-2}$ g/10mL
- Papaína Prozin (P): $0,5 \cdot 10^{-1}$ g/10mL
- Bromelina Prozin (P): $0,5 \cdot 10^{-1}$ g/10mL.

Sendo observado na figura 06 respostas similares entre todas as enzimas, em questão de absorbância, mas para cálculo de Unidade de Atividade Proteolítica (UAP) as diluições são consideradas.

Figura 06. Gráfico Abs 750 nmXTempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato caseína 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5.



Fonte: próprio autor

Assim, com as equações de reta produzidas, temos os seguintes valores de UAP/g de enzima.

Quadro 03. Equações de reta, R^2 , UAP por quantidade de enzima no ensaio e UAP por mL ou grama de enzima, ensaio com caseína 1% como substrato.

Enzima	Equação de reta	R^2	UAP/qt de enzima ensaio	UAP/mL* UAP/g
Alcalase AF 2.4L	$y=0,002x + 0,118$	0,995	$1,45 \cdot 10^{-3}$	290,40
Papaína Sigma Aldrich	$y=0,002x + 0,089$	0,984	$1,45 \cdot 10^{-3}$	29,04
Papaína Prozin	$y=0,002x + 0,128$	0,997	$1,31 \cdot 10^{-3}$	2,60
Bromelina Prozin	$y=0,002x + 0,061$	0,996	$1,52 \cdot 10^{-3}$	3,05

UAP/mL, unidade para enzima alcalase AF 2.4L, para as outras enzimas a unidade utilizada é UAP/g.

Fonte: próprio autor

Observando a figura 06 e as equações de reta no quadro 03 vê-se a similaridade de ação de todas as enzimas sobre esse substrato não específico, mas comparando a concentração enzimática no ensaio e por consequência a UAP, constata-se que a alcalase, enzima microbiana possui ação expressivamente maior em relação as peptidases cisteínicas. Entre essas, o fato da enzima analítica possuir valor de UAP apenas 10 vezes maior que a enzima industrial, demonstra a melhoria do processo de produção desta última, da etapa inicial de extração até a purificação. E estudos relacionados a imobilização de papaína como os de Alpay e Uygun (2014) em nanopartículas magnéticas ou de Homaei (2015) em Sepharose 6B ativada com brometo de cianogênio, preveem maior estabilidade perante temperaturas severas, diferenças de pH, permitindo sua reutilização sem afetar o produto final com aumento de rentabilidade.

4.1.2 Determinação da atividade proteolítica sobre derivados de ρ -nitroanilida

Avaliações da atividade da papaína e bromelina com diferentes derivados de ρ -nitroanilida obtiveram resultados elucidativos em relação a especificidade de sítio de ação entre as enzimas diferenciando até por origem de extração.

Em 2004, Hale e colaboradores constataram que dependendo da parte do abacaxi a qual a bromelina foi extraída, sua resposta aos substratos de peptídeos específicos como Z-Arg-Arg-p-nitroanilina, (pNA) e Bz-Phe-Val-Arg-pNA foram diferenciadas. A bromelina extraída da fruta e a enzima ananaina clivaram o Bz-Phe-Val-Arg-pNA e não obtiveram mesmo resultado em Z-Arg-Arg-p-nitroanilina, e a bromelina extraída do caule apresentou comportamento oposto.

A pesquisa realizada por Theodorou Bieth e Papamichael (2006) utilizou substratos sintéticos derivados de ρ -nitroanilida para definição do modo catalítico da família das peptidases cisteínicas, através do método de inventário de prótons os valores dos parâmetros cinéticos nas hidrólises nos seguintes substratos específicos Cbz-FR-pNA, Suc-FLpNA, e Cbz-FL-pNA mostraram que a papaína possui maior atividade catalítica que a quimopapaína e a bromelina extraída do caule.

Num estudo para estimação do uso de papaína (látex e fruto maduro) e bromelina (caule) na estabilização de vinhos brancos, Esti e seu grupo de colaboradores (2013), observaram o comportamento de tais enzimas em dois sistemas um com tampão McIlvane pH 7,0 e outro Tartárico (simular o vinho) em pH 3,2 com 12% de etanol. Os resultados

demonstraram atividade insignificante nos substratos Ac-Arg-pNA (p-nitroaniline), Z-Arg-Arg-pNA, H-Val-Ala-pNA e Suc-Ala-Ala-Val-pNA, diferente em Bz-Phe-Val-Arg-pNA, quando a papaína provinda do látex mostrou maior atividade catalítica e maior estabilidade que a bromelina e a papaína do fruto maduro, em ambos os sistemas tamponados.

Por fim, em 2014, Semashko e colaboradores concluíram por meio de ensaios com uma gama de derivados de p-nitroanilida, representados pela combinação Glp-Xaa-Ala-Y, onde Y é a p-nitroanilida e Xaa é igual a resíduo de Phe (fenilalanina) ou Val (valina), e esses por sua hidrofobicidade apresentam maior especificidade para as peptidases cisteínicas, contrariando o que se pensava que resíduos aromáticos obteriam piores resultados que resíduos de aminoácidos alifáticos pequenos. Outra constatação foi que resíduos Ala na posição P1 são mais seletivos para família de cisteinases C1 do que aqueles com resíduo Arg nessa posição.

Devido a esses estudos realizarem um comparativo com os substratos sintéticos derivados de p-nitroanilida entre as enzimas, foi de grande importância conhecer o comportamento antes de colocá-las em contato com uma amostra tão complexa que é o fígado suíno.

Para a determinação da atividade das proteases em derivados de p-Nitroanilida, foi elaborada curva padrão de p-Nitroanilina de 0 até 0,15 mmoles, que resultou no fator de conversão (F) de $1,97 \cdot 10^{-1}$ μ moles/Absorbância.

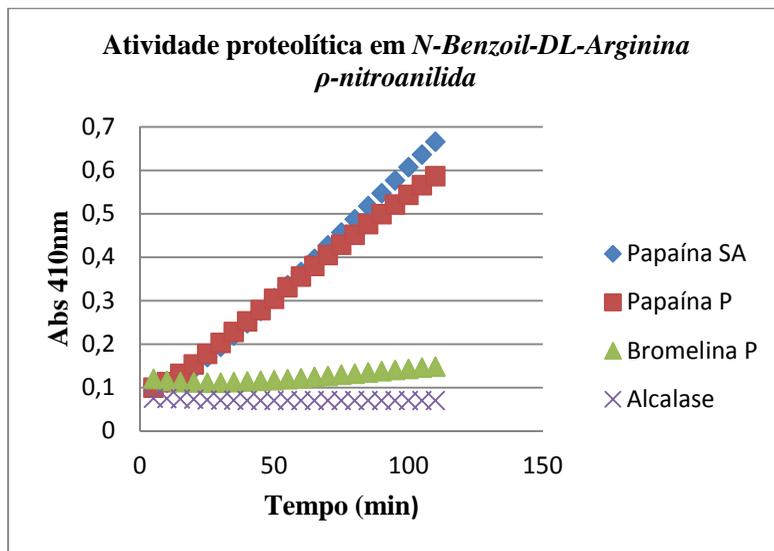
4.1.2.1 N-Benzoil-DL-Arginina p-nitroanilida(Z-R-pNA)

Para esse substrato as diluições utilizadas foram:

- Alcalase AF 2.4L : $0,5 \cdot 10^{-4}$ μ L/mL
- Papaína Sigma Aldrich (SA): $0,5 \cdot 10^{-3}$ g/10mL
- Papaína Prozin (P): $0,5 \cdot 10^{-2}$ g/10mL
- Bromelina Prozin (P): $0,5 \cdot 10^{-2}$ g/10mL.

Sendo realizadas leituras a cada 5 minutos no intervalo de duas horas, sendo observado que a subtilisina alcalase AF 2.4 L não atuou sobre esse substrato específico e a peptidase cisteínica bromelina obteve resultado praticamente nulo, não ocorrendo variação nas leituras. As peptidases cisteínicas papaína do laboratório Sigma Aldrich e a do Prozin obtiveram um aclave nas leituras, como é possível verificar na figura 07.

Figura 07. Gráfico Abs 410 nm x Tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato N-Benzoil-DL-Arginina ρ -nitroanilida.



Fonte: próprio autor

Assim, com as equações de reta produzidas, temos os seguintes valores de UAP/g de enzima, vistos no quadro 04.

Quadro 04. Equações de reta, R^2 , mmoles/min por quantidade de enzima no ensaio e mmoles/min por grama de enzima, ensaio com N-Benzoil-DL-Arginina ρ -nitroanilida como substrato.

Enzima	Equação de reta	R^2	mmoles/min/ qt de enzima ensaio	mmoles/ min/g
Papaína Sigma Aldrich	$y=0,005x + 0,051$	0,989	$1,06 \cdot 10^{-3}$	$2,12 \cdot 10^2$
Papaína Prozin	$y=0,005x + 0,071$	0,995	$9,26 \cdot 10^{-4}$	$1,85 \cdot 10^1$

Fonte: próprio autor

Diferente dos achados de Semashko et al (2014), ter resíduo aromático na posição P2 e resíduo de aminoácido Arginina na posição

P1 apresentou maior especificidade e seletividade para papaína e não apresentou significância para a alcalase e a peptidase bromelina.

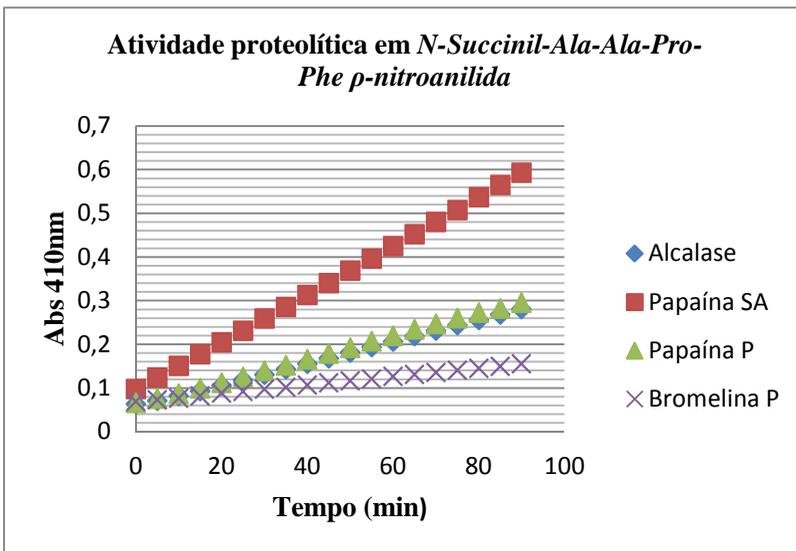
4.1.2.2 N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida(Z-SAAPF- ρ NA)

Nesse substrato a alcalase e papaína da Prozin responderam de forma similar, a bromelina permaneceu com variações de absorbância não relevantes, sendo observado na figura 08.

Concentrações das soluções estoques das enzimas, diluídas em solução tampão McIlvane 0,1M, pH7,0 :

- Alcalase AF 2.4L: $0,5 \cdot 10^{-7} \mu\text{L/mL}$
- Papaína Sigma Aldrich : $0,5 \cdot 10^{-2} \text{g/10mL}$
- Papaína Prozin : $0,015 \text{g/10mL}$
- Bromelina Prozin: $0,02 \text{g/10mL}$

Figura 08. Gráfico Abs 410 nm x tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida



Fonte: próprio autor

Assim, com as equações de reta produzidas, temos os seguintes valores de mmoles/min/g ou mmoles/min/mL de enzima observados no quadro 05.

Quadro 05. Equações de reta, R^2 , mmoles/min por quantidade de enzima no ensaio e mmoles/min por mL ou grama de enzima, ensaio com N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida.

Enzima	Equação de reta	R^2	mmoles/min/n/qt de enzima ensaio	mmoles/min/mL* mmoles/min/g
Alcalase AF 2.4L	$y=0,003x + 0,058$	0,999	$4,93 \cdot 10^{-4}$	$9,85 \cdot 10^3$
Papaína Sigma Aldrich	$y=0,006x + 0,095$	0,100	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$2,17 \cdot 10^1$
Papaína Prozin	$y=0,003x + 0,062$	0,999	$5,12 \cdot 10^{-4}$	3,40
Bromelina Prozin	$y=0,0001x + 0,068$	0,999	$1,97 \cdot 10^{-5}$	$9,85 \cdot 10^{-2}$

mmoles/min/mL, unidade para enzima alcalase AF 2.4L, para as outras enzimas a unidade utilizada é mmoles/min/g

Fonte: próprio autor

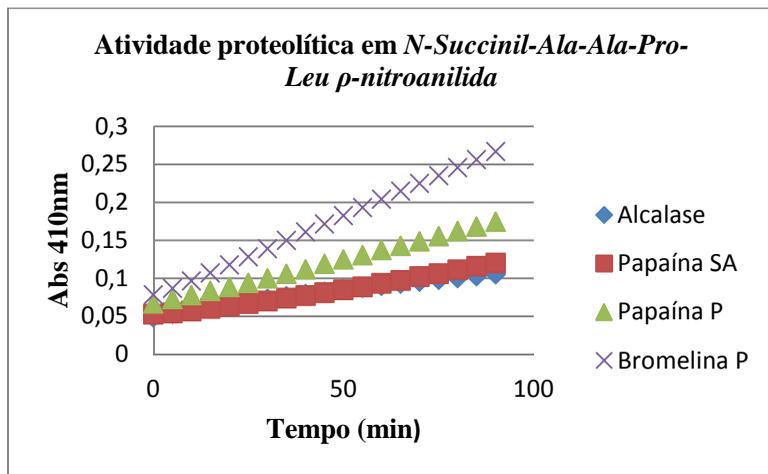
4.1.2.3 N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida(Z-SAAPL- ρ NA)

Para esse ensaio as leituras foram realizadas a cada 5 minutos no TECAN, no programa MAGELAN, com temperatura estabelecida a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, por 90 minutos. Nesse substrato a alcalase na figura 09 não demonstrou um grande aclave, mas por ter sido utilizado uma quantidade ínfima o valor de atividade foi o maior de todos, como observado no quadro 06. Já em relação as peptidases cisteínicas, as industriais marcaram ação similar a analítica, sendo que a bromelina obteve o melhor resultado entre elas.

Concentrações das soluções estoques das enzimas, diluídas em solução tampão McIlvane 0,1M, pH 7,0 :

- Alcalase AF 2.4L: $0,5 \cdot 10^{-7} \mu\text{L/mL}$
- Papaína Sigma Aldrich : $0,5 \cdot 10^{-2} \text{g/10mL}$
- Papaína Prozin : $0,015 \text{g/10mL}$
- Bromelina Prozin: $0,02 \text{g/10mL}$

Figura 09. Gráfico Abs 410 nm x tempo (min) das enzimas alcalase AF 2.4L, papaína Sigma Aldrich P3375, papaína e bromelina Prozin, com substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida.



Fonte: próprio autor

Assim, com as equações de reta produzidas, temos os seguintes valores de mmoles/min/g ou mmoles/min/mL de enzima.

Quadro 06. Equações de reta, R², mmoles/min por quantidade de enzima no ensaio e mmoles/min por mL ou grama de enzima, ensaio com N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida.

Enzima	Equação de reta	R ²	mmoles/ min/qt de enzima ensaio	mmoles/ min/mL* mmoles/ min/g
Alcalase AF 2.4L	$y = 0,0006x + 0,053$	0,990	$1,18 \cdot 10^{-4}$	$2,36 \cdot 10^3$
Papaína Sigma Aldrich	$y = 0,001x + 0,049$	0,993	$1,57 \cdot 10^{-4}$	1,58
Papaína Prozin	$y = 0,001x + 0,065$	0,999	$2,36 \cdot 10^{-4}$	1,58
Bromelina Prozin	$y = 0,002x + 0,076$	0,100	$4,14 \cdot 10^{-4}$	2,07

mmoles/min/mL, unidade para enzima alcalase AF 2.4L, para as outras enzimas a unidade utilizada é mmoles/min /g

Fonte: próprio autor

Através dos últimos dois ensaios foi possível observar a diferença de seletividade das enzimas bromelina e papaína, apenas com a modificação do resíduo de aminoácido da posição P1, sendo que a fenilalanina com seu anel aromático e hidrofobicidade apresentou valores melhores para as papaínas, e já com a leucina e sua estrutura alifática pequena melhorou ação da bromelina. Em ambos os casos a alcalase apresentou valores excelentes, mas como a papaína, sua ação catalítica foi melhor no ensaio com N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida.

4.2 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA MATÉRIA-PRIMA

4.2.1 Composição química

As avaliações realizadas em laboratório credenciado, foram sumarizados no quadro 07.

Quadro 07. Composição química da amostra de fígado suíno congelada.

Análise Físico-Química	Resultados	
	Amostra total	% em Base Seca
Proteínas	21,24±1,40g/100g	75,03
Lipídeos	3,32g/100g	11,73
Umidade e voláteis	71,69g/100g	
Resíduo Mineral Fixo	1,56g/100g	5,51

Fonte: próprio autor

O valor de proteína encontrado no quadro 07 ficou próximo do máximo da faixa de valores encontrados na literatura, já mencionado no item 2.2.2, o qual relaciona o conteúdo nutricional. Já a quantidade de lipídeos fica próxima ao valor mínimo da literatura, o que pode ser explicado pelas melhorias genéticas aplicadas na pecuária suína.

4.2.2 Determinação de pH

A determinação de pH nas amostras de fígado suíno descongeladas e diluídas com água deionizada, na proporção de 1:1, mostrou valores de $6,58 \pm 0,1$; o que está de acordo com GUERRERO-LEGARRETA (2011) e JAY(2005) entre o *in natura* de 6,99 e *post mortem* de 6,3. Conferindo também a não contaminação de bactérias lácticas já que seu pH não reduziu desta faixa de segurança.

4.2.3 Análise Microbiológica

As avaliações realizadas em laboratório credenciado foram sumarizados no quadro 08.

Quadro 08. Resultados da Microbiologia das Amostras de Fígado Suíno conservadas a $-8 \pm 1^\circ\text{C}$.

Análise microbiológica	Resultado
Contagem de Clostridium sulfito reductor	$<1,0 \times 10^1$ UFC/g
Contagem de Coliformes termotolerantes (a 45°C)	$<1,0 \times 10^1$ UFC/g
Contagem de Coliformes Totais	$<1,0 \times 10^1$ UFC/g
Contagem de estafilococos coagulase positiva	$<1,0 \times 10^2$ UFC/g
Contagem de mesófilos totais ($36 \pm 1^\circ\text{C}$)	$<1,0 \times 10^2$ UFC/g
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25g

Fonte: próprio autor

Como visto no quadro 08 as amostras apresentaram resultados satisfatórios em todos os itens requisitados pela RDC12 (ANVISA, 2011) para carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de bovinos, suínos e outros mamíferos (carcaças inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes); carnes moídas; miúdos de bovinos, suínos e outros mamíferos. Demonstrando criação, abate e conservação adequadas, viabilizando microbiologicamente a amostra para os ensaios.

4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

4.3.1 Análise do Delineamento Experimental

4.3.1.1 Proteína segundo método de extração por diferença de solubilidade em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e solução tampão fosfato 50 mM pH 7,4 com NaCl 0,6 M .

Para os ensaios de grau de hidrólise, foram realizadas extrações com solução tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e solução tampão fosfato 50 mM pH 7,4 com NaCl 0,6 M segundo metodologia de NUCKELS e colaboradores, os quais deram valores entre 14,84 a 16,37 g/100g de amostra. Valores abaixo dos encontrados pelo método Kjeldahl, informado no item 5.2.1, de $21,24 \pm 1,40$ g/ 100g, e os tabelados de 18,9-21,6g/100g de amostra. Lembrando que a limitação do método de Kjeldahl está em ele se basear no cálculo do nitrogênio orgânico total, o que não se limita aos relacionados com as proteínas, mas também aminoácidos livres, pequenos nucleotídeos, ácidos nucléicos, aminoaçúcares, porfirinas, algumas vitaminas, alcalóides, uréia e íons amônio.

4.3.1.2 Grau de hidrólise (GH) obtido com a enzima papaína Prozin®

Os valores de grau de hidrólise obtidos com a enzima papaína Prozin® utilizando o fígado suíno como substrato estão apresentados no quadro 09. O GH apresentou uma variação de 9,58 a 49,08%. Observando o menor valor quando a concentração de enzima, tempo e temperatura estavam no nível -1, e que os maiores valores se encontraram no ponto central da temperatura, no nível da relação enzima/substrato e de tempo em +1.

Quadro 09. Valores de grau de hidrólise (GH) utilizando fígado suíno como substrato nos ensaios de hidrólise com a enzima papaína Prozin®.

E	E/S %	T °C	T (min)	Resultados			Média	Desvio Padrão
1	-1	-1	-1	8,84	9,87	10,03	9,58	0,65
2	-1	-1	0	17,37	17,16	17,98	17,50	0,43
3	-1	-1	+1	28,15	21,66	23,74	24,52	3,31
4	-1	0	-1	20,54	19,90	20,30	20,25	0,32

5	-1	0	0	24,24	22,68	26,58	24,50	1,96
6	-1	0	+1	46,38	33,18	32,07	37,20	7,97
7	-1	+1	-1	23,39	24,22	24,77	24,13	0,69
8	-1	+1	0	30,62	31,86	29,34	30,61	1,26
9	-1	+1	+1	39,65	38,42	38,31	38,79	0,74
10	0	-1	-1	10,08	12,22	11,96	11,42	1,17
11	0	-1	0	19,34	19,83	18,83	19,33	0,50
12	0	-1	+1	28,46	25,81	27,13	27,13	1,33
13	0	0	-1	28,35	28,47	27,58	28,13	0,48
14	0	0	0	35,48	35,19	33,15	34,61	1,27
15	0	0	+1	53,41	49,60	40,96	47,99	6,38
16	0	+1	-1	26,85	27,17	28,71	27,58	0,99
17	0	+1	0	29,60	29,39	28,71	29,23	0,47
18	0	+1	+1	36,00	31,68	33,00	33,56	2,21
19	+1	-1	-1	13,84	14,26	15,77	14,62	1,02
20	+1	-1	0	17,04	17,08	18,41	17,51	0,78
21	+1	-1	+1	25,66	22,23	22,52	23,59	1,82
22	+1	0	-1	23,72	22,31	22,52	22,85	0,76
23	+1	0	0	39,91	36,21	37,18	37,77	1,92
24	+1	0	+1	56,97	45,08	45,19	49,08	6,83
25	+1	+1	-1	24,97	23,92	22,10	23,66	1,45
26	+1	+1	0	35,85	36,44	33,36	35,22	1,63
27	+1	+1	+1	46,98	40,34	40,95	42,76	3,67

Sendo E: Ensaio, E/S %: Relação enzima/substrato em porcentagem; T °C: temperatura, T (Min): tempo em minutos.

Fonte: próprio autor

Esses valores, registrados no quadro 09, de grau de hidrólise confirmam a melhor faixa de ação de temperatura da enzima que é de 60 a 80°C, sendo que o maior percentual de hidrólise foi encontrada a 60°C, e reduzido na temperatura mais elevada o que pode ser explicado pelo fato da variação da temperatura em $\pm 5^\circ\text{C}$ e que no nível +1, o valor tenha chego a 85°C desnaturando a enzima papaína, reduzindo sua atividade.

A análise estatística ANOVA feito pelo programa Statistic 7.0, levando em consideração as relações lineares e quadráticas de todas as variáveis, resultou na seguinte tabela de significância (Quadro 10).

Quadro 10. Teste de Significância ANOVA, com as relações lineares e quadráticas de todas as variáveis para enzima papaína Prozin[®]

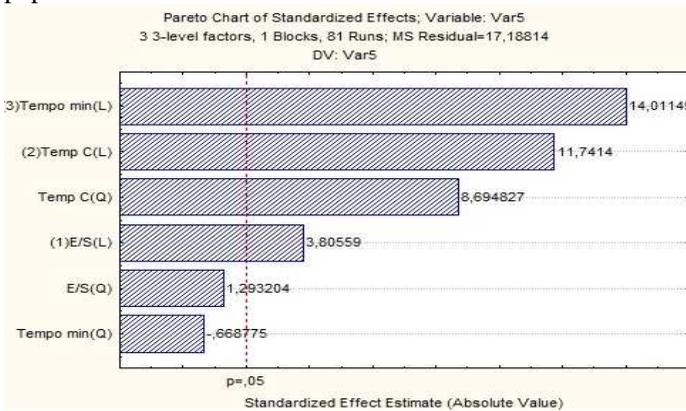
	Efeito	Erro padrão	t(74)	p	-95,% Limite	+95,% Limite
Signif /Interc.	34,00	1,219	27,90	0,00	31,6	36,43
E/S (L)	2,15	0,564	3,81	0,00	1,0	3,27
E/S (Q)	-1,26	0,977	-1,29	0,20	-3,2	0,68
T°C (L)	6,62	0,564	11,74	0,00	5,5	7,75
T°C (Q)	-8,50	0,977	-8,69	0,00	-10,4	-6,55
T min (L)	7,91	0,564	14,01	0,00	6,8	9,03
Tmin (Q)	0,65	0,977	0,67	0,51	-1,3	2,60

Sendo E: Ensaio, E/S %: Relação enzima/substrato em porcentagem; T °C: temperatura, T (Min): tempo em minutos.

Fonte: próprio autor

É possível verificar que os efeitos das relações quadráticas de temperatura e tempo foram menores que o F calculado (3,12), sendo evidenciado no diagrama de Pareto, Figura 10.

Figura 10. Diagrama de Pareto, análise das variáveis do ensaio com papaína Prozin®.



Fonte: próprio autor, a partir do programa Statistic 7.0

Desta forma, a análise foi refeita ignorando as relações quadráticas de temperatura e tempo. Resultando outro teste de significância com acréscimo de graus de liberdade.

Quadro 11. Teste de Significância ANOVA, somente com as variáveis significativas para enzima papaína Prozin®

	Efeito	Erro padrão	t(76)	p	-95,% Limite	+95,% Limite
Signif /Interc.	27,93	0,46	60,59	0,00	27,02	28,85
E/S (L)	4,29	1,13	3,80	0,00	2,04	6,54
T°C (L)	13,25	1,13	11,73	0,00	11,00	15,50
T°C (Q)	-8,50	0,98	8,69	0,00	6,55	10,44
Tmin (L)	15,81	1,13	14,00	0,00	13,56	18,06
	Coef.	Erro padrão	-95,% Limite	+95,% Limite		
Signif /Interc.	27,93	0,46	27,02	28,85		
E/S (L)	2,15	0,56	1,02	3,27		
T°C (L)	6,62	0,56	5,50	7,75		
T°C (Q)	-4,25	0,49	3,27	5,22		
Tmin (L)	7,91	0,56	6,78	9,03		

Sendo E: Ensaio, E/S %: Relação enzima/substrato em porcentagem; T °C: temperatura, T (Min): tempo em minutos.

Fonte: próprio autor

Com esses coeficientes de regressão descritos no quadro 11, é possível chegar ao seguinte modelo matemático para equação de determinação de grau de hidrólise:

$$GH = 27,93 + 2,15 (E/S) + 6,62 (T^{\circ}C) + 7,91 (T \text{ min}) - 4,25 (T^{\circ}C)^2$$

O que demonstra que todos os itens estudados, na sua relação linear, possuem significância para o resultado final da hidrólise, mas que os fatores tempo e temperatura são de suma importância para o alcance do objetivo em questão, que é a hidrólise parcial de 50% das proteínas. Assim, foi optado por questão econômica uma relação enzima/substrato do ponto central de 2%, a 60°C para a garantia de ter

uma temperatura ótima de atividade enzimática e maior interação do complexo enzima-substrato e no maior tempo de reação avaliado.

4.3.1.3 Grau de Hidrólise (GH) obtido com a enzima bromelina Prozin®

Os valores de grau de hidrólise obtidos com a enzima bromelina Prozin® utilizando o fígado suíno como substrato estão apresentados no quadro 12. O GH apresentou uma variação de 10,45 a 45,75%. Observando o menor valor quando a concentração de enzima, tempo e temperatura estavam no nível -1, e que os maiores valores foram encontrados em dois ensaios, um com relação enzima/substrato no ponto central com maiores tempo e temperatura, e na relação enzima substrato em 4%, mas com a menor temperatura.

Quadro 12. Valores de grau de hidrólise (GH) utilizando fígado suíno como substrato nos ensaios de hidrólise com a enzima bromelina Prozin®.

Ens	E/S %	T °C	T min	Resultados			Média	Desvio Padrão
1	-1	-1	-1	10,22	10,45	10,68	10,45	0,23
2	-1	-1	0	12,11	12,12	12,77	12,33	0,38
3	-1	-1	+1	20,77	17,79	19,03	19,20	1,50
4	-1	0	-1	19,48	20,59	20,74	20,27	0,69
5	-1	0	0	25,22	26,61	27,10	26,31	0,98
6	-1	0	+1	39,61	38,31	37,85	38,59	0,91
7	-1	+1	-1	13,71	13,56	15,08	14,12	0,84
8	-1	+1	0	19,37	19,12	20,05	19,51	0,48
9	-1	+1	+1	23,70	22,55	23,16	23,14	0,58
10	0	-1	-1	13,53	13,71	13,93	13,72	0,20
11	0	-1	0	15,19	15,15	15,91	15,42	0,43
12	0	-1	+1	23,65	20,76	22,21	22,21	1,45
13	0	0	-1	17,35	18,07	16,20	17,21	0,94
14	0	0	0	21,07	21,57	21,29	21,31	0,25
15	0	0	+1	27,03	26,96	25,18	26,39	1,05
16	0	+1	-1	16,33	17,55	16,90	16,93	0,61
17	0	+1	0	34,69	34,03	34,52	34,41	0,34
18	0	+1	+1	43,18	40,78	41,80	41,92	1,20
19	+1	-1	-1	25,88	28,85	27,30	27,34	1,49
20	+1	-1	0	38,18	39,66	37,68	38,51	1,03
21	+1	-1	+1	48,77	43,00	45,50	45,75	2,89

22	+1	0	-1	20,91	22,71	22,25	21,96	0,94
23	+1	0	0	25,59	24,52	26,00	25,37	0,76
24	+1	0	+1	34,03	31,10	32,05	32,39	1,49
25	+1	+1	-1	22,61	23,72	23,15	23,16	0,56
26	+1	+1	0	30,78	29,45	29,53	29,92	0,75
27	+1	+1	+1	34,74	39,95	34,83	36,51	2,98

Sendo E: Ensaio, E/S %: Relação enzima/substrato em porcentagem; T °C: temperatura, T (Min): tempo em minutos.

Fonte: próprio autor

Os ensaios com a enzima bromelina demonstram peculiaridades, apresentado pelo teste de significância - ANOVA feito pelo programa Statistic 7, mostrado no quadro 13.

Quadro 13. Teste de Significância ANOVA para enzima bromelina Prozin[®]

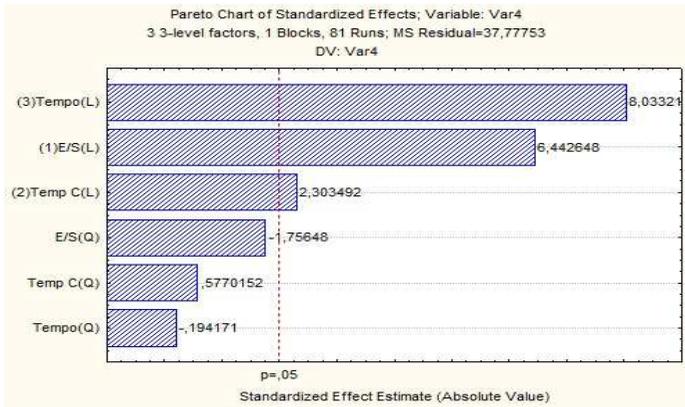
	Efeito	Erro Padrão	t(74)	p	-95,% Limite	+95,% Limite
Signif /Interc.	24,98	0,68	36,57	0,00	23,61	26,34
E/S(L)	10,78	1,67	6,44	0,00	7,44	14,11
E/S(Q)	-2,54	1,45	-1,76	0,08	-5,43	0,34
T°C(L)	3,85	1,67	2,30	0,02	0,52	7,19
T °C(Q)	0,84	1,45	0,58	0,57	-2,05	3,72
Tmin (L)	13,44	1,67	8,03	0,00	10,10	16,77
Tmin (Q)	-0,28	1,45	-0,19	0,85	-3,17	2,61

Sendo E: Ensaio, E/S %: Relação enzima/substrato em porcentagem; T °C: temperatura, T (Min): tempo em minutos.

Fonte: próprio autor

Nota-se que os efeitos das relações quadráticas de todas as variáveis foram menores que o F calculado (3,12), evidenciado a sequência de significância das variáveis no diagrama de Pareto, Figura 11.

Figura 11. Diagrama de Pareto, análise das variáveis do ensaio com bromelina Prozin®.



Fonte: próprio autor, a partir do programa Statistic 7.0

O Teste de Pareto evidencia o fato de que as temperaturas avaliadas nos ensaios não mostraram ser fator implicante para melhores hidrólises, mas sim a relação enzima/substrato e o tempo de reação. E retirando da análise as relações quadráticas não significativas, obteve-se novos valores de coeficientes de regressão com maior grau de liberdade, descritos no quadro 14.

Quadro 14. Teste de Significância ANOVA, somente com as variáveis significativas para enzima bromelina Prozin®

	Efeito	Erro Padrão	t(77)	p	-95,% Limite	+95,% Limite
Signif /Interc.	24,98	0,68	36,46	0,00	23,61	26,34
(1)E/S(L)	10,78	1,68	6,42	0,00	7,44	14,12
(2)T °C(L)	3,85	1,68	2,30	0,02	0,51	7,19
(3)T min(L)	13,44	1,68	8,01	0,00	10,10	16,78

	Coef.	Erro Padrão Coef.	-95,% Limite	+95,% Limite
Signif /Interc.	24,98	0,68	23,61	26,34
(1)E/S(L)	5,39	0,84	3,72	7,06
(2)T °C(L)	1,93	0,84	0,26	3,60
(3)T min (L)	6,72	0,84	5,05	8,39

Sendo E: Ensaio, E/S %: Relação enzima/substrato em porcentagem; T °C: temperatura, T (Min): tempo em minutos.

Fonte: próprio autor

Com esses coeficientes de regressão descritos no quadro 14, é possível chegar ao seguinte modelo matemático para equação de determinação de grau de hidrólise:

$$GH = 24,98 + 5,39 (E/S) + 1,93 (T^{\circ}C) + 13,44 (T \text{ min}).$$

Por isso, para a produção do hidrolisado em questão, foram escolhidos o ponto central da porcentagem de enzima e temperatura com o tempo prolongado, similar as escolhas feitas para a enzima papaína.

4.4 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS

4.4.1 Composição Química das amostras liofilizadas

As avaliações realizadas em laboratório credenciado foram sumarizadas no quadro 15.

Quadro 15. Valores de proteínas, lipídeos, umidade e voláteis, resíduo mineral fixo das amostras hidrolisadas e liofilizadas de fígado suíno.

Análise Físico-Química	Resultados de Liofilizados dos Hidrolisados com as seguintes enzimas:			
	Papaína		Bromelina	
	Amostra total	% em Base Seca	Amostra total	% em Base Seca
Proteínas	66,74g/100g	72,73	65,78 g/100g	72,22
Lipídeos	12,75g/100g	13,89	13,27 g/100g	14,57
Umidade e voláteis	8,24g/100g		8,94 g/100g	
Resíduo Mineral Fixo	5,98g/100g	6,52	5,33 g/100g	5,85

Fonte: próprio autor.

Comparando os valores antes e após processo de hidrólise e liofilização, quadros 07 e 15, verifica-se a significativa redução de umidade de mais de 70% para menos de 10%, tornando-os pó com maior estabilidade e maior segurança microbiológica. E nas comparações de percentuais em cálculos em base seca, é visto uma redução de proteínas de 2,30% na amostra tratada com papaína e de 2,81% na amostra hidrolisada com bromelina. No fator lipídico houveram aumentos similares em ambos hidrolisados, de 2,16% para a produzida com papaína e de 2,84% para a de bromelina, E a maior diferença das amostras está entre os aumentos de resíduo mineral fixo, sendo o maior registrado na de papaína (1,01%) do que a de bromelina (0,34%).

4.4.2 Determinação de ferro total e ferro-heme

Através da curva de calibração de Hematina Porcina de 0 a 50µg/mL, foi possível uma equação de reta $Y=0,0303x+0,0582$ com $R^2 = 0,9982$. Assim os valores de hematina encontrados nas amostras estão transcritos no quadro 16.

Quadro 16. Valores da concentração de hematina (µg/mL) em fígado suíno, hidrolisados e liofilizados de cada enzima.

Amostra	Abs640nm	µg de Hematina	Vol (mL)	[Hematina] µg/mL
Fígado descongelado	0,64±0,08	19,17	2,33	8,23
Hidrolisado com Papaína	0,57±0,04	16,92	3,30	5,13
Hidro + Liofilizado com Papaína	0,54±0,07	15,85	2,80	5,66
Hidrolisado com Bromelina	0,61±0,05	18,24	3,55	5,14
Hidro + Liofilizado com Bromelina	0,52±0,06	15,29	2,90	5,27

Fonte: próprio autor

Calculando o conteúdo de Ferro-Heme pela equação:

$$\text{HFe } (\mu\text{g/g}) = \text{conteúdo de Hematina } (\mu\text{g/mL}) \times (\text{AW/MW})$$

Onde AW é igual a massa atômica do ferro e MW a massa molecular da hematina. A relação entre o ferro presente na hematina é considerado como 0,0882µg HFe/ µg de hematina. Resultando os seguintes valores de ferro-heme (quadro 17).

Quadro 17. Valores de ferro-total e ferro-heme das amostras.

Amostra		Resultados das Análises	
		Ferro Total	Ferro-Heme
Fígado Suíno			0,73 µg/g
Papaína	Hidrolisado		0,45 µg/g
	Hidrolisado e Liofilizado	41,72mg/100g	0,50 µg/g
Bromelina	Hidrolisado		0,45 µg/g
	Hidrolisado e Liofilizado	42,56mg/100g	0,46 µg/g

Fonte: próprio autor

Comparando os valores entre ferro total e ferro-heme é visto que a parte biodisponível representa apenas 0,00001% do todo. E em relação somente ao ferro-heme e seus valores nas amostras levando em consideração o teor de umidade em cada uma delas, é perceptível que o processo de hidrólise reduz em torno de 40% a quantidade de ferro biodisponível, e a liofilização diminuiu mais os valores na faixa de 60%. Desta maneira, conclui-se que os procedimentos realizados na amostra, não apenas a hidrólise mas também a liofilização romperam a integridade da estrutura das proteínas quelantes de ferro.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO PROCESSO

Para avaliação de segurança do processo, o teste com inserção de um inóculo conhecido demonstrou que a eficiência na redução da carga microbiana se deve a inativação enzimática por calor a 100°C por 15 minutos, como observado no quadro 18.

Quadro 18. Valores de Unidade Formadoras de Colônia por 100g de amostra, no ensaio de segurança microbiológica do processo com inserção de inóculo conhecido.

Amostras em triplicata	Resultados em UFC/100g de amostra		
	Sem enzima	Papaína	Bromelina
Tempo zero: incubação	$1,60 \times 10^6$	$1,54 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$
Após Hidrólise de 4 horas	$0,61 \times 10^6$	$0,51 \times 10^6$	$1,82 \times 10^5$
Após inativação enzimática	$1,84 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$

O hidrolisado no momento final da reação, sem a etapa de inativação térmica, não possui qualidade microbiana, que é recuperada após os 15 minutos a 100°C. O que não isenta a necessidade de sanitização de todos os equipamentos utilizados na produção e garantia da procedência da amostra.

5 CONCLUSÃO

Os ensaios de atividade enzimática com substrato protéico como a caseína e com os sintéticos, derivados de ρ -nitroanilida demonstraram a particularidade de cada uma das enzimas estudadas. A hidrólise de caseína registrou maiores valores para a subtilisina microbiana alcalase AF 2.4L, seguida com um décimo do valor de UAP pela papaína analítica, e por fim as peptidases cisteínicas industriais papaína e bromelina com 1% do valor de UAP da primeira enzima. Esses resultados reforçam a acertividade da escolha das enzimas, já que o intuito era uma hidrólise parcial em condições brandas com paralização através de um aumento de temperatura em um breve espaço de tempo.

As reações com os substratos derivados de ρ -nitroanilida demonstraram que certas modificações na estrutura definem a singularidade de ação das enzimas proteolíticas, o primeiro ensaio com N-Benzoil-DL-Arginina ρ -nitroanilida mostrou ser específico para as papaínas tendo valor 10 vezes maior para a analítica. Já com os substratos N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe ρ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu ρ -nitroanilida, foi possível notar que a mudança do aminoácido fenilalanina por leucina na posição P1 aumentou a ação da bromelina, reduzindo a ação das papaínas, inalterando a ação da alcalase, com maior valor de atividade entre todas.

Nos ensaios com a amostra utilizando apenas as peptidases cisteínicas industriais, variando temperatura, tempo e relação enzima/substrato foram obtidos vários produtos com diferentes graus de hidrólise, e em ambas as enzimas mostraram que estar na faixa de temperatura ideal e o tempo de quatro horas é suficiente para a proteólise alcançar o grau de hidrólise desejado. As diferenças encontradas nesse ensaio entre as enzimas é que a bromelina possui maior ação que a papaína em faixa de temperaturas menores, atuando a 40°C com uma porcentagem maior de enzima similar a 80°C com nível médio de enzima.

A avaliação microbiológica da amostra inicial indica uma excelente condição sanitária tanto do início da criação do animal até a coleta do órgão na linha de abate, como também seu acondicionamento, validando-a nesse parâmetro para o processo. E em relação ao teste com inóculo conhecido em amostras que passaram pelas mesmas etapas, demonstrou que caso houvesse uma contaminação, a etapa de interrupção da hidrólise, isto é, aumento da temperatura a 100°C por 15

minutos, manteria os valores de unidades formadoras de colônia de *E. coli* dentro dos limites indicados pela RDC 12/2001.

Os hidrolisados parciais liofilizados produzidos, com ambas as enzimas, comparados com as amostras de fígado de suínos, resultaram em uma redução de aproximados 70% para menos de 10% de umidade e 2% de proteínas em base seca, tanto com a papaína como com a bromelina.

Ao final, obtiveram-se dois pós qualificados com alto teor protéico e seguro microbiologicamente, para futuros estudos e possível inclusão em formulações alimentícias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para maiores elucidações e garantias de qualidade e segurança sobre o hidrolisado encontrado faz necessário outros ensaios como:

- Avaliação toxicológica da amostra inicial e do produto final em relação as micotoxinas: ocratoxina, zearalenona e aflatoxinas;
- Análise de traços de Ractopamina, muitos estudos recentes (2015) estão desenvolvendo métodos para determinar essa droga em diferentes tecidos suínos e avaliando seus efeitos nas fibras musculares e proteomas sarcoplasmáticos destes animais.
- Doseamento das vitaminas A e do complexo B antes e após o processo, alguns estudos como de SZTERK et al. (2012), ESTEVE et al. (2001), ESCRIVA et al. (2001), entre outros, já demonstrou que extração com fluido super crítico e cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa obteriam dados significativos para a comparação das amostras.
- Aprimoramento da técnica de eletroforese em gel para a detecção dos hidrolisados parciais e averiguação dos tamanhos dos polipeptídeos resultantes.
- Aquisição de um sistema reator, com controle de temperatura e agitação, havendo a possibilidade de inserção fracionada da enzima, assim produzindo diferentes hidrolisados.
- Por fim, avaliação das propriedades funcionais e características sensoriais das amostras hidrolisadas e liofilizadas, conferindo atributos de matéria-prima com desenvolvimento de produto.

REFERÊNCIAS

AAS, K. The biochemistry of food allergens: what is essential for future research?. In: SCHMIDT, E; REINHARDT, D (Org.). **Food allergy**. Nova Iorque: Raven Press, 1988. p. 1.

ADLER-NISSEN, J. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: FEENEY, R E; WHITAKER, J R (Comp.). **Protein Tailoring for Food and Medical Uses**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1986. p. 97-122.

ALPAY, P; UYGUN, D A. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Aydin, Turquia, p. 56-63. 15 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714002926>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

ANDERSON, B. A. Composition and nutritional value of edible meat by-products. In: PEARSON, A M; DUTSON, T R (Comp.). **Edible meat by-products: Advances in meat research**. Londres: Elsevier Applied Science, 1988. p. 147-165

APPLE, J. K. et al. REVIEW: Meta-Analysis of the Ractopamine Response in Finishing Swine. **The Professional Animal Scientist**. Greenfield, Eua, p. 179-193. jun. 2007. Disponível em: <<http://pas.fass.org/content/23/3/179.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 jul. 2013.

BARBOSA, J et al. Food poisoning by clenbuterol in Portugal. **Food Additives And Contaminants**, Portugal, p. 563-566. jun. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02652030500135102>>. Acesso em: 07 mar. 2013.

BARROS NETO, B; SCARMINIO, I S; BRUNS, R E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BERRADA, H.; FONT, G. Antibiotics. In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Eds.) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, USA: Crc Press, 2011. p. 355 - 375. CD-ROM.

BRAGAGNOLO, N. Analysis of cholesterol in edible animal by-products In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Ed.). **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, 2011. p. 43-63. CD-ROM.

BRASIL. Resolução RDC N°12, de 12 de janeiro de 2001. Aprova o “**Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 20 mar. 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Suínos**, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>> Acesso em: 24 dez.2014.

BRASIL, Instrução Normativa n°20, de 21 de julho de 1999, **Métodos Analíticos Físico Químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus ingredientes- Sal e Salmoura.**, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, DOU, 09/09/1999. Brasília: MAPA, 1999.

BRÖMME, D; KALETA, J. Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implacations and recent advances in innhinator design. **Current Pharmaceutical Design**, Nova Iorque, p. 1639-1658. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12132996>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

CHANG, C Y; WU, K C; CHIANG, S H. Antioxidant properties and proteins composition of porcine haemoglobines hydrolysates. **Food Chemistry**, Taiwan, p. 1537-1546. jan. 2007.

CHEFTEL, J C; CUQ, J L; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1989. 346 p.

CUI, C et al. Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. **Innovative Food Science And Emerging Technologies**, China, p. 37-41. set. 2008. Disponível em: <[doi:10.1016/j.ifset.2008.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.09.003)>. Acesso em: 12 fev. 2013.

D'ACRE, R D; FLECHTMANN, C H W. **Introdução à Anatomia e Fisiologia Animal**. São Paulo, Sp: Nobel, 1980. 186 p.

DAINTY, R H; HIBBARD, C M. Precursors of the major end products of aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta*. **Journal Of Applied Microbiology**, p. 127-133. 1983. Disponível em: < DOI: 10.1111/j.1365-2672.1983.tb02656.x>. Acesso em: 06 mar. 2013

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. In: FENNEMA, O R; PARKIN, K L; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 5, p. 179-262.

De BRABANDER, H F et al. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal Of Chromatography A**, Bélgica, p. 7964-7976. nov. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.027>>. Acesso em: 07 mar. 2013

ECKERT, K et al. Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from mammary tumor patients. **Oncology reports**, Alemanha, p. 1191-1200. nov. 1999. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/or/6/6/1191>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

ERLANGER B.F. et al. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch Biochem Biophys** 95 p.271–278, 1961.

ESCRIVÁ, A. et al. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**. Valência, Espanha, p. 313-318. 20 dez. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301016181>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

ESTEVE, M.J. et al. Contents of vitamins B1,B2,B6 and B12 in pork and meat products. **Meat Science**. Valência, Espanha, p. 73-78. 12 nov. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174001002303>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

ESTÉVEZ, M. et al. Oxidation In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Eds.) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, 2011. p. 65-80. CD-ROM.

ESTI, M. et al. Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic-acidic buffer for wine application. **Food And Bioproducts Processing**. Viterbo, Itália, p. 595-598. 13 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308513000114>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

FELLOWS, P J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre, Rs: Artmed, 2006. 602 p.

FONKWE, A S; SINGH, R K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, Eua, p. 605-616. ago. 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(95\)00101-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(95)00101-8)>. Acesso em: 20 fev. 2013.

FORSYTHE, S J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2002. 424 p.

FORTE, G.; BOCCA, B. Environmental Contaminants: Heavy Metals. In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Eds.) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, USA: Crc Press, 2011. p. 403 - 440. CD-ROM.

FRANDSON, R D; WILKE, W L; FAILS, A D. **Anatomia e fisiologia de animais de fazenda**. 6. ed. Rio de Janeiro, Rj: Guanabara Koogan, 2005. 454 p.

FURTADO, M A M et al. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p. 625-639. jun. 2001. Disponível em: <http://www.cloud.editora.ufla.br/revistas/cienagro/pdf/25-3-2001_18.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2013.

GARCIA-SEKOVA, P.; MORENO, M. J. P.; MONZÓ, J. M.. Texture in Meat and Fish Products. In: CRUZ, R M S; KHMELINSKII, I., VIEIRA, M C (Ed.). **Methods in Food Analysis**: Crc Press Taylor & Francis Group, 2014. p. 76-104.

GILL, C O. Current and emerging approaches to assuring the hygienic condition of red meats. **Canadian Journal Of Animal Science**, p. 1-13. 1995. Disponível em: <<http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjas95-001>>. Acesso em: 06 mar. 2013.

GILL, C O; DELACY, K. Microbial spoilage of whole sheep livers. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 1962-1966. jun. 1982. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/43/6/1262.full.pdf+html?sid=176eaa34-c68e-40f8-b739-abf4bda47859>>. Acesso em: 06 mar. 2013.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N et al. Production of plants proteases in vivo and in vitro - A review. **Biotechnology Advances**, México, p. 983-996. ago. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

GREER, G G. Read meats, poultry and fish. In: MCKELLAR, R C (Comp.). **Enzymes of psychrotrophs in Raw Foods**. Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, 1989. 310p.

GUERRERO-LEGARRETA, I. Spoilage detection In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Eds.) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, USA: Crc Press, 2011. p. 207 - 218. CD-ROM.

GUERRERO-LEGARRETA, I; TAYLOR, A J. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. **Lwt - Food Science And Technology**, México, p. 201-209. jun. 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1994.1042>>. Acesso em: 06 mar. 2013.

HALE, L P et al. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**. Carolina do Norte, Eua, p. 783-793. 16 dez. 2004. Disponível em: <[doi:10.1016/j.intimp.2004.12.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2004.12.007)>. Acesso em: 20 fev. 2015

HIMONIDES, A.; TAYLOR, A.; MORRIS, A. Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Pilot Plant Scale Systems. **Food and Nutrition Sciences**, Vol. 2 No. 6, 2011, pp. 586-593. Disponível em: <doi: 10.4236/fns.2011.26082>. Acesso em: 13 fev.2013.

HOMAEI, A. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **International Journal Of Biological Macromolecules**. Bandar Abbas, Ira, p. 373-377. 04 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813015000665>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

HONIKEL, K.O. Composition and Calories In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Org.). **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, 2011. p. 105-121. CD-ROM.

HORNSEY, H.C. The colour of cooked cured pork. 1. Estimation of the nitric oxide-haem pigments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 7, p. 534-541, 1956.

IBGE. Censo Agropecuário: 2006 – dados preliminares. Rio de Janeiro, 2007.

IBGE. Sala de Imprensa: Pesquisas Trimestrais do Abate de Animais, do Leite, do Couro e da Produção de Ovos de Galinha, Comunicação Social, 20 mar 2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2107&id_pagina=1. Acesso em: 21 fev. 2013.

JAY, J M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. 711 p.

KOBLITZ, M G B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008. 234 p.

KRISTINSSON, H R; A RASCO, B. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, Florida, Usa, p. 43-81. jan. 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408690091189266>>. Acesso em: 02 mar. 2013.

LAHL, W J; BRAUN, S D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Vol.58, 1994, p. 68-71

Le BIZEC, B ; PINEL, G; ANTIGNAC, J P. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, Nantes, p. 8016-8034. 13 nov. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.007>>. Acesso em: 07 mar. 2013.

LECAILLE, F; KALETA, J; BRÖMME, D. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. **Chemical Reviews**, Nova Iorque, p. 4459-4488. nov. 2002. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr0101656>>. Acesso em: 03 mar. 2013

LEHNINGER, A L; NELSON, D L; COX, M M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo, Sp: Sarvier, 2006. 1202 p.

LOMBARDI-BOCCIA, G.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, B.; AGUZZI, A. Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 738-1741, 2002.

LOWRY, O H et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal Of Biological Chemistry**. Washington, Usa, p. 265-275. nov. 1951

MASANA, M.; RODRÍGUEZ, R. Ecología Microbiana. In: HUI, Y H.; GUERRERO-LEGARRETA, I; ROSMINI, M R. (Eds.) **Ciencia y Tecnología de Carnes**, Cidade do México: Noriega editores. 2006. cap. 10.

MAURER, H R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular And Molecular Life Sciences**, Berlim, p. 1234-1245. ago. 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/PL00000936>>. Acesso em: 03 mar. 2013

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos In: FENNEMA, O R; PARKIN, K L; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**.4°. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 4 p. 132 – 177.

MCKERROW, J H et al. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review Of Pathology: mechanisms of disease**, USA, p. 497-536. jan. 2006. Disponível em: <DOI: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100151>. Acesso em: 03 mar. 2013

MULLALLY, M M et al. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. **Journal Of Food Sciences**, p. 227-233. mar. 1995. Disponível em: <DOI: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb05643.x>. Acesso em: 04 mar. 2013.

MURRAY, R K et al. **Harper: Bioquímica**. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1994. 764 p

MYNOTT, T L et al. Bromelain prevents secretion caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins in rabbit ileum in vitro. **Cellular And Molecular Life Sciences**, Baltimore, p. 175-184. jul. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207276>>. Acesso em: 03 mar. 2013

NIELSEN, Pm; PETERSEN, D; DAMBMAN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal Of Food Sciences: Food chemistry and toxicology**, Dinamarca, p. 642-646. 2001. Disponível em: <<http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/Journal%20of%20food%20science/2001%20v.66/no.5/jfsv66n5p0642-0646ms19991109%5B1%5D.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2013

NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F Introduction, Offal meat: Definitions, regions, cultures. Generalities. In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Org.). **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, 2011. p. 3-11. CD-ROM.

ORDÓÑEZ, J A. et al. **Tecnología de alimentos: Vol 1 Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005a. 294 p.

ORDÓÑEZ, J A. et al. **Tecnología de alimentos: Vol 2 Alimentos de origem animal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005b. 279 p.

PARKIN, K.L. Enzimas. In: FENNEMA, O R; PARKIN, K L; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 6, p. 263-342.

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

PLUMMER, D. T. An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, 2a Edition. London, 1978.

REECE, W O. **Anatomia e fisiologia dos animais domésticos**. 3°. ed. São Paulo, SP: Roca, 2008. 468 p.

REIG, M; TOLDRÁ, F. Growth Promoters In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Org.). **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, Usa: Crc Press, 2011. p. 335-354. CD-ROM.

REIG, M; TOLDRÁ, F. Veterinary Drugs and Growth Promoters Residues in Meat and Processed Meats. In: TOLDRÁ, F (Org.). **Safety of meat and processed meat**. Nova Iorque: Springer, 2010. p. 365-390.

ROSSI, D M. **Utilização de Carne Mecanicamente Separada de Frango para a Produção de um Hidrolisado Protéico a partir de Enzimas Microbianas**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SAIGA, S; TANABE, S; NISHIMURA, T. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Japão, p. 3661-3667. out. 2003.

SCHMIDT, C G. **Hidrólise Enzimática de Carne de Frango**. 2008. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência Dos Alimentos, Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2008.

SCUSSEL, V M **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis, SC: Insular, 1998. 144p.

SEMASHKO, T A et al. Selective chromogenic and fluorogenic peptide substrates for the assay of cysteine peptidases in complex mixtures. **Analytical Biochemistry**. Moscou, Russia, p. 179-187. 03 jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.032>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

SGARBIERI, V C. **Proteínas em Alimentos Proteícos: Propriedades - Degradações - Modificações**. São Paulo, Sp: Varela, 1996. 517p.

SHELEF, L A. Microbial spoilage of fresh refrigerated beef liver. **Journal Of Applied Microbiology**, p. 273-280. dez. 1975. Disponível em: <DOI: 10.1111/j.1365-2672.1975.tb00572.>. Acesso em: 06 mar. 2013

SLIZYTE, R; RUSTAD, T; STORRO, I. Enzymatic hydrolysis of cod (Gadus morhua) by-products Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochemistry**, Noruega, p. 3680-3692. abr. 2005. Disponível em: <doi:10.1016/j.procbio.2005.04.007>. Acesso em: 20 jan. 2013.

SZTERK, A. et al. Application of the SPE reversed phase HPLC/MS technique to determine vitamin B-12 bio-active forms in beef. **Meat Science**. Warsaw, Polônia, p. 408-413. 18 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429804>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

TAVANO, O L. Protein Hydrolysis Using Proteases: An Important Tool for Food Biotechnology. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Uberaba, MG, *in press* jan. 2013. Disponível em: <doi:10.1016/j.molcatb.2013.01.011>. Acesso em: 12 fev. 2013.

THEODOROU, L G; BIETH, J G; PAPAMICHAEL, E M. The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family. **Bioresource Technology**. Ionnanina, Grécia, p. 1931-1939. 25 set. 2006. Disponível em: <doi:10.1016/j.biortech.2006.07.037>. Acesso em: 20 fev. 2007.

TOLDRÁ, F et al. Innovations in value-addition of edible meat by-products. **Meat Science**, Valencia, Espanha, Vol. 92 p. 290-296. abr. 2012. Disponível em: <doi:10.1016/j.meatsci.2012.04.004>. Acesso em: 21 fev. 2013.

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Environmental Contaminants: Pesticides In: NOLLET, L M L; TOLDRÁ, F (Eds.) **Handbook of analysis of edible animal by-products**. Boca Raton, Fl, USA: Crc Press, 2011. p. 377 - 402. CD-ROM.