

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Controle de microrganismos patogênicos em alimentos com uso de
hidrolisados proteicos de pescado**

Thamiris Pereira de Moraes

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

M827c Moraes, Thamíris Pereira de

Controle de microrganismos patogênicos em alimentos com uso de hidrolisados proteicos de pescado [recurso eletrônico] / Thamíris Pereira de Moraes ; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2023.
64 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Amido. 2. *Farfantepenaeus paulensis*. 3. *Micropogonias furnieri*. 4. Novozym. 5. Pepsina. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Título.

CDD 576.165

Thamíris Pereira de Moraes

**Controle de microrganismos patogênicos em alimentos com uso de
hidrolisados proteicos de pescado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2023

Thamíris Pereira de Moraes

**Controle de microrganismos patogênicos em alimentos com uso de
hidrolisados proteicos de pescado**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre/Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/03/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Daiane Elisa Wilsmann Szczepaniak
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Sandra Vieira de Moura
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

MORAES, Thamíris Pereira. **Controle de microrganismos patogênicos em alimentos com uso de hidrolisados proteicos de pescado.** 2023. 66f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A pesca é uma atividade realizada desde os primórdios da humanidade, representa uma fonte de renda para muitas famílias que vivem em regiões de rios, lagos e mares. As indústrias de pescados descartam enormes quantidades de resíduos, como aparas, pele, ossos, escamas e carapaças, o que gera poluição ambiental. Para evitar esse descarte em grande quantidade, existem alternativas de transformação dos resíduos em subprodutos, como a confecção de farinha de ossos, fertilizantes, óleo, silagem, ingredientes para ração dos próprios pescados. Além disso, também há a produção de hidrolisados proteicos usando como matriz proteica esses resíduos oriundos do processamento dos pescados pela indústria. Os pescados são alimentos suscetíveis à proliferação microbiana, principalmente devido às suas características intrínsecas, como alta atividade de água, grande biodisponibilidade de macro e micronutrientes, alto teor de gorduras insaturadas de fácil oxidação e pH próximo da neutralidade. Os objetivos do estudo foram obter isolados proteicos de filés e resíduos de processamento de *Micropogonias furnieri* (corvina) e *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa), testar diferentes enzimas e protocolos para síntese de hidrolisados proteicos feitos a partir dos isolados obtidos, avaliar a ação antimicrobiana dos compostos produzidos e testar essa ação em alimentos. *M. furnieri* eviscerados, escamas dessa mesma espécie e carapaça de *F. paulensis* foram utilizadas para produção de isolados proteicos a partir de filés, ossos desmineralizados e escamas de peixe e carapaça de camarão. As enzimas utilizadas como catalisadores das reações de hidrólise foram pepsina e novozym. Os hidrolisados proteicos foram testados quanto a ação bactericida frente a patógenos alimentares, *in vitro* e em alimentos experimentalmente contaminados. O hidrolisado de escama de *M. furnieri* quando obtido com pepsina a 10% 30' e o de carapaça de *F. paulensis* com o mesmo catalisador a 2% 30' apresentaram os melhores resultados, com ação antimicrobiana frente aos patógenos testados. Esses hidrolisados, quando utilizados na formulação de revestimentos de amido nos alimentos são alternativas promissoras para proteção frente a patógenos alimentares.

Palavras-chave: amido; *Farfantepenaeus paulensis*; *Micropogonias furnieri*; novozym; pepsina; revestimento.

Abstract

MORAES, Thamíris Pereira. **Control of pathogenic microorganisms in food using fish protein hydrolysates.** 2023. 66f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Fishing is an activity carried out since the dawn of humanity, it represents a source of income for many families living in regions of rivers, lakes, and seas. The fish industries discard huge amounts of waste, such as shavings, skin, bones, scales, and shells, which generates environmental pollution. To avoid this disposal in large quantities, there are alternatives for transforming waste into by-products, such as making a bone meal, fertilizers, oil, silage, and ingredients for fish feed. In addition, there is also the production of protein hydrolysates using these residues from the processing of fish by the industry as a protein matrix. Fish are foods susceptible to microbial proliferation, mainly due to their intrinsic characteristics, such as high water activity, high bioavailability of macro and micronutrients, high content of easily oxidized unsaturated fats, and pH close to neutrality. The objectives of the study were to obtain protein isolates from fillets and processing residues of *Micropogonias furnieri* (croaker) and *Farfantepenaeus paulensis* (pink shrimp), to test different enzymes and protocols for the synthesis of protein hydrolysates made from the obtained isolates, to evaluate the antimicrobial action of the compounds produced and test this action in food. Eviscerated *M. furnieri*, scales of the same species, and carapace of *F. paulensis* were used to produce protein isolates from fillets, demineralized bones, and fish scales and shrimp carapace. The enzymes used as catalysts for the hydrolysis reactions were pepsin and novozym. Protein hydrolysates were tested for bactericidal action against food pathogens, in vitro and in experimentally contaminated foods. The hydrolyzate of *M. furnieri* scale when obtained with 10% pepsin at 30' and that of *F. paulensis* carapace with the same catalyst at 2% at 30' showed the best results, with antimicrobial action against the tested pathogens. These hydrolysates, when used in the formulation of starch coatings in foods, are promising alternatives for protection against food pathogens.

Keywords: coating; *Farfantepenaeus paulensis*; *Micropogonias furnieri*; novozym; pepsin; starch.

Lista de Tabelas

Artigo 1

- Tabela 1 Concentração bactericida mínima dos hidrolisados de carne de *M. furnieri* obtidos com as enzimas pepsina e novozym em diferentes concentrações e tempos de reação de hidrólise frente a *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*..... 25
- Tabela 2 Concentração bactericida mínima dos hidrolisados de ossos de *M. furnieri* obtidos com as enzimas pepsina e novozym em diferentes concentrações e tempos de reação de hidrólise frente a *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*..... 26
- Tabela 3 Concentração bactericida mínima dos hidrolisados de escama de *M. furnieri* obtidos com as enzimas pepsina e novozym em diferentes concentrações e tempos de reação de hidrólise frente a *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*..... 27

Artigo 2

- Tabela 1 Concentração bactericida mínima dos hidrolisados de carapaça de *F. paulensis* obtidos com as enzimas pepsina e novozym em diferentes concentrações e tempos de reação de hidrólise frente a *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*..... 37

Artigo 3

Tabela 1	Contagens de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. aureus</i> e mesófilos em filés de <i>M. furnieri</i> experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido e sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de escamas de <i>M. furnieri</i> produzido com pepsina a 10% 30' (CH)	48
Tabela 2	Contagens de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. aureus</i> e mesófilos em <i>F. paulensis</i> sem cabeça e carapaça experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido e sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de escamas de <i>M. furnieri</i> produzido com pepsina a 2% 30' (CH).....	48
Tabela 3	Contagens de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. aureus</i> e mesófilos em filés de <i>M. furnieri</i> experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de escamas de <i>M. furnieri</i> produzido com pepsina a 10% 30' (CH) aos 0, 1 e 2 dias de estocagem.....	52
Tabela 4	Contagens de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. aureus</i> e mesófilos em <i>F. paulensis</i> sem cabeça e carapaça experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de carapaças de <i>F. paulensis</i> produzido com pepsina a 2% 30' (CH) aos dias 0, 1 e 2 de estocagem.....	53

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Revisão da Literatura.....	15
3 Artigos.....	21
3.1 Artigo 1.....	21
3.2 Artigo 2.....	33
3.3 Artigo 3.....	42
4 Considerações Finais.....	59
Referências.....	61

1 Introdução

A pesca é uma atividade realizada desde os primórdios da humanidade, representa uma fonte de renda para muitas famílias que vivem em regiões de rios, lagos e mares. De acordo com Brasil (2017), entende-se por pescado os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis, equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana.

Segundo a FAO (2020), a produção de pescados no mundo alcançou aproximadamente 179 milhões de toneladas em 2018. A produção pesqueira no Brasil vem crescendo continuamente. De acordo com dados relatados pela Engepesca (2021), a produção de pescados no Brasil no ano de 2020 atingiu quase 803 mil toneladas. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2020), a produção deste crustáceo em 2019 no país foi de 90 mil toneladas. Especificamente, no porto de Rio Grande – RS, foram desembarcadas 23.333 toneladas de pescados, incluindo peixes elasmobrânquios, crustáceos e cefalópodes, no ano de 2019 (FURG/SEMA, 2019).

Resíduo é todo material descartado nas cadeias de produção e consumo que, por limitações tecnológicas ou de mercado, não apresenta valor de uso ou de mercado e, se manejado e descartado de forma inadequada, pode resultar em impactos negativos ao ambiente (Nolasco, 2000). No Brasil, a Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010, institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, que determina a correta destinação desses resíduos, sendo a responsabilidade compartilhada pelos geradores deles, como os fabricantes, importadores, distribuidores, comerciantes e cidadãos (Brasil, 2010). A destinação final deve ser ambientalmente adequada, com segurança necessária a fim de minimizar os impactos ambientais adversos que venham a surgir de um descarte inadequado.

As indústrias de pescados descartam enormes quantidades de resíduos, como aparas, pele, ossos, escamas e carapaças, o que gera poluição ambiental (Venkatesan *et al.*, 2017). Para evitar este problema e diminuir a quantidade de resíduos deixados pela indústria, existem alternativas de transformação dos resíduos em subprodutos, como a confecção de farinha de ossos, fertilizantes, óleo, silagem, ingredientes para ração dos próprios pescados (Zamora-Sillero *et al.*, 2018).

Um método eficiente de aproveitamento alternativo dos resíduos ricos em proteínas da indústria de pescado é a hidrólise enzimática para obtenção de peptídeos bioativos. É um processo proteolítico enzimático em que as enzimas atuam como catalisadores biológicos, fazendo com que a hidrólise de proteínas seja acelerada, o que resulta na clivagem das ligações peptídicas com consequente produção de peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (Centenaro, 2011; Silva *et al.*, 2014). Os hidrolisados proteicos permitem a transformação do que antes era poluente em produtos de excelente qualidade. Denominado pela sigla FPH (*fish protein hydrolysate*), conforme designado pela FAO, os hidrolisados obtidos pela digestão de proteínas de pescados geram um produto final que contém entre 80 e 90% da proteína da matéria-seca (Amorim, 2014).

Os hidrolisados proteicos permitem a transformação do que era poluente ou resíduo de baixo valor agregado em produtos de excelente qualidade e com alto valor agregado ao produto final (Zavareze *et al.*, 2009). Também podem ter ação antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos que são veiculados por alimentos (Silva *et al.*, 2014).

Os pescados são alimentos suscetíveis à proliferação microbiana, principalmente devido às suas características intrínsecas, como alta atividade de água, grande biodisponibilidade de macro e micronutrientes, alto teor de gorduras insaturadas de fácil oxidação e pH próximo da neutralidade (Rocha *et al.*, 2013). Segundo Amaral *et al.* (2021), entre os anos de 2009 a 2019, ocorreram 7.674 surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil e, destes, os pescados foram responsáveis por 2,2%. A contaminação dos pescados com microrganismos patogênicos pode ocorrer já no seu ambiente natural de vida e permanecer após a captura, durante o transporte e processamento na indústria, podendo essa contaminação chegar até o ambiente de comercialização e carrear os microrganismos patogênicos para os objetos e utensílios dos locais de venda (Barreto *et al.*, 2012; Farias, 2006). Outro fator que pode influenciar na contaminação do produto final é a ação do homem na cadeia produtiva, já que manipuladores de alimentos possuem um papel importante na disseminação de patógenos (Reis *et al.*, 2017). Segundo Soares e Gonçalves (2012), a correta manipulação do pescado desde a captura até a comercialização é fundamental para garantir a qualidade microbiológica desse alimento.

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal da nasofaringe e pele de humanos. Portanto, as pessoas podem contaminar os alimentos quando os manipulam sem os devidos cuidados de higiene (Germano e Germano, 2015). Além disso, é uma espécie bacteriana conhecida por ser produtora de enterotoxinas, o que aumenta o risco quando o alimento é contaminado por ela (Germano e Germano, 2015). *S. aureus* é frequentemente isolado de peixes e crustáceos (Matuszewska *et al.*, 2022). A sua presença em pescados é bioindicadora de sanitização deficiente em uma ou mais etapas da cadeia produtiva. Os processos de produção de pescados, quando realizados de forma inadequada, com higiene precária, podem resultar em contaminação do produto final (Rocha *et al.*, 2013).

O gênero *Vibrio* contém 130 espécies conhecidas e 12 são consideradas patogênicas ao homem, entre essas estão as espécies naturalmente encontradas em ambiente marinho *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (Franco e Landgraf, 2008).

A ingestão de *V. parahaemolyticus* em alimentos provoca gastroenterite branda, mas também pode causar infecções extra intestinais, principalmente na pele ferida (Franco e Landgraf, 2008). Está frequentemente associado a camarões e caranguejos, mas também pode ser isolado de peixes. A maior parte dos surtos é causada pelo consumo de moluscos marinhos crus (ostras e mexilhões) e crustáceos malcozidos (camarões, caranguejos e lagostas) (Germano e Germano, 2015).

V. vulnificus é um dos patógenos humanos que apresenta maior poder de invasão e mortalidade. Pode entrar no organismo através do consumo de alimentos contaminados ou também através da pele com lesões e levar à morte indivíduos imunossuprimidos (Franco e Landgraf, 2008). Este microrganismo tem sido isolado de crustáceos e águas costeiras no mundo todo, mas não é isolado de águas marinhas com temperatura abaixo de 15°C (Germano e Germano, 2015).

Yersinia enterocolitica é uma bactéria classificada como psicrófila e cresce bem em temperaturas abaixo de 4°C, resiste ao congelamento e é capaz de sobreviver longos períodos em alimentos congelados (Mancini *et al.*, 2022). Existem relatos na literatura de isolamento deste microrganismo de pescados (Rocha *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2019). A ingestão de *Y. enterocolitica* pode causar enterocolite autolimitante, durando de 5 a 14 dias, porém existem relatos de persistência por vários meses. A bactéria, após ser ingerida se adere às células da mucosa do íleo e invade as células fagocitárias, multiplica-se extracelularmente, produzindo reação inflamatória local, conduzindo ao aparecimento de diarreia (Germano e Germano, 2015).

Salmonella é um dos microrganismos mais frequentemente envolvidos em casos e surtos de DTA em diversos países (Franco e Landgraf, 2008), incluindo o Brasil, onde ocupa o segundo lugar no ranking dos mais frequentemente envolvidos em surtos (Amaral *et al.*, 2021). É um microrganismo que pode ser isolado de pescados (Siqueira *et al.*, 2022; Gomes Junior *et al.*, 2022).

O amido é um polissacarídeo natural, composto por amilose e amilopectina, apresenta boa biodegradabilidade e baixo custo (Costa *et al.*, 2022), além de ser de fácil manipulação e rentabilidade (Adams, 2019), o que o torna uma alternativa potencial para o desenvolvimento de revestimentos para alimentos. Também é insípido, inodoro e transparente, não alterando o sabor, aroma e aparência do produto que é adicionado (Garcia *et al.*, 2010). Filmes bioativos permitem proteger os alimentos e prolongar a vida útil durante armazenamento e distribuição (Rocha *et al.*, 2018).

A adição de revestimentos de amido com hidrolisado proteico oriundo de pescados pode ser uma alternativa para proteção do alimento contra a contaminação por microrganismos indesejáveis que podem levar ao desenvolvimento de DTA. Entretanto, o efeito dos hidrolisados sobre os microrganismos alvo, sua eficácia quando utilizados em filmes de amido e as concentrações ideais devem ser determinados para que o uso desta alternativa possa ser adotado.

O estuário da Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul, é um local de intensa atividade pesqueira, albergando diversas espécies de peixes e crustáceos, entre os quais se destacam a corvina (*Micropogonias furnieri*) e o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), espécies largamente utilizadas para consumo humano (Rosa *et al.*, 2016). O processamento desses pescados gera vários resíduos, como escamas, ossos e parte da carne que sobra do fileteamento, no caso de *M. furnieri*, e de cabeças e carapaças, no caso de *F. paulensis*. A utilização desses resíduos para a produção de hidrolisados proteicos com atividade antimicrobiana frente aos principais microrganismos transmitidos por pescados beneficiaria a indústria, por agregar valor aos seus produtos, ao meio ambiente, pela redução de resíduos a serem descartados, e ao consumidor, pelo aumento na segurança dos alimentos consumidos.

2 Revisão da Literatura

Testes com hidrolisados proteicos têm sido realizados com resíduos de diferentes espécies de peixes e de camarão, além de cefalópodes (Venkatesan *et al.*, 2017; Mathew *et al.*, 2020). Os objetivos têm sido variados, incluindo ação antimicrobiana na segurança dos alimentos (Silva, 2014), ação antioxidante (Centenaro, 2011), controle de bactérias que causam doenças nos próprios pescados (Wald *et al.*, 2016), melhora da conversão alimentar dos pescados alimentados com hidrolisados proteicos (Wosniak, 2015) e também utilização como substitutos de medicamentos humanos (Zhang *et al.*, 2019). Todos visaram a agregar valor comercial aos subprodutos e diminuir a quantidade de descarte de resíduos.

O uso como antimicrobianos foi estudado por alguns autores, ainda com diferentes finalidades, como Rashidian *et al.* (2021), que testaram hidrolisados produzidos com carapaça de camarão (*Litopenaeus vannamei*) utilizando a enzima alcalase e observaram que o hidrolisado teve ação inibitória frente a *Streptococcus iniae* e *Yersinia ruckeri*, que são patógenos comuns de doenças nos pescados e nas pessoas que os manipulam. Wald *et al.* (2016) testaram hidrolisados proteicos produzidos com resíduos de *Oncorhynchus mykiss* utilizando pepsina a fim de avaliar a ação frente a patógenos de pescados, como *Flavobacterium psychrophilum* e *Renibacterium salmoninarum*, e obtiveram êxito em inibir os microrganismos testados.

Também existem estudos que visam à ação antimicrobiana frente a patógenos alimentares. Segundo Rocha *et al.* (2018), a preocupação inicial para que esses estudos fossem feitos foi baseada no estresse criado por utilizar antimicrobianos de forma indiscriminada na criação dos pescados, o que pode levar à resistência dos patógenos. Estes autores testaram hidrolisados proteicos feitos com filé de linguado (*Paralichthys orbignyanus*), utilizando as enzimas alcalase (13,3U/g) e protamex (14U/g), frente a microrganismos Gram-negativos e obtiveram êxito em inibi-los. Song *et al.* (2012) testaram hidrolisados de carne de anchova (*Septinna taty*) produzidos com a enzima pepsina (1.100U/g) frente a patógenos alimentares, como *Escherichia coli* e *S. aureus*, e obtiveram êxito na inibição desses microrganismos. Rocha *et al.* (2018) utilizaram carne mecanicamente separada (CMS) de corvina argentina (*Umbrina canosai*) para produzir hidrolisados usando as enzimas alcalase (30U/g) e

protamex (14U/g) como catalisadoras, testaram frente a diversos patógenos, incluindo bactérias e fungos, e a maioria dos que tiveram sua multiplicação inibida foram as bactérias Gram-positivas, dentre as quais *Y. enterocolitica*, e uma levedura (*Debaryomyces hanseii*).

Sila *et al.* (2014) apontaram a resistência de patógenos alimentares isolados de pescados a antimicrobianos usuais e para contornar essa resistência testaram hidrolisados feitos com carne de *Barbus callensis* e a enzima alcalase (0,25nmol/g), obtendo resultados satisfatórios contra *Bacillus cereus*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*. Estes autores afirmaram que, no contexto de segurança e proteção de alimentos por meio de produtos mais naturais, o uso de hidrolisados proteicos de subprodutos de pescados, com utilização de enzimas como catalisadores da reação, pode ser um meio interessante de proteção dos alimentos frente a patógenos alimentares, uma vez que a forma de ação desses hidrolisados não induz resistência do patógeno como àquela observada em reação a antimicrobianos usuais. De acordo com Offret *et al.* (2019), em comparação com os antimicrobianos comuns, os hidrolisados proteicos não desencadeiam os mesmos mecanismos de resistência e possuem um espectro estreito, forte atividade, estabilidade térmica, vários modos de ação, são atóxicos e geralmente reconhecidos como seguros.

Silva (2014) testou hidrolisados proteicos feitos com ossos desmineralizados de *M. furnieri* e as enzimas alcalase e protamex, ambas na concentração de 10 U/g de osso desmineralizado, frente a *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva. Ambos microrganismos foram inibidos quando testados frente aos hidrolisados feitos com ambas enzimas como catalisadores. Outros estudos, visando a diferentes ações para hidrolisados proteicos que tiveram a matriz proteica como ossos de peixes também foram feitos, como é o caso de Centenaro *et al.* (2011), que testaram hidrolisados proteicos feitos com ossos de *Umbrina canosai* e a enzima flavourzyme (1%) visando à ação antioxidante deste hidrolisado. Pérez *et al.* (2022) afirmaram que hidrolisados proteicos feitos com ossos de pescados e enzimas proteolíticas são excelentes formas de suplementação alimentar para humanos.

Assim como os ossos, as escamas dos pescados também são resíduos sólidos que são gerados a partir do beneficiamento dos peixes. Segundo Feltes *et al.* (2010), além da produção de farinha de peixe, ambos são utilizados na alimentação animal, na produção de fertilizantes ou produtos químicos, iscas e artesanatos. Zhang *et al.* (2019) afirmaram que gelatina é amplamente utilizada nos mais diversos tipos de

indústrias, como a biomédica, cosmética, alimentícia e utilizaram escamas de tilápia para produção de hidrolisados proteicos, com a finalidade de utilizá-lo como gelatina e recuperação de proteínas que seriam descartadas, sugerindo a sua utilização em processos relacionados a alimentos. Outros autores utilizaram escamas como matriz proteica para produzir hidrolisados visando ações medicamentosas para humanos, como Fahmi *et al.* (2004), que objetivaram verificar a ação do hidrolisado como similar a enzimas conversoras de angiotensina, assim como Huang *et al.* (2015), que testaram os hidrolisados como medicamentos para absorção de ferro no organismo humano e concluíram que os hidrolisados são boas formas de otimizar a suplementação de ferro.

Hidrolisados feitos com carapaça e cabeça de camarão como matriz proteica têm sido estudados por alguns autores, visando à comparação destes com aqueles feitos com matriz proteica de peixes e seus subprodutos, quanto às ações antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Olatunde *et al.*, 2020). Zhao *et al.* (2013) testaram a ação antimicrobiana de hidrolisados feitos com carapaça de *Euphausia superba* utilizando a enzima protamex e observaram que o hidrolisado apresentou ação frente a *S. aureus*. Estes autores atribuíram essa ação à ruptura da membrana externa da bactéria, com consequente aumento da permeabilidade da membrana celular e perda de substâncias intracelulares, o que culminou com a lise da bactéria. Beaulieu *et al.* (2013), que testaram hidrolisados de resíduos da carapaça de *Cancer irroratus* produzidos com a enzima protamex (0,1%), observaram eliminação de bactérias Gram-negativas, como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, e também de Gram-positivas, como *L. monocytogenes* e algumas espécies de *Staphylococcus*. Beaulieu *et al.* (2010) também produziram hidrolisado proteico com carapaça de *Chionoecetes opilio* usando a enzima protamex e observaram que o hidrolisado teve ação frente aos mesmos patógenos alimentares.

A enzima pepsina foi utilizada em diferentes concentrações como catalisador da reação de hidrólise por Wald *et al.* (2016), que produziram hidrolisados de carne de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e testaram a ação antibacteriana desse composto frente a patógenos da piscicultura, como *Flavobacterium psychrophilum* e *Renibacterium salmoninarum*. A ação antibacteriana frente a *F. psychrophilum* foi observada quando foram utilizados 2 mg/mL da enzima para produzir o hidrolisado. Já para *R. salmoninarum*, a concentração enzimática necessária foi de 5 mg/mL. Estes autores afirmaram que a atividade biológica dos hidrolisados produzidos é

dependente da matriz proteica utilizada e da enzima (catalisador), por isso a enzima pepsina foi escolhida, uma vez que apresenta boa especificidade para hidrólise de peptídeos. A atividade biológica também é significativamente influenciada pelas condições da reação de hidrólise, principalmente pelo tempo de reação. Santos (2011) afirmou que o aumento do tempo de reação resulta na diminuição do comprimento médio da cadeia peptídica na fração solúvel da proteína hidrolisada, pela quebra das ligações peptídicas, o que afeta as propriedades físico-químicas dos hidrolisados resultantes. Song *et al.* (2012) também utilizaram a enzima pepsina, na concentração de 1.000 U/g, como catalizador da reação de hidrólise, que teve como matriz proteica a carne de anchova (*Setipinna taty*) e testaram o hidrolisado frente a *E. coli*, que foi sensível à ação antimicrobiana do hidrolisado.

Wang *et al.* (2018) testaram hidrolisados proteicos produzidos com farinha de anchova e a enzima novozym frente a *E. coli* e *S. aureus*. O hidrolisado produzido apresentou ação bactericida frente aos patógenos testados, quando na concentração de 0,8 mg/mL. Segundo o laboratório produtor da enzima, os hidrolisados catalisados com essa enzima possuem uma ação antimicrobiana baseada na quebra dos açúcares presentes na parede celular das bactérias.

Os hidrolisados proteicos feitos com matriz proteica oriunda de subprodutos ou resíduos de pescados tem ampla utilização em alimentos, que pode ser para os próprios pescados, como mostrou o estudo de Wosniak (2015), que utilizou hidrolisados proteicos feitos com resíduos de sardinha e a enzima protamex como ingrediente para ração de outros pescados e então avaliou o desempenho desses animais com o hidrolisado como aditivo. Os hidrolisados também podem ser utilizados como ingredientes para alimentação humana, como é o caso do estudo feito por Costa *et al.* (2014), que fizeram sopa com hidrolisado proteico de resíduo ósseo de *M. furnieri* e alcalase. O trabalho foi pensado para melhor aproveitamento de resíduos de pescado que contém proteínas que são benéficas à saúde e são descartadas após o processamento. Os autores avaliaram a aceitação do público da sopa adicionada de hidrolisado proteico de pescado e concluíram que o gosto amargo do hidrolisado foi preponderante nas respostas, sendo necessários mais estudos para diminuir esse amargor e melhorar a aceitação do hidrolisado para consumo humano. Veit *et al.* (2012) testaram hidrolisados proteicos feitos com resíduos de *Oreochromis niloticus* e as enzimas protamex e brauzyn para confecção de empanados de pescado. O objetivo do estudo foi avaliar a composição nutricional desses alimentos, além da

realização de análise microbiológica e avaliação sensorial. Compararam os empanados sem hidrolisado com empanados com hidrolisado produzidos com protamex e com brauzyn. Todos tiveram uma composição nutricional semelhante, assim como os resultados microbiológicos, e a aceitação sensorial foi satisfatória, com 83,1% de aceitação, diferentemente do observado por Costa *et al.* (2014), possivelmente pelo alimento testado já ser a base de pescado. Os autores inferiram que é possível utilizar hidrolisado proteico de resíduo de pescado na formulação de empanados e este ser uma boa substituição da fonte proteica desse alimento.

A utilização de hidrolisados proteicos que tem como matriz proteica subprodutos ou resíduos de pescados é bastante ampla, visto que podem ser utilizados como fontes proteicas em alimentos, seja para os próprios animais, ou para os seres humanos, também como protetores para os alimentos, tendo função antioxidante e antimicrobiana. Entretanto, como a matriz proteica, as enzimas e os protocolos de produção são muitos e levam a resultados bastante diversos, é necessário que cada hidrolisado seja testado de forma independente e individual.

OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

Obter isolados proteicos de filés e resíduos do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*) e camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*);

Testar diferentes enzimas e protocolos para a síntese de hidrolisados proteicos a partir dos isolados proteicos obtidos;

Avaliar a ação antimicrobiana dos hidrolisados proteicos sintetizados;

Testar a ação antimicrobiana dos hidrolisados em alimentos.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES

Thamiris Pereira de Moraes
Débora Rodrigues Silveira
Juliana Fernandes Rosa
Cláudio Dias Timm

Submetido à revista Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE CORVINA
(*Micropogonias furnieri*) FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES**

**ANTIMICROBIAL ACTION OF PROTEIN HYDROLYZATE OBTAINED FROM CORVINE
(*Micropogonias furnieri*) ON FOOD PATHOGENS**

RESUMO

Subprodutos de peixe, como ossos, escamas e carne, são fontes ricas em proteínas que podem ser convertidas em peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas por meio de hidrólise enzimática. Este estudo teve como objetivo produzir hidrolisados a partir de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*) (carne, ossos e escamas) utilizando as enzimas pepsina e novozima, e avaliar sua atividade antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Staphylococcus aureus*). Os hidrolisados foram produzidos em diferentes concentrações enzimáticas (2%, 5%, 10%) e tempos de hidrólise (15 e 30 minutos). A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada para cada hidrolisado. Os resultados demonstraram que os hidrolisados de escamas apresentaram a maior atividade antimicrobiana, especialmente contra *S. aureus* (CBM = 0,39–0,78%). Os hidrolisados de ossos foram eficazes contra bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* Enteritidis (CBM = 0,39%), enquanto os hidrolisados de carne com 5% de pepsina mostraram forte atividade contra *V. parahaemolyticus*. Esses resultados destacam o potencial dos hidrolisados de subprodutos da corvina como agentes antimicrobianos naturais para aplicações em segurança alimentar.

Palavras-chave: Subprodutos de peixe, peptídeos bioativos, hidrólise enzimática, patógenos alimentares, conservantes naturais.

ABSTRACT

Fish byproducts, such as bones, scales, and meat, are rich sources of proteins that can be converted into bioactive peptides with antimicrobial properties through enzymatic hydrolysis. This study aimed to produce hydrolysates from corvina (*Micropogonias furnieri*) byproducts (meat, bones, and scales) using pepsin and novozym enzymes, and evaluate their antimicrobial activity against foodborne pathogens (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and *Staphylococcus aureus*). The hydrolysates were produced at different enzyme concentrations (2%, 5%, 10%) and hydrolysis times (15 and 30 minutes). The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined for each hydrolysate. Results showed that scale hydrolysates exhibited the highest antimicrobial activity, particularly against *S. aureus* (MBC = 0.39–0.78%). Bone hydrolysates were effective against Gram-negative bacteria, such as *Salmonella* Enteritidis (MBC = 0.39%). Meat hydrolysates with 5% pepsin showed strong activity against *V. parahaemolyticus*. These findings highlight the potential of corvina byproduct hydrolysates as natural antimicrobial agents for food safety applications.

Keywords: Fish byproducts, bioactive peptides, enzymatic hydrolysis, foodborne pathogens, natural preservatives.

ACÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES

ANTIMICROBIAL ACTION OF PROTEIN HYDROLYZATE OBTAINED FROM CORVINE (*Micropogonias furnieri*) ON FOOD PATHOGENS

INTRODUCTION

With a very long coastline of 8,400 kilometers and a favorable climate, Brazil is one of the largest fish producers in the world (Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura, 2014). Fishing has been carried out since the dawn of mankind and represents a source of income for many families living in regions with rivers, lakes and seas. Fishing production in Brazil has been growing steadily, with growth of 4.9% in 2019 (FURG/SEMA, 2019). In the same year, in the port of Rio Grande - RS, more than 23 tons of fish were landed, of which 97.6% comprised teleost fish and, of these, 15% were represented by the corvina (*Micropogonias furnieri*) (PEIXE BR, 2019), which is one of the most abundant species on the coast of Brazil and has a wide geographical distribution, occurring from the Antilles and Central America to Argentina (Vicentini and Araújo, 2002; Teixeira et al., 2009). From the processing of fish in the industry, around 50% of the total weight of the fish becomes waste, such as the head, skin, viscera, trimmings, fins, roe, bones and scales (Fallah et al. 2015; Martinez et al., 2015), and only 30% of this waste is used, mainly in the form of fish silage, animal feed, fertilizers or mechanically separated meat (Feltus et al., 2010; Villamil et al. 2017). They are also used as handicrafts by fishermen's families, as a way of increasing their income (Costa et al., 2016; Crepaldi et al., 2018).

Processing the by-products reduces production costs, but making fishmeal or oil doesn't add much value to the waste. An alternative that adds more value is the production of protein hydrolysates, which allow the transformation of what was polluting or low-value waste into excellent quality products with high added value to the final product (Zavareze et al., 2014; Abuine et al., 2019; Souza, 2019; Vázquez et al., 2020). Enzymatic hydrolysis is an enzymatic proteolytic process in which enzymes act as biological catalysts, accelerating the hydrolysis of proteins, resulting in the cleavage of peptide bonds with the production of peptides of different sizes and free amino acids (Centenaro, 2011; Silva et al., 2014). These peptides may have antimicrobial action (Silva et al., 2014).

According to Chou et al. (2016), this activity can be explained by the hydrophobic portion and the positive charge of the hydrolysates, which, by binding to the anionic surface of the microorganisms, induce the rupture of the bacterial membrane. In addition to being a method of utilizing and adding value to fish products, whether they are destined for disposal, such as by-products, or low-cost fish meat (Centenaro, 2011), protein hydrolysates also have the potential to be used directly in ready-to-eat foods in order to prevent their contamination by pathogenic microorganisms (Cortez-Vega et al., 2014).

Fish are foods that are susceptible to microbial proliferation, mainly due to their intrinsic characteristics, such as high water activity, high bioavailability of macro and micronutrients, high content of unsaturated fats that are easy to oxidize and pH close to neutral (Silva et al., 2019). According to Amaral et al. (2021), fish were related to 2.2% of foodborne disease (FBD) outbreaks reported in Brazil between 2009 and 2019.

Among the potential microorganisms that cause DTA, *Vibrio parahaemolyticus* stands out, responsible for causing enteritis, especially in people who consume raw or undercooked fish (CDC, 2019a). *Yersinia enterocolitica* also causes enteric infection in humans (CDC, 2019b), as well as *Salmonella*, which can cause severe diarrhea (CDC, 2022). *Staphylococcus aureus* is

commonly isolated from fish that has undergone extensive handling and is an indicator of poor hygiene at one or more stages of the production chain (Rocha et al., 2013). *Vibrio vulnificus* has great invasiveness and causes high mortality, and can enter the body via food or open wounds (Franco and Landgraf, 2008). When it comes to food safety, there is a constant search for natural products with fewer added chemical preservatives (Calo et al., 2015) and the use of protein hydrolysates could be a natural alternative to meet this demand.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial action of protein hydrolysates obtained from the meat, bones and scales of *M. furnieri* with specific enzymes (pepsin and novozym) against isolates of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *S. aureus*.

METHODOLOGY

Eviscerated *M. furnieri* and scales of the same species were obtained from the Central Market in Pelotas, RS, and immediately sent in isothermal boxes with reusable ice to the laboratory for processing. To separate the meat, the fish were filleted and the fillets were ground by hand until the pulp was obtained, which was washed with chlorinated water (5 ppm) 1:5 (w/v) and homogenized with MilliQ water 1:1. The meat protein isolate was obtained by homogenizing the pulp with distilled water (1:9) in an ultra-thermostatic water bath for 5 minutes at 2-3°C with stirring. The proteins were then solubilized by adding 1M NaOH (pH 11.2) for 20 minutes, the mixture was centrifuged (7,500 x g/15 minutes) and the supernatant separated and precipitated with 1M HCl (pH 5.2), also for 20 minutes. Centrifugation was then carried out again to remove the liquid residue (supernatant). The precipitate was then added to distilled water (1:1) (Silva et al., 2014).

The bones were manually separated from the meat and left in a 0.1M HCl solution for 24 hours at 4°C to remove any meat that was still attached. They were then kept at 35°C for 7 days to dry and then ground to undergo the demineralization process. The mixture was homogenized with 3% HCl (1:5) at 600 rpm/5 min at 4°C and the acid treatment was maintained for 24 hours. The mixture was then washed with distilled water at 35°C and centrifuged at 9,000 x g for 20 min. This process was carried out twice. The resulting sediment was then washed with distilled water at 35°C until pH 6.0 was reached. It was then filtered through a cotton filter, followed by drying at 35°C for 48 hours. The dried residue was then solubilized in distilled water 1:1 so that the bone protein isolate became liquid.

The scales were washed with sterile distilled water for 24 hours and then dried at 35°C for 7 days. They were then crushed and homogenized with sterile distilled water 1:1 to undergo the hydrolysis process.

Before starting the hydrolysis reaction, the endogenous enzymes of the meat, bone and scale protein isolates were inactivated by heating in a water bath at 85°C/15 minutes. The hydrolysis reaction took place in a double-walled glass reactor connected to a thermostatic bath. The enzymes pepsin (Sigma, Merck, Germany) and novozym (Sigma, Merck, Germany) were tested in three concentrations (2, 5 and 10%) and two hydrolysis times (15 and 30 minutes). The pH was adjusted to the optimum for each enzyme, for pepsin 2.0 and for novozym 8.0. To stop the hydrolysis reaction, the mixtures were heated to 95°C for 15 minutes. They were then kept at -18°C.

Four strains of *Y. enterocolitica* were used, one a reference strain (ATCC 9610) and three previously isolated by Rosa et al. (2019); two strains of *Salmonella*, one *S. Enteritidis* (ATCC 130786) and one *S. Enteritidis* (ATCC 130786). Enteritidis (ATCC 130786) and *S. Typhimurium* (ATCC 13311); three strains of *V. parahaemolyticus*, one reference (ATCC 17802) and two wild strains previously isolated by Rosa et al. (2016); two wild strains of *V. vulnificus* isolated by Rosa et al. (2016); and five strains of *S. aureus*, one reference (ATCC 259323) and four wild strains from the strain bank of the Animal Products Inspection Laboratory at the Federal University of Pelotas.

The antimicrobial activity of the protein hydrolysates was determined by checking the minimum bactericidal concentration (MBC). Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in 96-well microplates. In each well, 50 μ L of Brain Heart Infusion Broth (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) for *Y. enterocolitica*, *Salmonella* and *S. aureus* and Alkaline Peptone Water (APA, Himedia, Mumbai, India) for *Vibrio* were deposited. In the first well, 50 μ L of the hydrolysate to be tested was added. Serial dilutions were then made in consecutive wells, with 50 μ L being taken from the well with the highest concentration to the next. Eight dilutions were made and 50 μ L from the last well was discarded. Afterwards, 5 μ L of inoculum was added to each well, which consisted of a bacterial suspension at a concentration of 103cells/ μ L, previously determined by optical density and plate count. Wells without hydrolysate and without inoculum were the multiplication (positive) and sterility (negative) controls, respectively. Incubation was carried out for 48 hours at 37°C. The MIC was then determined by reading the optical density at 450nm. The MIC was considered to be the lowest concentration at which there was no bacterial multiplication. The CBM test was then carried out by seeding 10 μ L aliquots of the culture medium from the wells in which the tested microorganism was inhibited in Petri dishes with Plate Count Agar (PCA, Acumedia), plus 1% NaCl for the *Vibrio* tests, and incubating them at 37°C for 48 hours. CBM was considered to be the lowest concentration at which no colonies grew on the surface of the culture medium.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the CBM tests are shown in the tables below, with hydrolysates using meat as the protein matrix in Tab. 1, bone in Tab. 2 and scale in Tab. 3.

Table 1. Minimum bactericidal concentration of corvina meat hydrolysates obtained with the enzyme's pepsin and novozym at different concentrations and hydrolysis reaction times against *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *S. aureus*.

Isolated	Hydrolyzed											
	P2% 15'	P2% 30'	P5% 15'	P5% 30'	P10% 15'	P10% 30'	N2% 15'	N2% 30'	N5% 15'	N5% 30'	N10% 15'	N10% 30'
<i>Y. enterocolitica</i> V33	-	-	50	-	50	25	-	-	-	-	50	50
<i>Y. enterocolitica</i> V35	-	-	-	-	50	25	-	-	-	-	50	50
<i>Y. enterocolitica</i> E48	-	-	-	-	50	25	-	-	-	-	-	50
<i>Y. enterocolitica</i> E 49	-	-	-	-	50	25	-	-	-	-	50	50
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	50	50	50	50	-	-	50	50	25	-	50	50
<i>Salmonella</i> Typhimurium	50	-	-	-	50	50	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	50
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	-	-	0,39	3,12	-	-	-	50	6,25	0,39	1,56	-
<i>V. parahaemolyticus</i> 42	50	50	12,5	12,5	-	-	12,5	12,5	-	-	50	-
<i>V. parahaemolyticus</i> 58	-	-	12,5	50	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> 38	-	-	12,5	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 186.4	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 187.2	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 189.1	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 195	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,39	-	50	50	50	-	-	12,5	-	-	0,39	-

(-): there was no action of the hydrolysate on the microorganism tested

Table 2. Minimum bactericidal concentration of *M. furnieri* bone hydrolysates obtained with the enzyme's pepsin and novozym at different concentrations and hydrolysis reaction times against *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *S. aureus*.

Isolated	Hydrolyzed											
	P2%15'	P2%30'	P5%15'	P5%30'	P10%15'	P10%30'	N2%15'	N2%30'	N5%15'	N5%30'	N10%15'	N10%30'
<i>Y. enterocolitica</i> V33	-	25	-	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> V35	0,39	-	-	-	0,39	-	-	-	25	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> E48	-	-	-	-	0,39	-	-	-	-	1,56	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> E 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC9610	25	-	-	-	-	25	-	-	50	-	50	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-	-	1,56	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> 17802	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39
<i>V. parahaemolyticus</i> 42	50	50	-	-	-	50	-	-	0,39	-	50	50
<i>V. parahaemolyticus</i> 58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> 38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 186.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 187.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 189.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): there was no action of the hydrolysate on the microorganism tested

Table 3. Minimum bactericidal concentration of *M. furnieri* scale hydrolysates obtained with the enzyme's pepsin and novozym at different concentrations and hydrolysis reaction times against *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *S. aureus*.

Isolated	Hydrolyzed											
	P2% 15'	P2% 30'	P5% 15'	P5% 30'	P10% 15'	P10% 30'	N2% 15'	N2% 30'	N5% 15'	N5% 30'	N10% 15'	N10% 30'
<i>Y. enterocolitica</i> V33	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> V35	-	-	-	50	-	50	-	-	0,39	0,39	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> E48	50	-	50	0,39	-	-	-	-	50	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> E 49	-	-	-	-	-	50	-	-	50	0,39	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC9610	-	-	-	-	-	-	50	-	50	50	-	50
<i>S. Typhimurium</i>	25	50	25	0,39	25	-	-	-	25	-	-	1,56
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> 17802	50	50	-	-	0,39	-	-	25	-	-	-	1,56
<i>V. parahaemolyticus</i> 42	-	-	25	-	-	-	25	-	50	50	-	6,25
<i>V. parahaemolyticus</i> 58	-	-	-	-	-	-	25	-	50	50	-	-
<i>V. vulnificus</i> 37	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> 38	-	-	0,39	-	-	-	12,5	-	-	-	-	50
<i>S. aureus</i> 186.4	-	-	-	-	0,39	0,78	-	-	50	50	50	50
<i>S. aureus</i> 187.2	-	-	-	-	0,39	0,78	-	-	-	-	50	50
<i>S. aureus</i> 189.1	-	-	-	3,12	-	0,78	0,78	-	-	-	50	50
<i>S. aureus</i> 195	-	-	-	-	-	0,78	6,25	-	-	-	50	50
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	50	50

(-): there was no action of the hydrolysate on the microorganism tested

This is the first study to evaluate the antimicrobial action of protein hydrolysates obtained from the meat, bones and scales of *M. furnieri* made with the enzyme's pepsin and novozym. The concentration of hydrolysate needed to achieve antimicrobial action varied depending on the different enzymes used and the different protocols for obtaining the hydrolysates, which demonstrates the specific action of each type of hydrolysate. The enzyme-substrate ratio used in the different protocols, together with the intrinsic characteristics of each isolate, led to different responses, resulting in the need for different concentrations of hydrolysate to achieve antimicrobial action against foodborne pathogens. The biological activity of peptides released during hydrolysis, such as antimicrobial activity, depends on a number of factors, such as the ratio of enzyme to substrate and the hydrolysis reaction time (Wald et al., 2016). The enzyme-substrate ratio determines the ability to synthesize hydrophobic fragments in the hydrolysate (Sila et al., 2014). This hydrophobic portion is responsible for binding the hydrolysates to the target microorganism. The peptide then breaks through the bacterial membrane, causing cell lysis (Rocha et al., 2018; Hoyer et al., 2012).

Comparing the three protein sources used, the hydrolysates made from scales generally showed the best results, as can be seen in Tables 1, 2 and 3. Scale hydrolysates showed bactericidal action against all the bacterial isolates tested, at lower hydrolysate concentrations. For all the microorganisms tested, at least one of the hydrolysates was sufficient at the lowest concentration tested, 0.39%, to show bactericidal action. Also, the fact that this waste is the least used in the industry means that its use as a bactericidal compound is very beneficial, as in addition to reducing or eliminating its disposal, it adds value, transforming the waste into a marketable by-product.

Comparing the enzymes used in the study, it can be seen that hydrolysates made with pepsin showed better action against different pathogenic microorganisms, when compared to hydrolysates that had novozym as the catalyst for the reaction. This better action is possibly due to a better bond between the hydrolysate obtained with pepsin and the microorganisms tested, since lower concentrations of the hydrolysates made with this enzyme were needed, compared to the hydrolysates with novozym, in microorganisms that both showed bactericidal action. This is the case of the hydrolysates made with scale and tested against *S. aureus*. The hydrolysates using 10% pepsin required concentrations ranging from 0.39% to 0.78% to eliminate the microorganism, while the hydrolysates made with the enzyme novozym, also at 10%, required a concentration of 50% to show the same action.

Several scale hydrolysates had bactericidal action against *Salmonella* Typhimurium, but the one that stood out the most was the scale produced with 5% 30' pepsin, which showed efficacy at the lowest concentration used in the study (0.39%), followed by the one made with 10% 30' novozym, where the concentration needed to show bactericidal action was 1.56%. Other authors have also had success when testing protein hydrolysates made with by-products from fish processing and some specific enzymes, such as Tang et al. (2015), who used fish cooking water as a raw material for making protein hydrolysates, together with the 2% protamex enzyme as a catalyst for the reaction, and as in the current study, observed bactericidal action not only for *S. Typhimurium*, but also for *S. aureus*, which was also eliminated by some of the hydrolysates tested in our study.

Scale hydrolysates and 10% novozym showed antimicrobial activity against all *S. aureus* isolates at both times tested. Wang et al. (2018) also used the enzyme novozym to produce protein hydrolysates from fish by-products and the hydrolysate produced showed antimicrobial action against the same microorganism.

When looking at the results obtained against the *Yersinia enterocolitica* isolates tested, the reference strain was eliminated by most of the meat hydrolysates produced, but the same was not observed in relation to the wild ones. Possibly this bactericidal action was due to the fact that this isolate had been in stock for a long time and showed low resistance to the antimicrobial actions of the hydrolysates. The meat hydrolysate produced with 10% novozym at both times tested was very efficient at eliminating this group of microorganisms, whether it was the reference strain or the wild ones, which demonstrates the good action of meat hydrolysates with novozym against this pathogen.

In our study, the antimicrobial action against *Salmonella* was only effective with hydrolysates obtained using meat and 10% pepsin, for both serotypes tested, validating the claim that hydrolysates have specific actions on certain microorganisms. Thus, it is necessary to have the right combination of protein substrate and enzyme to achieve antimicrobial action against pathogenic microorganisms.

Silva et al. (2014) also tested the antimicrobial action of *M. furnieri* protein hydrolysates against *Salmonella*, but made with different enzymes to those tested in the current study, and observed action with the hydrolysate obtained with 2% flavourzyme. On the other hand, Santos (2011), when testing sardine meat hydrolysate produced with 3% neutrase, did not observe any antimicrobial action against the same microorganism.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 was eliminated when tested against low concentrations of the meat hydrolysates obtained with 2% pepsin for 15' and 10% novozym for 15', demonstrating that both hydrolysates at a concentration of 0.39% can eliminate the microorganism. Other concentrations of the meat hydrolysates were also effective in eliminating the microorganism, such as the hydrolysate with 2% novozym for 15' which required a concentration of 12.5%, while the meat hydrolysates with 5% pepsin at both times tested and 10% for 15' required a concentration of 50% to eliminate the same microorganism. The results show that this microorganism is sensitive even at low concentrations of corvina meat protein hydrolysate obtained with the enzymes tested.

When reference strains are used, as in the current study, it is already known which antimicrobials they are sensitive to. In the case of ATCC 25923 (*S. aureus*), the American Type Culture Collection (ATCC, 2023) stated that it is sensitive to ampicillin, kanamycin, cephalixin, cephaloridine, cephalothin, clarithromycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, novobiocin and tetracycline. Some of these antimicrobials act in a similar way to protein hydrolysate, causing disruption of the bacterial cell wall, as is the case with ampicillin, cephalixin, cephaloridine and cephalothin. Therefore, it is possible that the strain tested showed the sensitivity observed due to the mechanism of action being similar to that of the protein hydrolysate. The ATCC 17802 strain (*V. parahaemolyticus*) has also been described as being sensitive to some antimicrobials, such as oxolinic acid, ampicillin, ciprofloxacin, oxathetracycline and tetracycline (ATCC, 2023), and its sensitivity to hydrolysates is explained in the same way.

The three *Vibrio parahaemolyticus* strains tested were eliminated when faced with hydrolysates made with meat and 5% pepsin at both times tested. The wild strain called 42 needed the same concentration in both hydrolysates to undergo bactericidal action, while the other wild strain, called 58, also needed a concentration of 12.5% when faced with meat hydrolysate with 5% pepsin and 15', and the concentration needed to have bactericidal action was the highest observed, at 50%, when faced with hydrolysate made for 30'. In addition to each hydrolysate needing a specific and individual bond with each of the pathogens to achieve an effective antimicrobial action, the results indicate that the concentration of the hydrolysate is also variable depending on the target microorganism and a determining factor in microbial inhibition.

Regarding the results of the hydrolysates made from bones, it can be seen that those made from this protein matrix and novozym at 5% for 30' were efficient at low concentrations (0.39%) in eliminating *Salmonella* Enteritidis. Similar results were observed by Silva (2014), who evaluated the action of protein hydrolysates obtained from *M. furnieri* bones with two different enzymes, alkalase and flavourzyme, and both hydrolysates showed antimicrobial action against *S. Enteritidis*. Our results reinforce the possibility of using protein hydrolysates obtained from fish bones to control *S. Enteritidis*.

The hydrolysate of bone and novozym at 10% for 30' was effective, at a concentration of 0.39%, in eliminating the reference strain of *V. parahaemolyticus*, possibly because it is sensitive to antimicrobials that have the same mechanism of action, as already mentioned. The difference in sensitivity observed between the reference strain and the wild strains is possibly due to the fact that the wild strains are under greater pressure in the environment and are consequently more resistant, since only one of the wild strains tested was also sensitive to the hydrolysate in question, but required a much higher concentration of hydrolysate (50%).

Another point observed was that the bone hydrolysates, regardless of the enzyme used as a substrate, showed bactericidal action only against Gram-negative bacteria. Different results were obtained by Jemil et al. (2014), who tested hydrolysates produced from fish meat and proteolytic enzymes obtained from *Bacillus subtilis* A26, as a catalyst for the reaction, and stated that Gram-negative microorganisms show greater resistance to hydrolysates, mainly because of the greater resistance action that the presence of lipopolysaccharides in the cell wall confers. It is possible that the greater antimicrobial activity of the bone hydrolysates against Gram-negative microorganisms observed in our study is due to the type of protein matrix and the enzymes used, which led to a different final composition of the hydrolysates to that obtained by Jemil et al. (2014).

FINAL CONSIDERATIONS

Protein hydrolysates from *M. furnieri* by-products are promising alternatives as bactericidal agents against foodborne pathogens commonly isolated from fish. The bactericidal activity observed in the current study was highly dependent on different variables, such as the

hydrolysis reaction time, the protein matrix used and also the catalyst, enzyme, used to compose the reaction, and no single protocol was established to obtain a specific hydrolysate that has a bactericidal effect against all the bacteria used in the study.

Meat hydrolysates produced with 5% pepsin at both times tested are efficient in eliminating *V. parahaemolyticus*, which is also sensitive to scale hydrolysate with 10% novozym 30'.

Y. enterocolitica is eliminated when faced with bone hydrolysate obtained with 10% pepsin 15'. On the other hand, scale hydrolysate with the same enzyme has a bactericidal action against *S. aureus*, which is also sensitive to hydrolysates of the same protein matrix obtained with the 10% novozym enzyme.

The elimination of *Salmonella* Typhimurium is more effective when hydrolysates of scales obtained and the enzyme pepsin are used, especially if produced at an enzyme concentration/time of 5% 15', when satisfactory results can be observed even with a low concentration (0.39%) of hydrolysates. The hydrolysate of bone and novozym at 5% 30' was the one with the best bactericidal action against *Salmonella* Enteritidis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Funding Code 001.

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

ABUINE, R.; RATHNAYAKE, A.U.; BYUN, H.G. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fish. Aquat. Sci.*, v.22, n.1, p.1-14, 2019.

AMARAL, S.M.B.; ALMEIDA, A.P.F.; SILVA, F.S. et al. Overview of foodborne disease outbreaks in Brazil from 2009 to 2019. *RECIMA21*, v.2, n.11, e211935, 2021.

CALO, J.R.; CRANDALL, P.G.; CORLISS, A.O. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems: a review. *Food Control*, v.54, p.111-119, 2015.

CENTENARO, G.S. *Obtaining biopeptides with antioxidant activity from animal proteins*. 2011. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

CHOU, S.; SHAO, C.; WANG, J. et al. Short, multiple-stranded β -hairpin peptides have antimicrobial potency with high selectivity and salt resistance. *Acta Biomater.*, v.30, p.78-93, 2016.

CORTEZ-VEGA, W.R.; PIZATO, S.; SOUZA, J.T.A. et al. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improving the conservation properties of fresh-cut 'Formosa' papaya. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, v.22, p.197-202, 2014.

COSTA, W.M.; VIDAL, J.M.A.; VEIGA, M.C.M. et al. Making use of fish waste: handicrafts with fish scales. *Rev. Ciênc. Ext.*, v.12, n.2, p.8-17, 2016.

CREPALDI, A.L.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; GUEDES, C.S. et al. Degradation of fish scales by fungi of the genus *Paecilomyces*. *Magistra*, v.29, n.3/4, p.346-355, 2018.

FALLAH, M.; BAHRAM, S.; JAVADIAN, S.R. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. *Food Sci. Nutr.*, v.3, n.2, p.153-157, 2015.

FELTES, M.; CORREIA, J.F.; BEIRÃO, L.H. et al. Alternatives for adding value to fish industrialization waste. *Braz. J. Agric. Environ. Eng.*, v.14, n.6, p.669-677, 2010.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2018. 182p.

HOYER, B.; BERNHARDT, A.; HEINEMANN, S. et al. Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, v.13, n.4, p.1059-1066, 2012.

JEMIL, I.; JRIDI, M.; NASRI, R. et al. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochem.*, v.49, p.963-972, 2014.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: a review. *Food Res. Int.*, v.73, p.204-212, 2015.

ROCHA, F.A.G.; ARAÚJO, L.O.; ALVES, K.S. et al. Coagulase-positive staphylococci in tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*) sold at the Nerival Araújo model market, Currais Novos/RN. *Holos*, v.1, p.84-91, 2013.

ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; ROMANI, V.P. et al. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food Hydrocoll.*, v.81, p.351-363, 2018.

ROSA, J.V.; SILVA, C.S.J.; BARBOSA, F. et al. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolated from fish caught in the Patos Lagoon estuary. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v.37, p.1345-1354, 2016.

ROSA, J.V.; SOUZA, A.I.A.; TIMM, C.D. *Yersinia enterocolitica* in fish from the Lagoa dos Patos estuary, Brazil. *Zootec. Trop.*, v.37, p.7-13, 2019.

SANTOS, M.F.G. *Production of fish protein hydrolysates (HPP) from by-products of the Peniche fish industry-applications*. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Politécnico de Leiria, Peniche.

SILA, A.; HEDHILI, K.; PRZYBYLSKI, R. et al. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. *J. Funct. Foods*, v.11, p.322-329, 2014.

SILVA, A.S.; SOARES, L.S.; LIMA, D.V. et al. *Aeromonas* spp in fish and in continental waters. *Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim.*, v.13, n.1, p.15-47, 2019.

SILVA, C.M. *Antioxidant and antimicrobial activity presented by enzymatic hydrolysates obtained from corvina (Micropogonias furnieri) by-products*. 2014. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

SILVA, C.M.; FONSECA, R.A.S.; PRENTICE, C. Comparing the hydrolysis degree of industrialization byproducts of Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) using microbial enzymes. *Int. Food Res. J.*, v.21, n.5, p.1757-1763, 2014.

- SOUSA, V.F.D. *Preparation and characterization of tilapia protein hydrolysates*. 2019. 87f. Dissertação – Universidade de Lisboa, Lisboa.
- TANG, W.; ZHANG, H.; WANG, L. et al. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chem.*, v.168, p.115-123, 2015.
- TEIXEIRA, M.S.; BORGES, A.; FRANCO, R.M. et al. Quality index method (QIM): development of a sensory protocol for corvina (*Micropogonias furnieri*). *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.16, n.2, p.163-170, 2009.
- VÁZQUEZ, J.A.; FRAGUAS, J.; MIRÓN, J. et al. Valorization of fish discards assisted by enzymatic hydrolysis and microbial bioconversion: lab and pilot plant studies and preliminary sustainability evaluation. *J. Clean. Prod.*, v.246, p.119027, 2020.
- VICENTINI, R.N.; ARAÚJO, F.G. Morphometric characterization of the corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest) (*Pisces, Sciaenidae*) in Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Zool.*, v.19, n.1, p.163-170, 2002.
- VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J.F. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chem.*, v.224, p.160-171, 2017.
- WALD, M.; SCHWARZ, K.; REHBEIN, H. et al. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chem.*, v.205, p.221-228, 2016.
- WANG, L.; SUN, J.; DING, S. et al. Isolation and identification of novel antioxidant and antimicrobial oligopeptides from enzymatically hydrolyzed anchovy fish meal. *Process Biochem.*, v.74, p.148-155, 2018.
- ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; SALAS-MELLADO, M. et al. Functionality of goat protein hydrolysates (*Prionotus punctatus*) obtained from different microbial proteases. *Quím. Nova*, v.32, n.7, p.1739-1743, 2009.

3.2 Artigo 2

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE CARAPAÇA DE CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus paulensis*) FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES

Thamíris Pereira de Moraes
Débora Rodrigues Silveira
Juliana Fernandes Rosa
Cláudio Dias Timm

Será submetido à revista American Journal of Veterinary Research

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE CARAPAÇA DE CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus paulensis*) FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES

INTRODUÇÃO

Os estuários são ambientes de transição entre o continente e o oceano, possuem alta produtividade biológica, servindo como área de crescimento, alimentação e berçário de muitas espécies de peixes e crustáceos (Carvalho, 2020). O camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) é capturado predominantemente em águas frias, mais próximas à costa, na região sul do Brasil (Teodoro, 2018), porém sua área de captura se estende desde a Bahia, Brasil, até as águas costeiras de Buenos Aires, Argentina. Esta é a principal espécie de camarão encontrada no estuário da Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul, Brasil (Teodoro, 2018).

O processamento do camarão gera uma grande quantidade de resíduos, já que para a comercialização são retirados carapaça, cabeça e intestinos (Ghorbel-Bellaaj, *et al.*, 2018). Por causa da liberação de amins biogênicas, há formação de cheiro pútrido e contaminação ambiental dos locais em que há descarte dos resíduos do processamento do camarão de forma inadequada (Mathew *et al.*, 2020). Uma alternativa de aproveitamento para esses compostos, que são ricos em proteínas, é a produção de hidrolisados proteicos, que são pequenos peptídeos formados a partir da reação de clivagem em locais específicos das proteínas (Sila *et al.*, 2014). Esses peptídeos têm resíduos hidrofóbicos que são responsáveis pela formação de poros na membrana celular de microrganismos alvos, como bactérias patogênicas (Sila *et al.*, 2014). A utilização dos resíduos do processamento do camarão pela indústria é uma alternativa para reduzir custos, não degradar o meio ambiente e produzir compostos com valor agregado (Olatunde *et al.*, 2020).

O camarão é um alimento de fácil decomposição, portanto exige grandes cuidados de conservação. Além disso, está sujeito à contaminação pelos mais variados microrganismos patogênicos, seja no seu *habitat* natural ou durante a manipulação para comercialização (Germano e Germano, 2015). Existem relatos na literatura de isolamento de diversos microrganismos patogênicos de camarão. Rocha *et al.* (2018) isolaram *Yersinia enterocolitica*, cuja ingestão pode causar enterocolite (Germano e Germano, 2015). Bactérias do gênero *Vibrio*, que quando ingeridas

provocam gastroenterite (Franco e Landgraf, 2008), também já foram isoladas (Mok *et al.*, 2021). Barbosa (2013) isolou *Staphylococcus aureus* de camarões comercializados em feiras-livres em São Paulo, este microrganismo é capaz de produzir toxinas e causar intoxicações nos consumidores. Também surtos de toxinfecção alimentar causados por *Salmonella* veiculada por camarão têm sido relatados (Franco e Landgraf, 2008; CDC, 2021).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos obtidos a partir de carapaça de *F. paulensis* frente a isolados de *Y. enterocolitica*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *S. aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas carapaças de camarão-rosa (*F. paulensis*) no Mercado Central de Pelotas, RS, e imediatamente encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo reutilizável ao laboratório para processamento.

As carapaças foram lavadas com água destilada estéril por 24 horas e então passaram por secagem a 35°C por 7 dias. Após, foram trituradas e misturadas com água destilada estéril 1:1 para passar pelo processo de hidrólise.

Antes de iniciar a reação de hidrólise, as enzimas endógenas das carapaças foram inativadas por aquecimento a 85°C/15 minutos. A reação de hidrólise ocorreu em reator de vidro de parede dupla conectado a um banho termostatizado. Foram testadas as enzimas pepsina (Sigma, Merck, Alemanha) e novozym (Sigma, Merck, Alemanha) em três concentrações (2, 5 e 10%) e dois tempos de hidrólise (15 e 30 minutos). Foi ajustado o pH para o ideal de cada enzima, para pepsina 2,0 e para novozym 8,0.

Para interromper a reação de hidrólise, as misturas foram aquecidas a 95°C durante 15 minutos. Após, foram mantidas a -18°C.

Foram utilizadas quatro cepas de *Y. enterocolitica*, uma de referência (ATCC 9610) e três previamente isoladas por Rosa *et al.* (2019); duas de *Salmonella*, uma *S. Enteritidis* (ATCC 130786) e uma *S. Typhimurium* (ATCC 13311); três de *V. parahaemolyticus*, uma de referência (ATCC 17802) e duas selvagens previamente isoladas por Rosa *et al.* (2016); duas cepas selvagens de *V. vulnificus* isoladas por Rosa *et al.* (2016); e cinco de *S. aureus*, uma de referência (ATCC 259323) e quatro

selvagens do banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas.

A atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos foi determinada através da verificação da concentração bactericida mínima (CBM).

Inicialmente, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram depositados 50 µL de Caldo Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion*, BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) para *Y. enterocolitica*, *Salmonella* e *S. aureus* e de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) para *Vibrio*. No primeiro poço, foram adicionados 50 µL do hidrolisado a ser testado. Então, foram feitas diluições seriadas nos poços consecutivos, retirando-se 50 µL do poço de maior concentração para o seguinte. Foram feitas 8 diluições e 50 µL do último poço foram descartados. Após, foram adicionados 5 µL de inóculo em cada poço, que consistiram em uma suspensão bacteriana na concentração de 10^3 células/µL, previamente determinada pela densidade ótica e contagem em placas. Poços sem o hidrolisado e sem o inóculo configuraram os controles de multiplicação (positivo) e de esterilidade (negativo), respectivamente. Foi feita incubação por 48 horas a 37°C. Então, foi determinada a CIM através da leitura da densidade ótica de 450 nm. A CIM foi considerada como a menor concentração na qual não houve multiplicação bacteriana. Após, foi realizada a CBM através da semeadura em placas de Petri com Ágar Padrão para Contagem (*Plate Count Agar*, PCA, Acumedia), adicionado de 1% de NaCl para os testes com *Vibrio*, de alíquotas de 10 µL do meio de cultura dos poços em que o microrganismo testado foi inibido e incubação a 37°C por 48 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes de CBM são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração bactericida mínima dos hidrolisados de carapaça de *F. paulensis* obtidos com as enzimas pepsina e novozym em diferentes concentrações e tempos de reação de hidrólise frente a *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*.

Isolado	Hidrolisado									
	P2%15'	P2%30'	P5%15'	P5%30'	P10%15'	P10%30'	N2%15'	N2%30'	N5%15'	
<i>Y. enterocolitica</i> V33	-	-	-	-	50	-	-	-	50	
<i>Y. enterocolitica</i> V35	-	-	-	-	-	50	-	0,39	-	
<i>Y. enterocolitica</i> E48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. enterocolitica</i> E 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salmonella</i>										
<i>Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-	-	-	-	50	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>										
ATCC17802	50	12,5	-	50	50	50	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>										
42	25	50	50	50	50	0,78	-	-	3,13	
<i>V. parahaemolyticus</i>										
58	50	50	50	50	50	-	-	-	-	
<i>V. vulnificus</i> 37	-	50	-	50	-	-	-	-	-	
<i>V. vulnificus</i> 38	12,5	50	-	50	50	-	-	1,56	-	
<i>S. aureus</i> 186.4	-	50	-	-	50	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i> 187.2	-	50	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i> 189.1	-	50	0,78	-	-	-	50	3,13	-	
<i>S. aureus</i> 195	50	50	-	50	50	-	50	-	-	
<i>S. aureus</i>										
ATCC25923	50	50	-	-	-	-	-	-	-	

(-): não houve ação do hidrolisado sobre o microrganismo testado

Este é o primeiro estudo analisando a ação antimicrobiana de hidrolisados de carapaça de *F. paulensis* produzidos com as enzimas pepsina e novozym frente a patógenos alimentares. A ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos feitos com resíduos de camarão frente a bactérias patogênicas tem sido muito pouco estudada.

A sensibilidade de *S. aureus* a hidrolisados produzidos a partir de resíduos de camarão foi reportada por Djellouli *et al.* (2019), porém estes autores utilizaram enzimas obtidas de *Enterococcus faecalis* adicionadas de glucosamina, e também por Zhao *et al.* (2013), que utilizaram a enzima protamex na produção do hidrolisado. Rashidian *et al.* (2021) produziram hidrolisados de resíduos de camarão com a enzima alcalase, os quais apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Yersinia ruckeri* e *Streptococcus siniae*, patógenos que causam doenças nos próprios camarões e nas

peças que os manipulam. No nosso estudo, mostramos que hidrolisados feitos com resíduos de camarão produzidos com as enzimas proteolíticas pepsina e novozym têm ação bactericida frente a patógenos alimentares.

No presente estudo, a concentração necessária dos hidrolisados para que apresentassem ação antimicrobiana foi de 50%. Mesmo se tratando de uma concentração alta de hidrolisado, não inviabiliza o estudo, já que a matriz proteica utilizada é um resíduo do processamento normalmente descartado, sem uso ou agregação de valor, e muitas vezes de forma inadequada. A utilização da carapaça de camarão como matriz para a fabricação de um composto que apresenta ação antimicrobiana é uma alternativa preferível ao descarte.

Os resultados relativamente variáveis indicam que particularidades do processamento (tipo e concentração da enzima, tempo de hidrólise) promovem algumas características nos hidrolisados que podem determinar a sua capacidade bactericida. Entretanto, alguns hidrolisados foram efetivos contra todas as cepas de uma determinada espécie bacteriana ou mesmo espécies do mesmo gênero, como é o caso do hidrolisado produzido com pepsina a 2% 30', que apresentou ação bactericida frente aos isolados de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*, e do hidrolisado produzido com pepsina a 5% 30', que teve ação bactericida frente a todos os isolados de *Vibrio*. Segundo Sila *et al.* (2014) e Rocha *et al.* (2018), a atividade antimicrobiana dos hidrolisados é explicada pela porção hidrofóbica, que assim conseguem se ligar à superfície da parede celular do patógeno e produzir poros, o que causa a lise celular. Porém a ação antimicrobiana, para ser expressa, necessita que exista uma boa relação entre a enzima e o substrato proteico utilizados para síntese do hidrolisado (Silva, 2014). Provavelmente a ligação entre a pepsina e a carapaça de camarão tenha ocorrido de forma mais específica sob essas condições de processamento (2 e 5 % por 30'), conferindo aos hidrolisados características estruturais com alta afinidade pelos sítios de ligação encontrados nos grupos de bactérias frente aos quais apresentaram atividade antimicrobiana.

O tempo da reação da hidrólise na produção dos hidrolisados determina uma maior ou menor ação bactericida, como pode ser observado nos resultados obtidos frente aos isolados de *S. aureus* testados, que só sofreram ação bactericida quando frente ao hidrolisado de carapaça produzido com pepsina a 2% 30' de reação, o hidrolisado feito com a mesma concentração do catalisador, porém com menor tempo de reação, ou seja, 15', não foi eficiente. Examinando os resultados observados com

o hidrolisado de carapaça obtido com pepsina a 5% também pode-se observar essa ação do tempo de reação, quando são vistos os resultados obtidos frente aos isolados de *V. vulnificus* testados, em que o hidrolisado com 30' de reação apresentou ação bactericida e o com 15' não.

Todos os isolados de *V. parahaemolyticus* apresentaram sensibilidade frente aos hidrolisados em que foi utilizada a pepsina como catalisadora da reação de hidrólise, o que não foi observado com os hidrolisados produzidos com a enzima novozym, já que foram poucos os isolados sensíveis a eles. Estes resultados corroboram a observação de Wald *et al.* (2016) de que a enzima pepsina apresenta boa especificidade para hidrólise de polipeptídeos.

Quase todos os hidrolisados não apresentaram ação antimicrobiana frente aos isolados de *Yersinia* e *Salmonella*. É possível que estes microrganismos sejam resistentes aos hidrolisados utilizados ou que não tenha ocorrido uma adequada ligação entre a matriz proteica e a enzima utilizada na sua produção para que fosse formado um hidrolisado com ação bactericida frente a esses patógenos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hidrolisados proteicos feitos com carapaça de *F. paulensis* e a enzima pepsina são alternativas promissoras como agentes de ação bactericida frente a patógenos alimentares, como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*.

A atividade bactericida é bastante variável em função da enzima e do protocolo de produção do hidrolisados, além da atividade antimicrobiana ser distinta para diferentes bactérias, de forma que não se estabeleceu um protocolo único para obtenção de um determinado hidrolisado que tenha efeito bactericida frente a todas as bactérias utilizadas no estudo.

Embora em altas concentrações, o hidrolisado de carapaça de *F. paulensis* produzido com pepsina a 2% por 30' elimina *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*, e a 5% por 30' elimina *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, Liliansa José. Qualidade microbiológica de camarões resfriados e comercializados em feiras-livres do município de São Paulo/SP. 2013. 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias – Unesp.

CARVALHO, Thayanne Cristine Caetano de. Caracterização da pesca artesanal de camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez Farfante, 1967) capturado em um estuário amazônico (Pará-Brasil). 2021. 105f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais) – Universidade Federal da Amazônia.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Salmonella**. 2021 Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em 17 dez. 2022.

DJELLOULI, M., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., ARANCIBIA, M. Y., KARAM, N., MARTÍNEZ-ALVAREZ, O. Antioxidant and antimicrobial enhancement by reaction of protein hydrolysates derived from shrimp by-products with glucosamine. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-15, 2019.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos**: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 5 ed. São Paulo: Editora Manoele, 2015. 1077p.

GHORBEL-BELLAAJ, O.; MAALEJ, H.; NASRI, M.; JELLOULI, K. Fermented Shrimp Waste Hydrolysates: Promising Source of Functional Molecules with Antioxidant Properties. **Journal of culinary science & technology**, v. 16, n. 4, p. 357-377, 2018.

MATHEW, G. M.; MATHEW, D. C.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; HUANG, C. C.; BINOD, P.; SIROHI, R.; KIM, S. H.; PANDEY, A; Sustainable and eco-friendly strategies for shrimp shell valorization. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115656, 2020.

MOK, J. S.; CHO, S. R.; PARK, Y. J.; JO, M. R.; HA, K. S.; KIM, P. H.; KIM, M. J. Distribution and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 171, p. 112785, 2021.

OLATUNDE, O. O.; BENJAKUL, S.; YESILSU, A. F. Antimicrobial compounds from crustaceans and their applications for extending shelf-life of marine-based foods. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 20, n. 8, p. 629-646, 2020.

RASHIDIAN, G.; ABEDIAN KENARI, A.; NIKKHAH, M. Evaluation of antioxidative and antibacterial activities of fractionated hydrolysate from shrimp *Litopenaeus vannamei* head wastes against aquatic pathogenic bacteria. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 8, p. 3696-3704, 2021.

ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; ROMANI, V. P.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P.; PRENTICE, C. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. **Food hydrocolloids**, v. 81, p. 351-363, 2018.

ROSA, J. V.; SILVA, C. S. J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J.; DUVAL, E. H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* isolados de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 37, p. 1345-1354, 2016.

ROSA, J. V.; ADAMATTI, A. I.; TIMM, C. D. *Yersinia enterocolitica* em pescados do Estuário da Lagoa dos Patos. **Zootecnia Tropical**, v. 17, n. 1-2, p. 7-13, 2019.

SILA, A.; HEDHILI, K.; PRZYBYLSKI, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Functional Foods**, n. 11, p. 322-329, 2014.

SILVA, Carolina Moroni. Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por hidrolisados enzimáticos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*). 2014. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

TEODORO, Sarah de Souza Alves. Estrutura genética populacional do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) nas costas sul e sudeste brasileira. 2018. 115f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista.

WALD, M.; SCHWARZ, K.; REHBEIN, H.; BUßMANN, B.; BEERMANN, C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. **Food chemistry**, v. 205, p. 221-228, 2016.

ZHAO, L.; YIN, B.; LIU, Q.; CAO, R. Purification of antimicrobial peptide from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and its function mechanism. **Journal of Ocean University of China**, v. 12, n. 3, p. 484-490, 2013.

3.3 Artigo 3

**REVESTIMENTO DE AMIDO ADICIONADO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE
RESÍDUOS DE PESCADO NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS
INDESEJÁVEIS EM FILÉS DE *Micropogonias furnieri* E PORÇÕES DE
*Farfantepenaeus paulensis***

Thamíris Pereira de Moraes
Débora Rodrigues Silveira
Juliana Fernandes Rosa
Cláudio Dias Timm

Será submetido à revista Food and Science Technology

REVESTIMENTO DE AMIDO ADICIONADO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE RESÍDUOS DE PESCADO NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS INDESEJÁVEIS EM FILÉS DE *Micropogonias furnieri* E PORÇÕES DE *Farfantepenaeus paulensis*

INTRODUÇÃO

O processamento dos pescados para consumo humano resulta em diversos subprodutos e resíduos, como pele, vísceras, aparas, cabeça, espinha, carapaça e escama, os quais correspondem a mais ou menos 75% do total de pescado capturado. Entretanto, alguns desses resíduos podem originar peptídeos de elevado interesse, por ter atividade biológica importante para outras formas de processamento (Santos, 2011; Souza, 2018).

Os hidrolisados proteicos feitos de resíduos do processamento de pescado, como escama e carapaça, com enzimas catalisadoras, como pepsina e novozym, podem apresentar ação antibacteriana frente a patógenos de alimentos. Em comparação com antimicrobianos comuns, os hidrolisados não desencadeiam os mesmos mecanismos de resistência e possuem um espectro estreito, forte atividade, estabilidade térmica, vários modos de ação e são atóxicos (Offret *et al.*, 2019). Eles permitem a transformação do seria um poluente ou resíduo de baixo valor agregado em produto de boa qualidade, inclusive com ação antimicrobiana, protegendo alimentos suscetíveis à contaminação por patógenos (Zavareze *et al.*, 2014). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados utilizando resíduos de pescados para produzir hidrolisados com atividade antimicrobiana. Silva (2014) avaliou a ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos feitos com ossos desmineralizados de *Micropogonias furnieri* e enzimas proteolíticas (alcalase e protamex) frente a patógenos alimentares, como *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva, obtendo resultados satisfatórios. Também Zhao *et al.* (2013), que utilizaram carapaça de camarão como matriz proteica para produção de hidrolisado e a enzima protamex como catalisadora dessa reação, observaram que o hidrolisado produzido teve ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

A segurança dos alimentos vem ganhando espaço e atenção global face à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA). De acordo com Kobuszewska e Wysok (2022), o patógeno mais comumente encontrado em pescados

é o *Vibrio parahaemolyticus*, já que é um membro natural do ambiente marinho e estuarino. Quando é ingerida por humanos, essa bactéria provoca diarreia, muitas vezes com cólicas abdominais, náuseas, vômitos, febre e calafrios (CDC, 2019).

Os problemas de saúde ocasionados pelo consumo de pescado se devem também à prática deficiente de higienização no transporte e armazenamento (Barreto *et al.*, 2012). Manipuladores e equipamentos que entram em contato com os alimentos possuem um papel importante na disseminação de microrganismos patogênicos em toda cadeia de processamento de pescados (Reis *et al.*, 2017). Um importante patógeno que pode contaminar os alimentos durante o processamento é a bactéria *S. aureus*, a qual tem sido isolada de amostras de peixes e camarões (Arfatahery *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2020). A presença deste microrganismo em pescados prontos para consumo é preocupante, uma vez que produz enterotoxinas que quando ingeridas podem causar intoxicação alimentar nas pessoas (Franco e Landgraf, 2008). Outro grupo que é um importante indicador da qualidade microbiológica dos pescados são os mesófilos aeróbios. (Franco e Landgraf, 2008). Existem relatos na literatura de verificação de altas contagens deste grupo de microrganismos em pescados, como o trabalho de Ferreira *et al.* (2020), que observaram altas contagens de mesófilos em pescados comumente consumidos no Maranhão, Brasil, assim como o estudo de Meza-Villalobos *et al.* (2023), que também observaram altas contagens em pescados frescos comercializados no México.

Micropogonias furnieri, popularmente conhecido como corvina, é uma das espécies mais abundantes de peixe na costa brasileira, sendo objeto de intensa atividade pesqueira (Vicentini e Araújo, 2002) no sul do Brasil. Da mesma forma, de acordo com Teodoro (2018), camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) representa um dos recursos pesqueiros mais explorados na região sul brasileira, onde é capturado predominantemente em águas frias próximas à costa e nas lagoas da planície costeira, como a Lagoa dos Patos. São espécies de pescados comumente comercializados na região sul do Brasil e de ampla manipulação nas indústrias dessa região, além de serem bem aceitos pelos consumidores.

O amido é um biopolímero renovável, constituído de amilose e amilopectina. É a matéria-prima mais usada para fabricação de filmes e revestimentos comestíveis por ser barato, relativamente fácil de manusear, totalmente biodegradável e amplamente disponível na natureza (Araújo-Farro *et al.*, 2010). Filmes de amido podem ser utilizados como veículo para substâncias ativas das quais se deseja

alguma atividade sobre o alimento em que foi aplicado (Villadiego *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2010), como foi o estudo feito por Atrib (2021) que utilizou cobertura de amido de milho com óleo essencial de *Origanum vulgare* para o controle de *V. parahaemolyticus* em filés de *M. furnieri*.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação antimicrobiana do revestimento de amido adicionado de hidrolisados proteicos feitos com resíduos do processamento de pescados sobre contaminantes de peixe e camarão prontos para venda ao consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Foram utilizadas três cepas de *V. parahaemolyticus*, uma de referência (ATCC 17802) e duas selvagens previamente isoladas por Rosa *et al.* (2016); cinco de *S. aureus*, uma de referência (ATCC 25923) e quatro selvagens do banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas.

Hidrolisados proteicos de escama de *M. furnieri* e carapaça de *F. paulensis*

Para obtenção dos hidrolisados de escama e carapaça, primeiramente foram obtidos os isolados proteicos, para isso, tanto as escamas de *M. furnieri*, quanto as carapaças de *F. paulensis* foram lavadas com água destilada estéril por 24 horas e então passaram por secagem a 35°C por 7 dias. Após, foram trituradas e homogeneizadas com água destilada estéril 1:1 para passar pelo processo de hidrólise.

Antes de iniciar a reação de hidrólise, as enzimas endógenas dos isolados proteicos foram inativadas por aquecimento a 85°C/15 minutos. A reação de hidrólise ocorreu em reator de vidro de parede dupla conectado a um banho termostatizado. Foi utilizada a enzima pepsina (Sigma, Merck, Alemanha) em duas concentrações (2 e 10%) e o tempo de hidrólise foi de 30 minutos. Foi ajustado o pH para 2,0, que é o ideal para pepsina, conforme recomendado pelo laboratório produtor desse catalisador.

Para interromper a reação de hidrólise, as misturas foram aquecidas a 95°C durante 15 minutos. Após, foram mantidas a -18°C.

Para produção do hidrolisado de escama foi utilizada a concentração de 10% da enzima e para o de carapaça de camarão a concentração foi de 2%. Os protocolos (tipo e concentração da enzima e tempo de hidrólise) foram escolhidos por terem apresentado os melhores resultados em testes de avaliação de atividade antimicrobiana realizados em estudos anteriores.

Aplicação do produto

Contaminação experimental dos pescados

Foram utilizadas porções de 10 g de filé de *M. furnieri* e de *F. paulensis* desprovidos da cabeça e da carapaça. As porções foram experimentalmente contaminadas com os isolados de *V. parahaemolyticus* e *S. aureus*. Inóculos de diluições seriadas das culturas bacterianas foram preparados e 0,1 mL da diluição 10^3 UFC/mL foi pipetado e espalhado na superfície das porções de filé e de camarão, obtendo-se a concentração final de 10^1 células bacterianas por grama de pescado. Amostras não contaminadas experimentalmente foram utilizadas para avaliar mesófilos aeróbios e para servir como controle negativo para *V. parahaemolyticus* e *S. aureus*; amostras experimentalmente contaminadas, mas sem aplicação da cobertura com hidrolisado, serviram como controle positivo da contaminação experimental; e amostras experimentalmente contaminadas e com cobertura, mas sem hidrolisado, foram testadas para verificação do efeito do amido sobre os microrganismos.

O experimento foi realizado em triplicata.

Produção e aplicação da cobertura

O revestimento foi preparado utilizando 2% de amido de milho. Para seu preparo, se utilizou água destilada estéril aquecida juntamente com o amido, mexendo constantemente, até atingir 70°C. Após resfriado a temperatura ambiente, foram adicionados os hidrolisados em igual volume.

Os pescados foram imersos na cobertura e submetidos à secagem em temperatura ambiente. Então, foram acondicionados em sacos estéreis e armazenados sob refrigeração a 4°C. Foram realizadas contagens após 0, 1 e 2 dias de estocagem.

Contagem bacteriana

As contagens de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos aeróbicos foram realizadas de acordo com o Bacteriological Analytical Manual (2022).

Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando-se a análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância mostrou que não houve efeito das repetições sobre as contagens bacterianas em nenhum dos testes realizados. Por outro lado, a análise de variância indicou efeito da cobertura tanto nos testes com hidrolisados produzidos com escamas de *M. furnieri* como naqueles produzidos com carapaças de *F. paulensis*. No teste de Tukey, em todas as análises foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com a cobertura adicionada dos hidrolisados e os tratamentos sem cobertura (Tabelas 1 e 2), o que significa que o efeito nas contagens foi devido à presença dos hidrolisados proteicos na cobertura de amido. Os tratamentos sem cobertura e com cobertura sem hidrolisados foram estatisticamente iguais, indicando que a cobertura de amido não afetou as contagens dos microrganismos testados.

Tabela 1. Contagens em log de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos em filés de *M. furnieri* experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de escamas de *M. furnieri* produzido com pepsina a 10% 30' (CH)

Microrganismos	SC	CA	CH
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	4,05a	3,92a	3,1b
<i>V. parahaemolyticus</i> 38	4,10a	4,01a	2,77b
<i>V. parahaemolyticus</i> 42	4,35a	4,35a	3,93b
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5,11a	5,00a	3,42b
<i>S. aureus</i> 186	5,24a	5,24a	4,78b
<i>S. aureus</i> 187	5,21a	5,21a	4,19b
<i>S. aureus</i> 189	5,28a	5,29a	3,93b
<i>S. aureus</i> 195	4,71a	4,73a	3,83b
Mesófilos	4,92a	4,91a	3,87b

Médias com as mesmas letras nas linhas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Tabela 2. Contagens em log de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos em *F. paulensis* sem cabeça e carapaça experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de carapaças de *F. paulensis* produzido com pepsina a 2% 30' (CH)

Microrganismos	SC	CA	CH
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	4,06a	4,06a	3,27b
<i>V. parahaemolyticus</i> 38	3,06a	2,95a	2,48b
<i>V. parahaemolyticus</i> 42	4,04a	4,40a	2,98b
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5,17a	5,15a	4,42b
<i>S. aureus</i> 186	5,14a	5,14a	4,42b
<i>S. aureus</i> 187	5,00a	4,56a	4,00b
<i>S. aureus</i> 189	5,60a	5,60a	4,11b
<i>S. aureus</i> 195	4,75a	4,75a	3,69b
Mesófilos	5,67a	6,00a	5,30b

Médias com as mesmas letras nas linhas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Não existem relatos na literatura de outros trabalhos que tenham estudado a utilização de cobertura de amido adicionada de hidrolisados proteicos com atividade antimicrobiana oriundos de resíduos do processamento de pescados com a finalidade de diminuir a contaminação por microrganismos indesejáveis em pescados. Pelo nosso conhecimento, coberturas contendo hidrolisados produzidos a partir de pescados foram estudados apenas com a finalidade de conservação através da atividade antioxidante dos hidrolisados (Lima, 2018).

Os resultados observados no presente estudo foram bastante promissores. Embora os microrganismos não tenham sido eliminados dos alimentos experimentalmente contaminados, a sua contagem foi significativamente diminuída. A Instrução Normativa nº 161 de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Brasil, 2022), que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos no Brasil, determina como 10^3 UFC/g o limite máximo para *Staphylococcus* coagulase positiva em pescados. A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos (ICMSF) determina como 10^4 UFC/g a contagem máxima de *S. aureus* tanto para peixes, quanto para crustáceos crus (Cole *et al.*, 2011). O mesmo limite é

estabelecido pela Food and Drug Administration (FDA), órgão regulamentador americano, para todos os pescados crus (FDA, 2022). A aplicação da cobertura de amido com hidrolisado não reduziu as contagens para abaixo desse limite em todos os testes. Entretanto, as contagens iniciais de *S. aureus* nos pescados experimentalmente contaminados estavam mais altas que as contaminações por *S. aureus* naturalmente encontradas em pescados, conforme relatado em estudos realizados no Brasil (Viana *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2018). Portanto, é provável que, se as contagens iniciais forem mais baixas, o resultado após o uso das coberturas com os hidrolisados seja de contagens ainda menores. Por outro lado, considerando que a concentração de *S. aureus* necessária para produzir toxinas em quantidade capaz de provocar intoxicação alimentar é de 10^5 UFC/g de alimento (Franco e Landgraf, 2008), a aplicação da cobertura com hidrolisado foi eficaz em diminuir as contagens para valores considerados seguros.

Estudos no Brasil que relatam a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em pescados (Muratori *et al.*, 2014, Souza *et al.*, 2014) reportam contaminações que variam de 10 a 10^5 UFC/g, o que dificulta a comparação dos nossos resultados com as contagens naturalmente encontradas. Atualmente, a legislação brasileira não determina parâmetros para *V. parahaemolyticus* em pescados. Entretanto, a FDA recomenda que os pescados contenham menos que 10^4 células de *V. parahaemolyticus* por grama de alimento (FDA, 2022). Todas amostras que inicialmente se encontravam com contagem acima de 10^4 UFC/g ficaram com contagens abaixo desse limite quando a cobertura de amido com hidrolisado foi aplicada, o que indica que a atividade antimicrobiana dos hidrolisados testados foi suficiente para baixar os níveis de contaminação a valores considerados seguros por um órgão respeitado internacionalmente como referência quanto à segurança dos alimentos.

No Brasil, a legislação não estabelece parâmetros para mesófilos aeróbios em pescados, porém a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMS) preconiza o limite de 10^5 UFC/g como indicativo de boa qualidade e de 10^6 UFC/g como de qualidade aceitável. As amostras de *M. furnieri* já estavam naturalmente com contaminação abaixo desses limites, entretanto as amostras de *F. paulensis* apresentaram contagem média acima de 10^5 UFC/g. Embora com diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos sem hidrolisado e com o hidrolisado, ela não chegou a 1 log UFC/g e, portanto, foi insuficiente para baixar as

contagens para valores inferiores ao mencionado. Os resultados obtidos com mesófilos aeróbios foram menos efetivos do que aqueles obtidos com *S. aureus* e *V. parahaemolyticus*, o que possivelmente se deva ao fato de se tratar de um grupo relativamente amplo de microrganismos, dentre os quais é de se esperar que um percentual não conhecido seja insensível aos efeitos antimicrobianos dos hidrolisados.

No presente estudo, a contaminação experimental dos filés de *M. furnieri* e das porções de *F. paulensis* foi feita na superfície do alimento. Os mesófilos aeróbios, assim como *S. aureus*, são microrganismos que contaminam predominantemente a parte exterior dos alimentos, já que são contaminantes de superfície geralmente provenientes da manipulação inadequada ou de falha nas boas práticas higiênicas durante o processamento. O revestimento de amido com hidrolisado forma uma camada que envolve o alimento. Pela proximidade e facilidade de contato, é de se esperar que a cobertura superficial com antimicrobianos tenha uma ação mais efetiva sobre os microrganismos que contaminam a parte exterior dos alimentos. Porém, o filme com os hidrolisados antimicrobianos também foi efetivo na diminuição das contagens de *V. parahaemolyticus*. Embora este microrganismo tenha uma capacidade invasiva grande (Soo *et al.*, 2020), ele também está presente na superfície do pescado (Silva, 2007). Provavelmente, a diminuição nas contagens de *V. parahaemolyticus* observada nas amostras com cobertura de amido com hidrolisados se deva à ação sobre as bactérias localizadas mais superficialmente no alimento.

As matrizes alimentares empregadas para teste no presente estudo foram as mesmas que serviram de origem para confecção dos hidrolisados proteicos utilizados. Seguiu-se essa abordagem para que não houvesse uma possível interferência do gosto do hidrolisado utilizado na confecção do revestimento do alimento a ser testado, como foi o ocorrido no estudo de Costa *et al.* (2014), que testaram hidrolisados proteicos de resíduos de ossos de *M. furnieri* em sopas e concluíram que o gosto da sopa, após adição do hidrolisado ficou mais amargo. Usando a mesma matriz proteica e alimentar, possivelmente não ocorrerá essa alteração no gosto do alimento, assim como no estudo de Veit *et al.* (2012), que testaram hidrolisados proteicos feitos com resíduos de *Oreochromis niloticus* na confecção de empanados de pescados e tiveram aceitação sensorial satisfatória.

De acordo com o descrito por Villadiego *et al.*, (2005), os revestimentos feitos com amido apresentam baixa permeabilidade ao oxigênio e baixas taxas de umidade relativa, porém no atual estudo, pode-se observar que o revestimento de amido não constituiu uma barreira para a penetração do oxigênio, já que quando são observados os resultados dos testes feitos com o revestimento apenas com amido não houve efeito da cobertura nas contagens dos microrganismos mesófilos aeróbios estudados.

Os resultados das contagens de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos nos dias 0, 1 e 2 de estocagem a 4° C são observados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Contagens em log de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos em filés de *M. furnieri* experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de escamas de *M. furnieri* produzido com pepsina a 10% 30' (CH) aos 0, 1 e 2 dias de estocagem

	Dia 0	Dia 1	Dia 2
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802			
SC	3,76c	4,13b	4,24a
CA	3,76a	3,77a	4,24a
CH	2,82c	2,98b	3,48a
<i>V. parahaemolyticus</i> 38			
SC	3,82c	4,16b	4,33a
CA	3,82a	3,84a	4,38a
CH	2,75b	2,13c	3,44a
<i>V. parahaemolyticus</i> 42			
SC	4,20c	4,38b	4,47a
CA	4,21c	4,38b	4,4a
CH	3,86b	3,96a	3,96a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
SC	4,82a	5,23a	5,29a
CA	4,84c	4,95b	5,19a
CH	3,59a	3,3a	3,36a
<i>S. aureus</i> 186			
SC	5,04c	5,28b	5,43a
CA	5,06c	5,22b	5,44a
CH	4,59b	4,81a	4,94a
<i>S. aureus</i> 187			
SC	5,11c	5,23b	5,28a
CA	5,11c	5,23b	5,28a
CH	3,72a	4,34a	4,50a
<i>S. aureus</i> 189			
SC	5,17b	5,30a	5,38a
CA	5,18b	5,31a	5,39a
CH	3,63c	3,88b	4,28a
<i>S. aureus</i> 195			
SC	4,37c	4,67b	5,10a
CA	4,40c	4,70b	5,10a
CH	3,36c	3,88b	4,25a
Mesófilos			
SC	4,67c	4,96b	5,14a
CA	4,66c	4,96b	5,13a
CH	3,30c	3,99b	4,32a

Médias com as mesmas letras na linha são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Tabela 4. Contagens em log de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos em *F. paulensis* sem cabeça e carapaça experimentalmente contaminados e tratados sem cobertura (SC), com cobertura de amido sem hidrolisado (CA) e com cobertura de amido adicionada de hidrolisado de carapaças de *F. paulensis* produzido com pepsina a 2% 30' (CH) aos dias 0, 1 e 2 de estocagem

	Dia 0	Dia 1	Dia 2
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802			
SC	3,60b	4,18a	4,39a
CA	3,58b	4,20a	4,41a
CH	2,47b	3,58a	3,76a
<i>V. parahaemolyticus</i> 38			
SC	2,67b	3,28a	3,24a
CA	2,70b	3,00a	3,17a
CH	2,21a	2,65a	2,60a
<i>V. parahaemolyticus</i> 42			
SC	3,71c	4,04b	3,78a
CA	3,73a	4,14a	3,98a
CH	2,49b	2,85b	3,58a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
SC	5,14ab	5,27a	5,10b
CA	5,15ab	5,25a	5,06b
CH	4,14c	4,48b	4,65a
<i>S. aureus</i> 186			
SC	5,12a	5,11a	5,20a
CA	5,12a	5,11a	5,19a
CH	3,71c	4,52b	5,01a
<i>S. aureus</i> 187			
SC	3,92c	4,74b	5,11a
CA	3,88c	4,69b	5,12a
CH	3,67b	4,22a	4,12a
<i>S. aureus</i> 189			
SC	5,00c	5,70b	6,12a
CA	5,02c	5,63b	6,12a
CH	4,00c	4,19b	4,15a
<i>S. aureus</i> 195			
SC	4,43c	4,67b	5,14a
CA	4,40c	4,70b	5,15a
CH	3,22a	3,66a	4,19a
Mesófilos			
SC	5,20b	5,83a	5,98a
CA	5,25c	5,85b	5,97a
CH	4,86c	5,39b	5,64a

Médias com as mesmas letras na linha são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Quando são observados os resultados dos testes realizados com o hidrolisado de escama frente a *V. parahaemolyticus*, nota-se que, de forma geral, houve aumento nas contagens nos três dias de estocagem, exceto o isolado 42, que apresentou, nos dias 1 e 2 de estocagem contagens estatisticamente iguais quando no teste do revestimento com hidrolisado. Houve uma tendência de aumento nas contagens nos três dias de estocagem também quando são vistos os crescimentos dos testes feitos sem cobertura. Sobre os resultados obtidos com os isolados de *S. aureus* frente ao mesmo hidrolisado, houve um comportamento mais individual de cada isolado, uma vez que alguns, como os isolados de referência e 187, se mantiveram estatisticamente iguais nos três dias de estocagem, quando testados frente ao revestimento com o hidrolisado de escama. Os outros isolados testados apresentaram um comportamento semelhante aos de *V. parahaemolyticus*, de aumento das contagens nos três dias de estocagem. Esse mesmo comportamento foi observado nos mesófilos, que tiveram sua contagem aumentada. É importante salientar que apesar do aumento nas populações microbianas nas amostras tratadas com cobertura contendo hidrolisados, estas contagens mantiveram-se sempre abaixo e diferentes estatisticamente das contagens observadas nos outros dois tratamentos (sem cobertura e com cobertura sem hidrolisado).

Comportamento diferenciado entre os isolados também foi observado nos testes feitos com o hidrolisado de carapaça frente a *V. parahaemolyticus*, frente aos testes com o revestimento adicionado de hidrolisado e frente ao teste sem o revestimento. Sobre os isolados de *S. aureus* frente ao hidrolisado de carapaça, mais uma vez o isolado 187 apresentou comportamento diferente dos outros pertencentes ao mesmo grupo, uma vez que as contagens nos dias 1 e 2 do teste com revestimento adicionado do hidrolisado foram estatisticamente iguais, o que não foi observado nos outros isolados, que apresentaram aumento das contagens nos três dias de estocagem. Os mesófilos, quando frente ao hidrolisado de carapaça apresentaram o mesmo comportamento que quando frente aos testes com o hidrolisado de escama. Da mesma forma que em relação a *S. aureus*, o comportamento de *V. parahaemolyticus* e dos microrganismos mesófilos durante os dias de estocagem não afetou a diferença estatística observada entre as contagens nas amostras com e sem hidrolisado, sempre menores naquelas cobertas com hidrolisado.

CONCLUSÕES

Cobertura de amido adicionada de hidrolisado proteico feito a partir de escamas de *M. furnieri* com o catalisador pepsina a 10% 30' e cobertura de amido adicionada de hidrolisado proteico de carapaça de *F. paulensis* produzido com pepsina a 2% 30' são eficazes na diminuição da contaminação por *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos aeróbios em filés de *M. furnieri* e porções de *F. paulensis*, respectivamente.

As coberturas de amido adicionadas de hidrolisado proteico mantêm o efeito na diminuição estatisticamente significativa das contagens microbianas por pelo menos até dois dias de estocagem sob refrigeração.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO-FARRO, P. C.; PODADERA, G.; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 839-848, 2010.

ARFATAHERY, N.; DAVOODABADI, A.; ABEDIMOHTASAB, T. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in fishery products in Iran. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2016.

ATRI, Amanda Barbosa. Cobertura de amido de milho com óleo essencial de *Origanum vulgare* para controle de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri*. 2021. 39f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). **Bacteriological Analytical Manual**, US Food and Drug Administration. 2022.

BARRETO, N. S. E.; MOURA, F. D. C. M.; TEIXEIRA, J. A.; ASSIM, D. A.; MIRANDA, P. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 86-95, 2012.

BRASIL (2022). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial – República Federativa do Brasil.

CARVALHO, Thayanne Cristine Caetano de. Caracterização da pesca artesanal de camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez Farfante, 1967) capturado em um estuário amazônico (Pará-Brasil). 2020. 105f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais) – Universidade Federal da Amazônia.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Vibrio Species Causing Vibriosis**. 2019. Acessado em 18 jan. 2023. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vibrio/>.

COLE, M., KASUGA, F.; FARBER, J. M.; ANDERSON, W.; ANELICH, L.; BUCHANAN, R. L.; ZWIETERING, M. **Microorganisms in foods 8: use of data for assessing process control and product acceptance**. 2011.

COSTA, E. L.; SOUZA, L. G.; PUGA, M. N.; GERALDO, D. F.; YAMAMURA, H.; YAMAMURA, E. T. H. Análise sensorial de sopa à base de hidrolisado proteico de carcaça de pescado. **VI Simpósio de Controle de Qualidade do Pescado**. 2014.

COSTA, A. L. P.; DO NASCIMENTO, J. F.; DA SILVA JÚNIOR, A. C. S. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. **PubVet**, v. 12, p. 172, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance June**, 2022 Edition, 2022.

FERREIRA, E. M.; DA SILVA LOPES, I.; DE MATOS PEREIRA, D.; LEÔNCIO, G. G.; PEREIRA, L. E. C.; QUEIROZ, M. L. M.; COSTA, F. N. Alterações sensoriais, microbiológicas e químicas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e do peixe-serra (*Scomberomorus brasiliensis*) desembarcados em portos no Maranhão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 26662-26676, 2020.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

KOBUSZEWSKA, A.; WYSOK, B. Fish as a source of foodborne bacteria. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 79, n. 3, p. 117-122, 2022.

LIMA, Helder Levi Silva. Filmes antioxidantes comestíveis de celulose bacteriana e hidrolisado de gelatina de pele de pescado. 2018. 167f. Tese (Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

MEZA-VILLALOBOS, L. A.; MEZA-ESPINOZA, L.; ESPINOSA-CHAURAND, L. D.; DIAZ-RAMÍREZ, M.; CORTÉS-SÁNCHEZ, A. D. J. Evaluación microbiológica de pescado (*Cynoscion albus*) destinado al consumo humano. **Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar**, v. 7, n. 1, p. 1263-1283, 2023.

MURATORI, M. C. S. M.; VELOSO, A. P. B.; COSTA, A. P. R.; PEREIRA, M. M. G.; GUIMARAES, C. M. M.; CALVET, R. M.; SANTOS, Y. F. M.; CARDOSO FILHO, F.

D. C. *Vibrio parahaemolyticus* em carcinicultura marinha. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, p. 289-296, 2014.

OFFRET, C.; FLISS, I.; BAZINET, L.; MARETTE, A.; BEAULIEU, L. Identification of a novel antibacterial peptide from Atlantic mackerel belonging to the GAPDH-related antimicrobial family and its in vitro digestibility. **Marine drugs**, v. 17, n. 7, p. 413, 2019.

REIS, D. H. C. Avaliação do perfil microbiológico do peixe *Pseudoplatystoma corruscans* e *Colossoma macropomum* (pintado e tambaqui), comercializados no município de Rolim de Moura, tendo em foco a saúde pública. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 21-28, 2017.

ROSA, J. V.; SILVA, C. S. J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J.; DUVAL, E. H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* isolados de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 37, p. 1345-1354, 2016.

SANTOS, Maria de Fátima Gonçalves. Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – aplicações. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche.

SILVA, Miriam Lopes da. Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo. 2007. 146f. Dissertação (Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.

SILVA, Carolina Moroni. Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por hidrolisados enzimáticos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*). 2014. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

SOO, T. C. C.; SEE, S. N. A.; BHASSU, S. Potential muscle activity disturbance in *Penaeus monodon* during Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) infection: Inference through gene expression, calcium concentration, and MicroRNA. **Journal of invertebrate pathology**, v. 177, p. 107497, 2020.

SOUZA, A. L. M.; GUIMARÃES, J. T.; BARCELLOS, C. C. C.; CALIXTO, F. A. A.; FRANCO, R. M.; MESQUITA, E. F. M. Número mais provável de *Vibrio parahaemolyticus* na carne de cação anequim (*Isurus oxyrinchus*) comercializada no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. VI Simpósio de Controle de Qualidade do Pescado, 2014.

SOUZA, Raoní Gonçalves. Desenvolvimento e avaliação do hidrolisado proteico a partir da hidrólise enzimática de coprodutos de atum (*Thunnus alalunga*). 2018. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Pesca) – Instituto Federal do Espírito Santo.

TEODORO, Sarah de Souza Alves. Estrutura genética populacional do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) nas costas sul e sudeste brasileira. 2018. 115f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista.

VEIT, J. C.; MALUF, M. L. F.; SIMÕES, M. R.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. Inclusão de hidrolisados proteicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em empanados de peixe. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 16, n. 2, p. 85-92, 2012.

VIANA, I. C. L. D. A.; VALIATTI, T. B.; SOBRAL, F. D. O. S.; ROMÃO, N. F.; FONSECA, C. X.; OLIVEIRA, U. A. D. Análise microbiológica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) comercializado na feira municipal de Ariquemes, Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 67-73, 2016.

VICENTINI, R. N.; ARAÚJO, F. G. Caracterização morfométrica da corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest) (*Pisces, Sciaenidae*) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 1, p. 163-170, 2002.

VILLADIEGO, A. M. D.; SOARES, N. D. F. F.; ANDRADE, N. J. D.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V. P. R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52, n. 300, p. 221 – 244, 2005.

WALTER, E. H. M.; FONTES, L. C. B., OSAWA, C. C., STEEL, C. J.; CHANG, Y. K. A influência de coberturas comestíveis na aceitação sensorial e intenção de compra de bolos de chocolate. **Food Science and Technology**, n. 30, p. 335-341, 2010.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDÉZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, p. 1739-1743, 2009.

ZHAO, L.; YIN, B.; LIU, Q.; CAO, R. Purification of antimicrobial peptide from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and its function mechanism. **Journal of Ocean University of China**, v. 12, n. 3, p. 484-490, 2013.

4 Considerações Finais

A indústria do pescado gera uma grande quantidade de resíduos e descartes, utilizando esses materiais como matriz proteica para hidrolisados, além de diminuir a quantidade de descarte e os gastos com isso, são gerados compostos que podem vir a beneficiar os consumidores de pescado, já que vão trazer uma proteção frente a patógenos alimentares, também beneficiar as próprias indústrias, já que o que antes, gerava custo de descarte pode ser um agregador de valor aos produtos comercializados.

A atividade bactericida observada no atual estudo foi bastante dependente de diferentes variáveis, como tempo de reação de hidrólise, matriz proteica utilizada e também o catalisador, enzima, utilizado para compor a reação, não se estabelecendo um protocolo único para obtenção de um determinado hidrolisado que tenha efeito bactericida frente todas as bactérias utilizadas no estudo.

Os hidrolisados proteicos de resíduos e subprodutos de *M. furnieri* são alternativas promissoras como agentes de ação bactericida frente a patógenos alimentares comumente isolados de pescados.

A utilização da carapaça de camarão como matriz para a fabricação de um composto que apresenta ação antimicrobiana é uma alternativa preferível ao descarte. Hidrolisados proteicos feitos com carapaça de *F. paulensis* e a enzima pepsina são alternativas promissoras como agentes de ação bactericida frente a patógenos alimentares, como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *S. aureus*.

Cobertura de amido adicionada de hidrolisado proteico feito a partir de escamas de *M. furnieri* com o catalisador pepsina a 10% 30' e cobertura de amido adicionada de hidrolisado proteico de carapaça de *F. paulensis* produzido com pepsina a 2% 30' são eficazes na diminuição da contaminação por *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e mesófilos aeróbios em filés de *M. furnieri* e porções de *F. paulensis*, respectivamente.

As coberturas de amido adicionadas de hidrolisado proteico mantêm o efeito na diminuição das contagens microbianas por pelo menos até dois dias de estocagem sob refrigeração.

São necessários mais estudos sobre os revestimentos de amido adicionados de hidrolisado proteico feito com resíduos do processamento de pescado, principalmente no que tange a aceitação dos consumidores, uma vez que os pescados, por terem um gosto bastante característico, necessitam de testes para que seja comprovada a viabilidade e aceitação dos consumidores, não só nas próprias espécies de pescados que deram origem aos hidrolisados, mas também em outros tipos.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **Produção Brasileira de Camarão Marinho Cultivado por Estado: Dados Reais de 2015 a 2019**. Disponível em: < <https://abccam.com.br/wpcontent/uploads/2020/10/Producao-de-Camarao-2020.pdf>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2022. 2020.

ADAMS, Lívia Almeida. **Uso de revestimentos comestíveis de amido e gelatina em queijo prato**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 28p. 2019.

AMARAL, S. M. B.; de ALMEIDA, A. P. F.; da SILVA, F. S.; SILVA, Y. Y. V.; DAMACENO, M. N. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, n. 11, p. e211935-e211935, 2021.

AMORIM, Ricardo Gaya Oliveira. **Hidrolisado protéico dos resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) como forma de agregar valor ao pescado e reduzir o passivo ambiental das indústrias de pesca no município de Itajaí-SC**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2014. Disponível em: < <https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1899/1/Ricardo%20Gaya%20Oliveira%20de%20Amorim.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

BARRETO, N. S. E.; MOURA, F. D. C. M.; TEIXEIRA, J. A.; ASSIM, D. A.; MIRANDA, P. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 86-95, 2012.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; DESBIENS, M.; SAINT-LOUIS, R.; ZATYLNÝ-GAUDIN, C.; THIBAUT, S. Evidence of antibacterial activities in peptide fractions originating from snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-products. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 2, p. 197-209, 2010.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BONNET, C.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M. É. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 149-157, 2013

BRASIL, Casa Civil. Lei nº, 12.305, de 2 de agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013 de 26 de novembro de 2017. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. 2017.

CECCARELLI, D.; AMARO, C., ROMALDE, J. L., SUFFREDINI, E., & VEZZULLI, L. *Vibrio* species. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**, p. 347-388, 2019.

CENTENARO, Graciela Salette. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. 2011. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)– Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

COSTA, E. L.; SOUZA, L. G.; PUGA, M. N.; GERALDO, D. F.; YAMAMURA, H.; YAMAMURA, E. T. H. Análise sensorial de sopa à base de hidrolisado proteico de carcaça de pescado. **VI Simpósio de Controle de Qualidade do Pescado**. 2014

COSTA, F.; BRAGA, R. C.; BASTOS, M. D. S. R.; dos SANTOS, D. N.; FROTA, M. M. Revestimentos comestíveis à base de fécula de mandioca (*Manihot esculenta*) em produtos vegetais: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, e54511427428-e54511427428, 2022.

ENGEPESCA. Principais dados da pesca brasileira em 2021 e perspectivas para 2022. **Redes para aquicultura**. 2021. Disponível em: <<https://engepesca.com.br/post/principais-dados-da-pesca-brasileira-em-2021-e-perspectivas-para-2022#:~:text=Considerando%20o%20ano%20de%202020,de%20empregos%20diretos%20e%20indiretos>>. Acesso em: 01 dez. 2022.

FAHMI, A.; MORIMURA, S.; GUO, H. C.; SHIGEMATSU, T.; KIDA, K.; UEMURA, Y. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1195-1200, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action. 224p. 2020.

FARIAS, Maria do Carmo Andion. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém-Pará. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

FELTES, M.; CORREIA, J. F.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FURG/SEMA. **Boletim da pesca industrial marinha no Rio Grande do Sul – 2019**. Laboratório de Recursos Pesqueiros Demersais e Cefalópodes – Instituto de Oceanografia – FURG, 2019. 28p.

GARCIA, L.C.; PEREIRA, L.M.R.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; HUBINGER, M.D. Selection of an edible starch coating for minimally processed strawberry. **Food Bioprocess and Technology**, v.3, p.834–842, 2010.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos**: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 5 ed. São Paulo: Editora Manoele, 2015. 1077p.

GOMES JUNIOR, F. A.; FARIAS, T. S. F. D.; MOREIRA, C. D. F.; CARDOSO, T. M.; CARREIRO, L. G.; MATTOS, L. M.; TRAJANO, S. C. Principais bactérias patogênicas veiculadas por pescado e derivados. **Ciência e tecnologia de alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas**, v. 3, n. 1, p. 208-225, 2022.

HUANG, C. Y.; WU, C. H.; YANG, J. I.; LI, Y. H.; KUO, J. M. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 671-678, 2015.

MANCINI, M. E.; BEVERELLI, M.; DONATIELLO, A.; DIDONNA, A.; DATTOLI, L.; FALEO, S.; OCCHIOCHIUSO, G.; GALANTE, D.; RANDINONE, V.; SAMBRO, L.; BIANCO, A.; MICCOLUPO, A.; GOFFREDO, E. Isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* from foods in Apulia and Basilicata regions (Italy) by conventional and modern methods. **Plos One**, v. 17, n. 7, p. e0268706, 2022.

MATHEW, G. M.; MATHEW, D. C.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; HUANG, C. C.; BINOD, P.; SIROHI, R.; KIM, S. H.; PANDEY, A; Sustainable and eco-friendly strategies for shrimp shell valorization. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115656, 2020.

MATUSZEWSKA, M.; DABROWSKA, A.; MURRAY, G. G. R.; KETT, S. M.; VICK, A. J. A.; BANISTER, S. C.; MUNOZ, L. P.; CUNNINGHAM, P.; WELCH, J. J.; HOLMES, M. A.; WINERT, L. A. Absence of *Staphylococcus aureus* in wild populations of fish supports a spillover hypothesis. **BioRxiv**, v. 10, p. 2022.10.18.512561, 2022.

NOLASCO, Adriana Maria. Resíduos da colheita e beneficiamento da caixeta – *Tabebuia cassinoides* (Lam) D.C.: caracterização e perspectivas. 2000. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

OFFRET, C.; FLISS, I.; BAZINET, L.; MARETTE, A.; BEAULIEU, L. Identification of a novel antibacterial peptide from Atlantic mackerel belonging to the GAPDH-related antimicrobial family and its in vitro digestibility. **Marine drugs**, v. 17, n. 7, p. 413, 2019.

OLATUNDE, O. O.; BENJAKUL, S.; YESILSU, A. F. Antimicrobial compounds from crustaceans and their applications for extending shelf-life of marine-based foods. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 20, n. 8, p. 629-646, 2020.

PÉREZ, A.; RUZ, M.; GARCÍA, P.; JIMÉNEZ, P.; VALENCIA, P.; RAMÍREZ, C., PINTO, M.; NUÑEZ, S. M. PARK, J. W.; ALMONACID, S. Nutritional Properties of Fish Bones: Potential Applications in the Food Industry. **Food Reviews International**, p. 1-13, 2022.

RASHIDIAN, G.; ABEDIAN KENARI, A.; NIKKHAH, M. Evaluation of antioxidative and antibacterial activities of fractionated hydrolysate from shrimp *Litopenaeus vannamei* head wastes against aquatic pathogenic bacteria. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 8, p. 3696-3704, 2021.

REIS, D. H. C. Avaliação do perfil microbiológico do peixe *Pseudoplatystoma corruscans* e *Colossoma macropomum* (pintado e tambaqui), comercializados no município de Rolim de Moura, tendo em foco a saúde pública. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 21-28, 2017.

ROCHA, F. A. G.; de ARAÚJO, L. O.; ALVES, K. S.; DANTAS, L. Í. S.; da SILVA, R. P., de ARAÚJO, M. F. F. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **Holos**, v. 1, p. 84-91, 2013.

ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; ROMANI, V. P.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P.; PRENTICE, C. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. **Food hydrocolloids**, v. 81, p. 351-363, 2018.

ROSA, J. V.; SILVA, C. S. J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J.; DUVAL, E. H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella enterica* isolados de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 37, p. 1345-1354, 2016.

ROSA, J. V.; SOUZA, A. I. A.; TIMM, C. D. *Yersinia enterocolitica* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos, Brasil. **Zootecnia Tropical**, v. 37, p. 7 – 13, 2019.

SANTOS, Maria de Fátima Gonçalves. Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche—aplicações. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche.

SILA, A.; HEDHILI, K.; PRZYBYLSKI, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 322-329, 2014.

SILVA, C. M.; da FONSECA, R. A. D. S.; PRENTICE, C. Comparing the hydrolysis degree of industrialization byproducts of Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) using microbial enzymes. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 1757, 2014.

SILVA, Carolina Moroni. Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por hidrolisados enzimáticos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*). 2014. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

SIQUEIRA, L. J.; BONFIM, T. B.; WANSOVSKI, M.; SOUZA, B. E. O.; SANTOS, E. A.; RAGHIANTE, F. Qualidade sanitária de tilápias (*Oreochromis niloticus*) abatidas em uma unidade móvel de processamento de pescado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 13, p. 11-19, 2022.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A.o. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

SONG, R.; WEI, R.; ZHANG, B.; WANG, D. Optimization of the antibacterial activity of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) hydrolysates. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1979-1989, 2012.

VEIT, J. C.; MALUF, M. L. F.; SIMÕES, M. R.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. Inclusão de hidrolisados proteicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em empanados de peixe. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 16, n. 2, p. 85-92, 2012.

VENKATESAN, J.; ANIL, S.; KIM, S. K.; SHIM, M. S. Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review. **Marine drugs**, v. 15, n. 5, p. 143, 2017.

WALD, M.; SCHWARZ, K.; REHBEIN, H.; BUßMANN, B.; BEERMANN, C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. **Food Chemistry**, v. 205, p. 221-228, 2016.

WANG, L.; SUN, J.; DING, S.; QI, B. Isolation and identification of novel antioxidant and antimicrobial oligopeptides from enzymatically hydrolyzed anchovy fish meal. **Process Biochemistry**, v. 74, p. 148-155, 2018.

WOSNIAK, Bárbara. Efeito de diferentes tipos de hidrolisado de sardinha (*Clupeidae*), sobre o desempenho de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). 2015. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Pós-Graduação em Ciência Animal.

ZAMORA-SILLERO, J.; GHARSALLAOUI, A.; PRENTICE, C. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. **Marine Biotechnology**, v. 20, p. 118-130, 2018.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDÉZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, p. 1739-1743, 2009.

ZHANG, Y.; TU, D.; SHEN, Q.; DAI, Z. Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydrolysate production. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2998, 2019.