

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANA RITA RIBEIRO DE ARAÚJO CORDEIRO

FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS
DE SABOR DE HIDROLISADOS DE VÍSCERAS CAPRINAS

JOÃO PESSOA – PB

2021

ANA RITA RIBEIRO DE ARAÚJO CORDEIRO

**FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS
DE SABOR DE HIDROLISADOS DE VÍSCERAS CAPRINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr.^a Marta Suely Madruga

Co-orientadora: Dr.^a Taliana Kenia Alencar Bezerra

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C794f Cordeiro, Ana Rita Ribeiro de Araujo.
Fatores que afetam a produção de moléculas de sabor de
hidrolisados de vísceras caprinas / Ana Rita Ribeiro de
Araujo Cordeiro. - João Pessoa, 2021.
134 f. : il.

Orientação: Marta Suely Madruga.
Coorientação: Taliana Kenia Alencar Bezerra.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Hidrólise enzimática. 3.
Caprinocultura. 4. Hidrolisados proteicos - Visceras
caprinas. 5. Proteases. 6. Subprodutos caprinos -
Tratamento térmico. I. Madruga, Marta Suely. II.
Bezerra, Taliana Kenia Alencar. III. Título.

UFPB/BC

CDU 664(043)

ANA RITA RIBEIRO DE ARAÚJO CORDEIRO

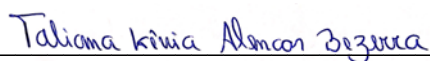
**FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS DE SABOR DE
HIDROLISADOS DE VÍSCERAS CAPRINAS**

Tese aprovada em 17/09/2021

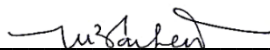
BANCA EXAMINADORA



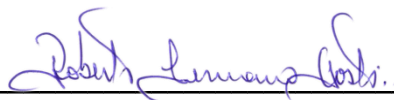
Prof.^a Dra. Marta Suely Madruga – PPGCTA/CT/UFPB
Orientadora - Presidente da Banca Examinadora



Prof.^a Dra. Taliana Kênia Alencar Bezerra – PPGCTA/UFPB
Coorientadora



Prof.^a Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco – ITAL/SP
Examinador Externo



Prof. Dr. Roberto Germano Costa – FAPESQ/PB
Examinador Externo



Prof.^a Dra. Ana Sancha Malveira Batista – PPGZ/UVA/CE
Examinador Externo



Prof.^a Dra. Carlos Alberto Gadelha – DBM/UFPB
Examinador Interno

A Deus por sua fidelidade e amor inquestionáveis
A minha família por todo o apoio e ternura
Ao meu companheiro, Marcos Cézar, por seu cuidado e amor
A minha filha, Mariana, por ressignificar o amor em mim
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que cuidadosamente guiou os meus dias e que com o seu amor incondicional me tornou forte e persistente nesta caminhada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a todos os professores que o constituem e a Fernanda e Neto, pela competência, dedicação e tratamento respeitoso.

À minha orientadora, Prof^a Dr.^a Marta Suely Madruga, por me conceder a oportunidade de realização deste trabalho, pelas orientações infundáveis e por todo o conhecimento transmitido com mestria. Obrigada.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr.^a Taliana Alencar Bezerra, por toda os ensinamentos infundáveis ao longo de minha caminhada acadêmica.

A minha mãe Maria do Socorro, por seu cuidado, por sua determinação, por estar sempre ao meu lado, por todas as orações e a quem eu dedico o mérito de tudo o que sou.

A meu pai Nilberto Elberto, por todo o otimismo e apoio, encorajando-me a nunca desistir.

A meu irmão Bruno Ribeiro, por todos os sonhos compartilhados e por sempre acreditar em mim.

A Marcos Cézar, por todo o companheirismo, carinho, amor e paciência em todos os momentos, e por acreditar e tornar capaz esse sonho. Te amo muito.

A minha filha Mariana, que com sua ternura e afago tornou meus dias mais serenos e felizes.

A Mércia, técnica do laboratório de Flavor, e amiga presente de Deus em minha vida, especialmente por sua generosidade e disposição em ajudar em todos os momentos. Obrigada por se fazer presente do primeiro ao último dia, e por transmitir seu otimismo e cuidado.

A Lorena, Pós-Doc do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por sua amizade e ajuda imprescindível a realização deste trabalho.

Aos amigos dos Laboratórios de Química de Alimentos e Flavor, Leila, Juliana, Simone, Mariana, Thayse, Lary e Deyse pelas conversas e risos compartilhados, e pela vivência de grande aprendizado.

RESUMO

As vísceras caprinas tem sido estudadas por seu potencial para produção de hidrolisados proteicos, considerando sua concentração proteica e composição aminoacídica. Assim objetivou-se investigar a qualidade aromática dos hidrolisados obtidos com vísceras caprinas. Em um primeiro estudo buscou-se obter moléculas de sabor a partir de hidrolisados de subprodutos caprinos, enfatizando a ação térmica durante o processamento. Foi utilizada uma mistura de subprodutos submetidos ou não à inativação de enzimas endógenas, seguida de hidrólise com a enzima proteolítica Alcalase® (*Bacillus licheniformis*) e autoclavagem após hidrólise. A produção de hidrolisados forneceu dados quantitativos e qualitativos sobre os precursores envolvidos na formação aromática de hidrolisados de proteínas. O processo de inativação de enzimas endógenas resultou em hidrolisados com maior grau de hidrólise e maior teor de proteína. O processo de autoclavagem produziu um aumento significativo na concentração de aminoácidos livres e maltose e uma redução no teor de glicose. A aplicação dos dois tratamentos térmicos resultou na produção de hidrolisados de proteína de subproduto caprino com diferentes perfis de voláteis. Em um segundo estudo, investigou-se a ação de três enzimas proteolíticas na produção de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas, e seu uso para produção de produtos flavorizantes. Foi pesquisada a produção de moléculas precursoras do sabor/aroma e a formação de compostos voláteis resultantes da aplicação de diferentes proteases; três tratamentos de hidrólise única (HA - Alcalase®, HF - Flavourzyme®, HN - Neutrase®) e um tratamento combinado (HFN - Flavourzyme® e Neutrase®). O maior grau de hidrólise foi obtido com a Alcalase (26.74%), bem como o maior número e maior concentração de compostos voláteis (23 voláteis e 27.5 µg/100mL, respectivamente). Os principais voláteis identificados nos hidrolisados incluíam ácidos, aldeídos, pirazinas, terpenos e aldeídos de Strecker. Os precursores de aroma solúveis em água e solúveis em gordura foram investigados, verificando-se maiores concentrações nos hidrolisados HF e HFN, provavelmente devido a baixa participação destes precursores na formação de compostos voláteis. Portanto, o uso da Alcalase na proteólise de vísceras caprinas se destacou diante das demais enzimas, fornecendo compostos de aroma impactantes para o sabor cárneo. Além disso, um artigo de revisão sobre potenciais estratégias de utilização e aplicação de subprodutos caprinos e ovinos foi produzido. A revisão apresentou ainda evidências notáveis quanto aos aspectos nutricionais, tecnológicos, funcionais, bioativos e de potencial flavorizante dos subprodutos caprinos e ovinos, como potencial significativo para fornecer novos e valiosos ingredientes alimentares.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; Proteases; Subprodutos caprinos; Tratamento térmico.

ABSTRACT

The goat viscera has been studied for its potential to produce protein hydrolysates, considering its protein concentration and amino acid composition. Thus, the aim was to investigate the aromatic quality of hydrolysates obtained from goat viscera. In a first study, it was sought to obtain flavor molecules from goat by-product hydrolysates, emphasizing the thermal action during processing. A mixture of by-products submitted or not to the inactivation of endogenous enzymes was used, followed by hydrolysis with the proteolytic enzyme Alcalase® (*Bacillus licheniformis*) and autoclaving after hydrolysis. The production of hydrolysates provided quantitative and qualitative data on the precursors involved in the aromatic formation of protein hydrolysates. The inactivation process of endogenous enzymes resulted in hydrolysates with a higher degree of hydrolysis and higher protein content. The autoclaving process produced a significant increase in the concentration of free amino acids and maltose and a reduction in the glucose content. The application of the two heat treatments resulted in the production of goat by-product protein hydrolysates with different volatile profiles. In a second study, the action of three proteolytic enzymes in the production of protein hydrolysates from goat viscera was investigated, and their use in the production of flavoring products. The production of flavor/aroma precursor molecules and the formation of volatile compounds resulting from the application of different proteases were investigated; three single hydrolysis treatments (HA - Alcalase®, HF - Flavourzyme®, HN - Neutrase®) and a combined treatment (HFN - Flavourzyme® and Neutrase®). The highest degree of hydrolysis was obtained with Alcalase (26.74%), as well as the highest number and highest concentration of volatile compounds (23 volatiles and 27.5 µg/100mL, respectively). The main volatiles identified in the hydrolysates included acids, aldehydes, pyrazines, terpenes and Strecker aldehydes. Water-soluble and fat-soluble aroma precursors were investigated, with higher concentrations in HF and HFN hydrolysates, probably due to the low participation of these precursors in the formation of volatile compounds. Therefore, the use of Alcalase in the proteolysis of goat viscera stood out compared to other enzymes, providing impactful aroma compounds for the meat flavor. In addition, a review article on potential strategies for the use and application of goat and sheep by-products was produced. The review also presented remarkable evidence regarding the nutritional, technological, functional, bioactive and flavoring potential aspects of goat and sheep by-products, as a significant potential to provide new and valuable food ingredients.

Keywords: Enzymatic hydrolysis; Goat by-products; Heat treatment; Proteases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO DE REVISÃO - VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE CAPRINOS E OVINOS: DESAFIOS E OPORTUNIDADES PARA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Figure 1. Produção mundial carne e subprodutos cárneos comestíveis.....	66
---	----

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1. Fluxograma de desenvolvimento da Tese.....	67
--	----

Figura 2. Fluxograma de obtenção de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas utilizando tratamento térmico.....	69
--	----

ARTIGO I - EFFECTS OF THERMAL PROCESSING ON THE FLAVOR MOLECULES OF GOAT BY-PRODUCTS HYDROLYSATES

Figure 1. General process of obtained flavoring molecules from goat by-product.....	84
---	----

Figure 2. Total amino acids (A), Free amino acids (B), sugars (C), Fatty acids (D) quantified in goat by-product mixture (Mix) and in goat by-product protein hydrolysates (HC: goat hydrolysate without previous thermal treatment or control, HT: goat hydrolysate after heat treatment, HCA: goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving, HTA: goat hydrolysate with heat treatment and autoclaving). a,b,c,d different letters indicate significant difference at $p < 0.05$	85
--	----

Figure 3. Hydrolysis kinetics of the goat by-product mixture (1: 1: 1) with (HT) and without (HC) inactivation of endogenous enzymes using alkalase.....	87
--	----

Figure 4. Biplot for the different goat by-product hydrolysates generated with different heat treatments (HC: goat hydrolysate without previous thermal treatment or control, HT: goat hydrolysate after heat treatment, HCA: goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving, HTA: goat hydrolysate with heat treatment and autoclaving), and total amino acids, free amino acids, sugars and fatty acids obtained by PCA (PC1: 61.70%, PC2: 30.58%).....	90
--	----

Figure 5. Biplot for the different goat viscera hydrolysates generated with different heat treatments (HC: goat hydrolysate without previous thermal treatment or control, HT: goat hydrolysate after heat treatment, HCA: goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving, HTA: goat hydrolysate with heat treatment and	
---	--

autoclaving), and volatile compounds obtained by PCA (PC1: 52.59%, PC2: 31.20%).....	91
--	----

ARTIGO II - EFFECT OF PROTEASES ON WATER-SOLUBLE AND FAT-SOLUBLE AROMA PRECURSORS OF GOAT VISCERAS PROTEIN HYDROLYSATE

Figure 1: Electrophoretic profile of goat viscera hydrolysates.....	128
Figure 2. Biplot for the different goat viscera hydrolysates generated with different enzymes (HA: goat hydrolysate obtained with enzyme Alcalase, HF: goat hydrolysate obtained with enzyme Flavourzyme, HN: goat hydrolysate obtained with enzyme Neutrase, HFN: goat hydrolysate obtained with enzyme Flavourzyme and Neutrase), and free amino acids and sugars (A) obtained by PCA (PC1: 51.51%, PC2: 39.57%); fatty acids (B) obtained by PCA (PC1: 68.03%, PC2: 23.22%); and volatile compounds (C) obtained by PCA (PC1:72.23, PC2: 22.90%).....	129
Figure 3. Heatmap of correlation matrix of the free amino acids, sugars and volatile compounds in goat viscera hydrolysates. The correlation coefficients of compounds are color coded from deep red (1) to deep blue (-1).....	131

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO- VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE CAPRINOS E OVINOS: DESAFIOS E OPORTUNIDADES PARA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Tabela 1. Composição nutricional da carne e dos subprodutos comestíveis de caprinos..	24
Tabela 2. Composição nutricional da carne e dos subprodutos comestíveis de ovinos.....	27
Tabela 3. Produtos caprinos e ovinos processados a partir de subprodutos.....	44
Tabela 4. Hidrolisados proteicos de subprodutos do abate de caprinos e ovinos.....	48

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1. Sistemas enzimáticos usados para tratamento de hidrólise de vísceras caprinas..	70
---	----

ARTIGO I - EFFECTS OF THERMAL PROCESSING ON THE FLAVOR MOLECULES OF GOAT BY-PRODUCTS HYDROLYSATES

Table 1. Profile of volatile compounds (AU x 105) in goat by-product protein hydrolysates.....	88
--	----

ARTIGO II - EFFECT OF PROTEASES ON WATER-SOLUBLE AND FAT-SOLUBLE AROMA PRECURSORS OF GOAT VISCERAS PROTEIN HYDROLYSATE

Tabela 1. Enzyme systems used and degree of hydrolysis (%) for treatment of goat viscera extract hydrolysis.....	98
Tabela 2. Physicochemical parameters, reducing sugar (mg/100g) and fatty acids (g/100g) in goat viscera protein hydrolysates.....	105
Table 3. Profile of volatile compounds (µg/100mL) in goat viscera protein hydrolysates	107
Table 4. Free amino acid composition (mg/100g) of goat viscera protein hydrolysates...	114

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.1 MATERIAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	67
3.2 EXPERIMENTO 1: EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NAS MOLÉCULAS DE SABOR DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE SUBPRODUTOS CAPRINOS.....	68
3.2.1 Produção de hidrolisados de vísceras caprinas.....	68
3.3 EXPERIMENTO 2: EFEITO DE PROTEASES NOS PRECURSORES HIDRO E LIPO-SOLUVEIS DE AROMA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERAS CAPRINAS.....	69
3.3.1 Produção de hidrolisados de vísceras caprinas com diferentes enzimas.....	69
3.4 MÉTODOS.....	70
3.4.1 Experimento 1: Efeito do processamento térmico nas moléculas de sabor de hidrolisados proteicos de subprodutos caprinos.....	70
3.4.2 Experimento 2: Efeito de proteases nos precursores hidro e lipo-solúveis de aroma de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas.....	73
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
3.5.1 Experimento 1: Efeito do processamento térmico nas moléculas de sabor de hidrolisados proteicos de subprodutos caprinos.....	75
3.5.2 Experimento 2: Efeito de proteases nos precursores hidro e lipo-solúveis de aroma de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas.....	76
REFERENCIAS.....	77
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1 ARTIGO I: EFFECTS OF THERMAL PROCESSING ON THE FLAVOR MOLECULES OF GOAT BY-PRODUCTS HYDROLYSATES.....	82
4.2 ARTIGO II: EFFECT OF PROTEASES ON WATER-SOLUBLE AND FAT- SOLUBLE AROMA PRECURSORS OF GOAT VISCERAS PROTEIN HYDROLYSATE.....	93
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	132
ANEXO.....	133

1 INTRODUÇÃO

Um volume considerável de subprodutos é gerado não apenas do abate, mas também da indústria de processamento de produtos de origem animal. No abate de caprinos, entre os subprodutos comestíveis que não são constituintes da carcaça, estão as vísceras, exemplificadas pelo sangue, cérebro, intestinos, fígado, rins, estômagos, coração e pulmão, representando, em média, de 15 a 20% do peso vivo total do animal, sendo fontes excelentes de proteínas, lipídeos, ácidos graxos, minerais, principalmente ferro e fósforo, além de vitaminas (QUEIROZ et. al, 2013; TOLDRÁ et. al, 2012; SANTOS et al., 2008).

A potencialidade de vísceras caprinas como matéria-prima para a obtenção de hidrolisado proteico foi estudada por Queiroz et al. (2017) e apresentaram um alto conteúdo de proteína (16,27 a 24,53%) e a presença majoritária dos aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina e glicina, indicando seu possível uso como um flavorizante/intensificador de sabor. Além disso, os hidrolisados obtidos apresentaram propriedades funcionais tecnológicas significativas, como solubilidade, capacidade de retenção de óleo, propriedades emulsionantes e atividade antioxidante, demonstrando seu potencial de aplicação como ingrediente funcional.

O processo de hidrólise enzimática aplicado a proteína é capaz de melhorar a funcionalidade quanto as suas características funcionais, sensoriais, físico químicas e de textura. Neste processo, alguns fatores devem ser controlados e avaliados, como o tempo de hidrólise, pH, temperatura, razão proteína/enzima e especificidade enzimática (LYNCH et al., 2018; BEZERRA et al., 2020).

Ao longo do processo de hidrólise proteica ocorre a formação de peptídeos, aminoácidos livres e compostos voláteis que, em conjunto, apresentam aroma característico, possibilitando estudos de aplicação do hidrolisado proteico de vísceras caprinas como flavorizante alimentício (MORA; REIG; TOLDRÁ, 2014; QUEIROZ et al., 2017).

Na construção de formulações de aromas, o processamento térmico, por exemplo, deve ser utilizado para promover a formação do aroma, por meio da reação de Maillard. Para isso, são empregadas altas temperaturas, processo que pode ser realizado por autoclavagem, permitindo a formação de compostos aromáticos além de garantir a segurança do alimento em estudo (PEINADO et al., 2016; SONG et al., 2017; ZOU et al., 2019).

As diferenças de especificidade de proteases e ação hidrolítica também possui influência sobre as características físico-químicas dos hidrolisados, no possível papel biológico e na habilidade em quelar minerais. Além disso, influenciará, por exemplo, na composição final dos

produtos de hidrólise, quanto ao tamanho dos peptídeos e a exposição dos grupamentos laterais hidrofóbicos (SUKKHOWN et al., 2017; BEZERRA et al., 2019).

Hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de subprodutos têm sido utilizados para produzir componentes de sabor (KUMAR et al., 2012; ZHAN et al., 2013; PEINADO; KOUTSIDIS; AMES, 2016). Informações encontram-se disponíveis a respeito do flavor das carnes de frango, bovina, suína e de pescado, no entanto, dados publicados sobre o flavor de caprinos ainda são escassos (MADRUGA et al., 2009, 2010, 2011).

A técnica de extração dos compostos voláteis utilizada permite variação no perfil desses compostos presentes na carne caprina, conforme reportado por Madruga et al. (2009), que identificaram e quantificaram 203 compostos. Um grande número de compostos derivados de Maillard, como pirazinas, piroles, piridinas e alquilsulfanatos foram encontrados. Compostos de impacto como 1,2-metiltridecanal, (E, E) -2,4-decadienal, 3- (metiltio) propanal, trissulfureto de dimetilo e uma série interessante de C2 a C5 alquilformilciclopentenos, foram identificados pela primeira vez no perfil volátil da carne caprina.

Sabe-se que grande parte do sabor de um alimento é diretamente influenciado pelo aroma, sendo esse um atributo decisivo na escolha do consumidor por determinado alimento (SUN et al., 2020). O aumento no consumo de alimentos produzidos pela indústria contribuiu com a expansão da indústria de aromas e, atualmente, esses compostos são responsáveis por 25% do mercado total de aditivos alimentares (AKACHA; GARGOURI, 2015).

Desta forma, objetivou-se explorar a potencialidade das vísceras caprinas – observando os fatores que afetam a produção de moléculas de sabor de hidrolisados proteicos obtidos com esses subprodutos caprinos. Para tanto, inicialmente foram investigados os efeitos da inativação de enzimas endógenas e o uso da autoclavagem após a hidrólise sobre as moléculas aromatizantes destes hidrolisados. Posteriormente, observou-se o efeito de diferentes proteases na transformação de compostos voláteis e precursores de aroma solúveis em água / gordura dos hidrolisado foi realizado. Foi produzido, ainda, um artigo de revisão sobre a valorização dos subprodutos caprinos e ovinos, destacando os desafios e oportunidades técnicas para a indústria de alimentos, onde os aspectos nutricionais, tecnológicos, funcionais, bioativos e de potencial flavorizante destes subprodutos foram apresentados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão da literatura está apresentada sob a forma de artigo de revisão, em atendimento a Norma Complementar nº 03/2011 do PPGCTA. O artigo será submetido para análise e publicação no periódico Trends in Food Science and Technology, sob o título *Valorização de subprodutos de caprinos e ovinos: desafios e oportunidades técnicas para indústria alimentícia*.

VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE CAPRINOS E OVINOS: DESAFIOS E OPORTUNIDADES PARA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Ana Rita Ribeiro de Araújo CORDEIRO^a, Marta Suely MADRUGA^{a*}

^a Departament of Food Engineering, Center for Technology, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, Brazil.

* Corresponding author: E-mail: msmadruga@uol.com.br – Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil – telephone: +55 83 3216 7473; +55 83 98847 5800.

RESUMO

Fundamentação: A produção de carne caprina e ovina atingiu >16 MT, com uma produção de subprodutos de 3MT, que são um desafio para a indústria do setor cárneo juntamente com a gestão ambiental. Os subprodutos, a exemplo do fígado, pulmão, coração, cérebro, baço, sangue, cauda e orelhas, são tradicionalmente utilizados na produção de pratos típicos da culinária regional ou local em conformidade com a cultura de cada povo. Estes subprodutos são uma fonte rica em lipídios, proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B e minerais. Podem ser efetivamente explorados para aplicações de maior valor agregado, incluindo os alimentos funcionais e ingredientes para rações, suplementos alimentares, enzimas e outros produtos químicos finos, hidrolisados proteicos e flavorizantes.

Escopo e abordagem: O presente artigo de revisão reúne dados sobre (i) a produção dos subprodutos obtidos do abate disponíveis para processamento e (ii) potenciais estratégias de utilização e aplicação dos subprodutos na obtenção de novos ingredientes de valor agregado. A revisão também discute outras macromoléculas além de proteínas, incluindo lipídeos, minerais, vitaminas, ácidos graxos e possíveis utilizações destes subprodutos em pratos culinários, em hidrolisados enzimáticos, e aditivos alimentares.

Principais descobertas e conclusões: Esta revisão destaca os desafios e oportunidades técnicas sobre o uso dos subprodutos caprinos e ovinos em diversas aplicações alimentares. Embora estes subprodutos se apresentem, sem dúvida, como uma fonte rica de nutrientes e permita a elaboração de pratos culinários e o desenvolvimento de diversas aplicações tecnológicas, infelizmente, faltam informações documentadas sobre o uso potencial destes subprodutos para extração de componentes bioativos, obtenção de peptídeos que apresentem diversas propriedades biológicas e tecnológicas. Além do uso de hidrolisado desses subprodutos como precursores para produção de flavorizantes. Portanto, este trabalho apresentará algumas informações sobre subprodutos caprinos e ovinos, com ênfase em suas potencialidades.

1 Introdução

A produção global de carnes vermelhas ultrapassou a marca dos 342 milhões de toneladas, dos quais 1,75% (~5,97 milhões de toneladas) foram de carne caprina e 2,86% (~9,79 milhões de toneladas) de carne ovina (FAO, 2018). A carne de pequenos ruminantes destaca-se entre as proteínas de origem animal consumidas que não tem restrição cultural e religiosa, apresentando-se também com excelente qualidade nutricional, com destaque para a carne caprina. No entanto, observa-se que principalmente a carne caprina não está entre as preferidas

dos países ocidentais, principalmente por suas características sensoriais, tendo recebido certa repulsa por parte dos consumidores. Em paralelo, observa-se que a demanda por esta carne em países em desenvolvimento, principalmente nas regiões semi-áridas, extrapola a produção. Estas áreas respondem por mais de 90% do rebanho caprino mundial com 780 milhões de cabeças (FAO, 2018). Sendo assim, a melhoria dos padrões de produção e da disponibilidade de produtos preparados a partir destas carnes podem contribuir para a popularização do seu consumo (Montebello; Araújo, 2006).

O incremento na produção de carne caprina/ovina vem acompanhado de um aumento na quantidade de subprodutos comestíveis, que são gerados não apenas do abate, mas também da indústria de processamento de carnes (Toldrá et al., 2012). Estima-se que cerca de 3 milhões de toneladas de subprodutos caprinos e ovinos tenha sido gerado em 2018, e que estes subprodutos representem, em média, de 15 a 20% do peso vivo total desses animais (FAO, 2018; Queiroz et al., 2017a).

Se não tratados adequadamente, os subprodutos do abate podem configurar problemas ambientais e econômicos para as unidades processadoras de carne. Por isso, diversos processos industriais (desenvolvimento de produtos cárneos, produção de hidrolisados proteicos e flavorizantes) têm sido propostos para aproveitar, tratar e reduzir a produção destes subprodutos, que em sua maioria são descartados ou utilizados apenas como produtos de baixo valor agregado (Rahman; Sahar; Khan, 2014). Estudos têm revelado que os subprodutos cárneos são matéria-prima valiosa para dar origem a novos ingredientes/produtos alimentícios, visto que apresenta excelente valor nutricional, são ricos em lipídeos e proteínas, o que justifica uma ampla variedade de aplicações (Lafarga; Hayes, 2014; Queiroz et al., 2017b).

Tradicionalmente os subprodutos cárneos de caprinos e ovinos são utilizados em diferentes preparações na alimentação humana, tanto na elaboração de pratos típicos regionais, conforme relataram Gagaoua et al. (2018), Steingrímssdóttir et al. (2018), Teixeira et al. (2020);

como no desenvolvimento de produtos processados, como patê (Dálmas et al., 2011; Amaral et al., 2013; Amaral et al., 2015; Hamzeh et al., 2016; Teixeira et al., 2019), salsicha (Dalmás et al., 2012; Silva et al., 2013), chouriço (Silva et al., 2014), dentre outros.

Em geral, a utilização otimizada dos subprodutos do abate possibilita uma redução no impacto ambiental ao mesmo tempo em que viabiliza a produção de novos ingredientes e produtos. O desenvolvimento de tecnologias para recuperar as proteínas dos subprodutos cárneos surge como uma alternativa de agregar valor a estes subprodutos (Lynch et al., 2018; Peinado; Koutsidis; Ames, 2016). Recentemente tem chamado à atenção o aproveitamento dos resíduos de caprinos e ovinos através da hidrólise enzimática para obtenção de flavorizantes (Zhan et al., 2013; Cordeiro et al., 2020), agentes espessantes, emulsificantes, agentes espumantes e agentes estabilizadores (Queiroz et al., 2017a, 2017b).

Sendo assim, os subprodutos do abate de caprinos e ovinos são uma excelente fonte de estudo, uma vez que dados publicados na literatura demonstraram sua importância nutricional, além de aplicações diversas - uso para alimentação, desenvolvimento de produtos cárneos e produção de hidrolisados proteicos - associada com valor de mercado (Dalmás et al., 2011; Silva et al., 2014; Barbosa et al., 2017).

Esta revisão, portanto, objetiva discorrer sobre os subprodutos comestíveis do abate de pequenos ruminantes, apresentando aspectos do aproveitamento dos subprodutos comestíveis caprinos e ovinos, principalmente os órgãos e vísceras, voltado a valorização deste material, fornecendo informações para promover e incentivar sua utilização. Analisará as questões de produção e os desafios e preocupações que o uso destes subprodutos exige. Além disso, irá descrever a qualidade nutricional destes subprodutos e seu uso como alimento, assim como a potencialidade dos hidrolisados proteicos para aplicações tecnológicas, bioativas e agente flavorizante. Para finalizar, o estudo contribuirá para o entendimento da utilização dos

subprodutos caprinos e ovinos como matriz alimentar, através de uma abordagem ampla e científica, que ao nosso conhecimento não foi relatada anteriormente na literatura.

2 Aspectos de produção de subprodutos de caprinos e ovinos

A produção e consumo de produtos caprinos e ovinos têm se mostrado em evidência com aumento global ao longo dos últimos 60 anos. A produção global de carne caprina, em 2018, atingiu cifras de 6 milhões de toneladas; enquanto a produção de carne ovina revelou um total de 9,78 milhões de toneladas (FAO, 2018). Embora a produção de carnes de pequenos ruminantes seja reduzida, se comparada à produção de outras carnes (bovinos, aves, suínos) (FAO, 2018), observa-se uma demanda crescente de consumo, que a produção animal precisa atender. Iniguez (2011) e Alao et al. (2017) ressaltam que diversos desafios são comumente lançados à produção de carnes destes pequenos ruminantes, dentre os quais se incluem: sólido comprometimento com programas de melhoramento genético, treinamento para produtores, inovação de instalações de abate e processamento, tratamento de subprodutos, análise de mercado e canais de marketing, educação do consumidor para o consumo de carne caprina e ovina, preferências regionais, etc.

Outro aspecto da cadeia produtiva dos pequenos ruminantes que chama atenção refere-se aos subprodutos gerados no abate; consideram-se como subprodutos, aproximadamente 15 a 20% do peso vivo total dos caprinos e de até 18% para os ovinos (Figura 1). Estes percentuais, em 2018, geraram cifras de cerca de 1,17 e 1,72 milhões de toneladas de subprodutos caprinos e ovinos, respectivamente (FAO, 2018; Queiroz et al., 2017a).

São subprodutos comestíveis: fígado, pulmão, coração, língua, rim, cérebro, baço, sangue, cauda e orelhas. Vale enfatizar que estes subprodutos representam uma excelente fonte de rendimento para os abatedouros, ao mesmo tempo em que contribuem para a dieta, quando

consumidos, pois são fontes relevantes de micronutrientes como aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (Aristoy; Toldrá, 2011; Honikel, 2011; Kim, 2010; Queiroz et al., 2017a).

O consumo de subprodutos comestíveis de pequenos ruminantes apresenta grande diversidade, observando-se que os subprodutos são apreciados diferentemente segundo tradições, cultura, patrimônio (Ockerman; Basu, 2004; Honikel, 2011; Gagaoua et al., 2018; Steingrímssdóttir et al., 2018), que levam a preferência de determinados subprodutos em uma determinada área ou país (Nollet; Toldrá, 2011; Teixeira et al., 2020).

Os Estados Unidos classificam como subproduto tudo o que se produz a partir do animal, exceto a carne, e os dividem em comestíveis e não comestíveis. As aparas da cabeça e gordura do rúmen e estômago são inclusas na definição dos subprodutos comestíveis (Jayathilakan et al., 2012). No Reino Unido esta segregação se faz entre subprodutos vermelho (fígado, pulmões, língua, cabeça e etc.) e branco (gordura), além do conjunto de vísceras e bexiga, o rúmen e patas. Medula espinhal e cérebro não estão incluídos nesta última lista desde o surto de encefalopatia espongiforme bovina. Sangue, pulmões, estômagos, intestinos, pés, testículos de mamíferos, são itens que não podem ser usados em produtos crus (Jayathilakan et al., 2012; Rahman; Sahar; Khan, 2014).

A partir dos anos 2000, novos regulamentos europeus e nos EUA surgiram oportunamente para oferecer novos caminhos e mercados ao uso e aproveitamento dos subprodutos, que por muito tempo foram desvalorizados. Um exemplo disto foi à criação da Diretiva Europeia (CE, 2008) que objetivou a prevenção de resíduos bem como a recuperação e reaproveitamento destes. Esta diretiva definiu ainda como subproduto toda substância ou objeto resultante de um processamento, o qual não foi objeto principal de produção, e que ao mesmo tempo não pode ser desperdiçado (Toldrá et al., 2012).

No Brasil, o regulamento de inspeção industrial e sanitária considera “miúdos” os órgãos e vísceras dos animais de açougue, usados na alimentação humana (encéfalo, língua,

149 coração, fígado, rins, rúmen, retículo, omaso), bem como mocotós e rabada (Brasil, 2017). De
150 acordo com a nomenclatura oficial de produtos cárneos no Brasil são denominados como
151 miúdos caprinos e ovinos o fígado, coração, rins, língua, estômago, pulmão, baço e timo (Brasil,
152 2003). A legislação brasileira considera obrigatório que os subprodutos sejam submetidos ao
153 serviço de inspeção antes de serem liberados, e seguirem para manipulação, limpeza e preparo,
154 para melhor apresentação ou tratamento posterior (Brasil, 2017).

155 Algumas implicações para segurança no consumo de carne e seus subprodutos,
156 surgiram, em 1986, devido à ocorrência da Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), na
157 Europa. Em 2001, tornou-se proibido pela União Européia a utilização de um grande grupo de
158 proteínas de origem animal para uso como ração animal, incluindo subprodutos cárneos, após
159 terem sido implicados na BSE (Salami et al., 2019). A regulamentação europeia não proíbe
160 atualmente o uso de subprodutos na ração animal, mas uma vigilância da saúde pública exige
161 que a segurança alimentar relacionada ao uso de subprodutos cárneos neste produto seja
162 continuamente avaliado. Mesmo assim, no Reino Unido, por exemplo, a medula espinhal e o
163 cérebro para uso alimentar estão proibidos desde o surto de BSE. Além disso, em diversos
164 países a carne mecanicamente separada tem uma má percepção do consumidor devido a
165 preocupações com a saúde em decorrência da contaminação pela encefalopatia enpongiforme
166 bovina (Jayathilakan et a., 2012; Salami et al., 2019).

167

168

169

170

171

172

173

3 Composição nutricional de subprodutos comestíveis de caprinos e ovinos

CARNE CAPRINA E OVINA

É fato que a qualidade nutricional das carnes de diferentes espécies pode variar em função de muitos fatores; no entanto, o teor de proteína, minerais e vitaminas disponíveis são geralmente consistentes (Bohrer, 2017). A carne caprina apresenta-se como uma fonte importante de proteínas (21,1%) bem como a carne ovina (24,0%), além de valores médios similares de teor de umidade (76,7% e 74%) e cinzas (0,92% e 1,15%) para caprinos e ovinos, respectivamente. Em termos de gordura, a carne caprina se destaca por apresentar percentuais bem mais reduzidos, com valores <3%, ao passo que a carne ovina alcança teores >8%, o que equivale a percentuais 3 vezes superiores (Pearson & Duttdson, 1988). A proteína da carne destes pequenos ruminantes possui todos os aminoácidos essenciais e baixo valor calórico, além do reduzido teor de gordura e colesterol, tornando-a uma alternativa a outras carnes vermelhas, para atender as preferências dos consumidores voltados para o consumo de alimentos mais saudáveis (Madruga et al., 2011; Bohrer, 2017). Uma comparação entre o perfil de aminoácidos de uma proteína ideal e da carne caprina e ovina (Tabelas 1 e 2) revela que elas contêm percentuais de aminoácidos essenciais superiores a 80%, exceto para a fenilalanina (60% e 57%), isoleucina (77% e 70%) e valina (77 e 78%).

As carnes caprina e ovina são fontes de muitos minerais, e suas composições minerais incluem cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na) e magnésio (Mg) como macroelementos mais comuns. Além desses, o ferro (Fe), cobre (Cu), selênio (Se), zinco (Zn) e manganês (Mn), cobalto (Co), níquel (Ni), vanádio (V), chumbo (Pb) e cádmio (Cd) também são considerados importantes dentre os oligoelementos. Os teores de Ca, Fe e P encontrados na carne de caprinos e ovinos variam em suas concentrações: 141 a 271 mg 100 g⁻¹ de P para caprinos e 176 a 215 mg 100 g⁻¹ de P para ovinos; 2,3 a 9,6 100 g⁻¹ de Ca para caprinos e 5 a 7 mg 100 g⁻¹ de Ca para

ovinos; e 2,8 a 11 100 g^{-1} de Fe para caprinos e 1 a 2,2 $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de Fe para ovinos. Entre os minerais encontrados, o Fe é encontrado em concentrações superiores na carne caprina, alcançando níveis três vezes superiores aos de outras carnes. Além disso, a importância nutricional do ferro em funções cerebrais, atividade física e transporte de oxigênio, é um convite ao consumo da carne caprina (Pearson & Dutton, 1988; Madruga et al., 2011).

A carne caprina também é fonte importante das vitaminas B1 ou tiamina ($0,11 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), B2 ou riboflavina ($0,49 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) e B12 ou cianocobalamina ($1,13 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). A carne ovina também é fonte dessas vitaminas, com valores de $0,105 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de B1, $0,28 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de B2 e $0,0026$ de B12. A carne caprina apresenta teores de riboflavina superiores aos das demais carnes. Todas essas vitaminas são essenciais ao metabolismo de proteínas e carboidratos, ao combate à anemia e fundamentais ao crescimento.

210 Tabela 1. Composição nutricional da carne e subprodutos comestíveis de caprinos.

	Carne	Cérebro	Coração	Rins	Fígado	Pulmão	Tripa	Baço	Língua
Composição Centesimal (g/100g), valor calórico total – VCT (Kcal/100g) e Colesterol (mg/100g)									
Umidade	71,2 – 78	76,74	75,15-80,4	80,26	73,37-74,0	79,03-80,3	80,94	77,93	68,4
Cinzas	0,88 – 1,1	1,29	0,95	1,1	1,3	0,74	0,23	1,15	1,02
Proteínas	18,7- 23,1	13,82	16,76-9,38	15,6	20,32-2,63	16,86-7,19	15,36	18,45	16,63
Gordura	1,8 – 6,4	8,06	4,40-6,36	2,93-1,21	4,88-5,98	2,26-3,09	3,36	2,37	13,68
VCT	91-150	127	118	89	126	96	92	96	189
Colesterol	45 – 75	1340	122	419	415	448	113	243	206
Aminoácidos essenciais (g/100g de proteína)									
Triptofano	0,0033	1,36	1,31	1,5	1,22	1,45	1,34	1,46	1,45
Histidina	0,046	5,29	5,38	5,23	4,23	4,64	4,4	4,62	4,7
Treonina	0,046	5,29	5,43	5,69	6,58	5,74	4,16	6,27	4,67
Valina	0,043	4,7	5,08	5,44	4,53	5,15	5,24	5,27	4,5
Metionina	-	6,01	5,59	5,52	6,27	6,07	5,55	6,49	5,7
Isoleucina	0,027	2,98	3,08	3,41	3,04	2,54	3,59	2,7	3,18
Leucina	0,061	5,21	6,35	4,64	6,02	5,82	5,99	5,5	5,59
Fenilalanina	0,028	6,61	6,25	5,74	5,64	7,16	7,76	6,58	7,02
Tirosina	0,021	4,68	3,97	4,77	3,5	4,51	4,11	3,74	3,97
Lisina	0,058	8,24	7,04	8,48	8,39	8,04	7,22	8,89	7,05
Aminoácidos não essenciais (g/100g de proteína)									
Ac. Asp.	0,024	5,27	1,29	5,29	4,2	3,05	13,68	4,82	8,47
Ac. Glu.	0,068	6,71	1,71	4,74	4,38	2,41	13,14	4,27	8,15
Serina	0,022	6,98	1,71	5,08	4,73	2,66	12,62	4,08	8,43
Glicina	0,151	5,29	1,71	4,93	4,76	2,49	12,09	4,61	8,74
Alanina	0,230	6,06	1,48	4,58	5,59	2,46	11,41	3,26	7,77
Arginina	-	8,2	1,62	4,48	5,02	2,88	11,46	3,24	8,33
Prolina	0,038	7,86	1,37	4,26	4,54	2,48	12,26	3,44	8,8
Cisteína	0,0003	6,34	1,45	4,64	4,78	2,38	13,47	4,15	8,26
AAE+AAE	0,866	5,27	1,29	5,29	4,2	3,05	13,68	4,82	8,47
Ácidos Graxos Saturados (g/100g)									
12:00	-	0,03-0,25	0	0,01-0,04	0,01	0,04	0,02-0,03	0,02	0,01
14:00	0,0488	0,41-0,48	0,03	0,13-0,23	0,07	0,04-0,07	0,03-0,09	0,15	0,06

16:00	0,6098	2,53-3,29	1	0,76-1,10	0,56	0,74-0,97	0,43-0,91	0,83	0,55
18:00	0,7561	2,40-2,52	1,01	1,78	0,47	0,94-1,10	0,32-0,51	0,67	0,55
20:00	0,0439	0	0,03	0	0	0	0,01	0	0,01
22:00	0,0244	0	0,03	0	0	0	0	0	0
24:00	-	0	0,04	0,01	0,03	0,05	0,02	0,01	0,02
AGS	1,483	5,59-6,63	2,14	1,93-3,29	1,14	1,77-2,23	0,88-1,56	1,68	1,2
Ácidos Graxos Mono Insaturados (g/100g)									
16:1	0,0244	0,43-0,62	0,02	0,04-0,15	0,02	0,04-0,07	0,03-0,04	0,06	0,02
18:1	0,9024	5,00-7,82	1,31	0,95-1,24	0,52	0,88-0,95	0,40-0,84	1,06	0,58
20:1	-	0,26	0,12	0,03-0,05	0,02	0,07	0,01	0,03	0,02
AGMI	0,9068	5,88-8,46	1,45	1,02-1,77	0,56	0,92-1,40	0,60-0,89	1,15	0,62
Ácidos Graxos Poliinsaturados (g/100g)									
18:2	0,0537	0,40-0,48	0,04	0,29-0,43	0,24	0,32-0,37	0,08-0,13	0,15	0,14
18:3	0,0195	0,47-0,51	0,08	0,01	0,01	0,01-0,06	0,02	0,01	0,01
20:4	-	0,06-0,07	0,3	0,01-0,13	0,23	0,36	0,02-0,22	0,08	0,2
22:6 n-3	0,0061	0	0	0,52	0	0	0,14	0	0
AGPI	0,0793	0,94-1,06	0,94	0,43-0,53	0,48	0,55-0,93	0,13-0,37	0,24	0,35
Minerais (mg/100g)									
Al	Nd	0,22	0,37	0,19	0,53	0,32	0,33	0,29	0,4
Ar	Nd	0,56	0,93	1,44	1,49	1,18	0,18	1,18	0,57
Ca	15,5-17,8	10,61	5,71	12,37	6,09	10,44	20,87	8,35	7,11
Cr	Nd	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01
Cu	0,07-0,23	0,3	0,34	0,25	3,7	0,22	0,07	0,13	0,16
Fe	2,0-20,84	1,63	3,38	6,73	6,56	7,1	0,81	51,41	2,09
Mg	20,4-28,9	13,94	18	18,6	18	11,48	13	15,3	19,39
Mn	0,007-0,021	0,04	0,03	0,08	0,26	0,04	0,07	0,03	0,04
Hg	Nd	0,03	0,04	0,38	0,44	0,07	0,15	0,05	0,2
Mo	Nd	0	0,07	0,12	0,12	0,02	0,03	0,09	0
Ni	Nd	0	0	0	0	0	0	0	0
P	212-275	296	174	220	336	209	59,2	266	212
K	301-413	296	224	195	284	180	45	368	223
Se	8,8	21,7	15	142	48,12	26	15,59	48,55	22,76
Na	98,5- 858,3	132	73,21	184	55,41	85,72	22,38	52,4	118

Zn	2,0-3,59	1,08	1,45	1,73	3,48	1,7	1,66	1,95	2,44
Vitaminas Hidrossolúveis (mg/100g)									
B1-Tiamina	0,11	0,13	0,17	2,04	1,52	0,28	1,3	0,13	0,17
B2-Riboflavina	0,49	0,14	0,22	3,04	0,88	0,17	2,54	0,14	0,22
B3-Niacina	-	0,08	0,32	2,79	0,83	0,14	1,8	0,08	0,32
Ac. Pantotênico	-	0,36	0,33	5,97	1,72	0,23	1,63	0,36	0,33
B6- Piridoxina	-	0,2	0,37	12,88	7,01	0,65	178	0,2	0,37
B9- Ácido fólico	-	0,02	0,1	0,81	0,21	0,2	2,36	0,02	0,1
B12 – Cianocobalamina	1,13								
Vit C	-								
Vitaminas Lipossolúveis (mg/100g)									
Vit. A	-	0,002	0,006	0,069	15,66	0,003	0,002	0,008	0,009
Vit. E	-	0,07	0,09	0,09	0,61	0,08	0,10	0,08	0,08
Vit. D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vit. K	-	0,0038	0,011	0,0035	0,013	0,0046	0,012	0,009	0,002

Fontes: IFCT 2017; Queiroz et al., 2017; Madruga et al., 2019; USDA, 2019; Osório et al., 2019.

214 Tabela 2. Composição nutricional da carne e subprodutos comestíveis de ovinos.

	Carne	Cérebro	Coração	Rins	Fígado	Pulmão	Tripa	Baço	Língua
Composição Centesimal (g/100g), valor calórico total – VCT (Kcal/100g) e Colesterol (mg/100g)									
Umidade	74,05	78,36- 79,2	76,7-77,06	79,23-79,77	69,71-71,37	79,7-80,41	78,81	78,15-79,66	66,6-68,77
Cinzas	1,15	1,19-1,33	0,93-0,97	1,00-1,26	1,26-1,44	0,97-1,10	0,26	1,17-1,3	0,92-1,06
Proteínas	24	10,4-13,05	16,47-8,19	15,74-6,22	20,38-2,26	16,7-16,12	16,76	16,02-17,2	15,7-16,61
Gordura	8,1	7,29-8,58	3,66-5,68	2,92-2,95	4,87-5,02	2,41-2,6	4,05	3,05-3,1	13,53-17,17
VCT	175	118-122	106-122	92-97	134-139	87-95	104	92	187-222
Colesterol	66	1336-1352	112-135	299-337	371-430	431	113	250-262	156-210
Aminoácidos essenciais (g/100g de proteína)									
Triptofano	0,073	1,29	1,4	1,59	1,19	1,36	1,46	1,38	1,36
Histidina	0,198	5,54	5,93	5,08	4,39	4,56	4,72	5,05	5,71
Treonina	0,267	5,3	5,45	4,89	5,52	5,41	3,86	6,94	4,87
Valina	0,337	4,19	4,86	5,11	4,68	4,53	6,05	5,5	3,62
Metionina	0,160	6,04	5,56	5,04	5,12	6,63	5,33	7,04	5,22
Isoleucina	0,302	2,47	3,18	3,78	2,83	2,58	3,44	2,89	3,64
Leucina	0,487	5,21	6,77	6,34	6,2	5,02	5,78	5,9	5,45
Fenilalanina	0,253	6,83	6,45	5,61	5,66	7,43	7,17	6,55	6,79
Tirosina	0,210	4,23	3,81	4,36	3,67	3,37	4,42	3,34	3,78
Lisina	0,552	8,51	7,86	7,69	7,79	7,78	7,05	8,91	7,49
Aminoácidos não essenciais (g/100g de proteína)									
Ac. Asp.	0,550	5,28	5,5	6,65	5,17	8,33	8,76	6,76	6,28
Ac. Glu.	0,907	1,34	1,61	1,69	1,68	1,4	1,48	1,46	1,48
Serina	0,232	5,19	4,72	4,91	4,91	4,64	4,36	4,39	4,79
Glicina	0,305	3,89	4,23	4,9	4,79	5,48	5,11	4,38	4,3
Alanina	0,376	3,2	2,09	2,57	2,64	2,48	2,6	2,27	2,72
Arginina	0,371	13,47	13,75	12,78	10,93	10,53	10,8	12,11	14,42
Prolina	0,262	4,69	4,15	3,78	4,53	3,22	3,32	4,02	3,72
Cisteína	0,075	8,08	7,65	8,82	8,22	7,27	8,65	8,83	8,3
AAE+AAE	5,917	94,75	94,97	95,59	89,92	92,02	94,36	97,72	93,94
Ácidos Graxos Saturados (g/100g)									
12:00	0,01	0,00	0,02	0,00-0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,03-0,25

14:00	0,15	0,02-0,04	0,13-0,20	0,03-0,06	0,02-0,05	0,04	0,15	0,07	0,41-0,48
16:00	1,01	0,94-1,06	0,77-0,86	0,42-0,51	0,68	0,65	1,00	0,66	2,53-3,29
18:00	0,643	1,00-1,07	0,69-1,16	0,52-0,55	1,08-1,12	0,44	0,80	0,75	2,40-2,52
20:00	-	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
22:00	-	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24:00	-	0,05	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	0,00
AGS	3,35	2,04-2,19	1,68-2,25	1-1,12	1,82-1,94	0,89-1,14	1,96	1,03-1,53	5,59-6,63
Ácidos Graxos Mono Insaturados (g/100g)									
16:1	0,144	0,03-0,05	0,03-0,07	0,02-0,04	0,03-0,13	0,02	0,08	0,02	0,43-0,62
18:1	2,21	1,06-1,29	0,82-1,38	0,54-0,55	0,74-0,92	0,73	1,42	0,72	5,00-7,82
20:1	-	0,09	0,02-0,04	0,01-0,03	0,00	0,02	0,03	0,02	0,26
AGMI	2,37	1,18-1,55	0,87-1,6	0,59-0,63	0,77-1,05	0,67-0,77	1,53	0,76-0,81	5,88-8,46
Ácidos Graxos Poliinsaturados (g/100g)									
18:2	0,33	0,03-0,04	0,21-0,24	0,21-0,22	0,32-0,35	0,12	0,13	0,18	0,40-0,48
18:3	0,04	0,08	0,03-0,13	0,01-0,07	0,07	0,01	0,01	0,01	0,47-0,51
20:4	0,06	0,23-0,30	0,08-0,09	0,14-0,23	0,36	0,17	0,07	0,28	0,06-0,07
22:6 n-3	-	0,45-0,49	0,01-0,03	0,00-0,03	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00
AGPI	0,42	0,87-0,88	0,33-0,55	0,46-0,55	0,75-1,01	0,30-0,35	0,21	0,23-0,47	0,94-1,06
Minerais (mg/100g)									
Al	Nd	0,14	0,03	0,19	0,16	0,48	0,27	0,16	0,28
Ar	Nd	0,73	6,04	2,1	1,66	1,85	0,1	0,92	0,34
Ca	5 -7	9,0-10,27	6,0-6,79	13,0-14,15	5,92-7,0	7,74-10,0	8,0-14,85	9,0-11,49	8,05-9,0
Cr	Nd	0	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02	0,01	0,08
Cu	0,120	0,24-0,28	0,29-0,40	0,38-0,45	5,70-6,98	0,25-0,41	0,06	0,12-0,16	0,17-0,21
Fe	1,0-2,2	1,75-1,93	3,07-4,60	6,11-6,38	6,15-7,37	6,40-8,58	0,90-2,30	41,89-53,11	2,46-2,65
Mg	24	12,0-14,08	15,19-17,0	17,0-17,46	17,91-19,0	11,68-14,0	17,81-21,0	17,23-21,0	21,0-24,53
Mn	0,010	0,04	0,03-0,05	0,11-0,69	0,18-0,28	0,02-0,03	0,04-0,16	0,04-0,05	0,03-0,05
Hg	Nd	0,02	0,03	0,61	0,16	0,07	0,19	0,04	0,45
Mo	Nd	0	0	0,02	0,15	0,01	0	0,04	0
Ni	Nd	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
P	176 – 215	270,0-271,0	163,0-175,0	204,0-246,0	334,0-364,0	187,0-219,0	55,61-400,0	266,0-280,0	184,0-207,0
K	333	296,0-312,0	225,0-316,0	198,0-277,0	280,0-313,0	204,0-238,0	42,0-48,75	327,0-358,0	220,0-257,0
Se	Nd	34,6	33,3	127	43,38	16,12	13,92	64,53	23,2

Na	72	112,0-122,0	72,62-89,0	156,0-163,0	55,82-70,0	109,0-157,0	18,37-75,0	50,58-84,0	78,0-185,0
Zn	3,83	1,11-1,17	1,31-1,87	1,92-2,24	3,73-4,66	1,58-1,80	1,89-1,93	1,71-2,84	2,32-2,46
Vitaminas Hidrossolúveis (mg/100g)									
B1-Tiamina	0,102	0,12	0,15	0,07	0,34	0,17	0,02	0,07	0,35
B2-Riboflavina	0,267	0,21	0,2	0,23	0,3	0,35	0,08	0,23	0,31
B3-Niacina	6,29	2,66	2,78	2,75	5,43	15,66	0,63	5,42	5,51
Ac. Pantotênico	0,685	1,73	0,35	0,88	1,66	6,95	0,2	6,07	6,22
B6- Piridoxina	0,15	0,33	0,16	0,02	0,3	0,26	0,22	0,27	0,51
B9- Ácido fólico	0,023	1,86	2,4	13,89	2,17	206	1,87	3,19	46,21
B12 – Cianocobalamina	0,0026								
Vit C	1,0								
Vitaminas Lipossolúveis (mg/100g)									
Vit. A	0,045	0,0015	0,0047	0,067	14,106	0,0024	0,003	0,0066	0,0073
Vit. E	-	0,09	0,15	0,10	0,60	0,08	0,20	0,10	0,07
Vit. D	-								
Vit. K	-	0,0028	0,0097	0,0029	0,0147	0,005	0,011	0,0075	0,0015

Fontes: Pearson & Duttdson, 1988; IFCT 2017; Queiroz et al., 2017; Madruga et al., 2019; USDA, 2019.

218 *SUBPRODUTOS COMESTÍVEIS DE CAPRINOS E OVINOS*

219 Os subprodutos comestíveis do abate de caprinos e ovinos constituem fontes
220 significativas de nutrientes essenciais, assim como a própria carne; observando-se valores
221 nutricionais comparáveis entre estes. Na literatura científica, dados sobre o valor nutricional
222 dos subprodutos, são relativamente escassos, com números limitados disponíveis na internet na
223 forma de tabelas nutricionais de alimentos; sendo estes em número bem mais reduzidos para os
224 subprodutos de caprinos. Anderson (1988) descreveu a composição e o valor nutricional de
225 subprodutos comestíveis, crus e cozidos, de ovinos juntamente com outras espécies; Honikel
226 (2011) publicou a composição de macro e micro nutrientes nos subprodutos de diferentes
227 espécies, no entanto nenhum dado foi apresentado para os subprodutos de caprinos em ambas
228 revisões. Vale salientar que os resultados reportados incluem dados de análises químicas,
229 composição centesimal e colesterol, perfil de ácidos graxos, minerais dos subprodutos,
230 principalmente de alguns órgãos como cérebro, coração, fígado, língua de ovinos (Anderson,
231 1988; Honikel, 2011; Toldrá et al., 2012; Prates et al., 2011; Kim, 2011; Garcías-Llatas et al.,
232 2011).

233 Alguns outros estudos também abordaram a caracterização de aminoácidos, de gordura,
234 colesterol, umidade nos subprodutos de caprinos e ovinos. O perfil de aminoácidos encontrados
235 em órgão cárneos de bovinos, suínos e ovinos, demonstrou que, em geral, leucina, valina,
236 metionina e treonina estavam em maiores concentrações no fígado em comparação a outros
237 órgãos. No pulmão e baço, as concentrações de aminoácidos tenderam a ser mais baixos para a
238 maioria dos aminoácidos investigados. Além disso, destacou-se a o maior conteúdo de
239 triptofano no pâncreas (Schweigert, Bennett e Guthneck, 1953).

240 As características químicas de subprodutos (cérebro, coração, rins, fígado e língua do
241 local iraquiano) de ovinos e bovinos sob o efeito do churrasco e métodos de cozimento
242 convencionais também foi estudado (Mustafa, 1988). Entre as amostras que estavam cruas e

grelhadas o teor de umidade, gordura e colesterol variou significativamente. Amostras grelhadas e cozidas apresentaram maiores teores de gordura e colesterol, possivelmente devido a baixa umidade encontrada nestas amostras.

O efeito de uma dieta rica em cálcio sobre a caracterização química de fígado, rim, coração, *Longissimus dorsi* (LD) e *Bíceps femoral* (BF) de caprinos foi estudado (Park et al., 1991). Os resultados mostraram que a gordura e o colesterol foram influenciados pelo cálcio dietético, raça e tecido animal. Menor teor de colesterol foi encontrado no coração e fígado caprinos (167,5 e 214,2 mg/100g de tecido) e maior colesterol no rim (276,7 mg/100g de tecido).

Nas Tabelas 1 e 2 estão compilados, em detalhes, dados da composição centesimal, aminoácidos, lipídios, minerais e vitaminas para os subprodutos cárneos de caprinos e ovinos, onde discutiremos estas informações com foco nos valores levantados e artigos publicados.

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O componente predominante nos subprodutos cárneos comestíveis dos pequenos ruminantes é a umidade, com variações de 66 a 81%, sendo interessante notar que o nível mais elevado é encontrado na tripa de caprinos (80,9%), enquanto o teor mais baixo, na língua de ovinos (66,6%). Pulmão, coração, cérebro, também possuem elevados níveis de umidade, que variam de 76,7% a 80,3% (Tabelas 1 e 2).

Os subprodutos caprinos e ovinos se destacam no teor de proteínas, com percentuais que podem variando, em geral, de 15 a 20% (Tabelas 1 e 2), com pequenas exceções, provavelmente em função dos teores de outros componentes como umidade e lipídeos. Fígado, pulmão, coração e baço apresentam as maiores concentrações proteicas, com valores de 15 a 22%. O menor teor de proteína é detectado no cérebro.

Dentre os macros constituintes os percentuais de gordura dos subprodutos comestíveis de caprinos e ovinos apresentam maior variabilidade (<2% a > 17%). Sabe-se que os pequenos ruminantes tendem a depositar elevado teor de gordura visceral, principalmente os caprinos, o que justifica esta variação (Madruga, 2019). No entanto o teor de gordura é baixo, geralmente < 5% no pulmão, baço e rins; estes valores também foram reportados por Honikel (2011) para ovinos e outras espécies. Valores mais altos de gordura são encontrados em cérebro, coração, pâncreas e língua (> 5,68). Enfatiza-se que o conteúdo de gordura influencia nas propriedades físicas, químicas, sensoriais e nutricionais destes subprodutos (Anaeto et al., 2014).

Anderson (1988) enfatizou que os órgãos, fígado e rim, contêm valores negligenciáveis de carboidrato; Honikel (2011) reportou valores de 5% de carboidratos para fígado, com valores inferiores para outros órgãos de ovinos.

Autores como Park, Kouassi e Chin (1991) relataram pequenas diferenças para os teores de umidade, gordura total e conteúdo de colesterol do fígado, rim, coração e carne de caprinos. Hoffman, Laubscher e Leisenganget al (2013) reportaram o valor nutricional dos órgãos de cordeiros de duas raças sul-africanas, Dorper e Merino, observando que havia diferenças significativas em função da raça; no entanto os órgãos cérebro, rim, fígado, pulmão e baço de ambas as raças se apresentaram ricos em colesterol e, portanto, devem ser restritos em dietas humanas.

Calculando-se o valor calórico dos subprodutos, observa-se que todos aqueles com baixo teor de gordura e carboidratos fornecem valores inferiores a 100 kcal/100g (Tabelas 1 e 2); aportes calóricos superiores são observados para a língua, cérebro e fígado (>100 e >230 kcal/100g). Honikel (2011) reportou valores calóricos em subprodutos comestíveis de ovinos com variação de 95 a 150 kcal/100g.

Os subprodutos comestíveis de caprinos e ovinos apresentam elevado teor de colesterol (112 a 1350 mg/100g), alguns, como o cérebro, apresentam teores de até vinte vezes superiores

aos da carne caprina e ovina (50 a 70 mg/100g). Os rins, fígado, pulmão, pâncreas e baço apresentam teores de colesterol que variam de 250 a 371 mg, sendo três a cinco vezes maiores do que na carne magra. Em menor proporção têm-se a língua apresentando aproximadamente 135 mg de colesterol e o coração com 156 mg de colesterol/100g. Segundo Honikel (2011) o teor de colesterol não depende fortemente do teor de gordura, pois se trata de um constituinte das membranas celulares dos animais necessário para sua funcionalidade. É mais dependente do tamanho das células (área de superfície) do que do teor de gordura. Park, Kouassi e Chin (1991) reportaram pequenas diferenças nos teores de colesterol de fígado, rim e coração de caprinos de diferentes raças.

AMINOÁCIDOS

A composição dos aminoácidos mostra uma reduzida variação de valores entre subprodutos e espécies, sendo a composição de aminoácidos essenciais e não essenciais razoavelmente constantes (Tabelas 1 e 2). O conteúdo de aminoácidos essenciais de subprodutos de caprinos e ovinos é raramente descrito na literatura. Anderson (1988) revisou em uma tabela o conteúdo de aminoácidos de subprodutos carneos comestível de cordeiro e outras espécies de mamíferos. Queiroz et al. (2017a) investigaram o perfil de aminoácidos de vísceras caprinas confirmando que esses subprodutos são uma excelente alternativa para produção de novos produtos alimentícios ou ingredientes funcionais. O perfil de aminoácidos também foi reportado em produtos tradicionais elaborados com subprodutos de caprinos e ovinos, a exemplo do “sarapatel” (Brasil et al., 2014) e a buchada (Queiroz et al., 2013), produtos elaborados com vísceras de caprinos e ovinos.

Dentre os aminoácidos essenciais dos subprodutos de caprinos e ovinos se destacam a lisina, fenilalanina e metionina. Arginina e cistina são os aminoácidos não essenciais com maiores concentrações nos subprodutos em questão.

Quando o perfil de aminoácidos essenciais de uma proteína ideal é comparado com o encontrado em subprodutos de caprinos e ovinos, verifica-se que os percentuais de histidina e metionina são maiores que 100% em todos os subprodutos. As concentrações de lisina, fenilalanina e treonina, são superiores a 90%, com exceção apenas para o conteúdo de treonina nos pulmões (77,20% – 83,20% de ovinos e caprinos, respectivamente). Fígado (62,0% - 60,20%) e coração (67,70% - 63,50%) apresentam as maiores concentrações de leucina, sendo que todos os subprodutos apresentam valores superiores a 50%, exceto os rins caprinos com 46,40%. Todos os subprodutos apresentam ainda valores percentuais de triptofano superiores a 80%, excluindo-se apenas o fígado (74,38% - 76,25% de ovinos e caprinos, respectivamente).

Nos subprodutos comestíveis de caprinos e ovinos estão presentes teor de isoleucina superior a 35%, exceto rins e tripa, e a língua ovina, apresentando valores superiores a 50%. Cérebro (59,86%) e língua (51,71%) de ovinos apresentam as menores concentrações de valina, tendo os demais subprodutos percentuais acima de 60% desse aminoácido (Tabelas 1 e 2).

Aristoy e Toldrá (2011) ressaltaram que os aminoácidos essenciais em subprodutos cárneos são um grupo muito importante de nutrientes, que não sofrem perdas pelo cozimento e processamento, via reações de degradação secundária como Maillard ou racemização e cross-linking reações, devido ao baixo teor de carboidratos.

ÁCIDOS GRAXOS

A composição de ácidos graxos dos subprodutos de caprinos e ovinos tem sido estudada. Algumas investigações (Anderson, 1988; Park; Washington, 1993; Madruga et al., 2007; Hoffman; Laubscher; Leisegang, 2013; Queiroz et al., 2013; Brasil et al., 2014; Umaraw et al., 2018) tem a composição de ácidos graxos em alguns órgãos e vísceras destas duas espécies.

No perfil de ácidos graxos destes subprodutos observa-se maior concentração de ácidos graxos saturados, com destaque para os ácidos palmítico e esteárico. Ácidos graxos

monoinsaturados (ácido oleico) e poli-insaturados (ácido linoleico e ácido araquidônico) se sobressaem em maiores concentrações nos subprodutos como língua e cérebro. Valores mais reduzidos de ácidos graxos saturados e monoinsaturados são encontrados no pulmão, rins e baço, os quais também tem reduzido teor de gorduras (Tabelas 1 e 2).

A soma de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados é maior que o teor de ácidos graxos saturados (SFA), indicando-se que os SFA estão em percentuais $\leq 50\%$. Enquanto observa-se valores superiores a 45% para os ácidos graxos monoinsaturados presentes nos subprodutos caprinos, o mesmo tipo de gordura saudável encontrado no azeite de oliva. Acredita-se que as gorduras monoinsaturadas possam diminuir o colesterol total e reduzir o risco de doenças cardíacas (Rhee et al., 2000). De 32 a 57% da gordura saturada dos subprodutos ovinos e caprinos, respectivamente, é de ácido esteárico que tem efeito neutro nos níveis de colesterol total em humanos (Banskalieva et al., 2000).

Anderson (1988) relatou os ácidos oleico, octadecanóico, hexadecanóico e linoléico como os principais componentes no perfil de ácidos graxos de vísceras de cordeiro. Além disso, observa-se que as porcentagens médias de ácidos graxos hexadecanóico, octadecanóico e oleico no subproduto de caprinos são semelhantes às relatadas para a carne caprina (Madruga et al., 2006; Banskalieva et al., 2000; Rhee et al., 2000).

Composição de ácidos graxos de fígado, coração, rim, *Longissimus dorsi* (LD) e *Biceps femoris* (BF) das raças caprinas Alpina e Nubiana foram avaliados por Park e Washington (1993); observando que todas as amostras de órgãos tiveram maiores concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) do que o LD e BF músculos ($P < 0,001$). Os órgãos também continham significativamente ($P < 0,01$) maior percentual de ácidos graxos saturados (SFA). Brasil et al. (2014), Queiroz et al. (2013), Madruga et al. (2007) reportaram que a composição de ácidos graxos da “buchada”, um subproduto cárneo caprino, continha principalmente ácido esteárico, ácido oleico, ácido palmítico e baixos níveis de ácidos graxos insaturados.

Hoffman, Laubscher e Leisegang (2013) reportaram que os perfis de ácidos graxos diferiam entre órgãos e raças; no entanto, poucas diferenças foram observadas no total de SFA e MUFA. Dorper heart (1,8%) teve menor PUFA total do que coração Merino (7,3%), $p < 0,05$. Todos os órgãos apresentaram razões P: S favoráveis, com exceção da língua, o coração e o estômago. O cérebro, os pulmões e os testículos de ovinos das raças Dorper e Merino tinham proporções n-6 / n-3 favoráveis. Umaraw et al. (2018) observaram que a análise do perfil de ácidos graxos de vísceras e músculo longissimus lumborum de caprinos Barbari apresentou superioridade na relação PUFA / SFA e relação n6 / n3 das vísceras sobre o músculo caprino.

MINERAIS

São escassas as informações sobre o perfil de minerais em subprodutos comestíveis de caprinos e ovinos, observando-se que os subprodutos têm sido pouco analisados e os dados tem predominância para o fígado e os rins. García-Llatas et al. (2011) registraram que em termos nutricionais, a concentração de minerais é menor nos órgãos e vísceras em comparação com o músculo, reportando dados de microminerais em subprodutos de diferentes espécies, incluindo ovinos.

Anderson (1988) reportou a composição de minerais em vísceras e músculo crus e cozidos de ovinos, observando que o cozimento, tende em geral a aumentar os níveis de minerais como cálcio, magnésio, fosforo, zinco, cobre e manganês, em consequência da concentração.

Umaraw et al. (2018) observaram, ao analisar músculo *longíssimos lumborum* e subprodutos de cabritos Barbari (*Capra hircus*) quanto ao seu perfil mineral, diferença ($P < 0,05$) entre a carne e os subprodutos. O rim apresentou maior teor de sódio (202,39 mg / 100 g), enquanto o teor de potássio foi maior nos testículos (362,61 mg / 100 g). Cobre, ferro e zinco foram encontrados em maiores concentrações no fígado (6,97 mg / 100 g), baço (31,16 mg /

100 g) e músculo (4,15 mg / 100 g), respectivamente. Concluindo, os subprodutos comestíveis contam com altas concentrações de minerais essenciais que podem fornecer uma quantidade apreciável de doses diárias recomendadas.

Os minerais detectados em maiores proporções nos subprodutos de caprinos e ovinos são potássio, fósforo e sódio (Tabelas 1 e 2). Os níveis de fósforo e potássio são mais elevados no pulmão, cérebro, baço, rim, língua e fígado. O sódio tem destaque na língua, rins e cérebro, valores estes mais elevados que na carne de sua respectiva espécie.

Detalhando-se por subprodutos observa-se que os rins apresentam maiores proporções de cálcio, potássio, selênio e sódio. O coração destaca-se por seu conteúdo de arsênio e potássio, enquanto o pâncreas, em cálcio e magnésio. O baço apresenta elevada proporção de ferro, magnésio e potássio. O fígado mostra-se rico em cobre, fósforo e zinco e a língua em magnésio.

O conteúdo de ferro é mais abundante no baço, onde varia de 51,4 mg nos ovinos a 53,1 mg nos caprinos. Rins, pulmão e fígado apresentam teores de ferro que variam de 6,11 mg a 8,58 mg. O magnésio é encontrado em maior percentual na língua (19,4 a 25,5 mg respectivamente), sendo o menor nos pulmões (11,5 a 14 mg). O conteúdo de cálcio é mais elevado no pâncreas, variando de 14,85 mg para os ovinos a 20,87 mg nos caprinos. A maioria dos subprodutos possuem altos valores de selênio, com destaque nos rins (127 a 142 mg), seguidos pelo baço (48,5 a 64,5 mg), fígado (43,4 a 48,1 mg). O teor de zinco é mais elevado no fígado, seguido da língua, baço e rins.

VITAMINAS

Dentre os micronutrientes, as vitaminas lipó e hidrossolúveis de subprodutos de caprinos e ovinos são raramente reportadas. A maioria dos subprodutos comestíveis (coração, rim, fígado, pâncreas) é excelente fonte das vitaminas do complexo B. Além de que a vitamina

A, geralmente é encontrada em concentrações superiores nas vísceras em comparação com a carne. Vitamina C também tem destaque no rim, fígado e pâncreas.

Kim (2011) e Anderson (1988) listam a composição vitamínica nos subprodutos crus de ovinos; observando-se perdas razoáveis no conteúdo de vitaminas durante o processo de cozimento.

Quanto a presença de vitaminas (Tabelas 1 e 2) pode-se observar que os valores de tiamina e riboflavina são semelhantes entre os ovinos e caprinos, e que são essenciais ao crescimento, ao metabolismo de carboidratos e proteínas, e no combate a anemia (Madruga, 2019). Fígado, língua e pulmão contêm as maiores quantidades destas vitaminas e os produtos restantes contêm <0,15 mg de tiamina e <0,22 mg de riboflavina.

A tiamina, vitamina essencial para o bom funcionamento das células nervosas e do cérebro, quando submetida a altas temperaturas sofre degradação térmica podendo liberar compostos voláteis responsáveis pelo odor e sabor característicos “cárneo”, e por isso pode ser um bom precursor de aroma de carne durante o processo de cozimento (Milani et al., 2014).

O fígado apresenta destaque na quantidade de niacina, sendo considerada melhor fonte entre os subprodutos. Com exceção para o pulmão e rins, os demais subprodutos apresentam valores similares de vitamina B-6 entre as espécies, com valores que variam de 0,16 a 0,51 mg/100g. O conteúdo de ácido pantotênico é maior no pulmão, baço e língua. Pulmão e língua são as melhores fontes de vitamina B9, em ambos os ruminantes (caprinos e ovinos).

4. Uso cultural e culinário de subprodutos comestíveis de caprinos e ovinos

Em geral, o consumo de vísceras faz parte do cardápio humano, com sua ingestão diária sob diferentes formas, em diferentes países, oferecendo uma variedade de alimentos que são nutricionalmente atrativos. Órgãos comestíveis são altamente apreciados no Sudeste Asiático e na África, enquanto a demanda é variável e baixa em Austrália e EUA, respectivamente (Fatma & Mahdey, 2010).

Por exemplo, o coração é usado como carne de mesa, frequentemente assados ou refogados e também pode ser utilizado como ingrediente em processados cárneos (Jayathilakan et al., 2012). Os rins podem ser cozidos, grelhados, refogados e fritos (Ockerman; Hansen, 2000). Fígado, o mais consumido, pode ser usado na preparação de embutido e patê (Dalmás et al., 2011).

Nos Estados Unidos e Europa, o fígado de cordeiro apresenta boa aceitação devido ao sabor e textura leve (Mazhangara et al., 2019). Pulmões de cordeiros são utilizados em alguns tipos de salsichas e outros processados cárneos (Jayathilakan et al., 2012; Alao et al., 2017).

Intestinos tem sua principal aplicação como invólucro para linguiças e salsichas, mas em alguns países também podem ser utilizados como alimento após serem fervidos (Ockerman; Hansen, 2000). As orelhas são defumadas e salgadas, ou cozidas com os pés. O baço geralmente é consumido frito ou utilizado na preparação de chouriço (Jayathilakan et al., 2012).

Paralelamente, os subprodutos de caprinos e ovinos, vísceras, órgão e sangue, também se destacam por fazer parte da identidade cultural de diferentes países, desempenhando um papel muito importante por constituírem elementos do patrimônio gastronômico e nutricional, sendo estes consumidos por séculos. Muitos desses produtos, denominados por “alimentos cárneos étnicos” são desconhecidos do público em geral, porém são à base de alimentos para populações de países em desenvolvimento, apresentando qualidades sensoriais peculiares e, ao

mesmo tempo, com elevados valores nutricionais e características nutracêuticas (Gagaoua et al., 2018).

Os “alimentos étnicos” são únicos, específicos da região e da comunidade, e alguns são exóticos e raros, geralmente incluem carnes, vísceras, órgãos e sangue. Alguns desses “produtos cárneos étnicos”, como salsichas, carnes secas ou defumadas, são vendidos nos mercados locais, contribuindo assim para a economia local (Steingrímisdóttir; Thorkelsson; Eythórsdóttir, 2018).

A preparação da maioria dos “alimentos étnicos cárneos caprinos/ovinos” tem suas próprias características e aspectos organolépticos típicos, que resultam principalmente da adição de especiarias e ervas durante seu preparo, estes condimentos derivam em uma importante atividade antimicrobiana e na melhoria da qualidade microbiológica dos produtos finais (Gagaoua et al., 2018).

Teixeira et al. (2020), Gagaoua e Boudechicha. (2018), Steingrímisdóttir, Thorkelsson e Eythórsdóttir (2018) publicaram artigos enfocando estudos atuais da qualidade dos “alimentos cárneos caprinos/ovinos étnicos” observando-se que em sua maioria estes “alimentos cárneos étnicos” (produtos tradicionais) são produzidos apenas com a carne de caprinos e ovinos, a exemplo da “Cecina de cabra”, “Cecina de castron”, “Violin di capra”, etc; no entanto vários outros “alimentos cárneos étnicos” são elaborados com as vísceras, sangue, órgãos etc. Publicações limitadas estão disponíveis sobre aspectos microbiológicos e nutricionais destes produtos cárneos, diferente do que ocorre com os produtos cárneos tradicionais de suínos, bovinos, aves, etc que tem sido amplamente estudado.

“Alimentos cárneos étnicos” produzidos com subprodutos caprinos/ovinos estão listados na Tabela 3, dentre estes se citam: picados de vísceras e sangue/ “buchada de bode” e “sarapatel” no Brasil; salsichas fermentadas de sangue/ “Blóðmör” e fígado de ovinos/ “Lifrarpylsa” típicos da Islandia; Sausinha de cordeiro preparada com subprodutos/ “Osbanda

consumidos na Argélia, Tunísia, Líbia e Marrocos e “Kourdass” tradicionais do Norte da África e Mediterrâneo (Brasil et al., 2014; Queiroz et al., 2013; Gagaoua; Boldechicha, 2018; Teixeira et al., 2020).

“Alimentos cárneos étnicos” têm sido reportados em alguns artigos, a “buchada” e o “sarapatel”, que constituem pratos típicos do Nordeste brasileiro, sendo comercializadas em restaurantes, bares, feiras livres ou mesmo preparado em casa, contendo coração, pulmão, fígado, intestino, estômago, sangue, tomate, pimentão, coentro, cebola, alho e especiarias (Queiroz et al., 2013; Brasil et al., 2014), foram objeto de estudos reportados por Costa et al. (2005), Madruga et al. (2004, 2007), Santos et al. (2008), Queiroz et al. (2013), Brasil et al. (2014), Albuquerque et al. (2019), que afirmaram a viabilidade do uso de subprodutos caprinos e ovinos na elaboração destes produtos cárneo, representando um orçamento adicional superior a 55% com relação ao valor das carcaças, além de ressaltarem o alto valor nutricional do produto final, principalmente devido ao elevado conteúdo proteico e perfil satisfatório de ácidos graxos e presença de aminoácidos essenciais, seus aspectos microbiológicos e importância social.

Costa et al. (2005) avaliaram as condições microbiológicas de buchada caprina pré-cozida, observando práticas higiênico-sanitárias inadequadas, além da necessidade de implementação de boas práticas de fabricação, a fim de garantir produtos com maior vida útil e padrões de qualidade desejáveis. Queiroz et al. (2013) e Brasil et al. (2014) avaliaram a qualidade microbiológica de buchada/sarapatel vendidos sob diferentes condições – feiras livre, açougues e supermercados sob refrigeração, congelado ou em temperatura ambiente - observando ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*; altas contagens de coliformes totais e termotolerantes, *Clostridium* sulfito-redutor e *Staphylococcus* coagulase-positivo foram detectados; indicando que as condições microbiológicas insatisfatórias levam a necessidade de melhoria nos aspectos sanitários do processamento e venda destes produtos.

Considerando as altas contagens reportadas em estudos prévios, Albuquerque et al. (2019) estudaram o efeito dos ácidos cítrico e málico na segurança alimentar da buchada ovina, reportando que a adição desses ácidos orgânicos diminuiu o pH e umidade das amostras, aumentando a acidez, sendo fatores determinantes como barreiras ao crescimento microbiano, sem interferir negativamente nos atributos sensoriais.

O perfil de componentes gordurosos (gordura, fosfolipídios, colesterol, ácidos graxos) foi analisado em cinco formulações de buchada caprina elaborada com vísceras e sangue observando-se que os componentes gordurosos foram mais elevados do que na carne caprina, os principais ácidos graxos foram o ácido esteárico, ácido oleico, ácido palmítico e baixos níveis de ácidos graxos insaturados (Madruga et al., 2007).

Albuquerque et al. (2019) enfatizaram que as formulações de buchada ovina exibiram alto percentual de proteína (24,75 – 27,04%) e reduzido teor de gordura (< 5%); no entanto, Santos et al. (2008), Queiroz et al. (2013), Brasil et al. (2014) ao quantificarem a composição química da buchada/sarapatel observaram percentuais de proteína (12 a 18%) inferiores e de gorduras superiores (> 5%). Estes autores comprovaram que a buchada/sarapatel se trata de um alimento nutritivo, com alto teor de proteína, gordura (9%) e perfis de ácidos graxos e aminoácidos importantes, representando uma alternativa a utilização de subprodutos como sangue e vísceras de caprinos e ovinos.

Artigos também têm reportado estudos voltados ao desenvolvimento de produtos cárneos processados com subprodutos (vísceras, sangue, órgãos) destes pequenos ruminantes, mas que não fazem parte do patrimônio gastronômico, a exemplo de chouriço defumado (Dalmás et al., 2012; Silva et al., 2013; Silva et al., 2014) e patês (Dalmás et al., 2011; Amaral et al., 2013; Amaral et al., 2015; Teixeira et al., 2019).

O preparo de linguiça defumada elaborada com sangue, vísceras e retraços de carne caprina foi avaliada por Silva et al. (2013) e Dalmás et al. (2012). Ficou evidenciado que esse

produto é rico em proteínas de alto valor biológico, aminoácidos essenciais, ácidos graxos e ferro, e obteve elevada aceitação sensorial (superior a 80%). A linguiça defumada apresentou características sensoriais de melhor sabor e aroma e se sobressaiu as demais formulações por apresentar elevado conteúdo de ferro e preferência na avaliação sensorial.

A utilização de sangue, fígado e aparas de carne caprinos na preparação de um patê caprino revelou um produto de alto valor agregado. As principais características nutricionais obtidas das formulações em estudo foram o elevado teor de proteína e ferro no produto, e propriedades físico-químicas características que atenderam às recomendações legais (Dalmás et al., 2011). A qualidade nutricional de um patê feito com sangue, fígado e aparas de carne de ovinos foi avaliada por Amaral et al. (2013), indicando conteúdo significativo de aminoácidos essenciais, proteínas (15,1%), ferro e ácido linoleico (16,68%), e boa aceitação sensorial, indicando que o patê seria uma possibilidade de agregar valor a estes subprodutos ovinos.

A elaboração de patês de carne ovina e caprina com diferentes proporções de gordura (barriga suína ou azeite) estudados por Teixeira et al. (2019), apresentaram baixo teor de gordura (9,7-18,2%) e elevado valor de proteína (22 – 24%). Os produtos obtidos se mostraram balanceados em gorduras de acordo com as recomendações alimentares e demonstraram uma possibilidade de valorização da carne destes animais.

Os diversos resultados obtidos nos estudos supracitados indicam que a utilização de subprodutos do abate de caprinos e ovinos é considerada uma opção viável e interessante para obtenção de novos produtos alimentícios com qualidades nutricionais desejáveis. A utilização desses componentes permite ainda ampliar a variedade de produtos ofertados pelos produtores, gerando renda e promovendo o desenvolvimento desta cadeia produtiva.

565 Tabela 3. Produtos caprinos e ovinos processados a partir de subprodutos.

Goat/lamb ethnic meat foods			
Denominação	Origem	Decrição	Referencia
Blóðmör	Iceland	Tipo salsicha(sangue de cordeiro, em conserva e fermentado)	Steingrímisdóttir; Thorkelsson; Eythórsdóttir, 2018.
Lifrarpylsa	Iceland	Tipo salsicha(sangue de cordeiro, em conserva e fermentado)	Steingrímisdóttir; Thorkelsson; Eythórsdóttir, 2018.
Osmana	Argélia, Tunísia, Líbia e Marrocos	Tipo salsicha (subprodutos de cordeiro – coração, fígado, baço e rins)	Gagaoua et al., 2018.
Kourdass	North Africa, Mediterraneo	Tipo salsicha (subprodutos de cordeiro - estômago, intestinos, fígado, pulmão, baço e gordura)	Gagaoua et al., 2018.
Geema	Kumano Himalaias/ Nordeste da Índia	Tipo salsicha (carne caprina picada, sangue fresco, colocado no intestino delgado de cabra).	Svanberg et al., 2015.
Arija	Kumano Himalaias/ Nordeste da Índia	Tipo salsicha (carne caprina picada, pulmões de cabra, recheados em intestinos grosso de cabra).	Rai; Tamang; Palni, 2010.
Mcharmila	Argélia e Marrocos	Prato de cordeiro preparado com fígado picado, especiarias, cozinhado 20/30 min.	Gagaoua et al., 2018.
Buchada de Bode	Nordeste do Brasil	Prato caprino preparado com subprodutos picadas (coração, pulmões, fígado, intestino, sangue, especiarias) recheado no estômago de cabra / cordeiro, costurado e cozido.	Queiroz et al., 2013, Santos et al., 2007, Madruga et al., 2007, Costa et al., 2005.
Buchada ovina	Sangue, vísceras	Prato de cordeiro preparado com subprodutos picadas (coração, pulmões, fígado, intestino, sangue, especiarias) recheado no estômago de cabra / cordeiro, costurado e cozido.	Albuquerque et al., 2019.
Sarapatel	Nordeste do Brasil	Goat and lamb dish prepared with chopped offal (heart, lungs, liver, intestine, blood, spices) and cooked.	Brasil et al., 2014.
Tarfa-gara	Argélia	Prato de cabra e cordeiro preparado com subprodutos picadas (coração, pulmões, fígado, intestino, sangue, especiarias) e cozido.	Gagaoua et al., 2018.
Klaya	Tunísia	Produto pronto para comer de cordeiro, preparado com carne e	Gagaoua et al., 2018.

		vísceras (fígado, rim, gordura, temperos) fervido e frito em azeite.	
Hrútspungar	Iceland	Prato de cordeiro preparado com testículos prensados	Steingrímssdóttir; Thorkelsson; Eythórsdóttir, 2018.
Kheuri	Sikkim Índia	Mistura de iaque ou bife recheado e pressionado no estômago da ovelha e pendurado ao ar livre por 1-2 meses.	Rai; Tamang; Palni, 2010.
Goat/lamb offal meat products			
Chouriço defumando	caprino	Sangue, víscera	Dalmás et al. (2012) Silva et al. (2013)
Chouriço caprino		Coração, rins	Silva et al. (2014)
Patê caprino		Sangue, fígado	Dalmás et al. (2011)
Patê ovino		Sangue, fígado, retraços de carne	Amaral et al. (2013), Amaral et al. (2015)
Patê caprino e ovino		Fígado	Hamzeh et al. (2016)
Patê caprino e ovino		Fígado	Teixeira et al. (2019)

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

5. Aplicação dos subprodutos de caprinos e ovinos na obtenção de novos ingredientes

Com uma abordagem de inovação podem ser aplicados aos subprodutos processos biotecnológicos em virtude do seu potencial nutricional característico. Portanto, o aproveitamento de subprodutos de pequenos ruminantes vai além da elaboração de pratos tradicionais e produtos cárneos processados para consumo humano, considerando que um melhor aproveitamento dos subprodutos possibilita a redução do impacto ambiental, ao mesmo tempo que viabiliza a produção de novos ingredientes e produtos. Com isto, diferentes processos e métodos tecnológicos são aplicados aos subprodutos para obtenção de produtos com funcionalidades diversas.

Devido a sua elevada composição em proteínas e aminoacídica diferenciada, os subprodutos têm sido amplamente utilizados de forma hidrolisada (Peinado; Koutsidis; Ames, 2016; Lynch et al., 2018). O processo de hidrólise consiste na quebra da ligação peptídica das proteínas, resultando na liberação de peptídeos de tamanhos moleculares diversos, com sequenciamento de aminoácidos distintos e aminoácidos livres (Martínez-Alvarez; Chamorro; Brenes, 2015).

Trabalhos de revisão foram publicados sobre a utilização de subprodutos cárneos para obtenção de peptídeos, ressaltando seu valor nutricional, propriedades funcionais modificadas ou pela capacidade em desbloquear bioatividades (Di Bernardini et al., 2011; Bah et al., 2016; Lafarga; Álvarez; Hayes, 2017; Bezerra et al., 2020).

A hidrólise pode ser realizada por métodos enzimático, químico ou térmico. Os métodos químico e térmico são considerados como de difícil controle e resultam produtos de menor qualidade nutricional e bioativa. Escolhidos preferencialmente nas indústrias alimentar e farmacêutica, e mais usualmente aplicados, estão os métodos que se fundamentam no uso de enzimas. Este método apresenta vantagens em relação aos demais, por não usar solventes

orgânicos ou produtos químicos que apresentem toxicidade, além de ser rápido e controlável (Ngo et al., 2012; Benhabiles et al., 2012).

As propriedades assumidas pelo hidrolisado final dependerão fundamentalmente do controle do grau de hidrólise (GH). O GH é definido como a porcentagem do total de ligações peptídicas hidrolisadas ao final do processo hidrolítico, considerando que se a proteína é integralmente transformada em aminoácidos livres teremos um GH de 100%. Em geral, quando se obtém um elevado GH significa que foram formados peptídeos com baixa massa molecular; além de elevado teor de aminoácidos livres; aumento no rendimento de recuperação de proteína-nitrogênio; melhor solubilidade e provavelmente sabor mais amargo (Zhan et al., 2013; Peinado; Koutsidis; Ames, 2016).

Estudos foram realizados hidrolisando especificamente subprodutos do abate de caprinos e ovinos (Tabela 4). Queiroz et al. (2017b) observaram após caracterização química, o uso potencial de vísceras caprinas na utilização de hidrolisados proteicos e concluiu que o perfil proteico encontrado nesses subprodutos (presença majoritária dos aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina e glicina) indicam seu possível uso como um flavorizante/intensificador de sabor. Além disso, os hidrolisados obtidos apresentaram propriedades funcionais tecnológicas significativas, como solubilidade, capacidade de retenção de óleo, propriedades emulsionantes e atividade antioxidante.

As condições de processo de hidrólise proteica a partir de vísceras de ovinos (estômago e intestino) foram estudadas por Meshginfar et al. (2014) com o objetivo de atingir a máxima atividade antioxidante do hidrolisado. O hidrolisado obtido apresentou alto percentual de proteína (83,78%) e baixo teor de gordura (0,34%), além de exibir maior atividade antioxidante DPPH com 68,21%, tornando possível o seu uso como um antioxidante natural com alto valor nutritivo.

Outro estudo envolvendo a produção de hidrolisados proteicos preparado a partir da massa visceral de ovinos (estômago, intestino grosso e delgado), Bhaskar et al. (2007) concluíram que estes subprodutos apresentaram potencial considerável para produção de hidrolisados e exibiram altas concentrações de alguns aminoácidos essenciais.

Além disso, o hidrolisado proteico foi caracterizado pela presença de peptídeos de baixo peso molecular, o que possivelmente indica a presença de bioatividade desses peptídeos. Os valores relativamente altos da pontuação de aminoácidos corrigida para digestibilidade de proteína e a digestibilidade in vitro estudadas indicaram o uso adequado deste hidrolisado como suplemento nutricional em vários alimentos (Bhaskar et al., 2007).

Tabela 4. Hidrolisados proteicos de subprodutos do abate de caprinos e ovinos.

Produtos	Subprodutos	Referencia
Flavorizante/Intensificador de sabor	Fígado, coração e pulmão	Queiroz et al. (2017b)
Antioxidante natural	Estômago e intestino	Meshginfar et al. (2014)
Suplemento nutricional	Estômago, intestino grosso e delgado	Bhaskar et al. (2007)
Aditivo alimentar	Plasma sanguíneo	Hou et al. (2019)
Aditivo e antioxidante natural	Vísceras	Meshginfar et al. (2017)
Antioxidante natural	Abomaso	Liu; Aisa; Yili. (2018)
Colágeno	Osso, cartilagem, aparas de carcaça e carne	Vidal et al. (2020)
Flavorizante	Osso	Zhan et al. (2013)

Usando plasma de ovelha como matéria-prima, três peptídeos foram isolados e caracterizados de diferentes frações provenientes de hidrolisado proteico com alcalase. O hidrolisado obtido exibiu considerável atividade do Poder Antioxidante pela Redução Férrica (FRAP) e atividade de eliminação de radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). As sequências encontradas incluíam aminoácidos que anteriormente foram relacionados como contribuintes principais às propriedades antioxidantes do peptídeo. Assim, o plasma de ovelha foi considerado boa fonte de peptídeos antioxidantes possibilitando seu uso

como aditivo alimentar útil e material bioativo, além de fornecer novas oportunidades de utilização de subprodutos de sangue animal (Hou et al., 2019).

O efeito da adição de hidrolisado proteico de vísceras de ovinos em pó na estabilidade oxidativa de duas matrizes (óleo de soja e a salsicha de frango) foi avaliado por Meshginfar et al. (2017). A pesquisa revelou que uma concentração de 700 ppm do hidrolisado de vísceras foi capaz de controlar a oxidação no óleo de soja e além disso, um efeito considerável de estabilidade da salsicha de frango como produto alimentar foi observado. Revelando que o hidrolisado em estudo pode ser usado em óleos ou produtos que contenham lipídios, a exemplo da salsicha, como aditivo enriquecedor e como antioxidante natural.

O uso de hidrolisados de proteínas de abomaso de ovinos para obtenção de peptídeos antioxidantes revelaram que os peptídeos purificados eram antioxidantes naturais e sugeriram sua utilização como aditivos alimentares e produtos farmacêuticos (Liu; Aisa; Yili, 2018).

Portanto, o processo de hidrólise enzimática é capaz de melhorar a funcionalidade da proteína quanto as suas características funcionais, sensoriais e físico-químicas. Podendo assim ser empregados para suplementar e obter novos produtos alimentícios, fornecer propriedades funcionais e para reduzir o potencial alergênico de alimentos e produzir componentes de sabor (Kumar et al., 2012).

Além da utilização do processo de hidrólise em subprodutos, a extração de colágeno de subprodutos de diferentes espécies apresenta-se como promissora e está sendo despertada por pesquisadores (Araújo et al., 2018a; Araújo et al., 2018b; Cordeiro et al., 2019).

Vidal et al. (2020) extraíram e caracterizaram colágeno dos subprodutos do abate de ovinos obtendo valores de rendimento de 18,0% e 12,5% para subprodutos de cordeiros e ovelhas, respectivamente. Além disso, os colágenos extraídos revelaram importantes propriedades tecnológicas (solubilidade em ácido, formação de espuma, poder emulsificante)

que permitem sua aplicação em produtos alimentícios, agregando valor e atribuindo um destino sustentável desses subprodutos do abate.

Cordeiro et al. (2020) estudaram a obtenção de moléculas aromatizantes a partir de hidrolisados de subprodutos caprinos, enfatizando a ação térmica durante o processamento. Concluíram que a aplicação de dois tratamentos térmicos resultou na produção de hidrolisados proteicos com diferentes perfis voláteis. O hidrolisado obtido sem tratamento térmico prévio, mas com autoclavagem apresentou maior concentração de moléculas precursoras envolvidas nas reações de formação do sabor cárneo, além de contribuir na geração de composto heterocíclicos, impactando na qualidade do aroma dos hidrolisados caprinos.

FLAVORIZANTES OBTIDOS DE SUBPRODUTOS DE CAPRINOS E OVINOS

Sabor é a impressão sensorial percebida através da combinação de gosto e odor, e é identificado como uma das mais importantes características relevantes na qualidade da carne caprina e ovina na decisão de compra do consumidor (Khan; Jo; Tariq, 2015). Ao contrário dos componentes de sabor, que geralmente não são voláteis, os componentes de odor compreendem uma combinação de compostos ativos que são concebidos através de moléculas orgânicas voláteis. O complexo sistema de aromas está relacionado às interações entre estes compostos voláteis e demais elementos presentes no alimento (Anandharamakrishnan; Ishwarya, 2015).

Compostos solúveis de baixo peso molecular e gordura são os principais precursores capazes de conferir o flavor de carne cozida (Madruga et al., 2010). A reação de Maillard, oxidação lipídica e degradação de vitaminas são as principais reações envolvidas no desencadeamento do aroma da carne cozida. Além destes, fatores como alimentação, sexo, idade e raça do animal, condições de cozimento e envelhecimento, contribuem para o desdobramento deste aroma (Khan; Jo; Tariq, 2015).

A qualidade atribuída ao aroma de um hidrolisado proteico dependerá da qualidade inicial da matéria-prima, que influencia o odor e sabor. O grau de hidrólise terá consequência na percepção sensorial e sofre influência do tipo e quantidade da enzima utilizada, do pH e temperatura da reação, bem como da proporção água:substrato utilizadas (Madruga, et al., 2010; Zhan et al., 2013). O calor é responsável pelo aumento dos compostos voláteis principais, e não apenas hidrolisa a proteína, mas também afeta o tipo e a contração de peptídeos (Sukkhown et al., 2017). As condições adequadas de hidrólise criam a reação para se obter um peptídeo funcional (Lynch et al., 2018; Martínez-Alvarez; Chamorro; Brenes, 2015; Halim; Yusof; Sarbon, 2016; Toldrá et al., 2018).

Ao longo do processo de hidrólise proteica ocorre a formação de peptídeos, aminoácidos livres e compostos voláteis que, em conjunto, apresentam aroma característico, possibilitando um direcionamento de aplicação do hidrolisado proteico como flavorizante alimentício (Mora; Reig; Toldrá, 2014; Queiroz et al., 2017b). Ao controlar o grau de hidrólise é possível obter diferentes constituições desses precursores e podendo gerar considerável diferença no sabor devido aos diferentes graus de formação de voláteis em condições de reação térmica. Dessa forma evidencia-se o papel importante da reação térmica no sabor (Zhan et al., 2013).

Hidrolisados proteicos obtidos a partir de subprodutos tem sido utilizados para produzir componentes de sabor (Peinado; Koutsidis; Ames, 2016; Kumar et al., 2012; Zhan et al., 2013). Informações encontram-se disponíveis a respeito do *flavor* das carnes de frango, bovina, suína e de pescado; no entanto, dados publicados sobre o *flavor* de caprinos e ovinos ainda são escassos (Madruga et al., 2009, 2010, 2011).

Os compostos voláteis presentes em carne caprina foram estudados por Madruga et al. (2009), que identificaram e quantificaram 203 compostos. Fenóis (4-metilfenol e 2,6-Dimetilfenol) foram extraídos e relatados como responsáveis por contribuir com os aromas de carneiro e caprino. Além destes, grande número de compostos derivados de Maillard, como

724 pirazinas, piroles, piridinas e alquilsulfanatos foram encontrados. Compostos de impacto como
725 1,2-metiltridecanal, (E, E) -2,4-decadienal, 3- (metiltio) propanal, trissulfureto de dimetilo e uma
726 série interessante de C2 a C5 alquilformilciclopentenos, foram identificados pela primeira vez
727 no perfil volátil da carne caprina.

728 Em estudo posterior, Madruga et al. (2010) determinaram as concentrações de alguns
729 precursores solúveis em água presentes no aroma caprino na carne crua e cozida. As maiores
730 perdas durante o processo de cozimento foram da frutose, glicose, inosina 5-monofosfato e
731 cisteína e parecem estar envolvidos na formação do aroma caprino. Frutose e glicina estavam
732 presentes em altas concentrações na carne caprina, além dos já esperados, como os açúcares,
733 ribonucleotídeos, creatinina e aminoácidos livres.

734 Cordeiro et al. (2020) estudando moléculas aromatizantes obtidas a partir de
735 hidrolisados de vísceras caprinas, verificaram quanto o processo térmico influenciou
736 quantitativamente e qualitativamente na produção dessas moléculas. Os resultados permitiram
737 inferir que o processo de autoclavagem proporcionou aumento significativo na concentração de
738 aminoácidos livres, como ácido glutâmico, alanina, arginina, valina, leucina, lisina e
739 fenilalanina, assim como, redução no conteúdo de glicose e aumento no conteúdo de maltose.
740 Além disso, a presença dos ácidos graxos oleico e linoleico, que desempenham papel
741 importante na formação de compostos voláteis característicos do aroma cárneo, estavam
742 presentes nos hidrolisados. Indicando que o processo de autoclavagem favoreceu a produção
743 de pirazinas e outros compostos heterocíclicos.

744 Análises de espectrometria de massa (CG-MS), olfatometria (CG-O) e análise sensorial
745 descritiva foram usadas para descrever as mudanças nas características do aroma de
746 flavorizantes de carneiros preparados a partir de hidrolisados proteicos de osso de ovelha com
747 diferentes graus de hidrólise. Os resultados revelaram que o grau de hidrólise foi um indicador
748 importante na preparação desses flavorizantes e demonstraram superioridade em um ou mais

atributos sensoriais (carneiro, torrado, carnudos). Foi possível ainda detectar 36 compostos chave que representam o sabor de carneiro. Os hidrolisados com uma faixa de grau de hidrólise de 25,92-30,89% apresentaram mais compostos odor-ativos através da reação térmica e foram indicados para serem usados como um precursor desejável para a produção de flavorizantes de carne de carneiro (Zhan et al., 2013).

Os ácidos graxos derivados de produtos caprinos e ovinos são precursores de compostos voláteis, e desta forma o uso de subprodutos destes animais na obtenção de hidrolisados proteicos incrementa sua aplicabilidade na tecnologia de alimentos como flavorizantes e ingredientes funcionais (Queiroz et al., 2013). Desta forma, estas propriedades favorecem o interesse da utilização destes hidrolisados na alimentação animal ou humana (Martinez-Alvarez et al., 2015).

Wong et al. (1975) defenderam inicialmente a hipótese de que certos ácidos graxos com cadeias ramificadas com grupo metil, presente na gordura subcutânea dos cordeiros e cabras, seriam os componentes diretamente responsáveis pelo odor “ovino” e “caprino” característico. Esta tese foi reforçada através de análise sensorial, na qual o odor “ovino” foi relacionado com a presença do ácido 4-metil octanoico (4-Me-8:0) e 4-metil nonanoico (4-Me-9:0). Seguindo a mesma linha de raciocínio, Brennand et al. (1989) estudando as propriedades aromáticas e os valores de “threshold” dos ácidos graxos de cadeias ramificadas, reportaram que o ácido graxo 4-etil octanoico (4-Et-8:0) apresentou o menor valor de “threshold” dentre os vinte e três ácidos analisados, observando ainda, que ácidos graxos contendo ramificações na posição “4”, apresentaram odores característicos de “caprino e ovino”, assim como ácidos graxos contendo cadeias com oito átomos de carbono.

Estudos atuais têm demonstrado que o “sabor de carneiro” vem particularmente do tecido adiposo subcutâneo, e que 4-Metil-8:0, 4-Etil-8: 0 e 4-Metil-9: 0 são os três principais ácidos graxos de cadeia ramificada responsáveis por conferir o sabor específico da espécie em

ovelhas (Gravador et al., 2019; Jaborek et al., 2020). Com base nisso, estudos sobre o sabor de caprinos e ovinos, buscaram pontuar através de painéis sensoriais por um longo tempo a preferência de intensidade de sabor do consumidor (Watkins et al., 2021). Outro estudo sugeriu testes sensoriais e maiores pontuações foram observadas para os atributos “carne de carneiro” e “cabra” em amostras enriquecidas com os ácidos graxos 4-Me-8: 0 e 4- Me-9: 0 em comparação aos sem adição de 4-Me-8: 0 (Wong et al., 1975).

Pesquisas posteriores revelaram que em caprinos machos, especificamente o ácido graxo 4-Et 8: 0, foi associado com o aroma caprino (Sugiyama et al., 1981), e esse mesmo ácido graxo foi identificado em carne ovina e caprina (Ha et al., 1990). Desde então, diversos estudos demonstraram que a presença desses ácidos graxos, afetam negativamente o sabor da carne caprina (Watkins et al., 2014; Castada et al., 2017; Jaborek et al., 2020).

Desta forma não há como relegar a segundo plano a importância dos ácidos graxos de cadeia ramificada na formação do flavour característico das espécies ruminantes, porém com um olhar mais crítico pode-se claramente identificar que pesquisas se fazem necessárias para um entendimento mais detalhado da real participação dos ácidos graxos ramificados na formação do flavour e aroma das espécies caprina e ovina. Logo, um dos pontos chaves a serem estudados, trata da produção de ácidos graxos metilados durante o processo de hidrólise enzimática, objetivando-se a obtenção de aromas naturais.

6 Conclusão

Esforços têm sido evidenciados para o aproveitamento de subprodutos de caprinos e ovinos em produtos diversificados, a exemplo das preparações alimentares, dos produtos cárneos processados, da obtenção de hidrolisados proteicos e de peptídeos funcionais, todos com foco na melhor adequação dos subprodutos como fonte de alimento humano. No entanto,

o aproveitamento e uso dos diversos subprodutos em alimentos humanos ainda é desafiador, principalmente no que diz respeito à aceitação pelo consumidor.

Evidências notáveis foram percebidas quanto aos aspectos nutricionais, tecnológicos, funcionais, bioativos e de potencial flavorizante dos subprodutos caprinos e ovinos. O não aproveitamento destes subprodutos ocasiona perdas no potencial de faturamento bem como eleva os custos de processamento envolvidos no descarte.

Vários fatores influenciam seu potencial para fortificação em alimentos, tais como valor nutricional, pré-tratamentos, biodisponibilidade de nutrientes, interação com outros ingredientes, características sensoriais, e requisitos regulatórios. A preocupação com a segurança alimentar no aproveitamento dos subprodutos deve ser uma prioridade.

A extração e isolamento de compostos bioativos de subprodutos caprinos e ovinos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antibacterianas através do processo de hidrólise enzimática também devem ser estudados com mais profundidade e ênfase e, têm recebido atenção especial de pesquisadores em consequência das características inerentes dos peptídeos obtidos de exibir bioatividades. Enfatiza-se ainda a escassez de estudos sobre o potencial flavorizante que estes subprodutos podem apresentar, através de estudos com ênfase em formulações de flavorizantes bem como as moléculas de sabor produzidas a partir destes subprodutos.

Tendo em vista todas essas considerações, fica evidente que a utilização dos subprodutos caprinos e ovinos como perspectiva alimentar é uma contribuição significativa para a economia e uma excelente solução para fortalecer a cadeia produtiva destes animais, bem como uma iniciativa para a gestão zero de resíduos.

Declaração de interesses concorrentes

Nenhum.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development; CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel –Brazil; CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (The Paraíba State Foundation for the Support of Research; FAPESQ) por seu apoio financeiro no Projeto 005/2019/PRONEX e pela bolsa concedida ao primeiro autor.

Referências

- Alao, B.O., Falowo, A.B., Chulayo, A., Muchenje, V. (2017). The Potential of Animal By-Products in Food Systems: Production, Prospects and Challenges. *Sustainability*, 9, 1089.
- Albuquerque, G.N., Costa, R.G., Barba, F.J. (2019). Effect of organic acids on the quality of sheep “buchada”: From food safety to physicochemical, nutritional, and sensorial evaluation. *J. Food Process Preserv*, e13877.
- Amaral, D.S., Silva, F.A.P., Bezerra, T.K.A. ; Guerra, I.C.D., Dalmás, P.S., Pimentel, K.M.L., Madruga, M.S. (2013). Chemical and sensory quality of sheep liver pâté prepared with variety meat. *Semina. Ciências Agrárias (Impresso)* **JCR**, 34,1741-1752.
- Amaral, D.S., Silva, F.A.P., Bezerra, T.K.A., Arcanjo, N.M.O., Guerra, I.C.D., Dalmás, P.S., Madruga, M.S. (2015). Effect of storage time and packaging on the quality of lamb pâté prepared with `variety meat?. *Food Packaging And Shelf Life* **JCR**, 3, 39-46.
- Anaeto, M., J. A., Adeyeye, Chioma, G. O., Olarinmoye, A.O., Tayo, G. O. (2010). Goat products: Meeting the challenges of human health and nutrition. *Agriculture And Biology Journal Of North America*, 1(6), 1231-1236,
- Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, P. S. Spray drying techniques for food ingredient encapsulation. Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 2015.

- Anderson, B. A. (1988). Composition and nutritional value of edible meat by-product. In A. M. Pearson, & T. R. Dutson (Eds.), *Advances in meat research*, 15–45. New York: Elsevier Applied Science.
- Araújo, Í. B. S., Lima, D. A. S., Pereira, S. F., Madruga, M. S. (2018a). Quality of low-fat chicken sausages with added chicken feet collagen. *Poultry Science JCR*, 98, 1064-1074.
- Araújo, I. B. S.; Bezerra, T. K. A.; Nascimeto, E. S.; Gadelha, C. A. A.; Santo-Gadelha, T.; Madruga, M. S. (2018b). Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Science Technology*, Campinas, Ahead of Print, 1-7.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2011). Essential Amino Acids. In L. M. L. Nollet, F. Toldrá, (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*, 123-135. New York: CRC Press.
- Bah, C.S.F.; McConnell, M.A., Mros, S., Bekhit, A. E. D. (2016). Production of Bioactive Peptide Hydrolysates from Deer, Sheep, Pig and Cattle Red Blood Cell Fractions Using Plant and Fungal Protease Preparations, *Food Chemistry* (2016).
- Barbosa, P. T., Santos, I. C. V., Ferreira, V. C. S., Fragoso, S. P., Araújo, I. B. S., Costa, A. C. V., Araújo, L. C., Silva, F. A. P. (2017). Physicochemical properties of low sodium goat kafta. *LWT - Food Science and Technology*, 76, Part B, 314-319.
- Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M. F. A., et al. (2012). Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Material Science and Engineering*, 32, 922 – 928.
- Bezerra, T. K. A., De Lacerda, J. T. J. G., Salu, B R., O, M. L. V., Juliano, M. A., Pacheco, M. T. B., Madruga, M. S. (2019). Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory and Anticoagulant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Chicken Combs and Wattles. *Journal Of Medicinal Food JCR*, 22, 1294-1300.
- Bezerra, T., Estevez, M., Lacerda, J. T., Dias, M., Juliano, M., Mendes, M. A., Morgano, M. A., Pacheco, M. T. B., Madruga, M. S. (2020). Chicken Combs and Wattles as Sources of Bioactive Peptides: Optimization of Hydrolysis, Identification by LC-ESI-MS2 and Bioactivity Assessment. *Molecules JCR*, 25, 1698.
- Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C., Lalitha, R.G. (2007). Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, 98, 388–394.

Bohrer, B. M. (2017). Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 103-112.

Branskalieva, V., Sahlu, T., & Goetsch, A. L. (2000). Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. *Small Ruminant Research*, 37, 255-268

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução Nº 1, de 9 de janeiro de 2003**. Dispõe sobre a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados em uso para aves e coelhos, suídeos, caprinos, ovinos, bubalinos, eqüídeos, ovos e outras espécies de animais. Disponível em:
<<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/resolu%C3%A7%C3%A3o-1.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2020

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto Nº 9.013, De 29 de Março de 2017**. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Publicado no Diário Oficial da União em 30 de março de 2017. Disponível em:
< https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos/decreto-n-9013-2017_alt-decreto-9069-2017_pt.pdf/view>. Acesso em: 11 jul. 2020.

Brasil, L., Queiroz, A., Silva, J., Bezerra, T., Arcanjo, N., Magnani, M., Souza, E., Madruga, M. S. (2014). Microbiological and nutritional quality of the goat meat by-product “sarapatel”. *Molecules*, 19, 1047 – 1059.

Castada, H.Z., Polentz, V., Barringer, S., Wick, M. (2017). Temperature-dependent Henry's Law constants of 4-alkyl branched-chain fatty acids and 3-methylindole in an oil-air matrix and analysis of volatiles in lamb fat using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31, 2135-2145.

Cordeiro, A. R. R. A., Bezerra, T. K. A., Queiroz, A. L. M., Tejo, M.; Pacheco, M.T.B., Madruga, M. S. (2019). Collagen production from chicken keel bone using acid and enzymatic treatment at a temperature of 30 °C. *Food Science and Technology JCR*, 1, 1-7.

Cordeiro, A. R. R. A., De Medeiros, L. L., Bezerra, T. K. A., Pacheco, M. T. B., Galvão, M. S., Madruga, M. S. (2020). Effects of thermal processing on the flavor molecules of goat by-product hydrolysates. *Food Research International JCR*, 138, 109758.

Costa, R. G., Madruga, M. S., Santos, N. M., & Medeiros, A. N. (2005). Qualidade físico-química, química e microbiológica da buchada caprina. *Higiene Alimentar*, 19, 62 – 68.

- Dalmás, P.S., Bezerra, T.K.A., Morgano, M.A., Milani, R.F., Madruga, M.S. (2011). Development of goat pâté prepared with variety meat. *Small Ruminant Research* **JCR**, 98, 46-50.
- Dalmás, P.S., Silva, F. A. P., Moreira, R. T., Bezerra, T. K. A., Guerra, I.C.D., Coutinho, E. P., Morgano, M.A., Milani, R.F., Madruga, M. S. (2012). Desenvolvimento de embutido rico em ferro elaborado a partir de subprodutos comestíveis do abate de caprinos. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (Online)* **JCR**, 30, 233-242.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- FAO. Overview of global meat market developments in 2018. Meat Market Review. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019.
Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>.
Acesso em: 20 de julho de 2020.
- Fatma, H. M. A., Mahdey, E. A. (2010). Incidence of brucella species in slaughtered food animals and its edible offal at Beni-suef, Egypt. *Global Veterinaria*, 5(5), 248-254.
- Gagaoua, M.; Boudechicha, H. (2018). Ethnic meat products of the North African and Mediterranean countries: An overview. *Journal of Ethnic Foods*, 5 (2), 83-98.
- García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. (2011). Minerals And Trace Elements. In: Nollet, L. M. L.; Toldrá, F. (Eds), Handbook of analysis of edible animals by-products. New York: CRC Press, 183-203.
- Gravador, R.S., Harrison, S.M., Monahan, F.J., Gkarane, V., Farmer, L.J., Brunton, N.P. (2019). Validation of a Rapid Microwave-Assisted Extraction Method and GC-FID Quantification of Total Branched Chain Fatty Acids in Lamb Subcutaneous Adipose Tissue. *Journal of Food Science*, 84, 80-85.
- Ha, J.K., Lindsay, R.C. (1990). Distribution of Volatile Branched-Chain Fatty-Acids in Perinephric Fats of Various Red Meat Species. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 23, 433-440.
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24-33.

- Hamzeh, A., Azizieh, A., Yazagy, S. (2016). The effect of the fat percentage and liver type in the stability and pH value of locally prepared Liver patê. *International Food Research Journal*, 23(3), 1131-1135.
- Hoffman, L.C., Laubscher, L.L., Leisegang, K. (2013). Nutritional Value of Cooked Offal Derived from Free-Range Rams Reared in South Africa. *Meat Science*, 93, 696–702.
- Honikel, K. O. (2011). Composition and calories. In: L. M. L. Nollet, F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products* Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 105-121.
- Hou, C., Wu, L., Wang, Z., Saguer, E., Zhang, D. (2019). Purification and Identification of Antioxidant Alcalase-Derived Peptides from Sheep Plasma Proteins. *Antioxidants*, 8, 592.
- Iñiguez, L. (2011). The challenges of research and development of small ruminant production in dry areas, *Small Ruminant Research*, 98 (1–3), 12-20.
- Jaborek, J.R., Zerby, H.N., Wick, M.P., Fluharty, F.L., Moeller, S.J. (2020). Effect of energy source and level, animal age, and sex on the flavor profile of sheep meat. *Translational animal Science*, 4, 1140-1147.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., Bawa, A.S. (2012). Utilization of Byproducts and Waste Materials from Meat, Poultry and Fish Processing Industries: A Review. *J. Food Science Technology*, 49, 278–293.
- Khan, M. I., Jo, C., Tariq, M. R. (2015). Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors - A systematic review. *Meat Science*, 110, 278 – 284.
- Kim, S., Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2, 1-9.
- Kim, Y. N. (2011). Vitamins. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*, 161–182. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Kumar, N. S. S., Nazeer, R. A., Ganesh, R. J. (2012). Functional properties of protein hydrolysates from different body parts of horse mackerel (*magalapis cordyla*) and croaker (*otolithes ruber*). *Mediterranean Journal Nutrition Metabolism*, 5, 105- 110.
- Lafarga, T., Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and byproducts: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98, 227-239.

- Lafarga, T., Álvarez, C., & Hayes, M. (2017). Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), e12418.
- Liu, B., Aisa, H. A., Yili, A. (2018). Isolation and identification of two potential antioxidant peptides from sheep abomasum protein hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 1-11.
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E., Drummond, L., Álvarez, C. (2018). Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. *Meat Science*, 144, 62-73.
- Madruga, M. S., Melo, H. M., Rezer, J. S., Lima, A. W. O. (2004). Condições microbiológicas de vísceras caprinas processadas em um micro-abatedouro e exposta à venda ao consumidor. *Higiene Alimentar*, 18(118), 60-64.
- Madruga, M. S., Araújo, W. O., Sousa, W. H., Cézar, M. F., Galvão, M. S., Cunha, M. G. G. (2006). Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science JCR*, 35, 1838-1844.
- Madruga, M. S., Sousa, W. H., Mendes, E. M. S., Brito, E. A. (2007). Carnes caprinas e ovinas: Processamento e fabricação de produtos derivados. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, 1, 61-67.
- Madruga, M. S., Elmore, J. S., Dodson, A. T., Mottram, D. S. (2009). Volatile flavour profile of goat meat extracted by three widely used techniques. *Food Chemistry*, 115, p. 1081 – 1087.
- Madruga, M. S., Elmore, J. S., Oruna-Cancha, M. J., Balagiannis, D., Mottram, D. S. (2010). Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat. *Food Chemistry*, 123, 513-520.
- Madruga, M. S., Bressan, M. C. (2011). Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. *Small Ruminant Research*, 98, 39-45.
- Madruga, M. S. (2019). Qualidade da carne caprina. Aspectos químicos, sensoriais e aromáticos. *Produção de caprinos no Brasil*, cap.2, 549 – 556.
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: a review. *Food Research International*, 73, 204-212.

- Mazhangara, I.R., Chivandi, E., Mupangwa, J.F., Muchenje, V. (2019). The Potential of Goat Meat in the Red Meat Industry. *Sustainability*, 11, 3671.
- Meshginfar, N.; Mahoonak, A. S.; Ghorbani, M.; Aalami, M. (2016). Effects of protein hydrolysate from sheep visceral on oxidative stability of soybean oil and chicken sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), e12875.
- Milani, T. M. G., Menis, M. E. C., Jordano, A., Boscolo, M., Conti-Silva, A. C. (2014). Pre-extrusion aromatization of a soy protein isolate using volatile compounds and flavor enhancers: Effects on physical characteristics, volatile retention and sensory characteristics of extrudates. *Food Research International*, 62, 375–381.
- Montebello, N. De P.; Araújo, W. M. C. (2006). *Carne & Cia*. Brasília: Editora Senac – DF, 1.
- Mora, L., Reig, M., Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65, 344–349.
- Mustafa, F. A. (1988). Moisture, fat and cholesterol content of some raw; barbecued and cooked organ meats of beef and mutton. *Journal of Food Science*, 53, 270–271.
- Meshginfar, N., Sadeghi, A., Ziaifar, A., Ghorbani, M., Kashaninejad, M. (2014). Study of antioxidant activity of sheep visceral protein hydrolysate: Optimization using response surface methodology. *ARYA Atherosclerosis* 10(4), 179–84.
- Meshginfar, N., Sadeghi, A., Ghorbani, M., Aalami, M. (2017). Effects of Protein Hydrolysate from Sheep Visceral on Oxidative Stability of Soybean Oil and Chicken Sausage: Effects Of Protein Hydrolysate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41.
- Ngo, D.; Vo, T., Ngo, D., Wijesekara, I., Kim, S. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 378–383.
- Nollet, L. M. L., Toldrá, F. (2011). Introduction. Offal meat: Definitions, regions, cultures, generalities. In: L. M. L. Nollet; F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 3–11.
- Ockerman, H. W.; Hansen, C. L. 2000, *Animal by-product Processing & Utilization*. CRC press. P. 1 – 544.

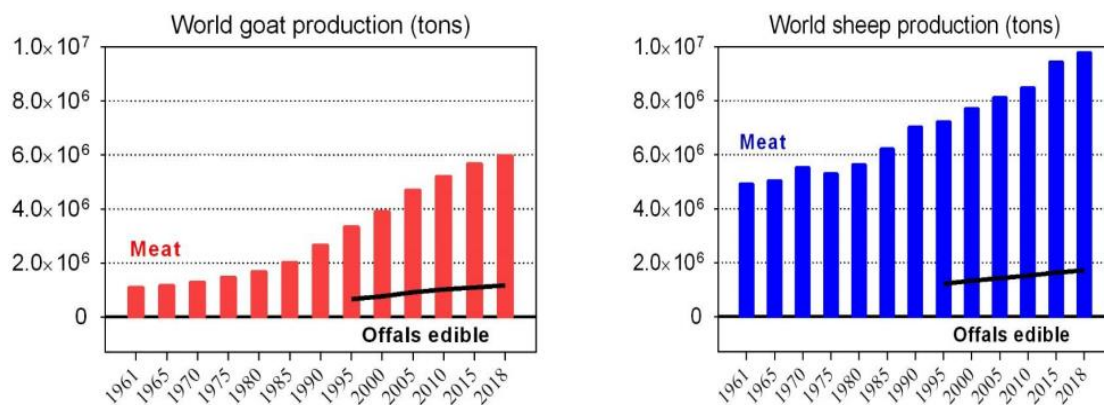
- Ockerman, H.W., Basu, L. (2004). By-products. In: JENSEN, W.; DEVINE, C; DIKEMANN, M (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences*. London, UK: Elsevier Science Ltd, 104- 112.
- Osório, J. C. S; Osório, M. T. M.; Sobrinho, A. G. S. (2019). Produção e qualidade da carcaça e da carne de caprinos. *Produção de caprinos no Brasil*, Capítulo 1, 571-548.
- Park, Y. W., Washington, A. C. (1993). Fatty Acid Composition of Goat Organ and Muscle Meat of Alpine and Nubian Breeds. *Journal of food Science*, 58(2), 245-248.
- Park, Y. W., Kouassi, M. A., Chin, K. B. (1991). Moisture, total fat and cholesterol in goat organ and muscle meat. *Journal of Food Science*, 56, 1191–1193.
- Pearson, A. M.; Dutson, T. R. (1988). Edible meat by-products advances in meat research. London: Elsevier Applied Science, 5.
- Peinado, I., Koutsidis, G., Ames, J. (2016). Production of seafood flavor formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *Food Science and Technology*, 66, 444 – 452.
- Prates, J.A.M., Alfaia, C.M., Alves, S.P., & Bessa, R.J.B. (2011). Fatty Acids. In: Nollet, L.M, Toldrá, F. (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. CRC Press, New York, 137-159.
- Queiroz, A. L. M., Brasil, L. M. S., Silva, J., Magnani, M., Souza, E. L., Madruga, M. S. (2013). Microbiological and nutritional quality of “buchada caprina” an edible goat meat by-product. *Small Ruminant Research*, 115, 62-66.
- Queiroz, A. L. M., Araújo, A. R. A., Pacheco, M. T. B., Madruga, M. S. (2017a). Potential use of goat viscera to obtain protein hydrolysates. *LWT – Food Science and Technology*, 84, 832-837.
- Queiroz, A. L. M., Bezerra, T. K. A., Pereira, S. F., Da Silva, M. E. C., De Almeida Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. Teresa B., Madruga, M. S. (2017b). Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20, 19–27.
- Rahman, U., Sahar, A., Khan, M. A. (2014). Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. *Food Research International*, 65, Part C, 322-328.
- Rai, A.K., Tamang, J.P., Palni, U. (2010). Microbiological studies of ethnic meat products of the Eastern Himalayas. *Meat Science*, 85(3), 560e7.

- Rhee, K.S., Waldron, D.F., Ziprin, Y.A., Rhee, K.C. (2000); Fatty acid composition of goat diets vs intramuscular fat. *Meat Science*, 54(4), 313-318.
- Salami S. A., Luciano, G., O'Grady, M. N., Biondi, L., Newbold, C. J., Kerry, J. P., Priolo, A. (2019). Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production, *Animal Feed Science and Technology*, 251, 37-51.
- Santos, N. M., Costa, N. M., Medeiros, A. N., Madruga, M. S., Queiroga, R. C. R. E. (2007). *Buchada Caprina: características físico-químicas e microbiológicas*. Areia-PB: UFPB/CCA.
- Santos, N.M., Costa, R.G., Madruga, M.S., Medeiros, A.N., Albuquerque, C.L.C., Queiroga, R.C.R.E. (2008). Constitution and Composition Chemistry of the Precooked Goat like *Buchada* Produced in the State of Paraíba, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 793-798.
- Silva, F.A.P., Amaral, D.S., Guerra, I.C.D., Dalmás, P.S., Arcanjo, N.M.O., Bezerra, T.K.A., Beltrão Filho, E.M., Moreira, R.T., Madruga, M.S. (2013). The chemical and sensory qualities of smoked blood sausage made with the edible by-products of goat slaughter. *Meat Science*, 94, 34-38.
- Silva, F.A.P., Amaral, D.S., Guerra, I.C.D., Arcanjo, N.M.O., Bezerra, T.K.A., Ferreira, V.C.S., Araújo, I.B.S., Dalmás, P.S., Madruga, M.S. (2014). Shelf life of cooked goat blood sausage prepared with the addition of heart and kidney. *Meat Science JCR*, 97, 529-533.
- Steingrimsdóttir, L., Thorkelsson, G., Eythórsdóttir, E. (2018). Food, Nutrition, and Health in Iceland. In *Nutritional and Health Aspects of Food in Nordic Countries*. Elsevier BV: Duxford, 145–177.
- Sugiyama, T., Sasada, H., Masaki, J., Yamashita, K. (1981). Unusual Fatty-Acids With Specific Odor From Mature Male Goat. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45.
- Sukkhown, P., Jangchud, K., Lorjaroenphon, Y., Pirak, T. (2017). Flavored-functional protein hydrolysates from enzymatic hydrolysis of dried squid by-products: Effect of drying method. *Food Hydrocolloids*, 76, 1 -10.
- Svanberg, I. (2015). Ræstur fiskur: Air-dried fermented fish the Faroese way. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 11, 76.
- Teixeira, A., Samanta, A., Etelvina, P., Fernando, M., Sandra, R. (2019). Physicochemical characteristics of sheep and goat pâtés. differences between fat sources and proportions. *Heliyon*, 5(7), e02119.

- Teixeira, A., Silva, S., Guedes, C., Rodrigues, S. (2020). Sheep and Goat Meat Processed Products Quality: A Review. *Foods*, 9, 960.
- Toldrá, F., Aristoy, M.C., Mora, L., Reig, M. (2012). Innovations in value addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92, 290–296.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.
- Umaraw, P., Pathak, V., Rajkumar, V., Verma, A.K., Singh, V.P., Verma, A.K. (2018). Quality characteristics of edible by products compared to Longissimus dorsi muscle of Barbari kids. *Indian Journal of Small ruminants*, 2(1), 134-138.
- Vidal, A. R., Duarte, L. P., Schmidt, M. M., Cansian, R. L., Fernandes, I. A., Mello, R. O., Demiate, I. M., Dornelles, R. C. P. (2020). Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter byproducts. *Waste Management*, 102, 838–846.
- Watkins, P.J., Kearney, G., Rose, G., Allen, D., Ball, A.J., Pethick, D.W., Warner, R.D. (2014). Effect of branched-chain fatty acids, 3-methylindole and 4-methylphenol on consumer sensory scores of grilled lamb meat. *Meat Science*, 96, 1088-1094.
- Watkins, P.J., Jaborek, J.R., Teng, F., Day, L., Castada, H.Z., Baringer, S., Wick, M. (2021). Branched chain fatty acids in the flavour of sheep and goat milk and meat: A review. *Small Ruminant Research*, 200.
- Wong, E., Johnson, C.B., Nixon, L.N. (1975). Contribution Of 4-Methyloctanoic (Hircinoic) Acid To Mutton and Goat Meat Flavor. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 18, 261-266.
- Zhan, P.; Tian, H.; Zhang, X.; Wang, L. (2013). Contribution to aroma characteristics of mutton process flavor from the enzymatic hydrolysate of sheep bone protein assessed by descriptive sensory analysis and gas chromatography olfactometry. *Journal of Chromatography B*, 921-922, 1-8.

Figure captions

Figura 1. Produção mundial carne e subprodutos cárneos comestíveis.



Fonte: Próprio autor

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Vísceras (fígado, coração e pulmão) de caprinos foram utilizadas neste trabalho que objetivou o aproveitamento de subprodutos de caprinos através da obtenção de hidrolisados proteicos com estudos do efeito térmico nas moléculas de sabor de hidrolisados de subprodutos caprinos (experimento 1) e o efeito de proteases nos precursores hidro e lipo-solúveis de aroma de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas (experimento 2), ambos com potencialidade de aplicação flavorizante. O trabalho de tese foi realizado em dois experimentos conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma de desenvolvimento da tese.



As vísceras caprinas (fígado, coração e pulmão) foram disponibilizadas por um fornecedor local, situado no Mercado Público Central da cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil).

Para os estudos foi utilizado uma mistura das vísceras (fígado, coração e pulmão) na proporção 1:1:1. As enzimas proteolíticas utilizadas para a obtenção dos hidrolisados proteicos

foram a Alcalase (*Bacillus licheniformis*), Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*) e Neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*) fornecida pela Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil) tomando-se por base os estudos prévios realizados por Queiroz et al. (2017b).

3.2 EXPERIMENTO 1: EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NAS MOLÉCULAS DE SABOR DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE SUBPRODUTOS CAPRINOS

3.2.1 Produção de hidrolisados de vísceras caprinas

As vísceras higienizadas (lavadas em água corrente) e refrigeradas foram pesadas, trituradas em um processador de carne (máquinas CAF, modelos, São Paulo, Brasil), homogeneizadas e armazenadas sob congelamento (-15 ± 1 °C) até sua utilização. Para obtenção dos hidrolisados amostras de 30g da mistura de vísceras foram utilizadas. Inicialmente foram realizados estudos de inativação térmica das enzimas endógenas, onde a mistura de vísceras foi submetida ao tratamento térmico de 90 °C por 15 minutos e uma outra mistura de vísceras foi preparada sem inativação térmica. As misturas de vísceras caprinas inativadas e controle foram então submetidas ao processo de hidrólise enzimática com Alcalase®, seguindo metodologia reportada por Queiroz et al. (2017), com tempo de hidrólise de 240 min, temperatura de 60 °C, e a relação enzima substrato de 5%. O grau de hidrólise (GH) foi definido segundo procedimento detalhado de Adler-Nissen (1986).

$$GH (\%) = B \times Nb \times (1/\alpha) \times (1/MP) \times 1/htot \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

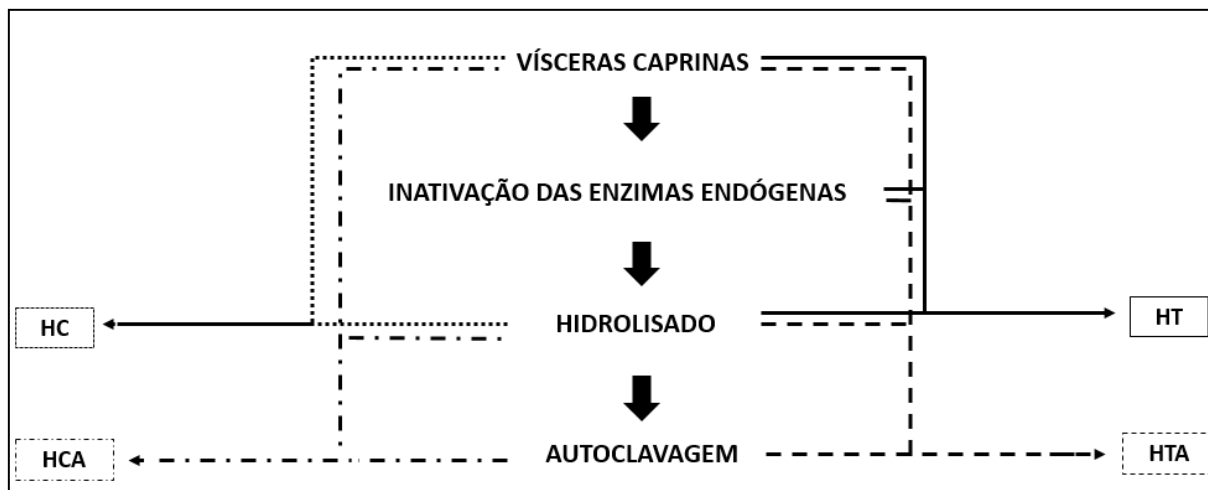
Em que:

GH (%) = grau de hidrólise; B = consumo de base em mL; Nb = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo α -NH₂; MP = massa da proteína em g; htot = número total de ligações peptídicas no substrato proteico – 7,6 para carnes (Adler-Nissen, 1986).

Ao término da hidrólise foram obtidos dois hidrolisados: HC (hidrolisado proteico de vísceras caprinas sem tratamento térmico ou controle) e HT (hidrolisado proteico de vísceras caprinas com tratamento térmico). Os dois hidrolisados foram autoclavados por 1 hora a 121 °C, e assim obtida mais duas amostras: HCA (hidrolisado proteico de vísceras caprinas sem tratamento térmico e com autoclavagem) e HTA (hidrolisado proteico de vísceras caprinas com tratamento térmico e com autoclavagem) (Figura 2). Os quatro hidrolisados foram então

caracterizados quanto ao teor de composição centesimal, ácidos graxos, aminoácidos livres e totais, açúcares e perfil de voláteis.

Figura 2. Fluxograma de obtenção de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas utilizando tratamento térmico.



3.3 EXPERIMENTO 2: EFEITO DE PROTEASES NOS PRECURSORES HIDRO E LIPO-SOLUVEIS DE AROMA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERAS CAPRINAS

3.3.1 Produção de hidrolisados de vísceras caprinas com diferentes enzimas

A Tabela 1 apresenta as características das proteases comerciais utilizadas na produção dos hidrolisados de caprinos. As vísceras higienizadas (lavadas em água corrente) e refrigeradas foram pesadas, trituradas em processador de carne (máquinas CAF, modelos, São Paulo, Brasil), homogeneizadas e armazenadas sob congelamento ($-15 \pm 1^\circ \text{C}$) até sua utilização. Amostras de 30g da mistura de vísceras foram utilizadas para obtenção dos hidrolisados proteicos seguindo metodologia reportada por Queiroz et al. (2017). As condições de pH, temperatura e tempo de reação, bem como as enzimas e suas combinações foram selecionadas com base na combinação de parâmetros que resultaram na maior produção de peptídeos, com base na literatura e trabalhos prévios realizados (QUEIROZ et al., 2017; CORDEIRO et al., 2020). O grau de hidrólise (GH) foi definido segundo procedimento detalhado de Adler-Nissen (1986), conforme equação 1 apresentada no item 3.2.1.

Ao término da hidrólise obteve-se quatro hidrolisados de vísceras: HA (hidrolisado proteico de vísceras caprinas com alcalase), HF (hidrolisado proteico de vísceras caprinas com

Flavourzyme), HN (hidrolisado proteico de vísceras caprinas com Neutrase) e HFN (hidrolisado proteico de vísceras caprinas com Flavourzyme e Neutrase). Os quatro hidrolisados foram então caracterizados quanto aos parâmetros físico-químicos (cor instrumental, pH), perfil eletroforético, intensidade de escurecimento, teores de aminoácidos livres, açúcares e ácidos graxos, perfil de compostos voláteis.

Tabela 1. Sistemas enzimáticos usados para tratamento de hidrólise de vísceras caprinas.

Sistema de Enzima	Atividade	Condições para hidrólise enzimática
Alcalase (HA)	Serina endoprotease	Temperatura: 60 °C pH: 8.0
Flavourzyme (HF)	Exopeptidase	Temperatura: 50 °C pH: 7.0
Neutrase (HN)	Metaloendoprotease	Temperatura: 50 °C pH: 7.0
Flavourzyme + Neutrase (HFN)	Exopeptidase + Metaloendoprotease	Temperatura: 50 °C pH: 7.0

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Experimento 1: Efeito do processamento térmico nas moléculas de sabor de hidrolisados proteicos de subprodutos caprinos

Composição centesimal: As análises de umidade, cinzas e proteínas foram realizadas seguindo a metodologia descrita nos itens nº 950.46A, 920.153 e 928.08, respectivamente, pela AOAC (2010). Os lipídios foram dosados seguindo os procedimentos de Folch, Less e Stanley (1957). Carboidratos foram dosados por diferença.

Aminoácidos totais (AAT): O perfil de aminoácidos totais foi identificado e quantificado de acordo com o método descrito por White, Hart e Fry (1986). As amostras foram previamente hidrolisadas a 110 °C/22h, com ácido clorídrico bidestilado 6 mol/L, sob vácuo, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC). A separação dos

derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Varian, Waters 2690, Califórnia, USA) em coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de pH 6,4 e uma solução de acetonitrila a 40 %. A injeção da amostra foi efetuada manualmente (20 µL) e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação dos aminoácidos foi realizada a um fluxo constante de 1 mL / minuto, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 45 minutos. A quantificação foi realizada mediante a utilização de curvas de calibração dos aminoácidos separados e identificados. Os resultados foram expressos em g de aminoácido por 100 g de amostra.

Aminoácidos livres (FAA): Os aminoácidos livres das amostras liofilizadas foram extraídos por agitação durante 60 min com ácido clorídrico 0,1 M (g / ml) seguido de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), de acordo com White, Hart e Fry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Varian, Waters 2690, Califórnia, USA) em coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de pH 6,4 e uma solução de acetonitrila a 40 %. A injeção da amostra foi efetuada manualmente (20 µL) e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação dos aminoácidos foi realizada a um fluxo constante de 1 mL / minuto, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 45 minutos. A quantificação foi realizada mediante a utilização de curvas de calibração dos aminoácidos separados e identificados. Os resultados foram expressos em g de aminoácido por 100 g de amostra.

Açúcares: A análise dos açúcares foi realizada usando um sistema de HPLC da Agilent, acoplado ao detector de índice de refração (RID), modelo 356 LC- RID (VARIAN, Waters, Califórnia, USA), utilizando coluna Agilent Hi-Plex Ca (7,7 x 300 mm, 8 µ), equipado com sistema isocrático de solvente, válvula "Rheodyne" com alça de 20 µl, temperatura do forno de 85 °C, fluxo de 0,6 mL/min e tempo de corrida de 30 min. A fase móvel utilizada foi a água ultrapura. Soluções padrão de foram injetadas para obter o tempo de retenção de cada composto. O software de processamento utilizado foi GALAXIE Chromatography Data System. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões maltose, ribose, glicose e frutose (Sigma-Aldrich) e a quantificação foi realizada pela área composta em uma curva de calibração de cada composto, em cinco concentrações. Os resultados foram expressos em g de açúcares/100 g de amostra.

Ácidos graxos: A transesterificação direta dos ácidos graxos presentes na gordura da mistura de vísceras caprinas foi realizada conforme descrito por O'fallon, Busboom, Melson e Gaskins (2007). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foram realizadas utilizando-se um Cromatógrafo Gasoso (HP Hewlett Packard 6890 Series GC Siystem), acoplado com coluna capilar de sílica fundida polar (Varian 430 – GC, California, EUA) acoplado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida (SPTM – 2560, SUPELCO, Bellefonte, EUA) com dimensões de 100 m x 0,25 mm 0,20 µm de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1 mL / minuto). As condições do CG foram: Temperatura do injetor 250 °C; a temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 2 minutos, aumentando-se 10 °C min⁻¹ até atingir 180 °C, permanecendo-se por 30 minutos, em seguida aumentou-se novamente 10 °C min⁻¹ e atingindo-se 240 °C e fixou-se por 34 minutos, com um tempo total de corrida de 86 minutos; a temperatura do detector foi de 260 °C. Fluxo dos gases auxiliares foram: Hélio 25 mL / minuto, Hidrogênio 30 mL / minuto, Ar sintético: 300 mL / minuto. Aliquotas de 1,0 µL do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless (Split 1:100). Os cromatogramas foram registrados em software tipo Galaxie Chromatography Data System. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19-Kit (*Fatty Acid Methyl Esters C4-C24*). Os resultados foram expressos em normatização de área (%).

Perfil de voláteis: A extração dos voláteis foi realizada através da técnica de microextração em fase sólida Headspace (HS-SPME) com um dispositivo SPME (Supelco, Bellefonte, EUA), metodologia adaptada de Breternitz, Boliniand e Hubinger (2017). Uma alíquota de 10 mL de hidrolisado foi transferida para um frasco de vidro de 20 mL. Os voláteis foram liberados a 50 °C atingindo o equilíbrio por 10 min. Depois disso, a fibra de Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 µm foi exposta ao headspace por 30 min de extração. A fibra utilizada foi ativada de acordo com as condições do fabricante antes do procedimento de extração. As análises cromatográficas foram realizadas usando cromatógrafo gasoso 7890B (Agilent Technologies 5977B, Little falls, DE, EUA) acoplado a espectrômetro de massa. Foram utilizadas as seguintes condições: uma coluna VF-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm); e uma temperatura inicial do forno de 40 ° C por 2 min, que aumentou de 15 ° C / min para 230 ° C e permaneceu por 10 min, por um tempo total de execução de 24,6 min. A temperatura do injetor foi fixada em 250 ° C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min no sistema de injeção dividida 1:20. A temperatura da linha de

transferência era de 250 ° C. O espectrômetro de massa foi operado no modo de impacto eletrônico (70 eV) e a faixa de varredura de massa foi de 29 a 350 m / z a 3.33 scans / s. Os compostos foram identificados através da comparação dos seus espectros de massa com os compostos padrão presentes na base de dados fornecida pelo equipamento NIST (National Institute of Standards and Technology, E.U.A). Os resultados foram expressos em unidades digitais (Counts).

3.4.2 Experimento 2: Efeito de proteases nos precursores hidro e lipo-solúveis de aroma de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas

Perfil eletroforético: Foi realizada utilizando-se a técnica descrita por Schagger e von Joagow (1987). As amostras foram diluídas em tampão redutor (0,5 mol/L Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 10% glicerol, 5% βmercaptoetanol e 0,1% Comassie Blue G250), homogeneizadas com auxílio de vórtex e sonicadas por 10 minutos. Logo após foram aquecidas a 90 °C por 5 minutos em banho à seco (Loccus, São Paulo, Brasil). No sistema SDS-PAGE-Tricina foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: gel de separação (16.5% T e 3% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C). Após as corridas, o gel foi fixado por 1 h em solução metanol, ácido acético e água (5:1:4 v/v/v) e corados por Comassie brilliant Blue G250 (0,025% de Comassie Blue em 10% ácido acético), durante 48 horas e posteriormente descorados em 10% ácido acético. Os pesos moleculares das frações de baixo peso foram comparados mediante utilização de marcador de peso molecular (Rainbow™ Marker – low range (RPN755E)).

Determinação de propriedades físico-químicas (cor instrumental e pH): A cor dos hidrolisados foi determinada através da medição das coordenadas L* (lightness), a* (redness) e b* (yellowness), por meio de colorímetro digital (CR400, Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão). Para a leitura foram fixadas as seguintes condições: iluminante C, ângulo de visão 8°, ângulo padrão do observador 10°, especular incluída, conforme especificações da Comissão Internationale de L'éclairage (CIE, 1986). O instrumento, antes da realização das leituras, foi calibrado em placa de cerâmica branca (Iluminante C: Y= 92,84 X=0,3136, y=0,3201). Os valores de pH dos hidrolisados foram medidos usando um medidor de pHmetro de bancada (Modelo 0400AS, Quimis, Diadema, São Paulo). O medidor de pH foi calibrado usando soluções tampão (pH 4 e 7) antes da análise. Os valores de pH foram registrados uma vez que as leituras foram estabilizadas.

Intensidade de escurecimento: As intensidades de escurecimento dos hidrolisados foram analisadas usando leituras de absorbância a 420 nm de acordo com Sun et al. (2011) e Tan, Abbas e Azhar (2012), usando um espectrofotômetro (DRAWELL, modelo DU8200, Curitiba-PR, Brasil). As amostras foram diluídas para uma concentração de 5 mg/mL de proteína com água ultrapura. A absorbância em 550 nm também foi medido para corrigir qualquer turbidez nas amostras.

Perfil de voláteis: A extração dos voláteis foi realizada através da técnica de microextração em fase sólida Headspace (HS-SPME) com um dispositivo SPME (Supelco, Bellefonte, EUA), metodologia adaptada de Breternitz, Boliniand e Hubinger (2017). Uma alíquota de 10 mL de hidrolisado foi transferida para um frasco de vidro de 20 mL. Em seguida, foi adicionado 1 µL de 1,2-diclorobenzeno em metanol como padrão interno (50 µg.µL⁻¹), sendo os frascos imediatamente selados com tampa com septo revestido de Teflon. Os voláteis foram liberados a 50 °C atingindo o equilíbrio por 10 min. Depois disso, a fibra de divinilbenzeno / carboxen / polidimetilsiloxano (DVB / CAR / PDMS) 50/30 µm foi exposta ao headspace por 30 min de extração. A fibra utilizada foi ativada de acordo com as condições do fabricante antes do procedimento de extração. As análises cromatográficas foram realizadas usando cromatógrafo gasoso 7890B (Agilent Technologies 5977B, Little falls, DE, EUA) acoplado a espectrômetro de massa. Foram utilizadas as seguintes condições: uma coluna VF-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm); e uma temperatura inicial do forno de 40 ° C por 2 min, que aumentou de 15 ° C / min para 230 ° C e permaneceu por 10 min, por um tempo total de execução de 24,6 min. A temperatura do injetor foi fixada em 250 ° C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min no sistema de injeção dividida 1:20. A temperatura da linha de transferência era de 250 ° C. O espectrômetro de massa foi operado no modo de impacto eletrônico (70 eV) e a faixa de varredura de massa foi de 35 a 350 m / z a 4,44 varreduras / s. Os compostos foram identificados comparando seu espectro de massa e LRI com aqueles de um composto autêntico executado em uma coluna DB-5, ou comparando seus espectros de massa com compostos padrão presentes no banco de dados fornecido pelo NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, EUA) equipamento. O índice de retenção linear (LRI) de cada composto foi calculado por meio dos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcanos C6-C25. A semiquantificação dos voláteis foi calculada extrapolando a área do padrão interno de 1,2-diclorobenzeno (adicionado a cada amostra) para a área integrada de cada

composto do perfil, e os dados foram expressos em $\mu\text{g} / 100\text{mL}$ de hidrolisado. Esta análise foi executada em triplicado.

Aminoácidos livres (FAA): Os aminoácidos livres foram determinados conforme metodologia descrita no item 3.4.1.

Açúcares: A análise dos açúcares foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.4.1.

Ácidos graxos: A transesterificação direta dos ácidos graxos presentes na mistura de vísceras caprinas foi realizada conforme descrito por O'fallon, Busboom, Melson e Gaskins (2007). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 5975) acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent Technologies 7820A), (Little Falls, DE, USA). A coluna capilar utilizada foi a VF-5MS, apolar, de sílica fundida, com dimensões de $30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19-Kit (Fatty Acid Methyl Esters C4-C24). As concentrações dos ácidos graxos foram apresentadas em g de ácido graxo / 100g gordura de hidrolisado.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 Experimento 1: Efeito do processamento térmico nas moléculas de sabor de hidrolisados proteicos de subprodutos caprinos

A análise estatística dos resultados de caracterização dos hidrolisados de vísceras caprinas foi realizada por meio do Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) utilizando o software Sistema de Análise Estatística (versão 11.0) (SAS, 2014). As respostas foram avaliadas através de Análise de Variância (ANOVA) a 5% de significância, tendo as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Tukey.

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizada para obter uma representação bi-dimensional das amostras de hidrolisados e o teor de ácidos graxos, aminoácidos, açúcares e compostos voláteis. Os dados foram processados no Software XLStat (versão 2014.5.03, Addinsoft, New York, USA).

3.5.2 Experimento 2: Efeito de proteases nos precursores hidro e lipo-solúveis de aroma de hidrolisados proteicos de vísceras caprinas

Os dados obtidos nos estudos envolvendo a caracterização dos hidrolisados de vísceras caprinas foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$). As amostras foram então submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas por Tukey ($p < 0,05$).

A análise de componentes principais (PCA) foi usada para obter uma representação bidimensional das amostras de hidrolisado e os teores de ácidos graxos, aminoácidos, açúcares e compostos voláteis.

Um mapa de calor (com os valores do coeficiente de correlação de Pearson) foi construído para observar correlações entre os compostos detectados. A análise estatística e gráficos utilizados foram gerados pelo XLSTAT (versão 2014.5.03, Addinsoft, New York, USA).

REFERÊNCIAS

- AKACHA, N. B.; GARGOURI, M. Microbial and Enzymatic Technologies used for the Production of Natural Aroma Compounds: Synthesis, Recovery Modeling, and Bioprocesses. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 675–706, 2015.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th ed. Gaithersburg, MD, USA, 2010.
- BEZERRA, T.; ESTEVEZ, M. ; LACERDA, J. T. ; DIAS, M. ; JULIANO, M. ; MENDES, M. A. ; MORGANO, M. A. ; PACHECO, M. T. B. ; MADRUGA, M. S. Chicken Combs and Wattles as Sources of Bioactive Peptides: Optimization of Hydrolysis, Identification by LC-ESI-MS2 and Bioactivity Assessment.. **Molecules** **JCR**, v. 25, p. 1698, 2020.
- BRETERNITZ, N. R., BOLINI, H. M. A., & HUBINGER, M. D. Sensory acceptance evaluation of a new food flavoring produced by microencapsulation of a mussel (*Perna perna*) protein hydrolysate. **LWT – Food Science and Technology**, v. 83, p.141–149, 2017.
- CORDEIRO, A. R. R. A.; DE MEDEIROS, L. L.; BEZERRA, T. K. A.; PACHECO, M. T. B.; GALVÃO, M. S. G.; MADRUGA, M. S. Effects of thermal processing on the flavor molecules of goat by-product hydrolysates. **Food Research International** **JCR**, v. 138, p. 109758, 2020.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1957.
- HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, n.6, p.912-916, 1989.
- KUMAR, M.; MCGLADE, D.; ULBRICHT, M.; LAWLER, J. Quaternized polysulfone and graphene oxide nanosheet derived low fouling novel positively charged hybrid ultrafiltration membranes for protein separation. **RSC Advances**, v. 63, n. 5, p.51208–51219, 2015.

LYNCH, S. A.; MULLEN, A. M.; O'NEILL, E.; DRUMMOND, L.; ÁLVAREZ, C. Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. **Meat Science**, v. 144, p. 62-73, 2018.

MADRUGA, M. S.; SOUSA, W. H.; MENDES, E. M. S.; BRITO, E. A. Carnes caprinas e ovinas: Processamento e fabricação de produtos derivados. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 1, p. 61-67, 2007.

MADRUGA, M. S.; ELMORE, J. S.; DODSON, A. T.; MOTTRAM, D. S. Volatile flavour profile of goat meat extracted by three widely used techniques. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1081 – 1087, 2009.

MADRUGA, M. S.; ELMORE, J. S.; ORUNA-CANCHA, M. J.; BALAGIANNIS, D.; MOTTRAM, D. S. Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat. **Food Chemistry**, v. 123, p.513-520, 2010.

MADRUGA, M. S.; BRESSAN, M. C. Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 39-45, 2011.

MORA, L.; REIG, M.; TOLDRÁ, F. Bioactive peptides generated from meat industry by-products. **Food Research International**, v. 65, p. 344-349, 2014.

O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; MELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to went meat tissues, oils and feedstuffs. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 1511-1521, 2007.

PEINADO, I.; KOUTSIDIS, G.; AMES, J. Production of seafood flavor formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. **Food Science and Technology**, v.66, p. 444 – 452, 2016.

QUEIROZ, A. L. M.; BRASIL, L. M. S.; SILVA, J.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L.; MADRUGA, M. S. Microbiological and nutritional quality of “buchada caprina” an edible goat meat by-product. **Small Ruminant Research**, v.115, p. 62-66, 2013.

QUEIROZ, A. L. M., BEZERRA, T. K'ENIA A., DE FREITAS PEREIRA, S., DA SILVA, M. E. C., DE ALMEIDA GADELHA, C. A., GADELHA, T. S., PACHECO, M. TERESA B., & MADRUGA, M. S. Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. **Food Bioscience**, v. 20, p. 19–27, 2017.

SANTOS, N.M.; COSTA, R.G.; MADRUGA, M.S.; MEDEIROS, A.N.; ALBUQUERQUE, C.L.C.; QUEIROGA, R.C.R.E. Constitution and Composition Chemistry of the Precooked Goat like *Buchada* Produced in the State of Paraíba, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.793-798, 2008.

SCHÄGGER, H.; JOAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem**, v. 166(2), p. 368-79, 1987.

SONG, S.; TANG, Q.; FAN, L.; XU, X.; SONG, Z.; HAYAT, K.; WANG, Y. Identification of pork flavour precursors from enzyme-treated lard using Maillard model system assessed by GC–MS and partial least squares regression. **Meat Science**, v. 124, p. 15–24, 2017.

SUKKHOWN, P.; JANGCHUD, K.; LORJAROENPHON, Y.; PIRAK, T. Flavored-functional protein hydrolysates from enzymatic hydrolysis of dried squid by-products: Effect of drying method. **Food Hydrocolloids**, p.1 -10, 2017.

SUN, W.W.; YU, S. J.; YANG, X. Q.; WANG, J. M.; ZHANG, J. B.; ZHANG, Y.; ZHENG, E. L. Study on the rheological properties of heat-induced whey protein isolate–dextran conjugate gel. **Food Research International**, v. 44, p. 3259–3263, 2011.

SUN, L. B.; ZHANG, Z.Y.; XIN, G.; SUN, B. X.; BAO, X. J.; WEI, Y.Y.; XU, H.-R. Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**, v.96, p. 176–187, 2020.

STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 8.0. Tusa, OK, EUA. (2014).

TOLDRÁ, F., ARISTOY, M.C., MORA, L., REIG, M. Innovations in value addition of edible meat by-products. **Meat Science**, v. 92, p. 290–296, 2012.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation**, v.8, n.4, p.170-177, 1986.

ZHAN, P.; TIAN, H.; ZHANG, X.; WANG, L. Contribution to aroma characteristics of mutton process flavor from the enzymatic hydrolysate of sheep bone protein assessed by descriptive sensory analysis and gas chromatography olfactometry. **Journal of Chromatography B**, v. 921-922 p.1-8, 2013.

ZOU, T.; KANG, L.; YANG, C.; SONG, H.; LIU, Y. Flavour precursor peptide from an enzymatic beef hydrolysate Maillard reaction-II: Mechanism of the synthesis of flavour compounds from a sulphur-containing peptide through a Maillard reaction. **LWT-Food Science and Technology**, v. 110, p. 8–18, 2019.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão apresentados no formato de artigo, em atendimento a Norma Complementar nº 03/2011 do PPGCTA.

4.1 ARTIGO I - EFFECTS OF THERMAL PROCESSING ON THE FLAVOR MOLECULES OF GOAT BY-PRODUCTS HYDROLYSATES

O artigo foi publicado no periódico Food Research International (ISSN 0963-9969), em 27 de setembro de 2020 sob o título *Effects of thermal processing on the flavor molecules of goat by-products hydrolysates*.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Effects of thermal processing on the flavor molecules of goat by-product hydrolysates

Ana Rita Ribeiro de Araújo Cordeiro^a, Lorena Lucena de Medeiros^a,
Taliana Kenia Alencar Bezerra^a, Maria Teresa Bertoldo Pacheco^b, Mércia de Sousa Galvão^a,
Marta Suely Madruga^{a,*}

^a Department of Food Engineering, Center for Technology, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, Brazil

^b Food Technology Institute (ITAL), Science and Food Quality Center, 13070-179 Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Autoclaving
Flavor
Goat by-products
Inactivation
Protein hydrolysates
Volatile compounds

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain flavor molecules from goat by-product hydrolysates, emphasizing the thermal action during processing. A mixture of by-products submitted or not to the inactivation of endogenous enzymes was used, followed by hydrolysis with the proteolytic enzyme Alcalase® (*Bacillus licheniformis*), and autoclaving after hydrolysis. The production of hydrolysates provided both quantitative and qualitative data on the precursors involved in the aromatic formation of protein hydrolysates. The inactivation process of endogenous enzymes resulted in hydrolysates with a higher degree of hydrolysis and greater protein content. The autoclaving process produced a significant increase in the concentration of free amino acids and maltose and a reduction in the glucose content. Application of the two heat treatments resulted in the production of goat by-product protein hydrolysates with different volatile profiles. The goat by-product protein hydrolysate without heat treatment but with autoclaving (HCA), showing a higher concentration of flavor precursors and the formation of heterocyclic volatiles, is expected to impact the aroma quality of goat hydrolysates.

1. Introduction

When goats are slaughtered, by-products are among the edible components that are not part of the carcass (blood, brain, intestines, liver, kidneys, stomach, heart and lungs), and they represent approximately 15–20% of the live weight of the animal (Queiroz, Araújo, Pacheco, & Madruga, 2017a). Some of these internal organs are considered excellent sources of protein, minerals (mainly iron and phosphorus), and vitamins (Queiroz et al., 2013).

A growing effort has been made to use and transform animal by-products into new products and functional ingredients with added value (Mora, Reig, & Toldrà, 2014). In studies on the proper use of goat by-products, it was observed that these by-products are interesting resources for the emergence of new products (Queiroz et al., 2013, 2017a). In this context, the conversion of goat by-products into a flavoring agents may be a commercially viable proposal and innovative use for goat by-products. Protein hydrolysates derived from meat systems are reagents commonly used to produce flavoring compounds (Zou, Kang, Yang, Song, & Liu, 2019); however, knowledge related to goat by-

product hydrolysates is very restricted.

Traditionally, there are a variety of technological applications aimed at the use of meat by-products for the production of new molecules (Araújo et al., 2018; Queiroz et al., 2017a; Xing, Liu, Cao, Zhang, & Guanghong, 2019), such as enzymatic and thermal hydrolysis, solvent extraction, microbial fermentation and autolysis (Toldrà, Reig, Aristoy, & Mora, 2017).

Enzymatic hydrolysis is the most widely used method in the food and pharmaceutical industries due to its sustainability, as it does not use organic solvents or products that present toxicity, in addition to its quick and controllable applications. It is also used to modify the physical, chemical and functional properties of foods and to improve their intestinal absorption characteristics without affecting their nutritional value (Benhabiles et al., 2012; Ngo, Vo, Ngo, Wijesekara, & Kim, 2012). A new approach has been created for the application of enzymatic hydrolysis to obtain flavoring compounds, thickening agents, emulsifiers, foaming agents and stabilizers (Zhan, Tian, Zhang, & Wang, 2013).

Studies focusing on the use of goat by-products carried out by our research group have shown that goat by-product protein hydrolysates

* Corresponding author at: Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.
E-mail address: msmadruga@uol.com.br (M.S. Madruga).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109758>

Received 12 May 2020; Received in revised form 23 September 2020; Accepted 27 September 2020

Available online 2 October 2020

0963-9969/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

have functional technological properties such as solubility, oil retention capacity, and emulsifying properties (Queiroz & Bezerra, 2017b). During protein hydrolysis, peptides, free amino acids, free fatty acids, and volatile compounds are formed, which interact with each other to give unique flavor characteristics (Mora, Toldrá-Reig, Reig, & Toldrá, 2019). Sometimes thermal processing must be used to ensure the creation of flavor compounds, mainly through the Maillard reaction. To reach this goal, high temperatures are usually employed. A process that is often carried out is autoclaving, which not only leads to the formation of aromatic compounds but also ensures the safety of the material. In the construction of flavor formulations, thermal processing must be used to promote the formation of flavor, through the Maillard reaction. For this, high temperatures are employed, a process that can be carried out by autoclaving, allowing the formation of aromatic compounds in addition to ensuring the safety of the food under study (Peinado, Koutsidis, & Ames, 2016; Song et al., 2017; Zou et al., 2019).

In this context, further studies focusing on the potential of using goat hydrolysates as flavoring agents were carried out. For this, the present work aimed to obtain aromatic molecules from goat internal organ (liver, heart and lung) hydrolysates, emphasizing the effects of inactivation of endogenous enzymes and the use of autoclaving after hydrolysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Goat by-products (liver, heart and lung) were provided by a local supplier located at the Central Public Market in the city of João Pessoa (Paraíba, Brazil). For the study, a mixture of the liver, heart and lung (at a 1:1:1 ratio) was used. The proteolytic enzyme used to obtain the protein hydrolysate was Alcalase® (*Bacillus licheniformis*), supplied by Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brazil), based on previous studies carried out by Queiroz and Bezerra (2017b).

2.2. Experimental design and production of goat by-product hydrolysates

The sanitized and refrigerated by-products were weighed, crushed in a meat processor (model CAF, São Paulo, Brazil), homogenized and frozen (-15 ± 1 °C). Samples of the by-product mixture (30 g) were used to obtain the hydrolysates. Initially, studies on the thermal inactivation of endogenous enzymes were carried out, where the by-product mixture was submitted to heat treatment at 90 °C for 15 min; a control by-product mixture was prepared without thermal inactivation. Inactivated and control goat by-product mixtures were then submitted to the enzymatic hydrolysis process with Alcalase®, according to methodology reported by Queiroz and Bezerra (2017b) and the hydrolysis degree (HD) was defined according to the procedure by Adler-Nissen (1986).

Two by-product hydrolysates were obtained at the end of the process: HC (goat by-product protein hydrolysate without previous thermal

treatment or control) and HT (goat by-product protein hydrolysate after heat treatment (90 °C for 15 min with agitation)). Then, both hydrolysates were autoclaved for 1 h at 121 °C, resulting in two new products: HCA: goat by-product protein hydrolysate without heat treatment and with autoclaving, and HTA: goat by-product protein hydrolysate with both heat treatment and autoclaving (Fig. 1). The four hydrolysates were then characterized in terms of total protein and lipid contents, fatty acids, free and total amino acids, sugars and volatiles.

2.3. Methods

Proximate composition: Moisture, ash and protein analyses were performed according to the methodology described in AOAC items 950.46A, 920.153 and 928.08, respectively (2010). Lipids were measured according to the procedures of Folch, Less, and Stanley (1957). Carbohydrates were calculated by the difference between 100 and the sum of the percentages of water, protein, fat and ash.

Total amino acids (TAAs): Total amino acids were quantified according to the methodology described by White, Hart, and Fry (1986), in which amino acids were determined in samples previously hydrolyzed at 110 °C/22 h, with 6 mol/L double-distilled hydrochloric acid under vacuum, followed by precolumn derivation of free amino acids with phenylisothiocyanate (PITC).

Free amino acids (FAAs): Free amino acids were extracted from lyophilized samples by shaking with 0.1 mol/L hydrochloric acid (g/mL) for 60 min followed by precolumn derivation of free amino acids with phenylisothiocyanate (PITC) according to White, Hart, and Fry (1986) and Hagen, Frost, and Augustin (1989).

Sugars: Sugar analysis was performed using an Agilent HPLC system, model 1260 Infinity LC (VARIAN, Waters, California, USA), coupled with an Agilent Hi-Plex Ca column (7.7 × 300 mm × 8 µm) at 85 °C with a refractive index detector (RID, VARIAN) and a manual sampler with a 20 µL handle. The flow rate applied was 0.6 mL/min, with a total analysis time of 30 min. The mobile phase used was ultrapure water. Standard solutions were injected to obtain the retention time for each compound ($R^2_{\text{maltose}} = 0.9988$; $R^2_{\text{glucose}} = 0.9910$; $R^2_{\text{fructose}} = 0.9997$; $R^2_{\text{ribose}} = 0.9997$). The results are expressed as g of sugars/100 g.

Fatty acids: Direct transesterification of the fatty acids present in the goat by-product mixture was performed as described by O'fallon, Busboom, Melson and Gaskins (2007). Identification and quantification of the fatty acid esters was performed using a gas chromatograph (HP Hewlett Packard 6890 Series GC System) coupled with a fused-silica polar capillary column (Supelco, USA) with dimensions of 100 m × 0.25 mm and a film thickness of 0.2 µm. Fatty acids were identified by comparing the retention times of the methyl esters of the samples with Supelco ME19 kit standards (Fatty Acid Methyl Esters C4-C24). Fatty acid concentrations are presented as g of fatty acid/100 g of hydrolysate.

Volatile profile: Volatile extraction was performed using a solid phase microextraction (SPME) technique with a SPME device (Supelco, Bellefonte, USA) methodology adapted from Breternitz, Bolini, and

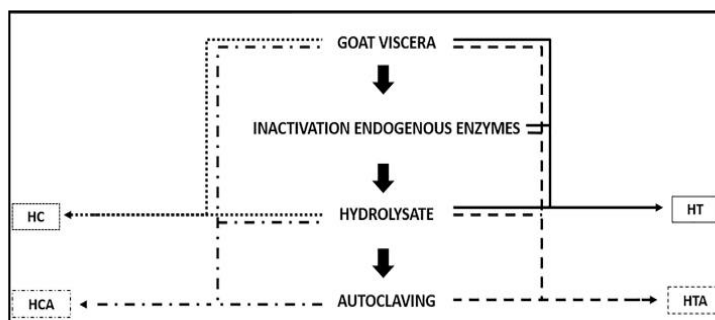


Fig. 1. General process of obtained flavoring molecules from goat by-product.

Hubinger (2017), using 7890B gas chromatograph (Agilent Technologies 5977B, Little falls, DE, USA) coupled to mass spectrometer. The fiber used was 65 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) and activated according to the manufacturer's conditions. After reaching equilibrium (50 °C for 10 min), the fiber was exposed to the headspace for 30 min of extraction. The following conditions were used: a VF-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) column; and an initial oven temperature of 40 °C for 2 min, that increased by 15 °C/min to 230 °C and remained for 10 min, for a total run time of 24.6 min. The injector temperature was fixed at 250 °C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min in the 1:20 split injection system. The temperature of the transfer line was 250 °C. The mass spectrometer was

operated in electron impact mode (70 eV) and the mass scanning range was from 29 to 350 u.m.a at 3.33 scans/s. Compounds were identified by comparing their mass spectrum and LRI with those of an authentic compound run on a DB-5 column, or comparing their mass spectra with standard compounds present in the database provided by the NIST (National Institute of Standards and Technology, USA) equipment. The results are expressed in digital units (counts). The linear retention index (LRI) of each compound was calculated via the retention times of a homologous series of C6–C25 n-alkanes.

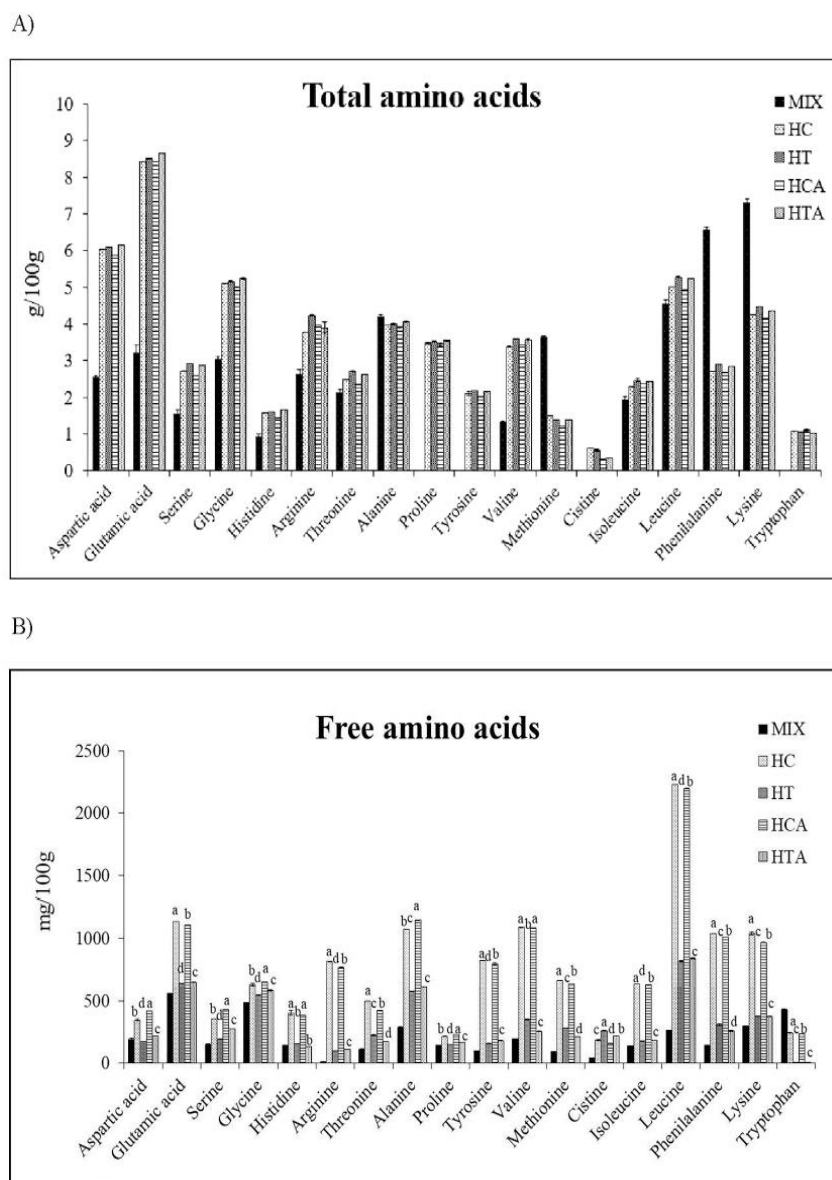
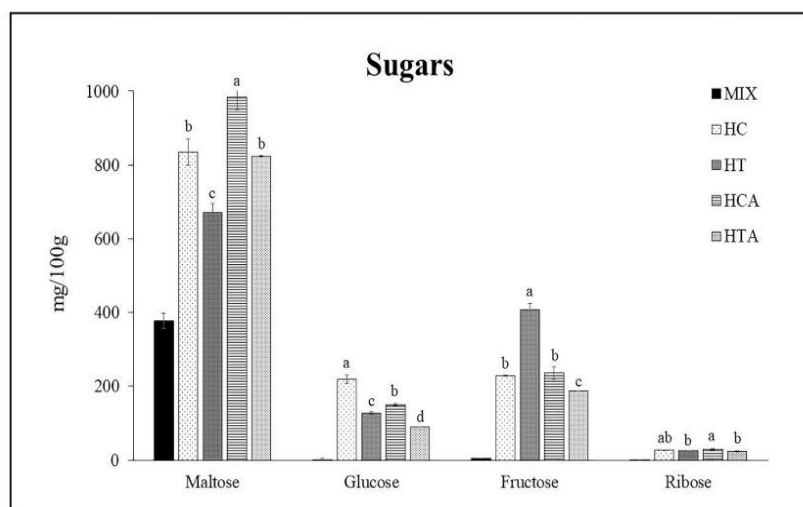


Fig. 2. Total amino acids (A), Free amino acids (B), sugars (C), Fatty acids (D) quantified in goat by-product mixture (Mix) and in goat by-product protein hydrolysates (HC: goat hydrolysate without previous thermal treatment or control, HT: goat hydrolysate after heat treatment, HCA: goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving, HTA: goat hydrolysate with heat treatment and autoclaving). a,b,c,d different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

C)



D)

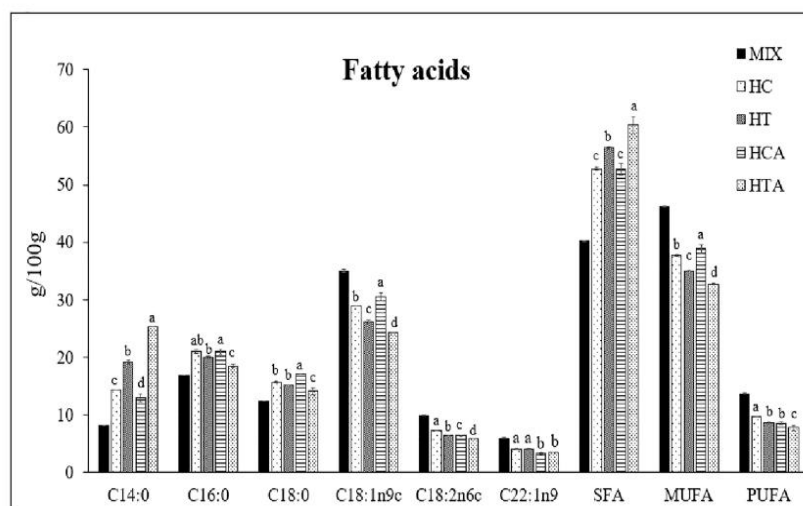


Fig. 2. (continued).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis of the goat by-product hydrolysate characterization results was performed using the fully randomized design (FRD) and Statistical Analysis System software (version 11.0) (SAS Institute, 2014). Responses were evaluated using analysis of variance (ANOVA) at the 5% significance level, with treatment averages compared to each other by the Tukey test.

Principal component analysis (PCA) was used to obtain a two-dimensional representation of the hydrolysate samples and the fatty acid, amino acid, sugar and volatile compound contents. Data were processed using XLStat software (version 2014.5.03, Addinsoft, New York, USA).

3. Results and discussion

3.1. Composition of the mixture of goat by-products

The goat mixture (liver, heart and lung) stood out for its high protein content (18.77%) and humidity (74.18%), with low concentrations of lipids (4.82%) and ash (1.20%); the total carbohydrate content was 1.03%. The high protein content revealed its potential for the production of hydrolysates as excellent sources of protein and the potential for the production of peptides, which are molecules that are used as precursors for the production of flavorings via the Maillard reaction (MR) (Nollet & Toldra, 2011; Queiroz et al., 2017a). The values found are in agreement with the results reported by Queiroz et al. (2017a). The low fat content (<5%) found was expected and is a valuation criterion in the

use of these by-products (Honikel, 2011).

The quantified total amino acid profile revealed the presence of 18 amino acids, which together comprised 45.48 g/100 g of sample (Fig. 2A), and the amino acids lysine, phenylalanine, leucine, alanine and methionine were the most abundant. Eighteen free amino acids (Fig. 2B) were also identified in the sample, with a total concentration of 33.64 g/100 g, and higher amounts of the amino acids glycine, glutamic acid, tryptophan, alanine and lysine were obtained.

The total amino acid profile was similar to that reported by Queiroz et al. (2017a) in goat by-products, as well as the free amino acid profile in goat meat reported by Madruga, Elmore, Oruna-Concha, Balagiannis, and Mottram (2010), where the goat meat contained the highest amounts of the free amino acids glycine, alanine, glutamine, arginine and glutamic acid. Amino acids such as leucine, isoleucine, serine, threonine, valine and phenylalanine are important in the formation of the meaty flavor, supplying Strecker aldehydes and other aromatic compounds such as pyrazines (Madruga et al., 2010).

The total sugar concentration in the by-product mixture was 384.63 mg/100 g (Fig. 2C), and it was found that maltose, fructose, glucose and ribose were the sugars present in the samples. Maltose was present in the highest concentration (377.12 mg/100 g), while fructose, glucose and ribose were present in lower concentrations (4.91 mg/100 g, 1.97 mg/100 g, and 0.63 mg/100 g, respectively). These last three monosaccharides and one disaccharide (maltose) are generally reported in meat products, as they are generated by the glycolysis process or nucleotide degradation (Koutsidis et al., 2008; Madruga et al., 2010). Lower ribose concentrations have been reported in goat meat (Madruga et al., 2010) and bovine meat (Koutsidis et al., 2008).

Nineteen fatty acids were identified in the by-product mixture, mostly consisting of saturated fatty acids (40.2%) and monounsaturated fatty acids (46.2%), followed by polyunsaturated fatty acids (13.6%). The predominant fatty acids were oleic (35%), palmitic (16.8%), stearic (12.4%), linoleic (9.9%) and myristic (8.1%) acids, which were quantified at higher levels in the by-product mixture. The composition of fatty acids found in the by-products is conditioned by the content of fatty acids that compose the animal tissue, as well as by the diet and genetics of these animals. Branskalieva, Sahlou, and Goetsch (2000) found that stearic and palmitic acids are among the main fatty acids identified in goat meat. Queiroz et al. (2017a) highlight that fatty acids found in goat products are precursors of volatile compounds, therefore, goat by-products can be used as raw materials for the production of protein hydrolysates, which are a source of new functional ingredients.

3.2. Production of goat by-product protein hydrolysates

The protein hydrolysate obtained from the by-product mixture after inactivation by endogenous enzymes (HT) reached a hydrolysis degree of 22.75% under the test conditions, differing from the hydrolysate obtained without inactivation (HC), which presented a hydrolysis degree of 18.76% (Fig. 3). This behavior probably occurred by the

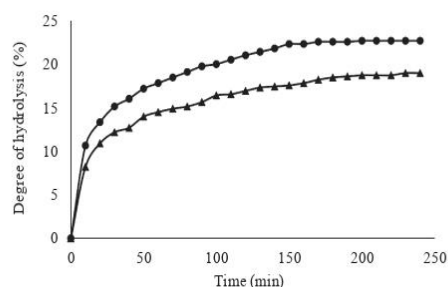


Fig. 3. Hydrolysis kinetics of the goat by-product mixture (1: 1: 1) with (HT) and without (HC) inactivation of endogenous enzymes using alcalase.

inactivating endogenous enzymes competing for the same substrate, as well as their inhibition, paving the way for the action of the exogenous enzyme *Bacillus licheniformis* (Alcalase®) to act specifically without interference from other enzymes. The hydrolysis degree is related to the intensity of the breakdown of peptide bonds, and with this enzyme in particular, is unspecific with high hydrolytic capacity (Halim, Yusof, & Sarbon, 2016; Toldrá et al., 2017). Queiroz and Bezerra (2017b) confirmed that the highest level of hydrolysis (17, 63%) was prepared from the goat viscera protein hydrolysate using the Alcalase® enzyme.

In addition, both curves showed common evolution, marked by the high hydrolysis rates during the initial minutes of the reaction, which decreased with hydrolysis time until the enzymatic reaction became stable after the first two hours. This is because hydrolysis products are responsible for enzyme inhibition and can act as agents capable of combating disturbances in the hydrolysis process (Abdelhedi et al., 2016).

Regarding the protein content found from the first two treatments (HC and HT) compared to the initial raw sample (goat by-product mixture), it was observed that hydrolysates had an increase of >60% of this component, which was expected. An increase in the percentage of lipids was also observed, being 61.20% in HC and 40.25% in HT compared to the percentage of lipids in the initial goat raw mixture.

After production of the hydrolysates, the autoclaved samples (HCA and HTA) showed a high protein content relative to the raw material (58.44% and 65.16%, respectively) and values similar to those of the first two hydrolysates (HT and HC).

3.3. Volatiles from goat by-product protein hydrolysates

Thirty-one volatile compounds were identified in the goat by-product protein hydrolysates (Table 1). The majority (25) of these compounds (6 aldehydes, 1 hydrocarbon, 7 ketones, 6 alcohols, 2 furans and 3 carboxylic acids) were formed via lipid degradation. The compounds formed via the Maillard reaction (8) included heterocyclic compounds containing oxygen, nitrogen and sulfur, such as pyrazines (5), a thiazole (1), and a thiophene (1) and nonheterocyclic compounds, such as a Strecker aldehydes (1). The profile of volatile compounds found corroborates studies carried out by Madruga et al. (2010), presenting compounds similar to those observed in cooked goat meat.

The main aromatic compounds identified in the headspace of the unautoclaved hydrolysates (HC and HT) were ketones, alcohols, aldehydes and pyrazines. The same classes of compounds are also in the majority in the autoclave-treated samples (HCA and HTA) but they are present in a different concentration order, with greater amounts of aldehydes followed by ketones, alcohols and pyrazines.

Carbonyl compounds (aldehydes and ketones) are important aromatic compounds (odor-active compounds) that contribute to the general odor attributed to a food. Both can be formed via the Maillard reaction or by lipid oxidation (Cardinal et al., 2020; Wei et al., 2020). Aldehydes, particularly those that are unsaturated are important intermediates and can participate in interactions between amino acids and carbonyl groups, for the subsequent formation of meat-specific volatile compounds (Song et al., 2017).

The contents of saturated aliphatic aldehydes, such as hexanal, octanal and nonanal, were higher than the contents of unsaturated aldehydes (2-nonenal; (E)-2-undecenal) after the treatments. This probably resulted from the fact that unsaturated aldehydes are more reactive than saturated aldehydes, and more likely to be involved in the Maillard reaction (Wei et al., 2020). In addition, it is believed that the formation of aliphatic aldehydes occurs via lipid oxidation, as reported in fish meat by Cardinal et al. (2020).

Aliphatic alcohols are known to contribute to meat flavor through unsaturated alcohols due to their lower threshold values. 1-Octen-3-ol, for example, which was present in all treatments, had its content reduced as the thermal treatments were applied. Its formation appears to be associated with fatty acid degradation (Sun et al., 2020) and it is

Table 1
Profile of volatile compounds (area units $\times 10^5$) in goat by-product protein hydrolysates.

Code	Compound	LRI ^a	ID ^b	Goat hydrolysates ^c				Flavor description ^d
				HC	HT	HCA	HTA	
<i>Acids</i>								
	Hexadecanoic acid	1966	A	nd ^e	nd	nd	174.83	Waxy
	Z-11-Octadecenoic acid	2139	B	nd	nd	0.17	158.76	
	Octadecanoic acid	2172	A	nd	nd	0.58	85.40	
<i>Alcohol</i>								
	3-Methyl-3-buten-1-ol	729	A	3.24	3.04	0.64	0.87	Buttery, fatty, sweaty
	1-Pentanol	778	A	7.47	12.28	2.90	6.76	Pungent, fermented, bready, alcoholic, balsamic, sharp
	1-Octen-3-ol	982	A	48.81	35.27	10.95	9.86	Mushroom
	2-Ethyl-1-hexanol	1031	A	nd	nd	12.99	11.17	Mushroom, cucumber, cooked vegetable
	2-Octen-1-ol	1070	A	9.86	16.16	2.02	15.22	Fatty
	2,6-Dimethylcyclohexanol	1117	B	36.47	42.15	16.69	74.19	
<i>Strecker Aldehydes</i>								
	3-Methylbutanal	650	A	nd	nd	8.22	35.89	Malty, dark chocolate, toffee
<i>Aldehydes</i>								
	Hexanal	802	A	39.93	23.45	2.83	4.64	Green, fatty, leafy, vegetative
	Heptanal	903	A	11.76	5.63	4.35	3.24	Fatty, oily, citrus, fruit, green
	Benzaldehyde	966	A	142.88	97.63	95.09	80.10	Roasted pepper, nutty
	Nonanal	1107	A	31.79	18.24	30.14	56.21	Fatty, floral, citrus, green
	2-Nonenal	1164	A	5.99	1.03	7.83	3.38	
	(E)-2-Undecenal	1376	A	nd	nd	4.43	5.47	Geranium, green, waxy
<i>Aromatic</i>								
	Methyl benzene	769	A	nd	11.65	nd	nd	Fruity, sweet
<i>Ester</i>								
	Methyl arachidonate	2274	A	nd	nd	nd	4.77	
<i>Furan</i>								
	2-Pentylfuran	994	A	18.90	15.05	26.39	33.74	Fruity, green, sweet, pungent
	5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4-7a-trimethyl-2-(4H)-benzofuranone	1557	B	4.23	3.68	4.69	1.46	
<i>Hydrocarbons</i>								
	p-Xylene	872	A	nd	nd	3.64	9.11	
<i>Ketones</i>								
	3-Hydroxy-2-butanone	709	A	11.05	7.31	3.70	13.27	Buttery, fatty, sweaty
	2-Heptanone	892	A	15.38	10.75	18.10	18.55	Soapy, fruity, blue cheese, green
	2,3-Octanedione	982	A	184.38	144.89	18.94	23.35	
	2-Nonanone	1094	A	8.02	2.10	20.61	65.67	Fatty, fruity, musty, blue cheese
	3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexenone	1130	B	14.04	5.16	9.05	2.42	
	2-Decanone	1195	A	17.28	7.06	33.04	21.74	Fatty, cucumber, paper
	β-Ionone	1499	B	8.00	5.62	6.94	3.55	
<i>Pyrazines</i>								
	2,5-Dimethylpyrazine	914	A	171.94	11.63	381.38	463.41	Cocoa, roasted nut, roast Beef, medicine
	2-Ethyl-5-methylpyrazine	1005	A	13.41	9.07	224.83	101.37	Fruity
	3,5-Dimethyl-2-ethylpyrazine	1084	A	nd	nd	374.45	142.47	
	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	1089	A	3.67	3.88	10.25	36.84	
	2,5-Dimethyl-3-isoamylpyrazine	1322	A	12.00	11.50	13.09	14.29	
<i>Terpenes</i>								
	α-Copaene	1370	B	2.57	1.40	1.06	1.23	Woody
	Caryophyllene	1442	B	3.80	3.12	2.96	1.62	Spicy
<i>Thiazole</i>								
	2-Acetylthiazole	1024	A	nd	nd	117.44	80.33	Roasty, nutty, popcorn, meat
<i>Thiophene</i>								
	2-Acetylthiophene	1097	A	6.38	nd	14.86	nd	

^a Linear retention indices.

^b A, mass spectrum and LRI agree with those of an authentic compound ran on DB-5 column; B, tentative identification where mass spectrum agrees with reference spectrum in the NIST/EPA/NIH mass spectral database.

^c HC (goat hydrolysate without previous thermal treatment or control), HT (goat hydrolysate after heat treatment), HCA (goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving), HTA (goat hydrolysate with heat treatment and autoclaving).

^d Aroma description obtained from database available on the web at <https://www.flavornet.org/flavornet.html>.

^e nd, not detected.

considered to be an important contributor to the overall meat aroma, as it provides a striking mushroom aroma with a lower threshold (Peinado et al., 2016; Ramalingam, Song, & Hwang, 2019).

The aromatic compound profile of the four hydrolysates

demonstrated that the unautoclaved hydrolysates (HC and HT) had a lower number of volatile compounds (26 compounds each) and lower peak area counts (827.82 and 508.75 counts, respectively). Regarding the autoclaved treatments, a higher number of compounds was found:

34 compounds in HCA and 35 in HTA; additionally, the peak counts were higher (1485.25 and 1765.18 counts, respectively).

Changes in the volatile compounds after the autoclaving process mainly showed a decrease in alcohol and aldehyde compound contents and an increase in pyrazines and benzaldehyde. The production of benzaldehyde can occur via the Maillard reaction or through the oxidation or photochemical degradation of toluene or other hydrocarbons. Pyrazines are also generated via the Maillard reaction and usually formed at high temperatures. Pyrazines occurred mainly when the hydrolysates were heated, and represent an important component of the aroma of goat hydrolysates; they were also reported to contribute to the aroma of roasted meat (Cardinal et al., 2020; Wei et al., 2020).

The autoclaving process (samples HCA and HTA) also favored the formation of six new compounds (3-methylbutanal, *p*-xylene, 2-acetylthiazole, 2-ethyl-1-hexanol, 3,5-dimethyl-2-ethylpyrazine and 2-undecenal), which are related to lipid degradation and products from the Maillard reaction. Similar results were observed in the studies carried out by Song et al. (2017) in swine lard hydrolysates, in which the hydrolysis process favored an increase in these volatile compounds.

The 2,5-dimethylpyrazine content was 2.21 times higher in HCA and 39 times higher in HTA compared to the corresponding unautoclaved samples, and the 2-pentylfuran content was 1.4 times higher in HCA and 2.24 times higher in HTA, respectively. The compound 2,5-dimethylpyrazine, which considerably contributes to the aroma of roasted meat and nuts, is believed to have been formed through the Maillard reaction, and therefore a higher amount of this compound would enhance the Maillard notes (Cardinal et al., 2020). In turn, 2-pentylfuran, contributing a grassy and pungent aroma, has a low threshold value in water, with little aromatic contribution to the hydrolysate produced.

3.4. Total amino acids (TAA) and free amino acids (FAAs) of the goat by-product hydrolysates

The total amino acid content for all samples (HC, HT, HCA, HTA) is shown in Fig. 2A. For all samples eighteen amino acids were identified and quantified, and the concentrations of total amino acids did not vary among the hydrolysates. The TAA percentage was 60.55 g/100 g for HC, 62.65 g/100 g for HT, 59.22 g/100 g for HCA, and 62.04 g/100 g for HTA. Glutamic and aspartic acids, glycine, leucine and lysine were the most abundant, together representing more than 45% of the total amino acids found. Similar results were observed in the goat by-product hydrolysates studied by Queiroz and Bezerra (2017b). That same study indicated that the high glutamic acid content enables the use of these hydrolysates as flavorings or flavor enhancers.

The content of free amino acids in the hydrolysate samples is shown in Fig. 2B. There was a significant difference ($p < 0.05$) in the concentrations of free amino acids in the hydrolysates, indicating that the application of temperature was able to change the amount of free amino acids in the hydrolysates. Their concentrations varied: 13.42 mg/100 g in HC, 5.49 g/100 g in HT, 13.28 g/100 g in HCA and 5.45 g/100 g in HTA. The amino acids leucine, glutamic acid, valine, alanine, phenylalanine and lysine were present in higher amounts in the control treatments (HC and HCA), representing more than 56% of the total free amino acids. In treatments where there was inactivation of endogenous enzymes (HT and HTA), higher concentrations of leucine, glutamic acid, alanine and glycine were observed, representing more than 45% of the total free amino acids found. These results corroborate with the results obtained by Madruga, Dantas, Queiroz, Brasil, and Ishihara (2013), who identified glutamic acid, alanine, glycine, leucine and lysine as the main amino acids in goat meat.

The metabolism of amino acids is an important route of formation of aromatic compounds. Through the Ehrlich pathway and subsequent conversion to its alcohol or corresponding acid, amino acids such as leucine, isoleucine, valine and phenylalanine are transformed into 3-methylbutanal, 2-methylbutanol, 2-methylpropanol and 2-phenylethanol, respectively (Sun et al., 2020).

The amino acids leucine, valine and phenylalanine are fundamental in the formation of aroma, supplying Strecker aldehydes and other aromatic compounds, such as pyrazines (Madruga et al., 2010). Additionally, free amino acids obtained from enzymatic hydrolysis are important precursors in the formation of compounds that are characteristic of meat aroma and roasting, and are associated with the flavor of cooked meat (Madruga et al., 2010; Zhan et al., 2013).

It is also notable that free amino acids play important roles in the taste of foods, and may or may not contribute to a sweet, sour, bitter, or umami taste (Sun et al., 2020). Glycine and alanine showed considerably strong sweetness, demonstrating that the sweet taste of lobster and crab, for example, results from the presence of these amino acids. Hydrophobic amino acids, such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan, leucine, valine and isoleucine are responsible for a bitter taste. Data reported by Ramalingam et al. (2019) and Nishimura and Kato (1988) showed that almost all peptides made up of these hydrophobic amino acids also give a bitter taste.

Glutamic and aspartic acids, when dissociated, cause sour stimuli, and in the presence of a sodium salt, cause an umami taste (Nishimura & Kato, 1988; Sun et al., 2020). Studies have suggested that glutamic acid plays an important role in the umami and savory flavors in meat (Solms, 1969). It has been found that the fraction of oligopeptides rich in glutamic acid can effectively mask the bitter taste. Thus, the addition of these peptides to drugs and beverages that have a bitter taste seems to be a useful alternative to reduce the bitter taste of these products (Nishimura & Kato, 1988).

3.5. Sugars from goat by-product protein hydrolysate

The concentrations of the sugars (maltose, glucose, fructose and ribose) after treatment are shown in Fig. 2C. Considerable variation found in their concentrations is due to the application or not of temperature in the processes to obtain the hydrolysates, with maltose at higher concentrations and ribose at lower concentrations in all by-product hydrolysates.

A significant increase ($p < 0.05$) in maltose concentration was observed in the autoclaved hydrolysates (HCA and HTA), thus demonstrating that autoclaving may have hydrolyzed glycogen, favoring maltose production. Glycogen is the main animal energy reserve compound and is mainly stored in the liver. The increase in the amount of carbohydrates in meat comes from the breakdown of glycogen and ATP, as well as from energy metabolism (Aaslyng & Meinert, 2017). In addition, heating meat affects the carbohydrates and modifies its flavor through the production of volatile compounds (Ramalingam et al., 2019).

On the other hand, the significant reduction ($p < 0.05$) in glucose after autoclaving treatment (31.1% in HCA and 29.8% in HTA) must have resulted from the involvement of glucose in the Maillard reaction. It is known that this is one of the most important reactions in the production of volatile compounds in cooked meat through the formation of certain pentose and hexose degradation products containing carbonyl groups, which are the main reagents in the formation of relevant heterocyclic compounds (pyrazines, thiazoles and thiophenes), already identified in the volatiles of hydrolysates produced and in cooked goat meat (Karangwa et al., 2013; Madruga et al., 2010).

With a concentration approximately 30 times lower than that of maltose, ribose showed behavior contrary to what was expected, with the initial amount practically unchanged after heat treatment. It is known that among reducing sugars, ribose is the most reactive in the Maillard reaction, thus resulting in less free ribose, corroborating the results found by Madruga et al. (2010).

In turn, fructose has been described as one of the sugars found in higher percentages in goat meat, a fact that was observed in all hydrolysates produced. Its concentration remained unchanged for the control hydrolysate (HC) even after autoclaving. However, it was observed that its concentration was reduced by approximately 54% in the HTA sample.

The heat treatment applied may have favored the reaction of fructose with an amino acid present through the glycation process, generating other Maillard reaction products or advanced glycation end products (Frolov, Hoffmann, & Hoffmann, 2006; Jerić, Versluis, Horvat, & Heck, 2002).

It is also known that sugars have variable levels of sweetness. Sucrose, for example, has by convention a sweetness of 100; thus, all other sugars are compared to it. Fructose is the sweetest (172%), followed by maltose (65%) and glucose (31%) (McCaughy, 2008).

3.6. Fat and fatty acids from goat by-products protein hydrolysates

The cooking methods and conditions (time, temperature and heating rate) are able to modify the chemical composition and nutritional value of meat (Peinado et al., 2016). In meat products, the specific flavor of each species comes from lipids. For example, the tenderization and/or oxidation process of lipid components is responsible for providing the specific flavors of the species identified in meat products. Through their interaction with products from the Maillard reaction, lipid oxidation products generate new flavors associated with cooked meat (Khan, Jo, & Tariq, 2015).

Comparing the initial treatments (HC and HT) and autoclaved treatments (HCA and HTA), the same behavior was observed after the thermic process regarding the fatty acid profile: a significant increase ($p < 0.05$) in the total content of saturated fatty acids and a decrease in the content of mono and polyunsaturated fatty acids.

The metabolism of fatty acids represents an important route of aroma production (Wei et al., 2020). It is clear that unsaturated fatty acids, mainly oleic and linoleic acids, play an important role in the formation of flavoring products, and in this study, they their contents were higher in the control treatment. Hundreds of volatile compounds are derived from the degradation of lipids, such as aldehydes, ketones, alcohols, esters, carboxylic acids, and lactones, which impact the aroma of cooked meat, in addition to alkylfurans and aliphatic hydrocarbons that have a reduce importance in the meat flavor (Mottram, 1998; Sun et al., 2020).

The decomposition of linoleic acid, for example, forms compounds, such as hexanal, 1-octen-3-ol, and 2-pentylfuran, which were observed in the hydrolysates, while the decomposition of linoleic acid can generate, particularly, nonanal and octanal (Ramalingam et al., 2019;

Wei et al., 2020; Xia, Mei, Yu, & Li, 2017). Considering the pleasant odors of hexanal, its moderate increase is desirable for maintaining the fresh flavor as long as it is in sufficiently low concentration. Probably, hexanal contributed to the aroma of the HC and HT hydrolysates.

3.7. Principal component analysis

Principal component analysis (PCA) was performed based on the average values of free and total amino acids, sugars and fatty acids in the four hydrolysates (Fig. 4). Through PCA, it was possible to explain 92.28% of the variability among the hydrolysate samples. The two main components (PC1 and PC2) showed variances of 61.70% and 30.58%, respectively.

Differences resulting from the applications of inactivation by endogenous enzymes and autoclaving were significant, with protein hydrolysate samples dispersed in different quadrants and most compounds located in the positive region of PC1.

Therefore, the hydrolysates that underwent inactivation by heat treatment by endogenous enzymes (samples HT and HTA) were better characterized by the content of total amino acids, while the control treatments (HC and HCA) were characterized by free amino acids (alanine, leucine, arginine, glutamic acid, lysine, phenylalanine and valine), as was the case with HCA; therefore, it is expected that this treatment will have a high impact on the formation of volatile compounds.

From the principal component analysis based on the values of volatile compounds (Fig. 5), it was possible to obtain a better representation of the differences among the four hydrolysates, since their distribution in the PCA graph revealed that the hydrolysates were divided into four different quadrants.

Approximately 83.79% of the variability among the hydrolysates could be explained, with the first principal component (PC1) explaining 52.59% of the variability and the second (PC2) explaining 31.20%. Differences due to autoclaving were significant, with HCA and HTA remaining on the positive axis of PC1 and HC and HT on the negative axis. Thus, it was observed that autoclaving had a significant impact on the formation of pyrazines and volatile compounds the meat aroma. In addition, important heterocyclic compounds, such as 2,5-dimethylpyrazine and 2-pentylfuran, strongly characterized the autoclave-treated

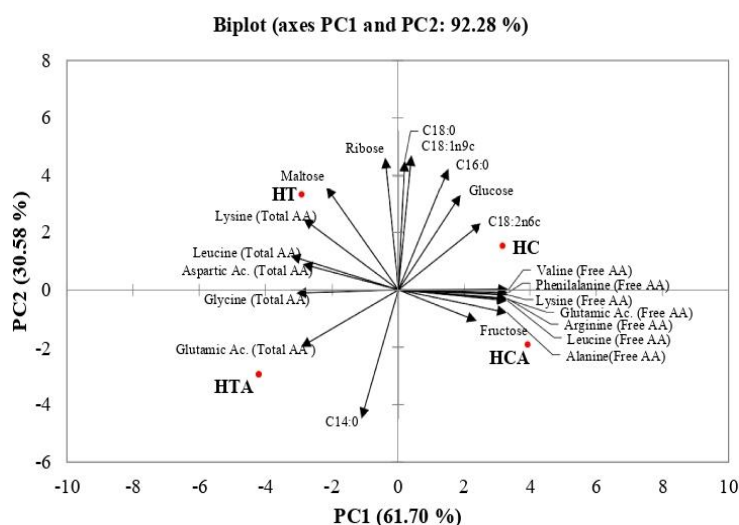


Fig. 4. Biplot for the different goat by-product hydrolysates generated with different heat treatments (HC: goat hydrolysate without previous thermal treatment or control, HT: goat hydrolysate with heat treatment, HCA: goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving, HTA: goat hydrolysate with heat treatment and autoclaving), and total amino acids, free amino acids, sugars and fatty acids obtained by PCA (PC1: 61.70%, PC2: 30.58%).

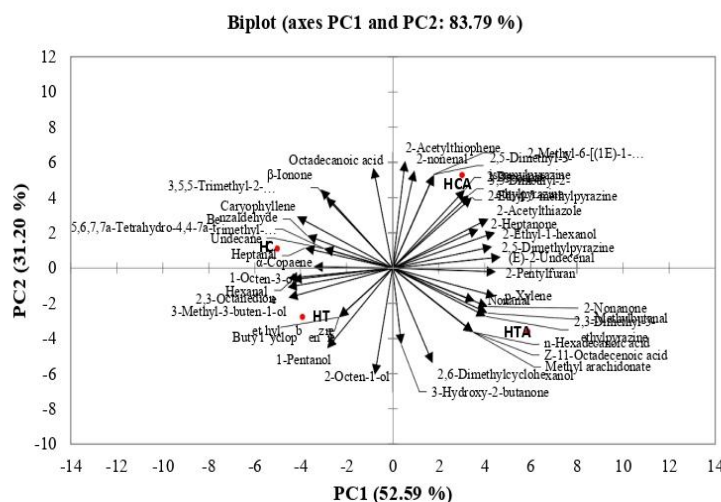


Fig. 5. Biplot for the different goat viscera hydrolysates generated with different heat treatments (HC: goat hydrolysate without previous thermal treatment or control, HT: goat hydrolysate after heat treatment, HCA: goat hydrolysate without heat treatment, and with autoclaving, HTA: goat hydrolysate with heat treatment and autoclaving), and volatile compounds obtained by PCA (PC1: 52.59%, PC2: 31.20%).

samples.

4. Conclusion

The thermal process of inactivating endogenous enzymes and autoclaving sterilization provided quantitative and qualitative data on the precursors involved in the aromatic formation of protein hydrolysates from goat by-products. The inactivation process of endogenous enzymes resulted in hydrolysates with a high degree of hydrolysis and high protein content. The autoclaving process provided a significant increase in the concentration of free amino acids, such as glutamic acid, alanine, arginine, valine, leucine, lysine and phenylalanine, along with a significant reduction in the glucose content and an increase in the maltose content. The fatty acids oleic and linoleic were observed in the products, which play an important role in the formation of the volatile compounds that are characteristic of the meat aroma. The application of two heat treatments resulted in the production of protein hydrolysates with different volatile profiles, demonstrating that the autoclaving process favored the production of pyrazines and other heterocyclic compounds. The HCA process, showing higher concentrations of flavor precursors and a greater formation of heterocyclic volatiles is expected to impact the aroma quality of goat hydrolysates. Further studies using different flavoring formulations and the application of goat protein hydrolysate (HCA) should be carried out.

CRedit authorship contribution statement

Ana Rita Ribeiro de Araújo Cordeiro: Conceptualization, Data curation, Writing - original draft, Investigation. Lorena Lucena de Medeiros: Validation, Software. Taliana Kenia Alencar Bezerra: Conceptualization, Methodology. Maria Teresa Bertoldo Pacheco: Visualization, Supervision, Methodology. Mércia de Sousa Galvão: Software, Methodology. Marta Sueli Madruga: Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development; CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil; CAPES) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (The Paraíba State Foundation for the Support of Research; FAPESQ) for their financial support on Project 005/2019/PRONEX and the scholarship granted to the first author.

References

- Aaslyng, M. D., & Meinert, L. (2017). Meat flavour in pork and beef – From animal to meal. *Meat Science*, 132, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.012>.
- Abdelhedi, O., Jridi, M., Jemil, I., Mora, L., Toldrà, F., Aristoy, M., ... Nasri, R. (2016). Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *Food Research International*, 86, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.013>.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Araújo, I. B. S., Bezerra, T. K. A., Nascimento, E. S., Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T., & Madruga, M. S. (2018). Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Science and Technology (ONLINE)*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1590/fst.27517>.
- AOAC (2010). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 18th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., & Goosen, M. F. A. (2012). Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Material Science and Engineering*, 32(4), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.013>.
- Bretermittz, N. R., Bolini, H. M. A., & Hubinger, M. D. (2017). Sensory acceptance evaluation of a new food flavoring produced by microencapsulation of a mussel (Perna perna) protein hydrolysate. *LWT – Food Science and Technology*, 83, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.016>.
- Branskalieva, V., Sahlu, T., & Goetsch, A. L. (2000). Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: A review. *Small Ruminant Research*, 37, 255–268. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00128-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00128-0).
- Cardinal, M., Chaussy, M., Donnay-Moreno, C., Cornet, J., Rannou, C., Fillonneau, C., ... Courcoux, P. (2020). Use of random forest methodology to link aroma profiles to volatile compounds: Application to enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) by-products combined with Maillard reactions. *Food Research International*, 134, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109254>.
- Folch, J., Less, M., & Stanley, S. A. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.

- Frolov, A., Hoffmann, P., & Hoffmann, R. (2006). Fragmentation behavior of glycated peptides derived from D-glucose, D-fructose and D-ribose in tandem mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(11), 1459–1469. <https://doi.org/10.1002/jms.1117>.
- Hagen, S. R., Frost, B., & Augustin, J. (1989). Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 912–916.
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>.
- Honikel, K. O. (2011). Composition and calories. In L. M. L. Nollet, & F. Toldra (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products* (pp. 105e121). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Jeric, L., Versluis, C., Horvat, S., & Heck, A. (2002). Tracing glycoprotein structures: Electron ionization tandem mass spectrometric analysis of sugar-peptide adducts. *Journal of Mass Spectrometry*, 37, 803–811.
- Karangwa, E., Raymond, L. V., Huang, M. G., Cheserek, M. J., Hayat, K., Savio, N. D., & Zhang, X. M. (2013). Sensory attributes and antioxidant capacity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and sunflower protein hydrolysate model system. *Food Research International*, 54, 1437–1447. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.034>.
- Khan, M. I., Jo, C., & Tariq, M. R. (2015). Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors - A systematic review. *Meat Science*, 110, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.002>.
- Koutsidis, G., Elmore, J. S., Oruna-Concha, M. J., Campo, M. M., Wood, J. D., & Mottram, D. S. (2008). Water-soluble precursors of beef flavour: I. Effect of diet and breed. *Meat Science*, 79(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.08.008>.
- Madruga, M. S., Elmore, J. S., Oruna-Concha, M. J., Balagiannis, D., & Mottram, D. S. (2010). Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat. *Food Chemistry*, 123, 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.004>.
- Madruga, M. S., Dantas, I., Queiroz, A., Brasil, L., & Ishihara, Y. (2013). Volatiles and water- and fat-soluble precursors of Saanen goat and cross Suffolk lamb flavour. *Molecules*, 18, 2150–2165. <https://doi.org/10.3390/molecules18022150>.
- McCaughy, S. A. (2008). The taste of sugars. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32 (5), 1024–1043. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.002>.
- Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65 (Part C), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014>.
- Mora, L., Toldrá-Reig, F., Reig, M., & Toldrá, F. (2019). Possible uses of processed slaughter byproducts. *Sustainable Meat Production and Processing*, 145–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814874-7.00008-0>.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat products: A review. *Food Chemistry*, 62 (4), 415–424. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00076-4).
- Ngo, D., Vo, T., Ngo, D., Wijesekara, I., & Kim, S. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001>.
- Nishimura, T., & Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews International*, 4(2), 175–194. <https://doi.org/10.1080/87559128809540828>.
- Nollet, L. M. L., & Toldra, F. (2011). Introduction. Offal meat: Definitions, regions, cultures, generalities. In L. M. L. Nollet, & F. Toldra (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products* (pp. 3e11). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- O'fallon, J. V., Busboom, J. R., Melson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to vent meat tissues, oils and feedstuffs. *Journal Animal Science*, 85 (6), 1511–1521. DOI: 10.2527/jas.2006-491.
- Peinado, I., Koutsidis, G., & Ames, J. (2016). Production of seafood flavour formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.025>.
- Queiroz, A. L. M., Brasil, L. M. S., Silva, J., Magnani, M., Souza, E. L., & Madruga, M. S. (2013). Microbiological and nutritional quality of “buchada caprina” an edible goat meat by-product. *Small Ruminant Research*, 115(1–3), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.08.006>.
- Queiroz, A. L. M., Araújo, A. R. A., Pacheco, M. T. B., & Madruga, M. S. (2017a). Potential use of goat viscera to obtain protein hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 832–837. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.049>.
- Queiroz, A. L. M., Bezerra, T., Kenia A., de Freitas Pereira, S., da Silva, M. E. C., de Almeida Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. Teresa B., & Madruga, M. S. (2017b). Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20, 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.009>.
- Ramalingam, V., Song, Z., & Hwang, I. (2019). The potential role of secondary metabolites in modulating the flavor and taste of the meat. *Food Research International*, 122, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.007>.
- SAS Institute. (2014). SAS user's guide: statistics; version 11.0. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Solms, J. (1969). The taste of aminoacids, peptides and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 686–688. <https://doi.org/10.1021/jf60164a016>.
- Song, S., Tang, Q., Fan, L., Xu, X., Song, Z., Hayat, K., ... Wang, Y. (2017). Identification of pork flavour precursors from enzyme-treated lard using Maillard model system assessed by GC-MS and partial least squares regression. *Meat Science*, 124, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.009>.
- Sun, L.-B., Zhang, Z.-Y., Xin, G., Sun, B.-X., Bao, X.-J., Wei, Y.-Y., ... Xu, H.-R. (2020). Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.018>.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2017). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>.
- Wei, C. K., Ni, Z. J., Thakur, K., Liao, A. M., Huang, J. H., & Wei, Z. J. (2020). Aromatic effects of immobilized enzymatic oxidation of chicken fat on flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) derived Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 306, Article 125560. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125560>.
- White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8, 170–177. doi: 10.1155/S1463924686000330.
- Xia, Q., Mei, J., Yu, W., & Li, Y. (2017). High hydrostatic pressure treatments enhance volatile components of pre-germinated brown rice revealed by aromatic fingerprinting based on HS-SPME/GC-MS and chemometric methods. *Food Research International*, 91, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.001>.
- Xing, L., Liu, R., Cao, S., Zhang, W., & Guanghong, Z. (2019). Meat protein based bioactive peptides and their potential functional activity: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14132>.
- Zhan, P., Tian, H., Zhang, X., & Wang, L. (2013). Contribution to aroma characteristics of mutton process flavor from the enzymatic hydrolysate of sheep bone protein assessed by descriptive sensory analysis and gas chromatography olfactometry. *Journal of Chromatography B*, 921–922, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.026>.
- Zou, T., Kang, L., Yang, C., Song, H., & Liu, Y. (2019). Flavour precursor peptide from an enzymatic beef hydrolysate Maillard reaction-II: Mechanism of the synthesis of flavour compounds from a sulphur-containing peptide through a Maillard reaction. *LWT-Food Science and Technology*, 110, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.022>.

4.2 ARTIGO II - EFFECT OF PROTEASES ON WATER-SOLUBLE AND FAT-SOLUBLE AROMA PRECURSORS OF GOAT VISCERAS PROTEIN HYDROLYSATE

O artigo foi submetido ao periódico Food Chemistry (ISSN 0308-8146), em 11 de setembro de 2021 sob o título “*Effect of proteases on water-soluble and fat-soluble aroma precursors of goat viscera protein hydrolysate*”.

EFFECT OF PROTEASES ON WATER-SOLUBLE AND FAT-SOLUBLE AROMA
PRECURSORS OF GOAT VISCERAS PROTEIN HYDROLYSATE

Ana Rita Ribeiro de Araújo CORDEIRO^a, Lorena Lucena de MEDEIROS^a, Lary de
Souza Olegário^a; Leila Moreira de Carvalho^a; Taliana Kenia Alencar BEZERRA^a, Maria
Teresa Bertoldo PACHECO^b, Mércia de Sousa GALVÃO^a, Marta Suely MADRUGA^{a*}

^a Departament of Food Engineering, Center for Technology, Federal University of
Paraíba, Campus I, 58051-900, Brazil.

^b Food Technology Institute (ITAL). Science and Food Quality Center, 13070-179,
Campinas, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: E-mail: msmadruga@uol.com.br – Department of Food
Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, 58051-900, João
Pessoa, Paraíba, Brazil – telephone: +55 83 3216 7473; +55 83 98847 5800.

ABSTRACT

This study investigated the action of proteolytic enzymes in the production of goat viscera
hydrolysates, and their flavoring potential. The study focus the production of flavor
precursor molecules and the formation of volatile compounds resulting from four
hydrolysis treatments: HA - Alcalase®, HF - Flavourzyme®, HN - Neutrase®, and F+N
- Flavourzyme® and Neutrase®. The highest degree of hydrolysis (26.74%), number (23
volatiles) and concentration of volatile compounds (27.5µg/100mL) were obtained with
the action of Alcalase. The main classes of volatile compounds identified in hydrolysates
included acids, aldehydes, pyrazines, terpenes and Strecker aldehydes. Amino acids,

sugars and fatty acids were identified with higher concentrations in HF and HFN hydrolysates due to the low participation of these precursors in the formation of volatile compounds. Therefore, the use of Alcalase in the proteolysis of goat viscera stood out compared to other enzymes, providing impacting aroma compounds, such as pyrazines, for meat flavor.

Keywords: Aroma precursors; Flavoring; Goat byproducts; Proteases; Enzymatic hydrolysates; Volatile compounds.

1. Introduction

Efforts have been directed towards the use of slaughter byproducts as sources of materials or ingredients capable of providing added value for consumption and use in food products. Studies involving the use of meat byproducts to obtain peptides have highlighted the nutritional value, modified functional properties, bioactivities and also the production of flavorings (Chiang et al., 2019; Bezerra et al., 2019). Considering the protein concentration and the differentiated amino acid composition, goat viscera have potential for the production of hydrolysates (Queiroz et al., 2017; Cordeiro et al., 2020).

The main aim of protein hydrolysis is to obtain maximum yield/recovery of all valuable components (peptides and amino acids), maintaining their high nutritional and/or bioactive quality. One of the factors that affect yield is the specificity of proteases that directly impact the characteristics of hydrolysates, as it affects the composition and sequences of amino acids and molecular weight of released peptides (McCarthy, O'Callaghan, & O'brien, 2013).

Alcalase is a bacterial protease produced from *Bacillus licheniformis* that preferentially cleaves peptide bonds with hydrophobic side chain in the C-terminal

portion (Adler-Nissen, 1986). It has high hydrolytic power and lower specificity, being widely used in the preparation of protein hydrolysates from different byproducts (Zhan et al., 2013; Li et al., 2016; Queiroz et al., 2017; Lynch et al., 2018). Other bacterial enzymes, such as flavourzyme (*Aspergillus oryzae*), have been used in the production of flavorings and in the removal of bitterness in protein hydrolysates with low degree of hydrolysis. This enzyme stands out for having higher exopeptidase activity, more specific and, therefore, lower hydrolytic activity.

Proteases can be technologically applied in order to improve the taste of protein hydrolysates, through the release of low molecular weight amino acids and peptides, which express unique flavor properties, including sweet, salty, sour, bitter and umami (Laohakunjit; Selamassakul; Kerdchoechuen, 2014).

During the process of protein hydrolysis of animal byproducts, peptides and free amino acids are released from the protein, giving rise to precursor molecules for aroma formation. Therefore, knowledge of the products formed from proteolysis makes it possible to direct the application of the protein hydrolysate as a food flavoring (Mora; Reig; Toldrá, 2014). Soluble compounds of low molecular weight, free amino acids, sugars and fatty acids are the main precursors capable of providing the characteristic meat flavor, resulting from diverse and complex reactions such as the Maillard reaction, lipid oxidation and vitamin degradation (Khan; Jo; Tariq, 2015).

Poultry, fish and cattle slaughter byproducts have been used in the production of flavorings (Zhan et al., 2013; Peinado et al., 2016). However, the number of works in the literature on the use of goat viscera to obtain flavorings is limited to our knowledge. Thus, the aim of this study was to evaluate the action of different microbial enzymes in the production of protein hydrolysates from goat viscera, with flavoring potential that is, in

the production of flavor and aroma precursor molecules with emphasis on the Maillard reaction.

2 Materials and Methods

2.1. Material

Goat viscera (liver, heart and lung) were provided by a local supplier located in the Central Public Market of the city of João Pessoa (Paraíba, Brazil). For the study, a goat viscera mix (liver, heart and lung) at 1:1:1 ratio was used. The proteolytic enzymes used to obtain protein hydrolysates were Alcalase® (*Bacillus licheniformis*), Flavourzyme® (*Aspergillus oryzae*) and Neutrase® (*Bacillus amyloliquefaciens*) supplied by company Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brazil).

2.2. Enzymatic hydrolysis of goat viscera mix

Table 1 presents the characteristics of commercial proteases used in the production of goat hydrolysates. Sanitized and refrigerated viscera were weighed, ground in meat processor (máquinas CAF 8, São Paulo, Brazil), homogenized and kept frozen (-15 ± 1 °C) until use. Goat viscera mix samples weighting 30g were used to obtain four protein hydrolysates according to methodology reported by Queiroz et al. (2017). Temperature, pH and reaction time conditions, as well as enzymes and their combinations were selected based on the combination of parameters that resulted in the highest production of peptides, based on literature and previous works (Queiroz et al., 2017; Cordeiro et al., 2020).

At the end of hydrolysis, the hydrolysates were obtained: HA (goat viscera protein hydrolysate with Alcalase), HF (goat viscera protein hydrolysate with Flavourzyme), HN (goat viscera protein hydrolysate with Neutrase) and HFN (goat viscera protein

hydrolysate with Flavourzyme and Neutrase). The four hydrolysates were then characterized for their electrophoretic profile, free amino acid, sugar, fatty acid contents, and finally volatile profile.

Table 1. Enzyme systems, type of activity, process conditions and degree of hydrolysis (%) resulting from proteolytic treatment of goat viscera extract.

Systems Enzyme	Activity	Conditions for enzymatic hydrolysis	Degree hydrolysis (%)
Alcalase	Serine endoprotease	Temperature: 60 °C pH: 8.0	HA = 26.74
Flavourzyme	Exopeptidase	Temperature: 50 °C pH: 7.0	HF = 3.73
Neutrase	Metallo endoprotease	Temperature: 50 °C pH: 7.0	HN = 4.11
Flavourzyme + Neutrase	Exopeptidase + Metalloendoprotease	Temperatura: 50 °C pH: 7.0	HFN = 4.24

2.3. Electrophoretic profile goat viscera hydrolysate

This analysis was performed using the technique described by Schagger and von Joagow (1987). Samples were diluted in reducing buffer (0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.1% Coomassie Blue G250), homogenized with the aid of vortex and sonicated for 10 minutes. Subsequently, they were heated at 90 °C for 5 minutes in dry bath (Loccus, São Paulo, Brazil).

In the SDS-PAGE-Tricine system, polyacrylamide gels of different concentrations were used: separation gel (16.5% T and 3% C), spacer gel (10% T and 3% C) and stacking gel (4% T and 3 % C). After runs, the gel was fixed for 1 h in a methanol, acetic acid and water solution (5:1:4 v/v/v) and stained with Comassie brilliant Blue G250 (0.025% Comassie Blue in 10% acetic acid) for 48 hours and then bleached in 10% acetic acid. The molecular weights of low-weight fractions were compared using molecular weight marker (RainbowTM Marker – low range (RPN755E)).

2.4. Determination of the physicochemical properties (color, pH and degree of hydrolysis)

The color of hydrolysates was determined by measuring L* (lightness), a* (redness) and b* (yellowness) coordinates using digital colorimeter (CR400, Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan). For reading, the following conditions were established: illuminant C, viewing angle of 8°, standard observer angle of 10°, specular included, according to specifications of the Commission Internationale de L'éclairage (CIE, 1986). The instrument was calibrated on a white ceramic plate (Illuminant C: Y=92.84 X=0.3136, y=0.3201), before the performance of readings

The pH values of hydrolysates were measured using benchtop pH meter (Model 0400AS, Quimis, Diadema, São Paulo).

The degree of hydrolysis (DH) was defined according to the detailed procedure of Adler-Nissen (1986), the pH being adjusted with NaOH (0,05 M) or HCl (0,05 M).

$$\text{DH}(\%) = B \times N_b \times (1/\alpha) \times (1/\text{MP}) \times 1/\text{htot} \times 100 \text{ Eq. (1)}$$

Where:

DH (%) = degree of hydrolysis; B = base consumption in mL; Nb = base normality; $1/\alpha$ = mean dissociation degree of the α -NH₂ group; MP = protein mass in g; htot = total number of peptide bonds in the protein substrate – 7.6 for meat.

2.5. Browning intensity analysis

The hydrolysate samples were diluted to concentration of 5 mg/ml protein with ultrapure water and the browning intensity evaluated by absorbance readings at 420 nm according to Sun et al. (2011) and Tan, Abbas and Azhar (2012), using spectrophotometer (DRAWELL, model DU8200, Curitiba-PR, Brazil). Absorbance at 550 nm was also measured to correct for any turbidity in samples.

2.6. Volatile components analysis using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Volatile extraction was performed using the Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) methodology with SPME device (Supelco, Bellefonte, USA) adapted from Breternitz, Boliniand and Hubinger (2017). An aliquot of 20 mL of hydrolysate was transferred to a 20 mL glass vial. Then, 1 μ L of 1,2-dichlorobenzene in methanol was added as internal standard (50 μ g. μ L⁻¹), and vials were immediately sealed with cap with Teflon-lined septum. Volatiles were released at 50 °C reaching equilibrium for 10 min. Subsequently, the 50/30 μ m divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber was exposed to the headspace for 30 min. The fiber used was activated according to manufacturer's instructions before extraction procedure. Chromatographic analyses were performed using 7890B gas chromatograph (Agilent Technologies 5977B, Little falls, DE, USA) coupled with mass spectrometer. The following conditions were used: VF-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) column and initial

oven temperature of 40 °C for 2 min, which increased by 15 °C/min to 230 °C, remaining for 10 min, for total run time of 24.6 min. The injector temperature was fixed at 250 °C. Helium was used as carrier gas at flow rate of 1.0 mL/min in the 1:20 split injection system. The transfer line temperature was 250 °C. The mass spectrometer was operated in electron impact mode (70 eV) and the mass scanning ranged from 35 to 350 m/z at 4.44 scans/s. Compounds were identified by comparing their mass spectrum and LRI with those of an authentic compound run on a DB-5 column, or comparing their mass spectra with standard compounds present in database provided by NIST (National Institute of Standards and Technology, USA) equipment. The linear retention index (LRI) of each compound was calculated via the retention times of a homologous series of C6–C25 n-alkanes. The semi-quantification of volatiles was calculated by extrapolating the area of the 1,2-dichlorobenzene internal standard (added to each sample) to the integrated area of every compound in the profile, and data were expressed as µg/100mL hydrolysate. This analysis was run in triplicate.

2.7. Analysis of water-soluble aroma precursors - Free amino acids (FAA) and Sugars

Free amino acids from lyophilized samples were extracted by shaking for 60 min with 0.1 M hydrochloric acid (g/ml) followed by pre-column derivation of free amino acids with phenylisothiocyanate (PITC), according to White et al. (1986) and Hagen, Frost and Augustin (1989).

The analysis of sugars was performed using Agilent HPLC system coupled to a refractive index detector (RID) model 356 LC-RID (VARIAN, Waters, California, USA), using Agilent Hi-Plex Ca column (7.7 x 300 mm, 8 µ), equipped with isocratic solvent system, "Rheodyne" valve with 20 µl handle, oven temperature of 85 °C, flow rate of 0.6

mL/min and run time of 30 min. Ultrapure water was used as mobile phase and standard solutions were injected to obtain the retention time of each compound. The processing software used was GALAXIE Chromatography Data System. The chromatograms of samples were compared with maltose, ribose, glucose and fructose standards (Sigma-Aldrich) and quantification was performed by the composite area in a calibration curve for each compound, at five concentrations. Results were expressed as g of sugars/100 g of sample.

2.8. Analysis of fat-soluble aroma precursors - Fatty acids

Direct transesterification of fatty acids present in the goat viscera mix was performed as described by O'fallon, Busboom, Melson and Gaskins (2007). Identification and quantification of fatty acid esters were performed using gas chromatograph (Agilent Technologies 5975) coupled to mass spectrometer (Agilent Technologies 7820A), (Little Falls, DE, USA). The capillary column used was fused silica non-polar VF-5MS, with dimensions of 30m x 0.25mm x 0.25 μ m. Fatty acids were identified by comparing the retention times of methyl esters of samples with Supelco ME19-Kit standards (Fatty Acid Methyl Esters C4-C24). Fatty acid concentrations were presented as g of fatty acid/100g hydrolysate fat.

2.9. Data analysis

Data obtained in studies involving the characterization of goat viscera hydrolysates were submitted to the Shapiro-Wilk normality test ($\alpha = 0.05$). Samples were then submitted to analysis of variance (ANOVA) and means compared by the Tukey test ($p < 0.05$).

Principal component analysis (PCA) was used to obtain a two-dimensional representation of hydrolysate samples and the contents of fatty acids, amino acids, sugars and volatile compounds.

A heat map (with Pearson's correlation coefficient values) was constructed to analyze correlations between detected compounds. The statistical analysis and graphics used were generated by XLSTAT (version 2014.5.03, Addinsoft, New York, USA).

3. Results and discussion

3.1. Degree of hydrolysis and electrophoretic profile of goat viscera hydrolysates

HA hydrolysate had significantly higher degree of hydrolysis (DH = 26.74%) than the other hydrolysates HF, HN and HFN hydrolysates (3.73%, 4.11%, 4.24%, respectively). The results showed that the degree of hydrolysis was higher using Alcalase (approximately 6 times greater than the others) indicating that the combined enzymatic activity (HFN) does not necessarily increase the degree of hydrolysis. It is observed that the comparing hydrolysates using different proteases is not a simple task because all enzymes are used in their optimal activity conditions and have different specificities (PEINADO et al., 2016). Similar values of degree of hydrolysis are observed in studies by Queiroz et al. (2017), who carried out the optimization and characterization of goat viscera protein hydrolysates using enzymes Alcalase and Brauzyne.

The presence of peptides was evidenced in electrophoresis by dark coloration at the end of the bands (below 12kDa), and their intensity varied according to the values of the degree of hydrolysis presented by the different enzymatic systems (Figure 1). The electrophoretic profile of hydrolysates obtained with Flavourzyme, Neutrase and Flavourzyme+Neutrase was similar, being composed of five bands with molecular weights apparently distributed in 38 and 24 kDa, with some bands above this molecular

weight (between 76 and 58 kDa) and with diffuse bands below 24 kDa. The MW distribution of hydrolysates, including peptides and free amino acids, can have a direct or indirect effect on the properties of hydrolysates, impacting sensory perception and aroma quality. Peptides obtained from protein hydrolysates can be used as precursors and under thermal reaction conditions, they can have a direct contribution to the formation of volatile compounds. Furthermore, certain amino acids in the linked form of peptides can form Strecker aldehydes through Strecker degradation (Zhan et al., 2013; Laohakunjit; Selamassakul; Kerdchoechuen, 2014).

3.2. Physicochemical properties of goat viscera hydrolysates

Significant differences ($p \leq 0.05$) in pH, browning intensity and instrumental color parameters were observed in goat viscera hydrolysates (Table 2). The final pH in each hydrolysate remained close to the optimum for the enzyme used, with greater alkalinity being observed for the Alcalase hydrolysate (> 9.0), and the others were similar (7.54 – 7.77).

The Maillard reaction can be affected by factors such as temperature and pH. At lower temperatures, the speed of this reaction is slow, but it practically doubles with every 10 °C increase between 40 °C and 70 °C (Arena et al., 2017). Basic pH values provide greater reactivity in the initial stage of the Maillard reaction, with maximum reaction speed occurring in the range, between pH 9 and 10 (Fenemma, 2010; Rodriguez et al., 2016), which probably justifies the greater production of volatile compounds in the Alcalase hydrolysate, resulting from the Maillard Reaction.

The L^* , a^* and b^* color parameters and the browning intensity of the protein hydrolysate solution were significantly different ($p \leq 0.05$). Hydrolysate “HF” presented greatest browning and lightness intensity (L^*). In other words, it provided greater

intensity of the red color (similar to “N” and “F+N”) and the yellow color (similar to “HA”). It is known that enzymatic hydrolysis reactions are able to contribute to reduce lightness, providing a darker appearance to hydrolysates (Kotlar; Ponce; Roura, 2013). In addition, the possible occurrence of the Maillard reaction during the hydrolysis process influences the product's sensory attributes, such as color, through the generation of melanoidins, which are compounds of brown color and high molecular weight (Martins; Jongen; Boekel, 2001).

Table 2. Physicochemical parameters, reducing sugar (mg/100g) and fatty acids (g/100g) in goat viscera protein hydrolysates.

Parameter	HA	HF	HN	HFN
pH	9.08 ± 0.02 ^a	7.54 ± 0.01 ^d	7.69 ± 0.01 ^c	7.77 ± 0.01 ^b
Browning Intensity	0.59 ± 0.03 ^b	0.68 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.01 ^b
L*	48.42 ± 0.16 ^b	52.21 ± 0.60 ^a	44.96 ± 0.14 ^c	43.49 ± 0.88 ^d
a*	3.08 ± 0.06 ^c	7.24 ± 0.27 ^{ab}	7.65 ± 0.27 ^a	6.76 ± 0.16 ^b
b*	12.28 ± 0.57 ^a	11.96 ± 0.41 ^a	8.69 ± 0.27 ^b	7.57 ± 0.72 ^b
Reducing Sugars (mg/100 g)				
Ribose	Nd	Nd	194.56 ± 2.94 ^a	88.23 ± 0.60 ^b
Glucose	85.35 ± 1.60 ^c	204.0 ± 4.32 ^b	106.81 ± 2.93 ^c	451.60 ± 29.60 ^a
Fructose	268.59 ± 0.47 ^b	475.42 ± 7.79 ^a	226.33 ± 7.06 ^c	475.50 ± 16.52 ^a
Maltose	339.76 ± 1.36 ^b	369.23 ± 12.59 ^b	251.20 ± 30.88 ^c	767.51 ± 24.10 ^a
Total	693.70 ± 1.68 ^d	1049.44 ± 15.78 ^b	778.90 ± 42.20 ^c	1782.84 ± 11.00 ^a
Fatty acids (g/100g)				
C10	0.002 ± 0.00 ^a	0.002 ± 0.00 ^a	0.002 ± 0.00 ^c	0.002 ± 0.00 ^b
C12	0.001 ± 0.00 ^a	0.001 ± 0.00 ^b	0.000 ± 0.00 ^c	0.001 ± 0.00 ^b
C13	0.000 ± 0.00 ^a	0.000 ± 0.00 ^a	0.000 ± 0.00 ^a	0.001 ± 0.00 ^a
C14	0.033 ± 0.00 ^a	0.036 ± 0.00 ^a	0.029 ± 0.00 ^b	0.034 ± 0.00 ^a
C14:1w9	0.001 ± 0.00 ^a	0.002 ± 0.00 ^{bc}	0.001 ± 0.00 ^c	0.002 ± 0.00 ^{ab}
C14:1w5	0.002 ± 0.00 ^c	0.002 ± 0.00 ^a	0.002 ± 0.00 ^c	0.002 ± 0.00 ^b
C15	0.009 ± 0.00 ^b	0.011 ± 0.00 ^a	0.009 ± 0.00 ^b	0.010 ± 0.00 ^a
C15:1	0.001 ± 0.00 ^b	0.001 ± 0.00 ^a	0.001 ± 0.00 ^b	0.001 ± 0.00 ^a
C16:1w5	0.004 ± 0.00 ^a	0.005 ± 0.00 ^a	0.004 ± 0.00 ^a	0.005 ± 0.00 ^a
C16:1w7	0.006 ± 0.00 ^a	0.006 ± 0.00 ^a	0.006 ± 0.00 ^a	0.005 ± 0.00 ^a
C16	0.648 ± 0.02 ^b	0.729 ± 0.03 ^{ab}	0.656 ± 0.04 ^{ab}	0.739 ± 0.04 ^a

C17:1	0.007 ± 0.00^b	0.009 ± 0.00^a	0.007 ± 0.00^b	0.008 ± 0.00^a
C17	0.033 ± 0.00^d	0.046 ± 0.00^a	0.037 ± 0.00^c	0.043 ± 0.00^b
C18:2	0.039 ± 0.00^b	0.041 ± 0.00^a	0.034 ± 0.00^c	0.038 ± 0.00^b
C18:1	0.541 ± 0.01^b	0.646 ± 0.01^a	0.554 ± 0.02^b	0.626 ± 0.01^a
c18:2t	0.006 ± 0.00^b	0.011 ± 0.00^a	0.009 ± 0.00^{ab}	0.007 ± 0.00^{ab}
C18:3	0.009 ± 0.00^c	0.013 ± 0.00^a	0.011 ± 0.00^b	0.011 ± 0.00^b
C18	0.859 ± 0.04^c	1.043 ± 0.05^{ab}	0.916 ± 0.06^{bc}	1.076 ± 0.08^a
C20:4	0.020 ± 0.00^a	0.020 ± 0.00^a	0.018 ± 0.00^a	0.020 ± 0.00^a
C20	0.001 ± 0.00^a	0.001 ± 0.00^a	0.001 ± 0.00^a	0.001 ± 0.00^a
AGS	1.59 ± 0.06^c	1.87 ± 0.08^{ab}	1.65 ± 0.09^{bc}	1.91 ± 0.12^a
AGMI	0.56 ± 0.01^b	0.67 ± 0.01^a	0.58 ± 0.02^b	0.65 ± 0.01^a
AGPI	0.07 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^a	0.07 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^b
Total	2.222 ± 0.068^b	2.626 ± 0.092^a	2.633 ± 0.130^a	2.297 ± 0.116^b

Nd = Not detected.

3.3. Volatiles from goat viscera protein hydrolysates

The volatile compounds identified in hydrolysates were classified into three groups, mostly as volatile compounds formed by (1) lipid degradation (aldehydes, hydrocarbons, ketones, alcohols, furans and carboxylic acids), (2) volatile compounds formed via the Maillard reaction (pyrazines and Strecker aldehydes) and volatile compounds produced by other interactions (aromatics, esters and terpenes) (Chiang et al., 2019; Cordeiro et al., 2020). The profile of volatile compounds found corroborates studies carried out by Cordeiro et al. (2020) for goat byproducts and those by Madruga et al. (2010) in cooked goat meat, in which most identified that volatile compounds were formed by lipid degradation.

285 Table 3. Profile of volatile compounds ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) in goat viscera protein hydrolysates.

286

Number and concentration of volatiles				Alcalase	Flavourzyme	Neutrase	Mix
Total number volatiles				23	19	18	20
Total volatiles concentration ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)				27.50 ± 7.84^a	1.77 ± 0.36^c	2.04 ± 0.77^c	6.59 ± 3.65^b
				Hydrolysates ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)			
Class	Compound	LRI ^a	ID ^b	Alcalase	Flavourzyme	Neutrase	Mix
Acids	Hexadecanoic acid	1968	A	3.63 ± 1.47^a	0.07 ± 0.03^b	0.08 ± 0.04^b	0.68 ± 0.65^b
	Z-11-Octadecenoic acid	2139	B	5.95 ± 2.24^a	0.08 ± 0.05^b	nd ^c	3.34 ± 1.97^{ab}
	Octadecanoic acid	2172	A	5.61 ± 1.80^a	0.13 ± 0.05^b	0.18 ± 0.09^b	0.89 ± 0.73^b
	Total concentration			15.19 ± 6.76^a	0.28 ± 0.16^b	0.26 ± 0.15^b	4.92 ± 3.16^b
Alcohol	3-Methyl-3-buten-1-ol	730	A	Nd	0.01 ± 0.00^a	Nd	nd
	1-Pentanol	765	A	0.10 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^a	0.09 ± 0.05^a	0.03 ± 0.00^a
	1-Octen-3-ol	980	A	0.18 ± 0.02^a	0.01 ± 0.00^b	0.04 ± 0.01^b	0.01 ± 0.00^b
	2,6-Dimethylcyclohexanol	1112	B	0.16 ± 0.01^{ab}	0.04 ± 0.01^b	0.28 ± 0.12^a	0.07 ± 0.02^b
	Total concentration			0.44 ± 0.01^a	0.08 ± 0.00^b	0.40 ± 0.21^a	0.11 ± 0.02^b
Aldehydes	Butanal	593	B	0.10 ± 0.04^a	0.02 ± 0.00^b	0.05 ± 0.02^{ab}	0.03 ± 0.00^b
	Pentanal	699	B	0.24 ± 0.01^a	0.04 ± 0.01^b	0.07 ± 0.03^b	0.06 ± 0.00^b
	Hexanal	800	A	0.17 ± 0.02^a	0.02 ± 0.00^b	0.03 ± 0.01^b	0.02 ± 0.01^b
	Heptanal	901	A	2.88 ± 0.82^a	0.29 ± 0.08^b	Nd	0.25 ± 0.06^b
	Benzaldehyde	962	A	4.65 ± 0.48^a	0.71 ± 0.07^b	0.11 ± 0.05^b	0.61 ± 0.07^b
	Total concentration			8.04 ± 1.69^a	1.08 ± 0.15^b	0.25 ± 0.12^b	0.96 ± 0.16^b
Aromatic	Methyl benzene	763	A	0.11 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	Nd	Nd
Ester	Methyl arachidonate	2274	A	0.11 ± 0.04^a	Nd	Nd	0.11 ± 0.06^a
Furan	2-Pentylfuran	993	A	0.14 ± 0.03^a	Nd	Nd	Nd
	5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4-7a-trimethyl-2-(4H)-benzofuranone	1532	B	0.12 ± 0.06^a	Nd	Nd	0.01 ± 0.00^b
	Total concentration			0.26 ± 0.03^a	Nd	Nd	0.01 ± 0.00^b
Hydrocarbons	Limonene	1031	A	0.15 ± 0.00^{ab}	0.09 ± 0.01^b	0.17 ± 0.03^a	0.11 ± 0.01^b
Ketones	2-Heptanone	891	A	0.14 ± 0.02^a	Nd	Nd	Nd
	2,3-Octanedione	984	A	Nd	Nd	0.11 ± 0.02^a	Nd
	3-Octanone	986	B	Nd	Nd	0.02 ± 0.01^a	Nd
	Total concentration			0.14 ± 0.02^a	Nd	0.13 ± 0.03^a	Nd
Terpenes	p-Cymene	1025	B	Nd	0.01 ± 0.00^b	0.10 ± 0.02^a	0.01 ± 0.00^b
	α -Copaene	1376	B	0.10 ± 0.03^a	nd	Nd	0.01 ± 0.00^b
	Caryophyllene	1440	B	0.25 ± 0.06^a	0.02 ± 0.01^b	0.08 ± 0.02^b	0.03 ± 0.01^b
	β -Ionone	1491	B	0.55 ± 0.18^a	0.05 ± 0.01^b	0.14 ± 0.04^b	0.09 ± 0.02^b

	Total concentration			0.81 ± 0.20^a	0.08 ± 0.01^b	0.30 ± 0.05^b	0.14 ± 0.03^b
Streacker Aldehydes	3-Methylbutanal	652	A	0.73 ± 0.18^a	0.09 ± 0.01^b	0.16 ± 0.07^b	0.13 ± 0.00^b
Pyrazines	2,5-Dimethylpyrazine	917	A	0.12 ± 0.01^a	Nd	0.16 ± 0.06^a	Nd
	2,5-Dimethyl-3-isoamylpyrazine	1315	A	1.32 ± 0.31^a	0.07 ± 0.01^b	0.19 ± 0.08^b	0.10 ± 0.02^b
	Total concentration			1.44 ± 0.37^a	0.07 ± 0.01^b	0.35 ± 0.18^b	0.10 ± 0.03^b

287 ^a Linear retention indices.

288 ^b A, mass spectrum and LRI agree with those of an authentic compound ran on DB-5 column; B, tentative identification where mass spectrum
 289 agrees with reference spectrum in the NIST/EPA/NIH mass spectral database.

290 ^c nd, not detected.

As shown in Table 3, a total of 27 compounds, belonging to various chemical classes, such as acids (3), alcohols (4), aldehydes (5), aromatics (1), esters (1), furans (2), hydrocarbons (1), ketones (3), terpenes (4), Strecker aldehydes (1) and pyrazines (2) were identified in the four goat viscera hydrolysates.

Acids, aldehydes, pyrazines, alcohols and terpenes were the main classes of compounds produced as a result of hydrolysis based on quantification, with different order of concentration according to the enzyme used. Normalized peak responses for these compounds were calculated by comparing the peak area to the standard inner area.

In the hydrolysate resulting from the proteolytic action of Alcalase the highest number of compounds (23) was detected, together with the highest total concentration of compounds ($27.50 \pm 7.84 \mu\text{g}/100\text{mL}$) compared to the other three treatments. Volatile compounds with acid function are present at higher concentration, followed by aldehydes and pyrazines, as well as in higher content compared to the other hydrolysates. This result indicates high degree of hydrolysis presented by Alcalase, where greater proportion of free amino acids or peptides are formed, which are capable of reacting with ribose during the hydrolysis process, leading to the formation of other volatile compounds.

Isolated or associated enzymes have been used in protein hydrolysis processes (Peinado et al. 2016; Chiang et al., 2019). These differ mainly due to their specificity, active site and catalytic mechanism, which justifies the results found in the present study.

Enzymes Flavorzyme and Neutrase produced hydrolysates with lower number of volatile compounds, 19 and 18 respectively, with lower total concentrations of volatile compounds in relation to the four treatments performed.

Aldehydes and acids were present at higher concentrations in Flavourzyme, while alcohols and pyrazines stood out with higher concentration in hydrolysate produced by Neutrase.

When combining Flavourzyme with Neutrase in simultaneous hydrolysis treatment (Mix), no significant difference in the proportion of volatile compounds was observed. The magnitude of differences was small for some volatile compounds even when they were significantly different.

When comparing HF and HN with HFN it was observed that there were no significant differences for the classes. HFN only showed a greater amount of carboxylic acids, which impacted the total concentration of aromatic compounds. This showed that the combined use of Flavourzyme with Neutrase can result in the formation of acids, and the appearance of esters and furans.

The main observations in volatile compounds of hydrolysates showed a direct relationship between total concentration (microgram/100g) of compounds produced and the degree of hydrolysis. Hydrolysate with the highest degree of hydrolysis, in this case that obtained with Alcalase, revealed higher content of acids, aldehydes and pyrazines.

It is known that acids and aliphatic aldehydes, in addition to ketones, are flavoring substances generally produced by fat oxidation and contribute to the characteristic flavor of different meats (Wei et al., 2020). Aliphatic aldehydes, such as hexanal and heptanal present in hydrolysates are mainly derived from lipid oxidation. The main aldehyde formation pathways are lipid oxidation and Strecker degradation, which occur during the Maillard reaction. These compounds have low odor threshold values, which characterize them as important odor-active compounds, being able to produce desirable roasted, nutty, cocoa, malty aromas and some undesirable ones such as rancid or oxidized aromas (Xu et al., 2018; Cardinal et al., 2020).

Benzaldehyde, a compound at high concentrations in the class of aldehydes, has its formation most likely associated with the Maillard reaction or through oxidation or phytochemical degradation of toluene or other hydrocarbons (Cordeiro et al., 2020).

Pyrazines are formed via the Maillard reaction and occur mainly with the heating of hydrolysates. They have important impact on the aroma of goat hydrolysates and contribute to the aroma of roasted meat (Cardinal et al., 2020; Wei et al., 2020). Compound 2,5-dimethylpyrazine, for example, is believed to contribute to the aroma of roasted meat and nuts, and because it is formed through the Maillard reaction, its higher concentration would enhance Maillard notes (Cordeiro et al., 2020).

Compound 1-Octen-3-ol, present in the four hydrolysates, is an alcohol whose formation is associated with the degradation of fatty acids and considerably contributes to the overall meat aroma, with characteristic and striking aroma of mushroom (Ramalingam, Song and Hwang, 2019). Aliphatic alcohols are pointed out as important contributors to meat flavor through the action of unsaturated alcohols with lower limit values (Wei et al., 2020).

In comparison, furans and pyrazines were present in lower amounts in hydrolysates, but because they are active in terms of odor, they are particularly important for the overall aroma of hydrolysates, responsible for roasted and burnt odors (Sun et al., 2020).

3.4. Water-soluble aroma precursors in goat viscera hydrolysates

Sugars

The effect of proteases on goat viscera resulted in significant variation ($p < 0.05$) in the concentrations of reducing sugars in hydrolysates (Table 2). Higher total sugar concentration (1782.84 mg/100g of sample) was observed in hydrolysate obtained with the mixture of enzymes, followed by that obtained with Flavourzyme (1049.44 mg/100g), Neutrase (778.90

mg/100g) and Alcalase (693.70 mg/100g). The presence of these sugars has been reported in goat meat products and byproducts (Madruga et al., 2010; Cordeiro et al., 2020), and it is known that they are generated in viscera and meat by the process of glycolysis or nucleotide degradation.

With the exception of the Flavourzyme hydrolysate, which had the highest fructose proportion, maltose was the sugar with the highest concentration in hydrolysates. Ribose, in turn, was the sugar with the lowest concentration in the four hydrolysates, except for Neutrase hydrolysate, which had lower glucose proportion. A study on goat byproducts and goat meat found that these raw materials had low ribose concentrations (Madruga et al. 2010, Cordeiro et al., 2020). In turn, fructose was reported as one of the carbohydrates with the highest concentration in goat meat, which corroborates results found.

Hydrolysates obtained with Alcalase and Flavourzyme did not reveal the presence of ribose. This result confirms the reactivity of ribose, and its involvement in the Maillard reaction during the hydrolytic process, which impacted the formation of volatile compounds, as discussed in item 3.3. In addition, the type of reducing sugar interferes with the speed of reaction with amine groups, and in this study, ribose was the most reactive sugar, followed by glucose, maltose and fructose, indicating that pentose is more reactive than hexose (Martins, Jongen, Boekel, 2001).

Together with amino compounds, reducing sugars participate in one of the most important ways of producing flavoring compounds, that is, the Maillard reaction, since they produce several degradation products of reducing sugars, mainly pentose and hexose containing carbonyl groups, which lead to the formation of impactful heterocyclic compounds (Mottram, 1998).

The greater or lower concentration of sugars in hydrolysates is justified by the differences in specificity and hydrolytic action of each enzyme used. This is because these differences will influence the physicochemical characteristics of hydrolysates (Lynch et al., 2018), since the various amino acids obtained will interact with sugars to form volatile compounds.

Free amino acids (FAAs)

Higher concentrations of free amino acids were observed in hydrolysate obtained with Flavourzyme (24.62 g/100g) compared to hydrolysate obtained with the other enzymes - with values of 17.17/Neutrase, 18.55/Alcalase and 21.33 /Flavourzyme+Neutrase (Table 4); this data supports the occurrence of specificity of each enzyme used in the present study. The action of Alcalase stood out in the production of sulfur amino acids, mainly methionine. It is noteworthy that this amino acid, in addition to impacting the production of sulfur aromas, are also important precursors of volatile compounds impacting meat aroma (Mottram, 1998).

The concentrations of free amino acids were similar to values reported for goat viscera protein hydrolysates (Queiroz et al., 2017; Cordeiro et al., 2020). Eighteen free amino acids were identified and quantified in the four hydrolysates, being that leucine, phenylalanine, valine, alanine, glutamic acid, lysine, tyrosine, isoleucine and arginine stood out in relation to the others (Table 4). It was observed that the free amino acids obtained in enzymatic hydrolysis are important in the formation of characteristic compounds that provide cooked and/or grilled meat aroma (Madruga et al., 2010; Zhan et al., 2013).

408 Table 4. Free amino acid composition (mg/100g) of goat viscera protein hydrolysates

Amino acid ¹	Alcalase	Flavourzyme	Neutrase	Mix	Taste	Chemical class
Essential Amino acid (EFAA)						
His	807 ± 0.00 ^b	863 ± 0.00 ^a	677 ± 0.00 ^d	747 ± 0.00 ^c	Bitter	Hydrophilic Basic
Ise	1022 ± 0.00 ^d	1334 ± 0.00 ^a	1222 ± 0.01 ^c	1266 ± 0.01 ^b	Bitter	Hydrophobic
Leu	3049 ± 0.01 ^a	3023 ± 0.00 ^b	2655 ± 0.00 ^d	2782 ± 0.01 ^c	Bitter	Hydrophobic
Phe	1522 ± 0.01 ^a	1481 ± 0.00 ^b	1240 ± 0.00 ^d	1354 ± 0.01 ^c	Bitter	Hydrophobic
Lys	1386 ± 0.00 ^d	2569 ± 0.01 ^a	1447 ± 0.00 ^c	2200 ± 0.01 ^b	Tasteless	Hydrophilic Basic
Trp	478 ± 0.01 ^a	365 ± 0.01 ^b	275 ± 0.00 ^c	267 ± 0.02 ^c	Bitter	Hydrophobic
Val	1641 ± 0.04 ^c	2046 ± 0.00 ^a	1586 ± 0.00 ^d	1861 ± 0.01 ^b	Bitter	Hydrophobic
Met	913 ± 0.00 ^a	780 ± 0.00 ^b	634 ± 0.00 ^d	704 ± 0.00 ^c	Bitter	Sulphur- containing/Hydr ophobic
Thr	727 ± 0.00 ^b	895 ± 0.00 ^a	530 ± 0.00 ^d	664 ± 0.00 ^c	Sweet	Hydrophilic not charged
Arg	1036 ± 0.01 ^b	1080 ± 0.00 ^a	240 ± 0.00 ^d	552 ± 0.00 ^c	Bitter	Hydrophilic Basic
Non-essential Amino acid (NEFAA)						
Ásp	412 ± 0.00 ^d	1008 ± 0.00 ^a	632 ± 0.00 ^c	891 ± 0.00 ^b	Acid	Hydrophilic Acid
Glu	1471 ± 0.00 ^c	2463 ± 0.00 ^a	1335 ± 0.00 ^d	2133 ± 0.00 ^b	Acid and umami	Hydrophilic Acid
Ser	512 ± 0.00 ^d	923 ± 0.01 ^a	536 ± 0.00 ^c	682 ± 0.00 ^b	Sweet	Hydrophilic not charged
Gly	604 ± 0.00 ^a	1254 ± 0.02 ^a	766 ± 0.00 ^c	1111 ± 0.00 ^b	Sweet	Hydrophilic not charged
Ala	1420 ± 0.00 ^d	2266 ± 0.01 ^a	1548 ± 0.00 ^c	2079 ± 0.01 ^b	Sweet	Hydrophobic
Pro	252 ± 0.00 ^d	1046 ± 0.01 ^a	856 ± 0.00 ^c	926 ± 0.00 ^b	Sweet + bitter	Hydrophobic
Tyr	1134 ± 0.00 ^a	1056 ± 0.00 ^b	863 ± 0.00 ^d	982 ± 0.00 ^c	Tasteless	Hydrophilic
Cys	161 ± 0.00 ^b	167 ± 0.00 ^a	124 ± 0.00 ^c	127 ± 0.00 ^d	Salty	Sulphur- containing/ Hydrophilic not charged
FAA	18546 ± 0.02 ^c	24619 ± 0.01 ^a	17165 ± 0.00 ^d	21327 ± 0.07 ^b		
EFAA	12580 ± 0.00 ^b	14436 ± 0.01 ^a	10506 ± 0.00 ^d	12397 ± 0.07 ^c		
NEFAA	5966 ± 0.02 ^d	10182 ± 0.00 ^a	6659 ± 0.00 ^c	8930 ± 0.00 ^b		
Bitter FAA	11853 ± 0.00 ^b	13074 ± 0.01 ^a	10249 ± 0.00 ^d	11442 ± 0.06 ^c		
Umami FAA	1883 ± 0.00 ^d	3471 ± 0.01 ^a	1967 ± 0.00 ^c	3023 ± 0.01 ^b		
Sweet FAA	3263 ± 0.02 ^d	5338 ± 0.02 ^a	3379 ± 0.00 ^c	4535 ± 0.01 ^b		
Salty FAA	161 ± 0.00 ^b	167 ± 0.00 ^a	123 ± 0.00 ^c	127 ± 0.00 ^d		
Tasteless FAA	2519 ± 0.00 ^c	3625 ± 0.01 ^a	2310 ± 0.01 ^d	3182 ± 0.01 ^b		
Sulphur- containing FAA	1073 ± 0.00 ^a	946 ± 0.01 ^b	758 ± 0.00 ^d	830 ± 0.00 ^c		
Ratio of Bitter/Umami	6,29 ± 0.01 ^a	3,77 ± 0.00 ^c	5,21 ± 0.00 ^b	3,78 ± 0.03 ^c		
Ratio of Sweet/Umami	1,73 ± 0.00 ^a	1,54 ± 0.01 ^c	1,72 ± 0.00 ^b	1,50 ± 0.01 ^d		
Hydrophobic FAA	10297 ± 0.01 ^c	12341 ± 0.01 ^a	10016 ± 0.01 ^d	11240 ± 0.06 ^b		
Hydrophilic FAA	8249 ± 0.03 ^c	12278 ± 0.00 ^a	7149 ± 0.01 ^d	10008 ± 0.01 ^b		
Acidic FAA	1883 ± 0.00 ^d	3471 ± 0.01 ^a	1967 ± 0.00 ^c	3023 ± 0.01 ^b		
Basic FAA	3229 ± 0.01 ^c	4512 ± 0.01 ^a	2364 ± 0.01 ^d	3499 ± 0.01 ^b		

409 ¹Data are generated as mean (mg/100g) and standard deviation.

Hydrophobics: Alanine, proline, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan (Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014).
 Hydrophilic: Aspartic Acid, Glutamic Acid, Serine, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Tyrosine, Cystine, Lysine (Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014).
 Umami: Aspartic acid + glutamic acid (Chiang 2019).
 Acid: Aspartic acid + glutamic acid ((Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014).
 Sulfurates: Cysteine + methionine (Chiang 2019).
 Salty: Cysteine (Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014).
 Tasteless: Lysine + Tyrosine (Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014).
 Basic: Histidine + Arginine + Lysine (Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014).
 Bitter: Histidine, Arginine, Tyrosine, Valine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Tryptophan, proline (Nishimura, 1988; Dashdorj, Amna, Hwang, 2015; Zhao, Schieber, Gänzle, 2016).
 Sweet: Serine, Glycine, Alanine, Threonine (Nishimura, 1988).

The metabolism of amino acids is an important pathway for the formation of aromatic compounds; for the type and amount of free amino acids present, individual, can generate different concentrations of volatile compounds impacting meat aroma through Strecker and Maillard degradation reactions. As well as through other thermal deamination and decarboxylation reactions, which perform important functions in the quality of aroma aimed at the production of flavorings (Zhan et al., 2013). Potent volatile compounds such as pyrazine and 2,3-dimethyl pyrazine, for example, widely used as similar to cooked and roasted meat flavors, can arise Strecker degradation pathway of cysteine (sulfur), from thermal reactions of lysine and glycine, and phenyl acetaldehyde and benzaldehyde from leucine, phenylalanine and methionine (Cardinal et al., 2020; Wei et al., 2020).

Also classified regarding the polarity of their side chain, basic (lysine, arginine and histidine) and acid polar amino acids (glutamic and aspartic acids) were identified in hydrolysates, with the highest concentration in Flavourzyme hydrolysate. It is known that each food has characteristic flavor determined by the balance of all its primary and/or secondary flavors. Free amino acids and peptides play important roles in each flavor of foods (Nishimura & Kato, 1988).

As shown in Table 4, free amino acids have been divided into several classes based on their taste characteristics. Bitter-taste amino acids (11.44 to 13.07 g/100g) were dominant in the four hydrolysates, followed by those with sweet (3.26 to 5.34 g/100g) and umami taste (1.88 to 3.47 g/100g), and finally and to a lesser extent, salty taste (0.12 to 0.17 g/100g).

The amino acid glutamic acid is widely used in the form of sodium salt as a flavor enhancing condiment in foods, being characterized as “umami” flavor. The potassium and ammonia salts of glutamic acid are also used as condiments to give the “umami” taste. In addition to this, glycine is also used as a condiment and additive in the food industry due to its antibacterial action, allowing for better product conservation (Rangan & Barceloux, 2009).

Due to its higher bitter/umami ratio (6.29), Alcalase hydrolysate presented prominent bitter taste compared to the other hydrolysates. At the same time, the sweet/umami ratio indicated that hydrolysates had similar sweet flavors. It is known that free amino acids influence the taste of most foods and that the savory properties of peptides, with diverse flavors, allow them to be used as enhancers and flavoring agents, in addition to having excellent nutritional quality (Zhao, Schieber, Gänzle, 2016).

Meat, offal, guts and viscera are rich in alanine, histidine and phenylalanine (Queiroz et al., 2017). In the food industry, the L-form of these amino acids, in addition to nutritionally enriching foods and beverages, can be used as a component of nutritional supplements, condiments and flavorings. In addition to these, isoleucine, leucine, methionine, serine, threonine, valine, arginine and cysteine are also widely used as flavoring agents (Nishimura & Kato, 1988; Sun et al., 2020).

The amount of hydrophilic amino acids was lower than that of hydrophobic amino acids in all hydrolysates (Table 4). For Alcalase and Neutrase hydrolysates, alone, the proportion of hydrophilic amino acids was lower than that in the other hydrolysates, probably because

endoproteinases have broad specificity for protein hydrolysis into hydrophobic amino acid residues, with non-polar amino acid residues remaining at the peptide C-terminal (Laohakunjit, Selamassakul, Kerdchoechuen, 2014; Tan et al., 2018). Furthermore, amino acids with hydrophobic side chains are known to generally have unpleasant bitter taste (Xing et al., 2019).

3.5. Fat-soluble aroma precursors in goat viscera hydrolysates

Fatty acids

Twenty fatty acids were identified and quantified in protein hydrolysates produced, consisting mainly of saturated (>70%) and monounsaturated (>24%) fatty acids, followed by polyunsaturated fatty acids (>3%). Palmitic (0.65 to 0.74 g/100g of hydrolysate) and stearic fatty acids (0.86 to 1.08 g/100g of hydrolysate) contributed more intensely among saturated fatty acids, while oleic acid (0.54 to 0.65 g/100g of hydrolysate) contributed the most to the unsaturated fatty acid profile (Table 2).

Palmitic and stearic fatty acids are identified as the main ones in goat meat and according to Queiroz et al. (2017) and Cordeiro et al. (2020), the fatty acid profile found in goat byproducts are precursors of volatile compounds, which justifies the use of this raw material for the production of protein hydrolysates for use as flavorings.

Significant differences ($p < 0.05$) were found in the sums of fatty acids in the four hydrolysates produced, with higher concentration in HF and HN hydrolysates, and it should be highlighted that these hydrolysates produced volatile compounds with lower number and concentration.

Lipid degradation is an important route of forming flavor compounds in foods, either through the release of short-chain fatty acids that release a rancid and pungent odor, for example, or other reactions that lead to the production of volatile compounds. It is also known

that the oxidative and thermal lipid degradation is associated with the Maillard reaction, which is responsible for the production of several flavor components, especially the aromatic notes of different species of meat products - goat, sheep, chicken, beef (Sun et al., 2020).

Several volatile compounds, such as ketones, aldehydes, alcohols, carboxylic acids and esters, are derived from lipid degradation and influence the cooked meat aroma. Through the interaction of these degradation products with Maillard reaction products, new flavors related to cooked meat are formed (Khan; Jo; Tariq, 2015; Sun et al., 2020).

Some fatty acid degradation products (linoleic and linolenic acids) such as 1-octen-3-ol, pentanal, heptanal, hexanal were the main contributors to the class of alcohols and aldehydes (volatile compounds), respectively. In hydrolysates produced, these compounds play an important role in the formation of flavorings (Peinado et al 2016; Tan et al., 2018). Aldehydes are compounds of important active odor due to their low detection threshold values; particularly aliphatic aldehydes, such as hexanal and heptanal, and were considered important contributors to the hydrolysates produced, mainly that obtained with Alcalase.

Fatty acids present a very important route of aroma production (Cordeiro et al., 2020). For example, when decomposed, linoleic acid can form important compounds such as hexanal, 1-octen-3-ol and 2-pentylfuran, mainly observed in the HA hydrolysate (Ramalingam et al., 2019; Wei et al., 2020). Hexanal has been reported to maintain fresh flavor as long as its concentration is low enough (Cardinal et al., 2020; Wei et al., 2020), which possibly contributed to the aroma of hydrolysates obtained in this study.

3.6. Principal Component Analysis (PCA) and Pearson Correlation

Principal component analysis (PCA) was performed based on the mean values of free amino acids and sugars in the four hydrolysates (Figure 2A). Through PCA, it was possible to

explain 91.08% of variability among hydrolysate samples, with the two main components (PC1 and PC2) showing variations of 51.51% and 39.57%, respectively. The changes resulting from the application of different enzymes were significant, with protein hydrolysate samples dispersed in different quadrants and most compounds located in the positive axis of PC1.

Single hydrolysis treatments using endopeptidases, HA and HN, were not well characterized by soluble precursors. HN was only characterized by its high ribose content, while HF was described by most free amino acids and HFN by total sugars, especially sweet, umami and acidic amino acids.

With PCA analysis based on fatty acid values (Figure 2B), it was possible to explain 91.25% of variability among samples, with variation of 68.03% and 23.22% for PC1 and PC2, respectively. Most fatty acids also remained on the positive axis of PC1, qualifying HF mainly by the total polyunsaturated and monounsaturated fatty acids (C14:1w9 and C16:1w5) and HFN by the saturated and monounsaturated fatty acids. HA and HN hydrolysates were also not well characterized by insoluble precursors, with HN mainly characterized by palmitoleic and eicosanoic fatty acids.

These results reinforce that amino acids and sugars present in treatment with Alcalase, for example, were at lower concentration due to the high participation of these precursors in the formation of volatile compounds through the Maillard reaction. Likewise, fatty acids that were also in smaller proportion in this hydrolysate possibly participated in thermal degradation reactions (very important route of aroma production), generating volatile compounds that impact the aroma of this hydrolysate (such as aliphatic aldehydes).

From the principal component analysis based on volatile compound values (Figure 3C), it was possible to obtain a better representation of the flavoring potential of the four hydrolysates, since their distribution in the PCA graph revealed that they were divided into

different quadrants, where, 95.13% of the variability among hydrolysates could be explained with the first principal component (PC1), explaining 72.23% of variability and the second (PC2), explaining 22.90%.

The differences resulting from the use of the different enzymatic systems were significant, with HA remaining on the positive axis of PC1 and characterized by the majority of volatile compounds determined. HN remained on the positive axis of PC2, qualified only by two ketones (2,3-Octanedione and 3-Octanone) and one terpene (p-Cymene) while HF and HFN were not well characterized by aroma compounds.

Thus, it was observed that the Alcalase hydrolysate had significant impact on the formation of volatile compounds in the meat aroma. Pyrazines, Strecker aldehydes, furans, aromatics, aldehydes and acids were important classes of compounds that strongly characterized samples treated with Alcalase. Probably, the use of higher temperatures (60°C) in the hydrolysis reaction with Alcalase allowed greater reactivity of the initial stage of the Maillard reaction, the metabolic pathway responsible for the formation of most of the volatile compounds obtained.

The heat map of the correlation matrix of amino acids, sugars and volatile compounds can be observed in Figure 3. This matrix allowed evaluating the relationships between water-soluble precursors and detected volatile components. The highly positively correlated compounds were grouped in deep red, and deep blue compounds showed negative or non-significant correlations. The results revealed a simple pattern of high negative correlations between aspartic and glutamic acids, serine, glycine, alanine, proline, isoleucine, lysine with most volatile compounds produced, and similarly, sugars were also correlated with these volatile compounds. Some groups of compounds were negatively correlated, demonstrating that the presence of certain amino acids and sugars impacts the formation of important volatile

compounds. Examples of these compounds are pyrazine and 2,5-dimethyl pyrazine, which may arise from the Strecker degradation of cysteine and thermal reactions of lysine and glycine, which compounds are negatively correlated in this study.

Certain amino acids present as peptides can form Strecker aldehydes and in this study 3-methylbutanal was negatively correlated with most amino acids obtained. This indicates that amino acids obtained from protein hydrolysates and identified sugars can be used as precursors, which under thermal reaction conditions, they have a direct contribution in the formation of volatile compounds.

4. Conclusion

The process of goat viscera protein hydrolysis using three proteases, isolated and combined, provided quantitative and qualitative data on water and fat-soluble precursors involved in the formation of volatile compounds. The use of Alcalase resulted in hydrolysate with higher degree of hydrolysis and concentration of volatile compounds, especially acids, aldehydes, pyrazines, terpenes and Strecker's aldehydes. In turn, Flavourzyme and Mix hydrolysates had higher concentration of water-soluble precursors (amino acids and sugars), which justifies the low participation of these precursors in the formation of aroma/flavor compounds associated with low concentrations of volatile compounds. Therefore, the hydrolysate resulting from the action of Alcalase, which resulted in higher aromatic quality and impact volatile compounds, showed potential as an innovative ingredient for the production of flavoring formulations. Proteolysis makes it possible to direct the application of protein hydrolysate as a food flavoring agent and to convert these low market value goat proteins into products with greater added value, such as flavor precursors.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development; CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil; CAPES) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (The Paraíba State Foundation for the Support of Research; FAPESQ) for their financial support in Project 005/2019/PRONEX and for the scholarship granted to the first author.

References

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Arena, S., Renzone, G., D'Ambrosio, C., Salzano, A. M., & Scaloni, A. (2017). Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies. *Food Chemistry*, 219, 477-489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.165>.
- Bezerra, T. K. A., de Lacerda, J. T. J. G., Salu, B. R., Oliva, M. L. V., Juliano, M. A., Pacheco, M. T. B., & Madruga, M. S. (2019). Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory and Anticoagulant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Chicken Combs and Wattles. *Journal Of Medicinal Food*, 22, 1294-1300. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0066>.
- Breternitz, N. R., Bolini, H. M. A., & Hubinger, M. D. (2017). Sensory acceptance evaluation of a new food flavoring produced by microencapsulation of a mussel (*Perna perna*) protein hydrolysate. *LWT – Food Science and Technology*, 83, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.016>.
- Cardinal, M., Chaussy, M., Donnay-Moreno, C., Cornet, J., Rannou, C., Fillonneau, C., & Courcoux, P. (2020). Use of random forest methodology to link aroma profiles to volatile compounds: Application to enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products combined with Maillard reactions. *Food Research International*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109254>.

- Chiang, J. H, Eyres, G. T., Silcock, P. J., Hardacre, A. K., & Parker, M. E. (2019). Changes in the physicochemical properties and flavour compounds of beef bone hydrolysates after Maillard reaction. *Food Research International*, 123, 642-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.024>.
- Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) (1986) Colorimetry. 2nd Edition, Publication CIE No. 15.2. Commission Internationale de l'Eclairage, Vienna.
- Cordeiro, A. R. R. A., De Medeiros, L. L., Bezerra, T. K. A., Pacheco, M.T. B., Galvão, M. S., & Madruga, M. S. (2020). Effects of thermal processing on the flavor molecules of goat by-product hydrolysates. *Food Research International JCR*, 138, 109758. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109758>.
- Fenemma, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2010). Química de Alimentos de Fennema- 4º ed. – Editora Artmed.
- Hagen, S. R., Frost, B., & Augustin, J. (1989). Pre column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 912-916. <https://doi.org/10.1093/jaoac/72.6.912>.
- Khan, M. I., Jo, C., & Tariq, M. R. (2015). Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors - A systematic review. *Meat Science*, 110, 278 – 284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.08.002>.
- Kotlar, C., Ponce, A. G., & Roura, S. I. (2013). Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. *LWT- Food Science and Technology*, 50(2), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.005>
- Laohakunjit, N., Selamassakul, O., & Kerdchoechuen, O. (2014). Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed *Gracilaria* sp.). *Food Chemistry*, 158, 162–170. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.101>
- Li, Y., Yu, J., Goktepe, I., & Ahmedna, M. (2016). The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*, 196, 1338-1345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.089>.
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E., & Drummond, L. (2018). Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. *Meat Science*, 144, 62- 73. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.019>.

- Madruga, M. S., Elmore, J. S., Oruna-Cancha, M. J., Balagiannis, D., & Mottram, D. S. (2010). Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat. *Food Chemistry*, 123, 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.004>.
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & Boekel, M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364–373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X).
- McCarthy, A., O’Callaghan, Y., & O’Brien, N. (2012). Protein hydrolysates from agricultural crops - bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture*, 3, 112–130. <https://doi.org/10.3390/agriculture3010112>.
- Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65, 344-349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014>.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat products: A review. *Food Chemistry*, 62(4), 415–424. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00076-4).
- Nishimura, T., & Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews International*, 4(2), 175–194. <https://doi.org/10.1080/87559128809540828>.
- O’fallon, J. V., Busboom, J. R., Melson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to went meat tissues, oils and feedstuffs. *Journal Animal Science*, 85, 1511-1521. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-491>.
- Peinado, I., Koutsidis, G., & Ames, J. (2016). Production of seafood flavor formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *Food Science and Technology*, 66, 444 – 452. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.025>.
- Queiroz, A. L. M., Bezerra, T. K. A., Pereira, S. F., Da Silva, M. E. C., Gadelha, C. A. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. T. B., & Madruga, M. S. (2017). Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.009>.
- Ramalingam, V., Song, Z., & Hwang, I. (2019). The potential role of secondary metabolites in modulating the flavor and taste of the meat. *Food Research International*, 122, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.007>.

- Rangan, C., & Barceloux, D. (2009). Food Additives and Sensitivities. *Disease-a-month:DM*, 55(5), 292-311. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2009.01.004>.
- Rodriguez, A., Cuffia, F., Piagentini, A. M., & Lema, P. (2016). Study of the browning and gelation kinetics in a concentrated sheep milk and sucrose system. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 1-7. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12327>.
- Schägger, H., & Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2), 368-79. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- SAS Institute. (2014). SAS user's guide: statistics; version 11.0. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Sun, W.W., Yu, S.J., Yang, X.Q., Wang, J.M., Zhang, J.B., Zhang, Y., & Zheng, E.-L. (2011). Study on the rheological properties of heat-induced whey protein isolate–dextran conjugate gel. *Food Research International*, 44(10), 3259–3263. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.019>.
- Sun, L.B., Zhang, Z.Y., Xin, G., Sun, B.X., Bao, X. J., Wei, Y. Y., Xu, H. R. (2020). Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.018>.
- Tan, T.C., AlKarkhi, A. F., & Easa, A. M. (2012). Assessment of the ribose-induced Maillard reaction as a means of gelatine powder identification and quality control. *Food Chemistry*, 134(4), 2430-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.049>.
- Tan, X., Qi, L., Fan, F., Guo, Z., Wang, Z., Song, W., & Du, M. (2018). Analysis of volatile compounds and nutritional properties of enzymatic hydrolysate of protein from cod boné. *Food Chemistry* 264, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.034>.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2017). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>.
- Xing, L., Liu, R., Cao, S., Zhang, W., & Guanghong, Z. (2019). Meat protein based bioactive peptides and their potential functional activity: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14132>.

Xu, Y., Li, L., Mac Regenstein, J., Gao, P., Zang, J., Xia, W., & Jiang, Q. (2018). The contribution of autochthonous microflora on free fatty acids release and flavor development in low-salt fermented fish. *Food Chemistry*, 256, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.142>.

Zhan, P., Tian, H., Zhang, X., & Wang, L. (2013). Contribution to aroma characteristics of mutton process flavor from the enzymatic hydrolysate of sheep bone protein assessed by descriptive sensory analysis and gas chromatography olfactometry. *Journal of Chromatography B*, 921-922, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.026>.

Zhao, C.J., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (2016). Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review. *Food Research International*, 89, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.042>.

Wei, C. K., Ni, Z. J., Thakur, K., Liao, A. M., Huang, J. H., & Wei, Z. J. (2020). Aromatic effects of immobilized enzymatic oxidation of chicken fat on flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) derived Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 306, 125560. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125560>.

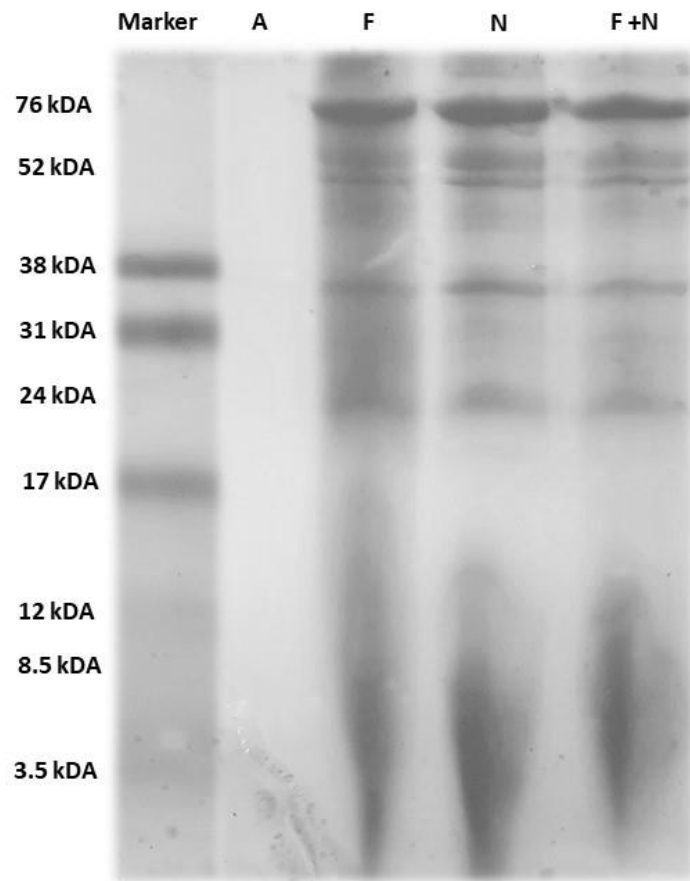
White, J. A., & Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation*, 8, 170-177. <https://doi.org/10.1155/S1463924686000330>.

Figure Captions

Figure 1: Electrophoretic profile of goat viscera hydrolysates

Figure 2. Biplot for the different goat viscera hydrolysates generated with different enzymes (HA: goat hydrolysate obtained with enzyme Alcalase, HF: goat hydrolysate obtained with enzyme Flavourzyme, HN: goat hydrolysate obtained with enzyme Neutrase, HFN: goat hydrolysate obtained with enzyme Flavourzyme and Neutrase), and free amino acids and sugars **(A)** obtained by PCA (PC1: 51.51%, PC2: 39.57%); fatty acids **(B)** obtained by PCA (PC1: 68.03%, PC2: 23.22%); and volatile compounds **(C)** obtained by PCA (PC1:72.23, PC2: 22.90%).

Figure 3. Heatmap of correlation matrix of the free amino acids, sugars and volatile compounds in goat viscera hydrolysates. The correlation coefficients of compounds are color coded from deep red (1) to deep blue (-1).



822
823
824

825

826

827

828

829

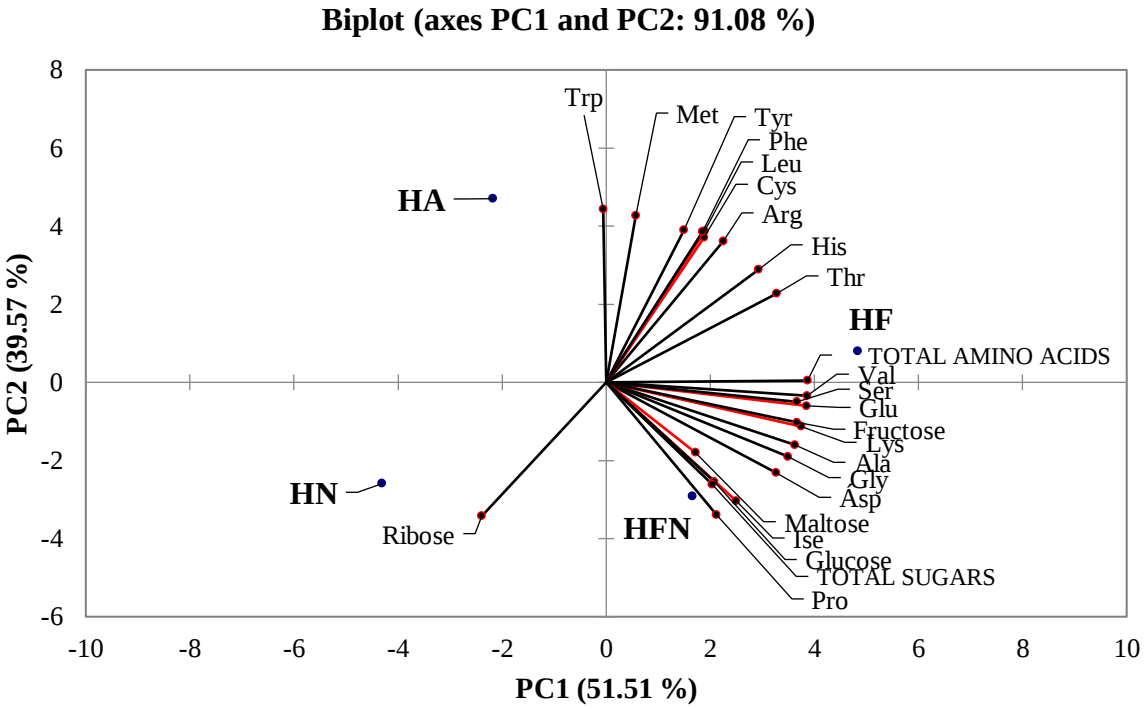
830

831

832

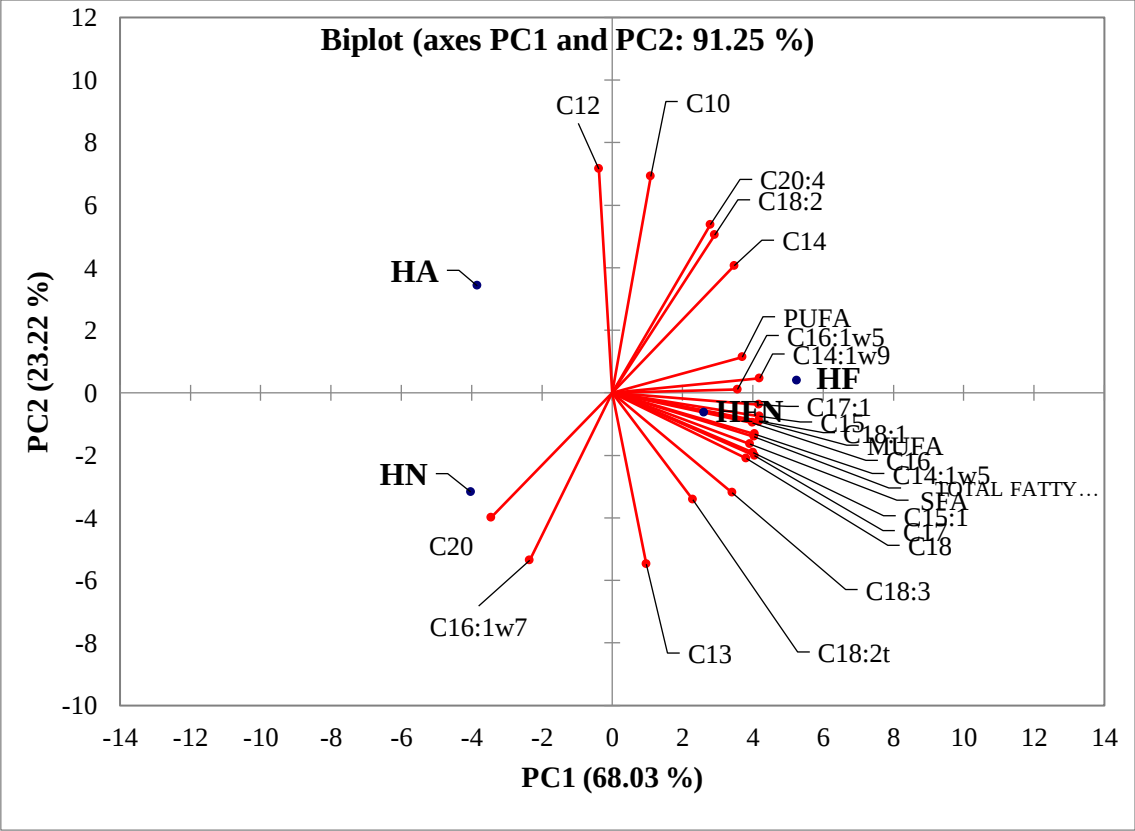
833

834 A)

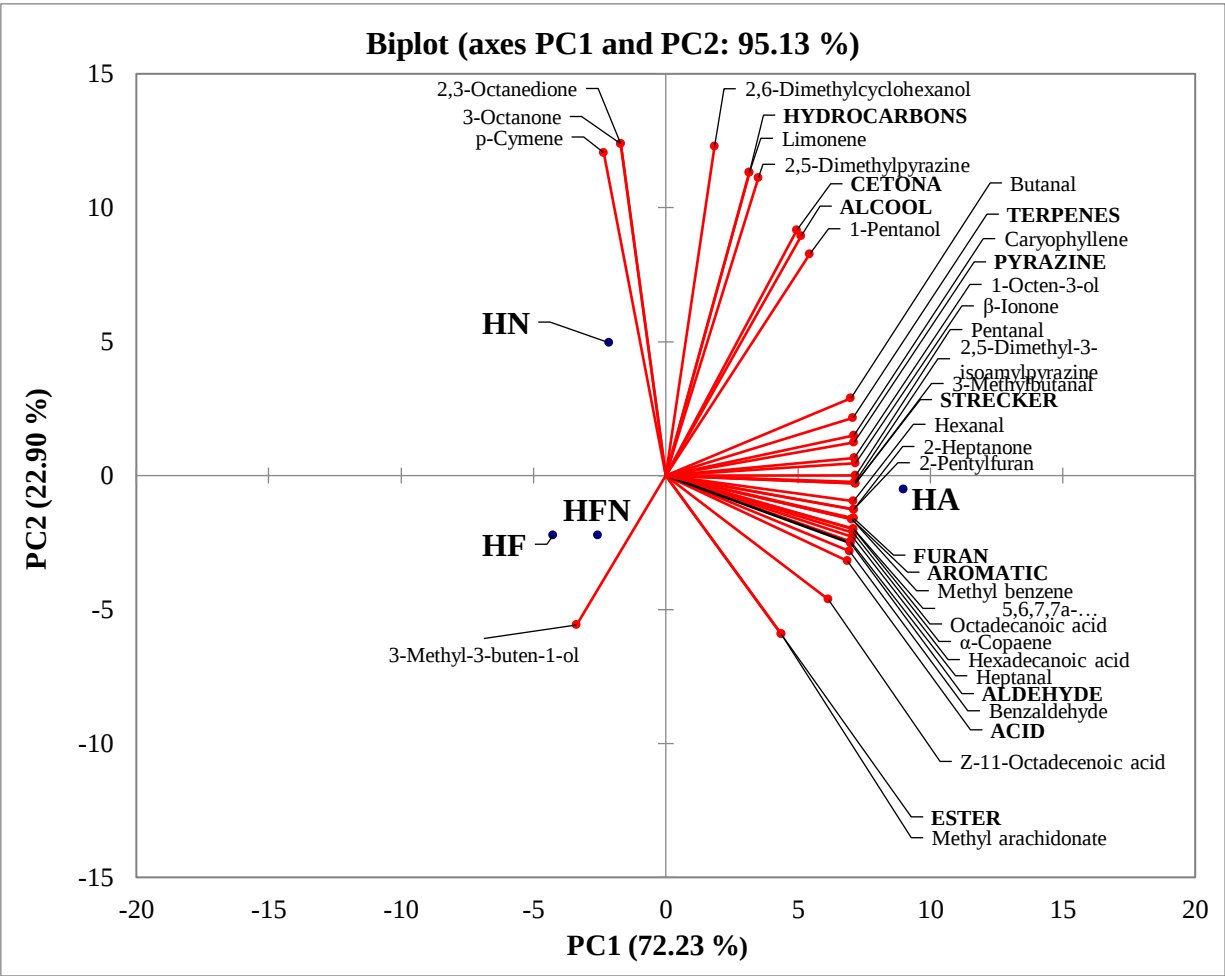


835

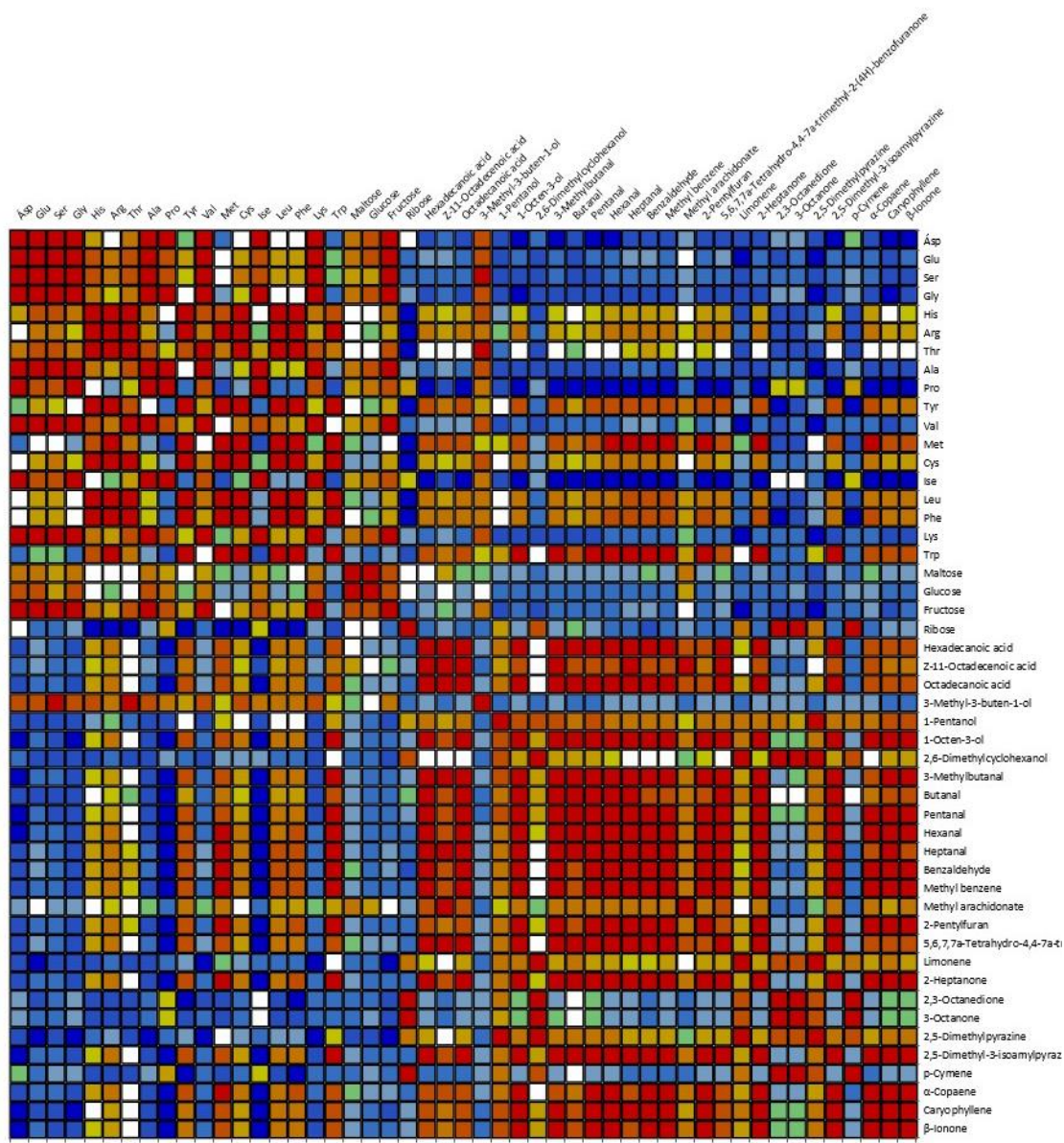
836 B)



837



848



849

850

851

852

853

854

5 CONCLUSÕES GERAIS

Diante da realização deste estudo, alguns resultados podem ser destacados:

- i) Fica evidente que a utilização das vísceras caprinas se apresenta como oportunidade de agregar valor à cadeia produtiva destes animais, através da produção hidrolisados proteicos com potencial flavorizante.
- ii) O processo térmico de inativação de enzimas endógenas e esterilização em autoclave forneceu dados quantitativos e qualitativos sobre os precursores envolvidos na formação aromática de hidrolisados de proteínas a partir de subprodutos caprinos.
- iii) A aplicação de dois tratamentos térmicos resultou na produção de hidrolisados proteicos com diferentes perfis de voláteis, demonstrando que o processo de autoclavagem favoreceu a produção de pirazinas e outros compostos heterocíclicos.
- iv) O processo de hidrólise proteica de vísceras caprinas utilizando três proteases, isoladas e combinada, forneceu dados quantitativos importantes sobre os precursores solúveis em água/gordura envolvidos na formação de compostos voláteis.
- v) O uso da Alcalase resultou em um hidrolisado com maior grau de hidrólise e concentração de compostos voláteis, e demonstrou maior qualidade aromática e compostos voláteis de impacto.

Novos estudos utilizando diferentes formulações de aromatizantes e a aplicação de hidrolisado proteico a partir de subprodutos caprinos devem ser realizados, com foco na melhor adequação destes subprodutos como fonte de alimento humano, promovendo o surgimento de novos produtos e aplicações promissoras na indústria de alimentos.

ANEXO

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo II

em@editorialmanager.com ↶ ↷ → ...
 Sáb, 11/09/2021 21:12
 Para: Ana Rita Ribeiro de Araújo Cordeiro
 Dear Mrs Cordeiro,

Your submission entitled EFFECT OF PROTEASES ON WATER-SOLUBLE AND FAT-SOLUBLE AROMA PRECURSORS OF GOAT VISCERAS PROTEIN HYDROLYSATE has been received by Food Chemistry.

Your manuscript is now with our editorial office and will go through a technical check. This process typically takes 1-2 weeks. If it passes, it will receive a manuscript number and be assigned to the Editor-in-Chief or Senior Editor who will do an initial scientific assessment. If it passes this stage, it will be assigned to an editor for peer review.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <https://www.editorialmanager.com/foodchem/>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: Ana Rita Cordeiro

If you need to retrieve password details, please go to: <https://www.editorialmanager.com/foodchem/L.asp?i=1371980&l=TE3268CV>

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Food Chemistry.

Kind regards,
 Editorial Manager
 Food Chemistry

#AU_FOODCHEM#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/foodchem/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.