

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"AVALIAÇÃO COMPOSICIONAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE RKS E
EFEITOS DO ARMAZENAMENTO A -18°C SOBRE FRAÇÕES PROTEICAS
E LIPÍDICAS DO MÚSCULO DE RX TOURO (*Bana catasbelana*)"

ANA LÚCIA DA SILVA CORRÊA
Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. ALOÍSIO JOSÉ ANTUNES
Orientador

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNI-
VERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CAMPINAS

1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Este exemplar ~~corresponde~~ ^{parece} a redação
final da tese defendida por Ana Lúcia
da Silva Corrêa e aprovada pela Comissão
Julgadora em 28.11.88.
Campinas, 28 de novembro de 1988.*

H. W. M.

Presidente da Banca

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao Prof. Dr. Aloísio José Antunes a orientação desta tese e a compreensão demonstrada em vários momentos, e aos amigos Viktor Christian Wilberg e Leandro Ferreira de Aguiar pela colaboração prestada.

Gostaria de expressar minha gratidão a Eliana Maria Petrossi Motta e a Nadje Hamdan de Moraes pela amizade, pelo carinho e pelo incentivo, sempre presentes, além da valiosa colaboração, extendendo-se os agradecimentos a Jaqueline Girnos.

Deixo registrado meu reconhecimento a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Não há palavras que possam expressar minha gratidão aos meus pais, Luciano e Eulice, cujo apoio foi muito importante nos momentos difíceis por que passamos. Todo respeito, todo estímulo e dedicação de minha mãe, assim como carinho e amizade recebidos de meus irmãos, Alvaro Luciano e Ana Elisa, possibilitaram a realização desta tese.

INDICE

INDICE DE TABELAS	1
INDICE DE FIGURAS	111
RESUMO	1v
SUMMARY	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 - Aspectos gerais	5
2.2 - Alterações no músculo durante congelamento.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 - Material	27
3.1.1 - Matéria prima.....	27
3.1.1.1 - Preparação da farinha de vísceras e cabeças	30
Fluxograma 1	31
3.1.1.2 - Reagentes	32
3.1.1.3 - Equipamentos	33
3.2 - Metodologia Experimental	34
3.2.1 - Análises físicas	34
3.2.1.1 - Determinação do rendimento da carcaça	34
3.2.2 - Análises químicas	35
3.2.2.1 - Composição química centesimal ..	35
3.2.2.2 - Determinação da solubilidade do músculo fresco e congelado	36
3.2.2.3 - Determinação do teor de lipídios totais no músculo congelado	38
3.2.2.4 - Determinação do teor de fosfolipídios na fração lipídica do músculo	38
3.2.2.5 - Determinação do teor de ácidos graxos livres	39
3.2.2.6 - Determinação do índice de peróxidos.....	39
3.2.2.7 - Determinação do pH do músculo ..	40
3.2.2.8 - Determinação da composição em aminoácidos	40
3.2.3 - Eletroforese	44
3.2.4 - Análises microbiológicas	46
3.2.5 - Análises sensoriais	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 - Análises físicas da carcaça	48
4.2 - Determinação da composição química	54
4.2.1 - Composição química da carne	54
4.2.2 - Composição química centesimal da farinha de vísceras e cabeça de rã touro	57
4.2.3 - Composição em aminoácidos da carne de rã..	57
4.2.4 - Composição em aminoácidos da farinha de vísceras e cabeças de rã touro	61
4.3 - Análises da carne de rã ao longo do armazenamento a -18°C	64
4.3.1 - Alterações na solubilidade das proteínas durante o congelamento	64
4.3.2 - pH	72
4.3.3 - Eletroforese em gel de poli(acrilamida).....	73
4.3.4 - Composição em aminoácidos do músculo fres- co e congelado	76
4.3.5 - Alterações na fração lipídica do músculo de rã durante o congelamento	78
4.3.5.1 - Fosfolipídios	81
4.3.5.2 - Ácidos graxos livres	82
4.3.5.3 - Índice de peróxidos	86
4.6 - Análise microbiológica	89
4.7 - Análise sensorial	92
5. CONCLUSÕES	95
6. BIBLIOGRAFIA	98
7. ANEXOS	122

INDICE DE TABELAS

Tabela 1	- Composição química aproximada de carnes magras de vários animais	11
Tabela 2	- Padrão de aminoácidos da proteína referência	43
Tabela 3	- Valores estimados de diferentes características em rãs touro (<i>Rana catesbeiana</i>) destinadas à comercialização	48
Tabela 4	- Resultados das análises de rendimento da carcaça para rãs touro (<i>Rana catesbeiana</i>)	49
Tabela 5	- Composição química dos músculos das rãs das espécies: <i>R. catesbeiana</i> (rã touro), <i>L. ocellatus</i> (rã mirim) e <i>L. labyrinthicus</i> (rã pimenta)	54
Tabela 6	- Composição química da farinha de vísceras e cabeça de rã touro (<i>R. catesbeiana</i>).....	58
Tabela 7	- Composição em aminoácidos da carne de rã das espécies: <i>R. catesbeiana</i> , <i>L. labyrinthicus</i> e <i>L. ocellatus</i>	59
Tabela 8	- Escore químico para a carne de rã touro (<i>Rana catesbeiana</i>), de rã mirim (<i>L. ocellatus</i>) e de rã pimenta (<i>L. labyrinthicus</i>)	60
Tabela 9	- Composição em aminoácidos da farinha de vísceras e cabeça de rã touro (<i>R. catesbeiana</i>)	62

- Tabela 10 - Influência do congelamento a -18°C na solubilidade das proteínas do músculo de rã touro (Rana catesbeiana) expressa em % da proteína total do músculo 66
- Tabela 11 - Variação do pH do músculo de rã touro (Rana catesbeiana) armazenado a -18°C por 182 dias..... 73
- Tabela 12 - Composição em aminoácidos da carne de rã touro (Rana catesbeiana) fresca e congelada 77
- Tabela 13 - Composição em aminoácidos das seguintes frações proteicas extraídas do músculo fresco e congelado de rã touro (Rana catesbeiana); proteína total extraível (PTE), proteínas miofibrilares (PM) e proteínas sarcoplasmáticas (PS) 79
- Tabela 14 - Influência do congelamento a -18°C na fração lipídica do músculo de rã touro (Rana catesbeiana).... 80
- Tabela 15 - Análise microbiológica do músculo de rã fresca e após armazenamento a -18°C por um período de 182 dias 89
- Tabela 16 - Resultados das análises sensoriais efetuados com a rã touro (Rana catesbeiana) fresca e armazenada a -18°C por 182 dias 93

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Músculos da coxa e perna direita de rã touro (<u>Rana catesbeiana</u>)	29
Figura 2 - Regressão linear entre as seguintes características de rã touro (<u>Rana catesbeiana</u>): a) peso ao abate (x) e peso da carcaça (y), b) peso ao abate (x) e peso das pernas (y)	51
Figura 3 - Regressão linear entre as seguintes características de rã touro (<u>Rana catesbeiana</u>): a) peso ao abate (x) e peso das vísceras (y), b) peso ao abate (x) e peso da pele (y), c) peso ao abate (x) e peso da cabeça (y)	52
Figura 4 - Alterações de solubilidade da proteína total extraível (PTE), das proteínas miofibrilares (PM) e das proteínas sarcoplasmáticas (PS) ao longo do armazenamento a -18°C	67
Figura 5 - Perfil eletroforético das proteínas sarcoplasmáticas do músculo de rã touro (<u>Rana catesbeiana</u>) ao longo do armazenamento a -18°C	75
Figura 6 - Decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares (P.M.) e aumento da concentração de ácidos graxos livres (A.G.L.)	85
Figura 7 - Variação do índice de peróxidos (IP) ao longo do armazenamento a -18°C	88

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo obter algumas informações sobre o rendimento da carcaça da rã touro (*Rana catesbeiana*), a composição de seu músculo e as alterações do mesmo durante o armazenamento a -18°C por um período de 182 dias, além da determinação da composição de uma farinha preparada com vísceras e cabeça, que juntas perfazem cerca de 24% do peso total ao abate. Para efeito comparativo foi determinada a composição do músculo fresco das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* (rã pimenta) e (*Leptodactylus ocellatus*) (rã mirim), muito apreciadas pelos consumidores brasileiros.

A composição química aproximada das três espécies mostrou-se semelhante: umidade, 82%; proteína bruta, entre 16 e 17%; lipídios totais, entre 0,6 e 0,8% e cinzas entre 0,91 e 0,96%.

A composição em aminoácidos destaca a carne de rã como boa fonte de aminoácidos essenciais, especialmente lisina e triptofano, sendo semelhante para as três espécies estudadas.

A farinha de vísceras e cabeça apresentou cerca de 46% de proteína bruta, 7% de lipídios e 38% de cinzas e uma composição em aminoácidos que mostrou ser especialmente rica em lisina e arginina.

As alterações das frações proteica e lipídica do músculo de rã armazenado a -18°C por um período de 182 dias foram acompanhadas em intervalos de 15, 33, 47, 63, 92, 124 e 182 dias. A so-

lubilidade da fração correspondente às proteínas miofibrilares, "actomiosina", decresceu, passando de aproximadamente 76% para 23% durante os 182 dias de armazenamento a -18°C . Não foi observada nenhuma alteração significativa na solubilidade das proteínas sarcoplasmáticas, apesar disso o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida evidenciou pequenas alterações após 47 dias, quando houve o surgimento de uma banda no início do gel. Embora o teor de lipídios totais tenha permanecido constante ao longo do armazenamento congelado, a quantidade de fosfolipídios diminuiu, a medida que o teor de ácidos graxos livres aumentava. A deterioração oxidativa dos lipídios no músculo congelado foi estimada através do índice de peróxidos.

O pH do músculo congelado não apresentou alterações significativas.

Houve redução da atividade microbiana ao longo do armazenamento congelado, uma vez que a contagem total de microorganismos decresceu da ordem de 10^3 para 10^1 .

A análise sensorial do músculo cozido, após o armazenamento congelado evidenciou perda de qualidade com maior relevância para os seguintes atributos: textura e odor. Apesar das alterações organolépticas no músculo congelado serem detectáveis, as médias mantiveram-se em níveis aceitáveis após o período de 182 dias de congelamento.

SUMMARY

The present study was undertaken in order to obtain informations about Bullfrog (Rana catesbeiana) in terms of its car-casse composition, its muscle chemical composition and the chemi-cal alterations in muscle during frozen storage at -18°C for 182 days period. The proximate and the aminoacid composition of a meal prepared with visceras and head which represented 24% of the total weight at slaughter was also assessed. For comparison, it was determined the fresh muscle composition of Leptodactylus labyrinthicus and Leptodactylus ocellatus species which are very appreciated by the Brazilian consumers.

The proximate composition of the three species were simi-lar. Umidity, 82%; crude protein, 16-17%; total lipid 0,6-0,8% and ash 0,91-0,96%.

The aminoacid composition revealed that frog meat is a good source of essential aminoacids, showing high lysin and tryptophan levels. The composition was similar for the three species studied.

The meal made out of visceras and head showed about 46% of crude protein, 7% of total lipids and 38% ash. Its aminoacids composition revealed that it contains high levels of lysin and arginine.

Changes in the lipid and protein fractions of the Bull-frog muscles stored at -18°C for 182 days were followed in periods of 15, 33, 47, 63, 92, 124 and 182 days. The solubility of the myofibrillar protein fraction, "actomyosin", dropped from about 76% to 23% during the 182 days storage period. No change in solubility of sarcoplasmic protein in frozen muscle was observed. However, the electrophoretic pattern (polyacrilamide gel disc electrophoresis) showed some minor changes after 47 days, when a new band appeared in the first portion of the gel. Although the total lipid content remained constant throughout frozen storage, phospholipid contents decreased as free fatty acid increased. Oxidative deterioration of lipid was estimated in frozen muscle through determination of the peroxide value.

The frozen muscle pH measurements did not show any relevant change.

The microbiological activity showed a reduction during frozen storage, since the total viable count dropped from 10^3 to 10^1 .

After frozen storage, the organoleptic evaluation of the cooked muscle revealed changes in quality changes primarily in texture and odor. Although these alterations were detectable, the scores were kept in acceptable levels after 182 days of the frozen storage.

1 - INTRODUÇÃO

Um levantamento preliminar de informações específicas sobre as características bioquímicas, nutricionais e tecnológicas em várias espécies de rãs mostra que os dados disponíveis são escassos apesar do potencial do músculo de rã como alimento humano.

A rã touro (Rana catesbeiana), foi introduzida no Brasil em meados de 1930 quando iniciou-se sua criação comercial e experimentos demonstram mais capacidade de adaptação e produtividade desta espécie no Brasil em relação a outros países criadores (Estados Unidos, México, Alemanha e Havaí). As variáveis climáticas tropicais parecem condicionar fatores de precocidade e reprodução permitindo desova parcelada sazonal (Vizotto, 1975). Estudos conduzidos pela Seção de Aquicultura da Divisão de Pesca Interior do Instituto de Pesca visam orientar os produtores no estabelecimento de critérios estáveis para produção, produtividade e comercialização de rãs, como uma etapa inicial necessárias para elevação do consumo da carne de rã (Fontanello et al., 1981). Em complementação a estes estudos, informações detalhadas sobre as características bioquímicas, nutricionais e tecnológicas da rã touro (Rana catesbeiana) incentivarlam a criação desta espécie em cativeiro, no sentido de que poderiam servir de base para a industrialização mais eficiente, rentável e, conseqüentemente, desenvolver-se um mercado potencialmente atrativo. O mercado externo também se poderia tornar uma via alternativa de comercialização.

Sendo a carne de rã um produto de grande susceptibilidade à contaminação bacteriana, seu processamento requer cuidados especiais. Vários estudos mencionam técnicas adequadas para obter-se a carne de rã com a melhor qualidade microbiológica possível (Nickelson e Wyatt, 1975), ao mesmo tempo em que estudos sistemáticos a respeito da composição química e valor nutritivo da carne de rã antes e durante o processamento são raros e importantes para o Brasil, uma vez que as rãs poderiam se constituir em importante fonte de nutrientes essenciais, tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal; as partes não comestíveis, vísceras, cabeça entre outros, mediante processamento adequado forneceriam ração de alto valor biológico (Muralidhara *et al.*, 1976). Além disso, a pele é comercializada alcançando altos preços em mercados internacionais. Sabe-se também que na Ásia o óleo de rã é tradicionalmente considerado possuidor de propriedades terapêuticas para algumas doenças dentre elas a asma (Devadasan e Rajendranathan Nair, 1980). Finalmente, a carne com teor protéico semelhante ao de outros animais, já vem sendo exportada, em pequena escala, após congelamento, para os Estados Unidos, França, Bélgica entre outros, verificando-se crescente demanda por parte desses países importadores.

As proteínas da carne de rã são susceptíveis a alterações na sua constituição assim como os lipídios, analogamente a outras carnes, durante congelamento, enlatamento e outros processos tecnológicos. Embora existam numerosos relatórios sobre estas alte-

rações para peixes, carne bovina e frango, estudos semelhantes com carne de rã são escassos.

Existem alguns estudos a respeito da composição da fração lipídica do músculo de rã (Pathak e Aggarwal, 1966; McMullin, 1968; Sarvaveda e Srikar, 1982) sendo enfatizada a composição em ácidos graxos. Em relação à fração proteica, a escassez de trabalhos é ainda maior. A maioria objetiva comparações entre as várias espécies por meio de análises de proteínas do soro sanguíneo. Devadasan e Rajendranathan Nair (1978) tem um estudo preliminar sobre a natureza da proteína do músculo da *Rana tigrina* antes e durante o armazenamento em gelo, assim como durante o enlatamento.

Neste trabalho foram obtidos alguns dados a respeito do rendimento da carcaça de rã touro (*Rana catesbeiana*), bem como das alterações químicas do músculo ao longo do congelamento a -18°C , por um período de até 182 dias. Foi determinado o perfil eletroforético das proteínas sarcoplasmáticas em gel de poliacrilamida, visando sua possível utilização para identificação da espécie *Rana catesbeiana* ao longo do armazenamento congelado. Mediante análise sensorial do produto congelado e fresco foram verificadas quais as propriedades organolépticas mais susceptíveis a alterações a longo do congelamento. Foi determinada a composição química centesimal e a composição em aminoácidos do músculo de rã (*Rana catesbeiana*) e das rãs selvagens, mirim (*Leptodactylus ocellatus*) e pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) para

efeito comparativo. Uma farinha composta de vísceras e cabeças de rãs touro (Rana catesbeiana) foi preparada e realizou-se sua composição química centesimal e composição em aminoácidos com vistas a um aproveitamento futuro como ingrediente para rações.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - ASPECTOS GERAIS

A rã touro (Rana catesbeiana) é a única espécie cujo cultivo é feito intensivamente, embora estudos venham sendo conduzidos visando a criação da espécie Leptodactylus ocellatus em cativeiro, pelos seguintes motivos: ausência quase total de canibalismo, metamorfose mais rápida que a da espécie Rana catesbeiana e alto rendimento de carcaça devido ao braço hipertrofiado. A espécie Leptodactylus labyrinthicus, exclusivamente nativa, também é muito apreciada pelos consumidores de rã (Lima, 1982). A classificação das três espécies acima, pertencentes à Classe Amphibia e Ordem Anura é a seguinte (Frost, 1985):

1 - Rana catesbeiana (Shaw, 1802)

Família Ranidae

Gênero Rana

Nome vulgar: rã touro

2 - Leptodactylus ocellatus (Linnaeus, 1758)

Família Leptodactylidae

Gênero Leptodactylus

Nome vulgar: rã mirim, paulistinha ou
manteiga

3 - *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824)

Família Leptodactylidae

Gênero *Leptodactylus*

Nome vulgar: rã pimenta

A criação de rãs touro, a partir de condições empíricas, levou inúmeros criadores a estabelecerem práticas para sistemas de cultivo intensivos, na tentativa de obter maior produção e produtividade, em decorrência da demanda crescente dos mercados interno e externo (Fontanello, 1981). O desfrute do criatório deve ser resultante de estudos sistemáticos de pesquisa orientada e integrada, com vistas ao estabelecimento de técnicas e metodologias tais como: escolha da localização do ranário com bases geoclimáticas, seleção das matrizes e reprodutores machos, manejo reprodutivo, formulação de dietas alimentares, controle sanitário de predadores e profilaxia, estabelecimento de critérios tecnológicos e sanitários para o processamento e armazenamento da carne, além da avaliação do custo-benefício e desta forma proceder-se ao estabelecimento do sistema de produção (Priddy e Culley Jr., 1971).

O músculo, especialmente o de vertebrados endotérmicos, após sofrer alterações bioquímicas, químicas e físicas após a morte, é chamado carne, embora os dois termos sejam muitas vezes usados indistintamente (Fennema, 1976). Com a morte do animal, a taxa de glicólise diminui, bem como os teores de creatina fosfato e ATP; aumenta a produção de ácido láctico provocando queda no pH

do músculo; as fibras musculares sofrem um encolhimento. Após este período que se denomina de estabelecimento do rigor mortis, inicia-se o desdobramento de derivados purínicos do ATP com produção de amônia e elevação do pH, nesta fase o músculo é comestível e inicia-se o ataque microbiano. Estudos a respeito das alterações físicas e bioquímicas, que afetam a qualidade comestível da carne de mamíferos, peixes e aves, bem como do fenômeno do rigor mortis e as alterações bioquímicas a ele associadas, são inúmeros para estes animais, (Bendall, 1960; De Fremery e Pool, 1960; Amlacher 1961; Partman, 1965; Newbold, 1966; Tarr, 1966). A velocidade de estabelecimento do rigor mortis em animais endotérmicos e peixes, varia enormemente de espécie para espécie, entre indivíduos de uma mesma espécie e até de músculo para músculo de um mesmo animal (Sidhu et al., 1974). Estudos semelhantes com carne de rã não são encontrados na literatura.

Vários autores têm caracterizado várias proteínas do músculo de rã, principalmente a hemoglobina, com objetivos taxonômicos. Hirabayashi e Hayashi (1970), estudaram o isolamento e a purificação das proteínas estruturais dos músculos da perna da rã da espécie *Rana nigromaculata*, tendo como objetivo detectar alterações nas características das proteínas contrácteis do músculo durante o crescimento das células musculares, como um sinal molecular de diferenciação; obtiveram isolados puros de miosina, actina e tropomiosina. Tanescu (1967) obteve a separação das proteínas sarcoplasmáticas do músculo gastrocnemius da perna da rã da espécie *Rana ridibunda* em coluna de DEAE- Sephadex e suas res-

pectivas absorções no espectro ultra violeta, como parte de seus estudos sobre as enzimas envolvidas na glicólise; a separação foi feita utilizando-se tampão fosfato em pH 8,0, tampão Tris-HCl em pH 7,2 e pH 8,5. Foram detectadas de 18 a 24 frações dependendo do tampão utilizado; um grupo principal, consistindo de três picos foi eluído em concentração de 0,1M, houve um grupo de proteínas que não ficou retido na coluna com nenhum dos tampões, embora sua concentração tenha decrescido com o aumento de basicidade do tampão de eluição; o espectro de absorção no ultravioleta das proteínas separadas na coluna, apresentou máximo de absorção a 280mu e na faixa de 205 - 225mu; um grupo de proteínas cuja absorbância estava na faixa de 205 - 225mu era detectado dependendo das concentrações do tampão e do NaCl utilizados na eluição. Usakov (1966), fez um estudo comparativo da estabilidade térmica de várias proteínas em duas espécies de rãs *Rana temporaria* e *Rana ridibunda*, verificou que ocorrem diferenças de estabilidade térmica em inúmeras proteínas (desidrogenases, colinesterase, adenosinatrifosfatase, hemoglobina, aldolase e fosfatase alcalina) e que estas diferenças seriam as responsáveis pelas diferenças interespecíficas, evidenciadas por diferenças em temperaturas ambientais e de reprodução. Inúmeros são também os trabalhos de caracterização de diferentes espécies de rãs através da hemoglobina (Aggarwal e Riggs, 1969; Ramakrishnan e Barnabas, 1966; Tentori et al., 1967; Tentori, 1968; Kyriakosopoulou - Sklavounou, 1979), das proteínas da linfa (Reichel, 1969; Chen, 1967) e da miosina (Lewis, 1968). Hamoir e Reuter (1956), ao estudarem detalhadamente o isolamento e as propriedades da miosina de rã

(*Rana temporaria* e *Rana viridis*) e comparando suas propriedades às de outros animais endotérmicos (carpa), e ao coelho, obtiveram inúmeros resultados: a extractabilidade da miosina de rãs e de peixe (carpa) é bem menor que a de coelho (endotérmico). Quando a extração era realizada em forças iônicas elevadas, em presença de ATP, a um pH de 7,0, a análise eletroforética apresentava uma fração que não podia ser observada nos extratos desprovidos de ATP, fração esta ligeiramente mais rápida que a correspondente à actomiosina. Ao isolarem e estudarem esta fração observaram que correspondia à miosina e que a miosina extraída do músculo de rã e da carpa, embora pudesse formar um complexo com a F-actina de coelho, apresentava diversas particularidades: migrava mais rapidamente que a miosina de coelho em um pH de 7,0 durante a eletroforese, sedimentava mais rapidamente e tinha uma viscosidade cerca de 50% superior. Com este trabalho Hamoir e Reuter (1956), demonstraram a semelhança existente entre as propriedades da miosina de rã e a de outros animais endotérmicos (Connell, 1954).

O método eletroforético tem sido muito utilizado para identificação de diferentes espécies de peixes quando há ausência das características externas e quando somente o filé está disponível para identificação (Mackie, 1969; Bremner e Vail, 1983; Sumner e Mealy, 1983). Inúmeros suportes tem sido utilizados na separação das proteínas aquossolúveis do músculo, sendo o gel de poliacrilamida o mais utilizado, uma vez que é rápido, confiável e necessita de uma pequena quantidade de músculo (Mackie, 1968), o método também tem se mostrado aplicável a peixes congelados e

cozidos, no caso de se estar utilizando peixe cozido a extração deve ser feita com uréia 6M e não com água destilada (Mackie, 1972). Damiani e Rossi, (1985) registraram a modificação do perfil eletroforético característico da espécie em peixes lacustres, quando estes estavam em estado de início de deterioração; nesse trabalho os pesquisadores utilizaram dois tampões diferentes como eletrólitos: TRIS-glicina e sódio barbital, sendo observado que o tampão TRIS-glicina mostrou-se de mais fácil utilização, uma vez que o traçado mostrou-se mais expandido, com as bandas mais distantes umas das outras; com o tampão sódio-barbital a separação foi insuficiente, e conseqüentemente de difícil interpretação.

A literatura sobre rãs é vasta mas seu enfoque é basicamente o de interesse zoológico, principalmente no que se refere aos aspectos taxonômicos. É relevante salientarmos ainda, que as espécies brasileiras são pouco estudadas, principalmente as que tem sua carne utilizada como alimento.

A composição química aproximada do músculo de rã, indicada na Tabela 1, e resultados de composição química (FIBGE, 1981) aproximada de carnes magras de vários animais para comparação, nos revela que o conteúdo de proteína de carne de rã é próximo ao de peixe magros, bem como o teor de lipídios. Sabe-se, entretanto, que o teor de lipídios é muito dependente da dieta do animal, em primeiro lugar, e com menos relevância, da região e da estação do ano em que foi capturado o animal (Stansby, 1962).

Tabela 1 - Composição química aproximada de carnes magras de vários animais (%)

Carnes	Umidade	Proteína	Lípidios	Cinzas
	(N \times 6,25)	bruta		
Boi (carne magra)	71,4	21,5	6,1	1,0
Cabrito (carne magra)	69,7	18,0	11,3	1,0
Carneiro (carne magra)	67,2	17,1	14,8	0,9
Coelho	70,0	21,0	8,0	1,0
Frango (carne magra)	73,7	22,0	3,3	1,0
Porco (carne magra)	70,0	19,5	9,1	1,4
Peixes magros de água doce	82,0	16,6	0,5	0,9
Peixes magros de água salgada*	78,3	19,9	0,9	1,4
Rã (<i>Leptodactylus ssp</i>)	78,8	19,9	0,3	1,0

* Média entre badejo (*Micropogonias* *ssp*), corvina (*Micropogon furnieri*), linguado (*Paralichthys ssp*), pescadinha (*Macrodon ancylodon*)

Os dados a respeito da composição química da carne de rã, sua composição em aminoácidos e em ácidos graxos, são escassos assim como a respeito das alterações do músculo após abate, durante armazenamento e processamento, dados estes que têm influência direta nas propriedades organolépticas, tais como: textura, cor, sabor, aroma; como já foi observado em outros animais (Pedraja, 1970; Kislaitis, 1962).

As proteínas do músculo são classificadas em proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e do tecido conjuntivo (estroma). As proteínas sarcoplasmáticas constituem a fração solúvel que pode ser extraída do músculo com água, ou com soluções salinas diluídas. Esta fração compreende as enzimas, entre elas principalmente as glicolíticas, embora também estejam presentes as do ciclo das pentoses, a creatina quinase, AMP desaminase, nucleoproteínas, proteínas lisossomiais e a mioglobina (Bodwell e McClain, 1971). Embora haja muita controvérsia a respeito da solubilidade das proteínas sarcoplasmáticas *in situ* (Melnick e Hultin, 1973), elas são facilmente extraídas do músculo. As proteínas miofibrilares são as proteínas estruturais do músculo, que lhe confere rigidez e participam da transformação de energia química em energia mecânica necessária à contração muscular; são solúveis em soluções salinas de alta força iônica entretanto não são solúveis em soluções salinas diluídas nem em água. Este grupo de proteínas compreende a miosina, actina, actomiosina, tropomiosinas, troponinas e actininas. O teor aproximado de miosina na fração correspondente às proteínas miofibrilares é de aproximadamente 54% e o de actinina em torno de 27%, dependendo da espécie e do músculo analisado; mas, ao efetuar-se a extração formam um complexo acto-miosínico. O tecido conjuntivo (estroma) tem como função o suporte da musculatura do animal e é construído principalmente das seguintes proteínas: colágeno, reticulina e elastina, sendo o colágeno o mais abundante, com seu teor variando de 20 a 25% da proteína total do músculo (Fennema, 1976).

A fração lipídica do músculo de rã, com teor de lipídios totais entre 0,5 e 1%, apresenta em torno de 90% de fosfolipídios e o restante são lipídios neutros, como foi determinado por Sarvaveda e Srikar (1982), na espécie *Rana hexadactyla*. Existem variações na composição da fração lipídica de acordo com: a idade do animal, a alimentação e a temperatura ambiental (Baranska e Wlowander, 1969). Em trabalhos feitos sobre a composição em ácidos graxos da fração lipídica do músculo de rã, McMullin et al. (1968) observaram que o teor de ácidos graxos saturados é inferior ao de ácidos graxos insaturados, em rãs da espécie *Rana clamitans*. Pathak e Aggarwal (1966) obtiveram resultados semelhantes em rãs da espécie *Rana tigrina*, sendo o ácido palmítico o de maior teor (em torno de 25%). Sarvaveda e Srikar (1982), trabalhando com rãs touro da espécie *Rana hexadactyla*, encontraram teores de ácidos graxos saturados ligeiramente superiores (54,1%) aos teores de ácidos graxos insaturados, na fração correspondente aos lipídios totais. As análises da fração correspondente aos lipídios neutros, evidenciaram que nesta fração os ácidos graxos insaturados são encontrados em maiores teores, perfazendo 55% dos ácidos graxos totais presentes nesta fração. Evidenciaram que os ácidos graxos saturados principalmente os de cadeia curta, estão presentes de forma mais expressiva nos fosfolipídios.

O mecanismo de contração muscular e de estabelecimento de rigor mortis em rã é similar ao de outros animais (Mac Donald, 1973). Logo após a morte do animal, inicia-se uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas que são subdivididas em três fases (Eskin, et al., 1971):

1) Fase pré rigor: nesta fase o músculo ainda é macio e facilmente extensível, sendo caracterizado bioquimicamente pela queda dos teores de adenosina trifosfato (ATP) e creatina fosfato, bem como da taxa de glicólise.

2) Fase de enrijecimento muscular, isto é, estabelecimento do rigor mortis. Neste período interrompe-se a atividade de muitas enzimas e dos microorganismos. A rigidez bloqueia a permeabilidade das células impedindo o intercâmbio normal de substâncias, o que provavelmente dificulta a ação microbiana. Assim, um período mais longo de rigidez é desejável sob o ponto de vista de qualidade microbiológica (Pedraja, 1972). O declínio do teor de adenosina trifosfato (ATP), parece ser o fator determinante do estabelecimento do rigor mortis em músculos (Zaitsev, 1969). Os músculos de mamíferos mantêm o nível de ATP por várias horas após a morte, ao passo que o músculo de peixe mostra rápido declínio no teor de ATP (Eskin *et al.*, 1971). Para o músculo de rã, dados a esse respeito não são encontrados na literatura. Em pescados, o início do rigor mortis se dá 1 a 3 horas após a morte e dura de 1 a 3 dias, dependendo da espécie e do estado fisiológico do indivíduo (Pedraja, 1970). O baixo teor de tecido conjuntivo em pescados (de 2 a 10% contra 17% da carne bovina), e a composição deste tecido pobre em colágeno, torna o músculo bastante suscetível ao ataque enzimático (Pedraja, 1972); quanto à carne de rã, Devadasan e Rajendanathan Nair (1980), determinaram ser de 4,8% o teor de tecido conjuntivo, mas não se tem nenhum relato a respeito de sua composição. Durante o rigor mortis, o pH do músculo sofre uma queda sensível, principalmente em animais endotérmicos;

esta queda de pH, além de retardar o crescimento de bactérias deterioradoras, mantém uma cor agradável na carne. Esta queda de pH está relacionada ao acúmulo de ácido láctico no músculo. Em animais endotérmicos o pH, ao atingir-se o rigor mortis, fica em torno de 5,3 - 5,5, ao passo que em pescado está em torno de 6,2 (Eskin, 1971).

3) Estágio de pós-rigor: caracterizado pelo amaciamento gradual dos músculos. Nesta fase há o desdobramento de derivados purínicos do ATP, formados por desaminação, e conseqüentemente formação de amônia. O pH, que havia sofrido redução logo após a morte, aumenta e tende a voltar ao valor verificado no momento da morte. Simultaneamente, os microorganismos podem desdobrar os amino ácidos livres, formando também amônia. Segue, então, a proteólise propriamente dita, com decomposição do alimento. No caso de peixes este processo é muito rápido, o que contribui para sua grande susceptibilidade à deterioração (Cheftel e Cheftel, 1976).

As alterações bioquímicas sofridas pelo músculo após a morte têm influência marcante nas suas características. A queda de pH, acompanhada de inúmeras reações, sendo a mais importante a glicólise, provoca alterações nas proteínas musculares. A primeira delas, bastante visível, é a perda da capacidade de retenção de água ("Water holding capacity" - WHC) (Cassens, 1966). As proteínas miofibrilares podem sofrer alterações sensíveis no estágio de pré-rigor, os filamentos de actina e miosina estão dissociados e extrai-se a miosina facilmente com soluções de alta força iônica. Com a queda do nível de ATP, a actina e a miosina se associam

formando um complexo, a actomiosina, o que torna a carne bastante rijá. Durante o estágio de pós rigor, a carne sofre tenderização, mas o complexo actomiosínico não se dissocia. Quanto às proteínas sarcoplasmáticas, o comportamento é diferente: em animais endotérmicos a solubilidade destas proteínas decresce a valores abaixo de 6% a 37°C (Sayre e Briskey, 1963; Scopes, 1964) e em peixe a solubilidade se mantém estável, não se evidenciando nenhuma influência sobre a textura, embora se inicie uma leve ação de enzimas autolíticas quando se estabelece o rigor mortis. Estudos semelhantes para o músculo de rã não são encontrados na literatura.

2.2 - ALTERAÇÃO NO MÚSCULO DURANTE O CONGELAMENTO

Várias são as alterações sofridas pelo músculo durante o congelamento, embora este retarde a deterioração sob o aspecto microbiano, uma vez que a temperaturas em torno de -18°C a maioria dos microorganismos cessa seu crescimento e os poucos que crescem nesta temperatura o fazem a uma taxa bastante reduzida (Jay, 1978). O congelamento pode ser letal a alguns microorganismos de relevância em alimentos (Ingram, 1951), mas não se deve considerá-lo um método de destruição de microorganismo, uma vez que a viabilidade varia entre as espécies, com o método de congelamento empregado, além da temperatura em que este último se processa e, finalmente, com a composição do alimento. Sabe-se, por exemplo, que temperaturas em torno de -20°C são menos deletérias aos microorganismos que temperaturas ao redor de -10°C (Gor-

gala e Hurst, 1963). Gunderson e Rose (1948) observaram em culturas puras isoladas de carne de frango, que embora o número de bactérias tenha se reduzido durante o armazenamento a $-25,5^{\circ}\text{C}$, todas as espécies mantiveram-se viáveis após 270 dias.

A Salmonella, encontrada principalmente no trato intestinal de vertebrados, pode transmitir a salmonelose ao homem mediante consumo de alimentos contaminados; a atenção tem sido muito grande para esta bactéria já que foi responsável por 31,9% das infecções alimentares em 1973 nos Estados Unidos, o que levou este país a suspender a importação de carne de rã contaminada com esta bactéria, refletindo em uma redução de 80% na importação de carne de rã do México (Nickelson e Wyatt, 1975). O Brasil enfrenta grandes dificuldades para exportação da carne de rã e a contaminação com Salmonella tem sido um dos principais motivos (ABCR, 1986). Ang et al. (1973), isolaram Salmonella do trato intestinal e fígado de rãs. Nickelson e Wyatt (1975), verificaram que o músculo de rãs da espécie Rana pipiens se mostrou estéril quando a dissecação era feita assépticamente, evidenciando que a contaminação do músculo ocorria durante o processamento, ao ser feita a limpeza da carcaça, sendo o trato intestinal a principal fonte. Sendo assim, o tecido muscular de rãs sadias foi considerado estéril, como o de outros animais, e foi desenvolvido um método novo para o processamento da carne de rã onde os índices de contaminação foram de 5,1% contra 35% dos índices observados para o processo tradicional.

Durante o congelamento a carne sofre alterações físicas, químicas e organolépticas indesejáveis (Fennema e Powrie, 1964). Os fatores determinantes da extensão dos danos causados pelo congelamento são a temperatura de congelamento e a duração do mesmo. Recomenda-se que se utilize temperaturas de -18°C ou inferiores, para que se reduza ao máximo a perda de qualidade, embora se saiba que temperaturas mais elevadas sejam encontradas durante a comercialização (Lane, 1966).

Os principais constituintes do músculo que sofrem alterações durante o congelamento são as proteínas e os lipídios. O congelamento e o armazenamento congelado provocam a desnaturação e a agregação das proteínas, bem como a ruptura das células musculares. Quando o processo de congelamento é rápido, estas alterações são pequenas, mas quando é lento são consideráveis. Atribui-se essas modificações à formação nos tecidos de cristais de gelo relativamente grandes e ao aumento da concentração de sais de líquidos residuais; estes últimos exerceriam, por osmose, uma ação desidratante sobre as células. O rompimento das células também favoreceria o contato entre lipídios e lipases ativas a baixas temperaturas, provocando liberação de ácidos graxos dos tecidos. Os ácidos graxos se fixariam às proteínas tornando-as hidrofóbicas e conseqüentemente desnaturando-as (Cheftel e Cheftel, 1976). Estes fenômenos acarretam uma diminuição da capacidade de retenção de água ("Water holding capacity"-WHC), o que leva a uma forte exsudação da carne durante o congelamento, com perdas de amino ácidos, vitaminas e sais minerais, além de alterações na

textura, tornando a carne ressecada, o que pode ser medido pela quantificação do exsudato ("drip"), durante o congelamento e o armazenamento congelado (Miyuchi, 1962).

Foi observado que as alterações ocorridas em carne bovina são de menores proporções que as ocorridas em pescado durante o congelamento e armazenamento congelado (Fennema *et al.*, 1973). Ocorre uma diminuição considerável da extractabilidade das proteínas do músculo de peixes em solução de NaCl 5%, evidenciada por um decréscimo da concentração de proteína solúvel nesta solução, quando análises são feitas ao longo do armazenamento (Dyer 1951). Estudos a respeito do mecanismo dessas alterações revelaram que elas estariam provavelmente relacionadas ao decréscimo na capacidade de retenção de água ("Water holding capacity" - WHC) do músculo durante o congelamento (Miyuchi, 1963), ocasionando enrijecimento do músculo congelado após cozimento (Dyer *et al.*, 1964; Morjani *et al.*, 1960). Scopes (1964), observou que as proteínas sarcoplasmáticas sofrem desnaturação durante o congelamento de carnes bovinas e isto refletiu em uma perda de solubilidade destas proteínas ao longo do congelamento. Por outro lado, Connell (1962), verificou que a fração sarcoplasmática das proteínas extraídas do músculo de peixe mantem-se bastante estável, não sofrendo alterações significativas na sua solubilidade, enquanto que a fração correspondente às proteínas miofibrilares perde solubilidade ao longo do armazenamento congelado. Ainda em músculo de peixe, Awad *et al.*, (1969) observaram um decréscimo de 93% para 43% na extractabilidade da proteína total do músculo extraída

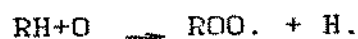
com em solução de NaCl 5%. Neste estudo a fração sarcoplasmática mostrou-se praticamente inalterada quando à sua extractabilidade, embora tenham sido observadas pequenas alterações no perfil electroforético; por outro lado, a fração correspondente às proteínas miofibrilares mostrou decréscimo acentuado de sua extractabilidade. Dados relacionados às alterações nas frações protéicas do músculo de rã congelado não são encontrados na literatura. É relevante salientar que vários autores em revisões de métodos para detecção de alterações em músculo de peixe durante o congelamento, consideram a medida da extractabilidade de frações protéicas como sendo talvez o único e mais útil método químico para verificação de alterações de qualidade durante o armazenamento congelado (Gould e Peters, 1971, Mills, 1975).

Os lipídios do músculo também sofrem alterações consideráveis durante o congelamento. Embora o teor de lipídios totais não se altere durante o armazenamento (Peters *et al.*, 1968), vários pesquisadores notaram um aumento considerável no teor de ácidos graxos livres durante o congelamento de músculo de peixe (Awad *et al.*, 1969; Dyer *et al.*, 1956). Há evidências de que a principal fonte de ácidos graxos livres em músculo de peixe com baixos teores de gorduras, sejam os fosfolipídios das membranas e não os triglicérides (Olley e Lovern, 1960). Muitos pesquisadores têm atribuído a insolubilização das proteínas miofibrilares aos ácidos graxos livres que interagiriam com as proteínas (Anderson *et al.*, 1963, Olley e Duncan, 1965; Castell, 1971). Sarva-veda e Srikar (1962), observaram um decréscimo de 90% para 85% no

teor de fosfolipídios do músculo de rã congelado a -20°C por 150 dias. Segundo Addison *et al.*, (1969) e Olley *et al.*, (1962), a hidrólise de fosfolipídios ocorre por ação enzimática levando à formação, por ambos os mecanismos, de ácidos graxos livres. Hardy *et al.*, (1979), observaram que em bacalhau congelado a lipólise tem um efeito mais prejudicial ao produto que a oxidação das gorduras. Olley *et al.*, (1962), bem como Shaw e Botta (1975) observaram que a produção de ácidos graxos livres afeta significativamente a textura de peixes da espécie *Mallotus villosus*, armazenados a -23°C .

A autooxidação dos lipídios tem grande interesse industrial e tecnológico, por ser a causa de rancidez no produto alimentício a ser consumido (Ackman, 1974). O mecanismo geral da autooxidação envolve três fases (Labuza, 1971):

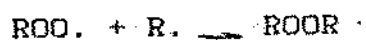
a) Iniciação ou indução



b) Propagação



c) Terminação



Os ácidos graxos insaturados susceptíveis à oxidação, num primeiro estágio da reação produzem radicais livres, neste estágio o consumo de oxigênio é baixo e lento, por esse motivo o nível de peróxidos também é muito baixo (Dugan, 1976). À medida que a reação avança, o teor de peróxidos aumenta ligeiramente e o consumo de oxigênio também aumenta. Ao mesmo tempo em que ocorrem as reações de indução e propagação, podem haver as reações de terminação que provocam a desaparecimento dos radicais livres e induzem à formação de compostos diversos: hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos e epóxidos; compostos estes responsáveis pelos odores e sabores de ranço.

Segundo Awad *et al*, (1969) e Dyer *et al*, (1956), no início do processo de rancificação o teor de peróxidos é mínimo (indução). A seguir, o teor atinge um máximo (propagação) e começa a declinar a um mínimo (terminação). A fase de decréscimo é explicada pelo fato dos peróxidos nesta etapa, se decomporem mais rapidamente do que são formados; na fase de decomposição dos hidroperóxidos, formam-se entre outros compostos já citados, aldeídos e cetonas de baixo peso molecular, responsáveis pelo odor de ranço. Farber (1965), considerou que, devido à natureza transitória dos hidroperóxidos, que representam apenas um estágio de uma reação em cadeia, a presença deles, mesmo em quantidades apreciáveis, nem sempre pode ser detectada em gorduras em estágio avançado de rancificação.

É sabido que ocorre rancificação em carnes, especialmente as de alto teor de gordura, durante armazenamento congelado e vários métodos químicos para determinação de rancidez vêm sendo aplicados. Banks (1938) determinou teores de peróxidos e aplicou o teste de Kreis, mas recomendou que análises sensoriais deveriam ser realizadas ao mesmo tempo para que fosse feita a determinação de rancidez. O grau de rancidez oxidativa foi determinado quantitativamente determinando-se o teor de malonaldeído pela reação com ácido 2 tiobarbitúrico por inúmeros pesquisadores (Kuwon *et al.*, 1965; Vynke, 1973; Karel *et al.*, 1975). Em uma revisão sobre os métodos químicos de determinação de rancidez, Banks (1966) concluiu que "a determinação de peróxidos em condições anaeróbicas é provavelmente o método mais sensível e confiável para detecção de alterações oxidativas em estágios iniciais". Nas gorduras já rancificadas pode-se determinar o grau de rancificação através da determinação dos teores de compostos carbonílicos, produtos de decomposição dos lipídios (Buttkus, 1967).

Dyer *et al.*, (1956) indicaram haver relação entre oxidação de lipídios e insolubilização de proteínas miofibrilares em peixes congelados. Stansby *et al.*, (1944) observaram que a desnaturação de proteínas, determinando enrijecimento do músculo, era particularmente importante em peixes magros. Segundo a Torry Research Station (1967), em peixes magros, do tipo bacalhau, a desnaturação protéica é mais pronunciada que em pescados gordurosos. Desai e Tappel, (1963) demonstraram que interações do tipo proteína - proteína, podem ocorrer em presença de produtos de oxidação de lipídios.

Ao determinar-se a vida útil de peixe armazenado congelado, cuja qualidade deteriora-se gradualmente, a Torry Research Station (1967), considera a temperatura de armazenamento como o fator determinante. Nikkilx e Linko (1956) assim como Pawar e Margar (1966) atribuem aos processos enzimáticos e oxidativos bem como às reações de desnaturação protéica, o comprometimento da vida útil de armazenamento. Foi observado que o estado fisiológico da sardinha no momento da captura, a composição da flora bacteriana (própria e de contaminação) e a natureza do conteúdo do tubo digestivo têm influência decisiva nos fenômenos de alteração de qualidade, comprometendo a vida útil, (Araújo, 1985). Sendo o papel desempenhado pela temperatura de fundamental importância quando se pretende aumentar a vida útil de armazenamento de produtos congelados, a ASHRE (Sociedade Americana de Engenharia e Refrigeração) (1974), recomenda temperaturas entre -23°C e $-17,7^{\circ}\text{C}$ para o armazenamento de peixe, carnes bovinas e aves congeladas. Não há nenhuma recomendação quanto ao armazenamento de carne de rã congelada.

A análise sensorial tem sido considerada um instrumento muito importante para avaliar-se a qualidade de produtos congelados ou armazenados em gelo. Embora avaliações sensoriais sejam utilizadas para determinação de alterações em produtos congelados e em produtos armazenados em gelo, Castell (1969), destacou alguns problemas para este tipo de determinação no caso de produtos congelados, em especial, uma vez que alterações de sabor e textu-

ra, que ocorrem ao longo do congelamento, ocorrem de maneira contínua, com aumento de intensidade principalmente; ao passo que, no caso do armazenamento em gelo, as alterações são qualitativas e são diferenciadas em estágios sucessivos, porém distintos de uma sequência.

Segundo Shewan *et al.*, (1953), o treinamento da equipe sensorial, com a finalidade de se reconhecer todos os fatores de qualidade do alimento, é fundamental quando se pretende obter resultados de maior confiabilidade. Um fator muito importante na análise sensorial é a forma de preparo da amostra para julgamento. Diversas pesquisas indicam que o cozimento é a melhor maneira para se detectar e comparar mudanças qualitativas (Connell, 1969; Dyer e Fraser, 1964). Com este processo não há ressecamento da carne o que ocorre quando o produto é assado e também não há interferências como quando utiliza-se a fritura.

A rancidez oxidativa nem sempre é fácil de ser avaliada por métodos sensoriais, já que os odores característicos de ranço podem sofrer interferência de outros compostos de degradação de lipídios (ex: ácidos graxos livres produzidos durante hidrólise de lipídios), que se formam ao longo do armazenamento congelado. Apesar disso, Connell e Howgate (1969) verificaram existir uma boa correlação entre avaliação sensorial de pescados e índice de TBA (ácido tiobarbiturico). Greig (1969), obteve altos índices de correlação com os índices de peróxidos.

O sabor, a textura e a aparência tem sido atributos muito utilizados na avaliação de produtos congelados. Cowie e Little (1966), utilizaram uma escala hedônica para avaliação de intensidade destes atributos, com as extremidades pobre e excelente; Baines et al. (1967) identificaram e colocaram em escalas separadas odor, sabor, rigidez e secura para bacalhau congelado e armazenado em gelo; no caso do produto congelado a identificação dos odores não foi possível então chamou-os de: odor e sabor de congelamento. A aparência embora altere-se durante congelamento, tem se mostrado difícil de quantificar; medidas da extensão da queima pelo frio; têm sido utilizadas para filés de peixe congelados para determinar-se padrões de qualidade em alguns casos. (Mills, 1975).

Apesar da importância dos métodos sensoriais em geral, em particular dos que envolvem degustação, métodos químicos e físicos alternativos são necessários para confirmarem-se as observações sensoriais, ou para serem detectadas algumas alterações específicas ocorridas durante congelamento. Devido à complexidade das alterações ocorridas durante congelamento, assim como das relações entre as alterações sensoriais e não sensoriais, seria provavelmente aconselhável a aplicação de mais de um teste de cada tipo de avaliação (sensorial, física e química) (Mills, 1975).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

3.1.1 - Matéria-prima

As rãs touro (*Rana catesbiana*) utilizadas neste trabalho, foram adquiridas em ranários da região de Campinas, abatidas no local, embaladas em sacos de polietileno e transportadas imediatamente para o laboratório em isopor com gelo. Foram adquiridas 20 kg de rãs com peso médio de 163 g. Estes exemplares foram utilizados para as análises físicas e químicas do material fresco e congelado, bem como para análise sensorial do material congelado.

As rãs selvagens, mirim e pimenta (*Leptodactylus ocellatus*) e (*Leptodactylus labyrinthicus*) respectivamente, sendo 11 exemplares da primeira e 5 exemplares da segunda, com os seguintes pesos médios: 118 g (rã mirim - *Leptodactylus ocellatus*) e 326 g (rã pimenta - *Leptodactylus labyrinthicus*), foram capturadas no Estado do Mato Grosso, nas proximidades da cidade do Alto Araguaia e transportadas vivas em isopor com gelo até o laboratório, onde foram abatidas por concussão cerebral e em seguida precedeu-se à retirada da pele e das vísceras através de incisão torácico-abdominal após a retirada da cabeça.

Os animais cujos músculos seriam utilizados nos ensaios de congelamento, foram embalados em sacos de polietileno com capacidade de 1 kg aproximadamente, e congelados imediatamente em freezer comum a -18°C por um período de 182 dias com intervalos de descongelamento para análise de 15, 33, 47, 63, 92, 124 e 182 dias.

As análises do material fresco foram efetuadas 2 horas após abate, período este em que a carne ficou mantida sob refrigeração em geladeira comum a uma temperatura em torno de 4°C e as análises do material congelado foram feitas após descongelamento. As amostras congeladas eram retiradas do freezer cerca de 24 horas antes das análises e mantidas em refrigerador comum a 4°C , para descongelarem.

Os músculos das coxas e pernas, indicados na Figura 1, segundo desenho de Kukenthal et al. (1969), de cerca de 20 animais foram moídos em moedor de carne com orifício de 0,5 cm, para posteriormente serem utilizados nas análises químicas do material fresco e congelado.

Para as análises sensoriais foram utilizadas as coxas e pernas intactas, após cozimento em salmoura 3% por 15 minutos, envoltas em papel alumínio (Dyer et al., 1964). Para simplificação de nomenclatura denominaremos perna o membro inferior da rã que inclui a coxa e a perna propriamente dita.

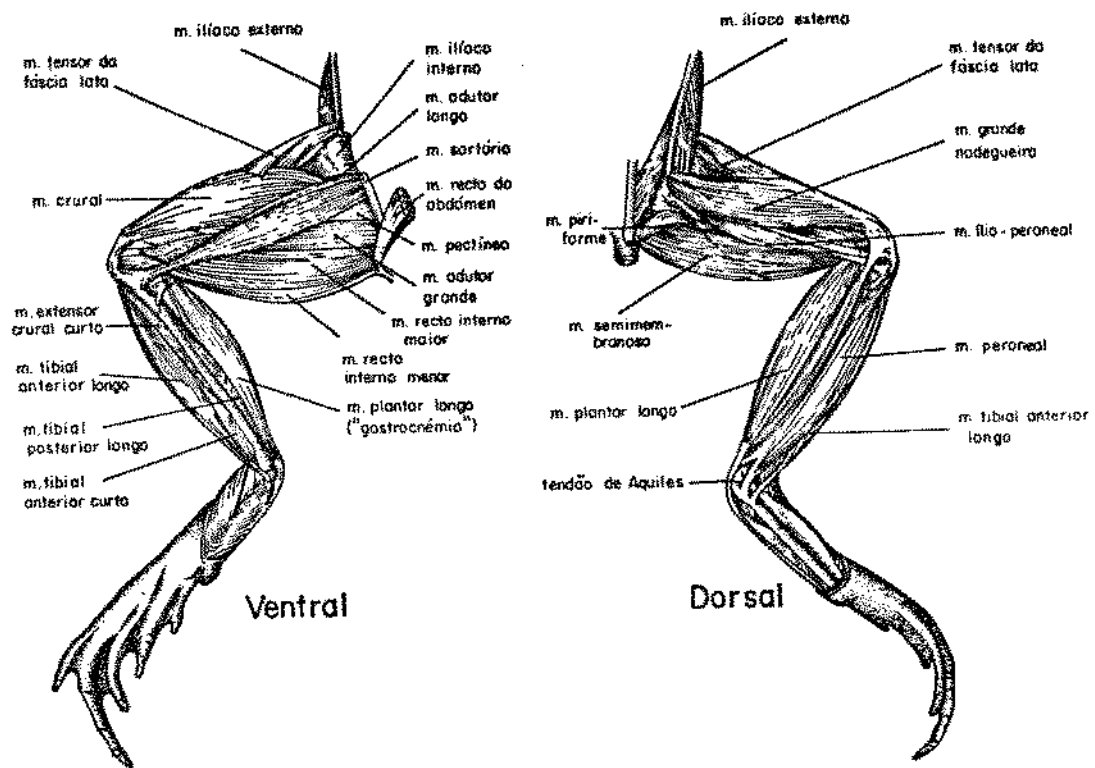


Fig. 1 - Músculo da coxa e perna direita de rã touro (*Rana catesbeiana*). Segundo Kukenthal *et al.*, 1969.

As vísceras e cabeça do material fresco foram utilizadas no preparo de uma farinha.

3.1.1.1 - Preparação da Farinha de Vísceras e Cabeças

As vísceras e cabeças de 150 rãs foram congeladas em sacos de polietileno durante 5 dias em freezer a -18°C e em seguida utilizadas para a fabricação da farinha, segundo o fluxograma (Muralidhara Rao et al., 1976).

Fluxograma 1 - Preparo da farinha de vísceras e cabeça de rã
touro (Rana catesbeiana)

MATERIAL CONGELADO

|

|

↓

Autoclavagem por 20 minutos a 1,5 Kg/cm (121°C)

|

|

↓

Secagem em estufa com circulação de ar (com velocidade de 3m/s a uma temperatura de 60°C), até a umidade da farinha atingir 10% - aproximadamente 48 horas.

|

|

↓

Moagem da massa seca em um moinho de martelos utilizando uma peneira de 50 mesh.

3.1.1.2 - Reagentes

Os reagentes mais importantes empregados neste trabalho foram:

Metanol P.A - Merck

Clorofórmio P.A - Merck

Ácido acético glacial P.A - Merck

Etanol absoluto P.A - Merck

Molibdato de amônio P.A - Merck

Metavanadato de amônio P.A - Merck

Ácido nítrico P.A - Merck

Ácido sulfúrico P.A - Merck

Ácido clorídrico P.A - Merck

TRIS-3[tri fluormetil hidroxil metileno] d - camforato

Sigma Chem. Co

TEMED-N,N,N',N'- Tetrametil etilenodiamina

Sigma Chem. Co

Acrilamida

Sigma Chem. Co

Bis-acrilamida N,N' - metileno bis-acrilamida

Sigma Chem. Co

Riboflavina

Sigma Chem. Co

Glicina

Sigma Chem. Co

B.S.A. (albumina de soro bovino)

Sigma Chem. Co

Persulfato de amônio

Sigma Chem. Co

Comassie blue - Merck

Amido black - Merck

Azul de bromofenol - Merck

3.1.1.3 - Equipamentos

Estufa Fanem - modelo 315 SE

Geladeira Consul - modelo Luxo

Geladeira com freezer - Brastemp modelo Duplex 440L

Triturador Braun - modelo KSM 2

Balança analítica Sauter

Balança semi-analítica eletrônica Acatec modelo REC-1000

Balança de torção - The Torsion Balance Co-modelo DWL 5

Agitador de tubos Phoenix - modelo HS 22, 5P

Centrífuga Fanem Ltda. - modelo Excelsa 3

Centrífuga refrigerada International Equipament Co - modelo B20-A

Liofilizador Edwards - modelo LKB

pH-metro Micronal - modelo B 374

Agitador Magnético Fanem - modelo 257

Liquidificador Arno - modelo LIR-C

Espectrofotômetro Baush and Lomb - modelo Spectronic 20

Autoanalisador de aminoácidos Technicon - modelo TSM

Aparelho tipo Kjeldahl para determinação de Nitrogênio

Autoclave Fabbe

Moinho de martelos Tigre - tipo CV 2 peneira 50 mesh

3.2 - METODOLOGIA

3.2.1 - Análises físicas

3.2.1.1 - Determinação do rendimento de carcaça

As rãs recém abatidas, da espécie Rana catesbeiana, que seriam utilizadas para análises do material fresco, foram pesadas em balança semi-analítica e medidas com uma régua graduada em milímetros. A coleta dos dados biométricos foi feita em 06 exemplares, sendo 4 machos e 2 fêmeas escolhidas ao acaso em um lote de aproximadamente 150 animais, na seguinte sequência: (X1) peso ao abate, (X2) peso da cabeça, (X3) peso da pele, (X4) peso das vísceras, (X5) peso da carcaça limpa, (X6) peso das pernas, (X7) comprimento das pernas. Para cada dado biométrico avaliado calculou-se a média e o desvio padrão.

Os cálculos dos coeficientes de correlação e as equações gerais de regressão (Snedcor e Cochran, 1967) foram calculados para as seguintes características:

- a) peso da carcaça limpa x peso ao abate
- b) peso das pernas x peso ao abate
- c) comprimento das pernas x peso das pernas
- d) peso das vísceras x peso ao abate
- e) peso da cabeça x peso ao abate
- f) peso da pele x peso ao abate

3.2.2 - Análises químicas

3.2.2.1 - Composição química centesimal

As determinações foram feitas em triplicata, utilizando-se o músculo fresco.

Umidade: Determinada pelo método de secagem em estufa a 100-110°C até atingir peso constante (Umemoto, 1972).

Proteína Bruta Total: Determinou-se o teor de nitrogênio total pelo método de semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1975) e o teor de proteína lenta foi calculado utilizando-se 6,25 como fator de conversão.

Lipídios Totais: Empregou-se o método de Bligh e Dyer (1959) com pequenas modificações.

Colocou-se 10g de músculo moído em tubo de ensaio com tampa de teflon, adicionou-se 10 ml de clorofórmio e 20 ml de metanol e agitou-se por 2 minutos, colocando-se em seguida, 30 minutos no agitador rotativo. O tubo foi colocado em refrigerador por 12 horas envolto em papel alumínio. Ao retirar-se o tubo do refrigerador foram adicionados mais 10 ml de clorofórmio e 10 ml de solução de sulfato de sódio 1,5%, sendo o tubo agitado em seguida, por 2 minutos em agitador rotativo. Para facilitar a separação das fases, o tubo foi centrifugado a 1.000 rpm por 2 minu-

tos. A camada superior foi descartada e recolheu-se cerca de 15 ml do extrato clorofórmico, ao qual adicionou-se aproximadamente 1g de sulfato de sódio anidro. Após agitação do extrato procedeu-se à filtração em filtro quantitativo. O teor de lipídios foi determinado em alíquotas de 5ml do extrato clorofórmico, após evaporação do clorofórmio em estufa a 50-55°C.

Cinzas: Determinada por incineração em mufla a 525°C (AOAC, 1975).

3.2.2.2 - Determinação da solubilidade das proteínas do músculo fresco e congelado

Os músculos das coxas e pernas moídos, como está descrito no item 3.1.1, foram utilizados para determinação das solubilidades das diferentes frações protéicas: proteína total, proteínas sarcoplasmáticas e proteínas miofibrilares.

Para a extração da proteína total do músculo, utilizou-se o método de Dyer *et al.* (1950), 20g de carne moída foram homogeneizadas no liquidificador por 3 minutos com 400ml de uma solução de 5% de NaCl em NaHCO_3 0,02M, pH de 7,2. O copo do liquidificador foi mantido envolto por gelo para impedir a elevação da temperatura acima de 4°C. A seguir, agitou-se o homogeneizado, em agitador magnético, por uma hora, nas mesmas condições de temperatura. Após esse período de agitação, a mistura foi centrifugada a 8.000 //

rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada, a 0°C. A proteína total solúvel foi determinada em uma alíquota do sobrenadante pelo método de biureto (Snow, 1950).

Para determinação da fração correspondente às proteínas miofibrilares (actinmiosina), 10 ml do sobrenadante correspondente à proteína total solúvel, foram adicionadas a 90 ml de água destilada a 4°C. Após 16 horas em refrigerador a 4°C, a suspensão de proteínas miofibrilares foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm em centrífuga refrigerada, a 0°C. O precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado novamente em idênticas condições (Dyer et al, 1950). Este precipitado, correspondente à actomiosina, foi dissolvido em NaOH 1N, sendo a concentração de actomiosina determinada pelo método de biureto (Snow, 1950).

As proteínas sarcoplasmáticas foram extraídas em triplicata, homogeneizando-se em liquidificador por 3 minutos, 2g de músculo moído, 100 ml de tampão fosfato com pH igual a 7,2 e força iônica de 0,05. Durante a homogeneização, o copo de liquidificador foi mantido envolto em gelo, para impedir a elevação da temperatura acima de 4°C. Após homogeneização, agitou-se a suspensão em agitador magnético por uma hora, nas mesmas condições de temperatura e em seguida procedeu-se à centrifugação desta suspensão a 8.000 rpm por 20 minutos, em centrífuga refrigerada, a 0°C. A quantidade de proteínas sarcoplasmáticas foi determinada em uma alíquota do sobrenadante pelo método de biureto (Snow, 1950).

3.2.2.3. - Determinação do teor de lipídios totais no músculo congelado

A determinação da quantidade de lipídios totais no músculo congelado foi feita com o músculo moído, como está descrito no item 3.1.1.

A extração dos lipídios totais foi realizada pelo método de Bligh e Dyer (1959), como está descrito no item 3.2.2.1.

Alíquotas do extrato clorofórmico foram utilizadas para as determinações do teor de fosfolipídios, do índice de ácidos graxos livres e do índice de peróxidos da fração lipídica do músculo.

3.2.2.4 - Determinação do teor de fosfolipídios na fração lipídica do músculo

O cálculo do teor de fosfolipídios, foi feito após determinação em duplicata do teor de fósforo em duas frações lipídicas de, aproximadamente, 0,1 g, após secagem do extrato clorofórmico em estufa a 50-55°C. O método utilizado foi o método de Morrison (1964) e o teor de fosfolipídios foi estimado multiplicando-se o teor de fósforo por 25.

3.2.2.5 - Teor de ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres foram determinados em duas alíquotas do extrato clorofórmico pelo método nº 684 do British Standard, recomendado por Kershaw (1986). A porcentagem de ácidos graxos livres foi calculada tomando-se como base o peso molecular do ácido oleico.

Após extração da gordura pelo método do Bligh e Dyer (1959), tomou-se 25ml de extrato clorofórmico e adicionou-se 25ml de etanol 95% neutralizado com NaOH, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Esta mistura foi titulada com NaOH 0,01N e a porcentagem de ácidos graxos livres determinada em relação à quantidade de gordura total.

3.2.2.6 - Índice de peróxidos

O índice de peróxidos, expresso em mEq/kg de lipídios totais, foi determinado em duas alíquotas de extrato clorofórmicos. O método baseia-se na reação de KI em solução ácida com o oxigênio ligado, seguida pela titulação do iodo liberado com uma solução de tiosulfato de sódio, como foi descrito por Pearson (1973).

Após extração dos lipídios totais pelo método de Bligh e Dyer (1959) determinou-se o índice de peróxidos em 15ml de extra-

to clorofórmico contendo aproximadamente 100mg de gordura, ao qual foram adicionados 22ml de ácido acético glacial e 1ml de solução saturada de KI. Após deixar-se a mistura em repouso no escuro por um minuto, foi feita a titulação com tiosulfato de sódio 0,002N utilizando solução de amido a 1% como indicador.

3.2.2.7 - Determinação do pH do músculo

Foi determinado introduzindo-se o eletrodo do pH metro diretamente em um homogenizado de músculo e água destilada, na razão de 1/1 (p/v). Estas determinações foram feitas com o músculo fresco, 24 horas após abate e após 7, 15, 33, 47, 63, 92, 124 e 182 dias de congelamento.

3.2.2.8 - Composição em aminoácidos

Determinou-se a composição em aminoácidos nas carnes frescas e congeladas, bem como nas farinhas de vísceras e cabeça para rã touro (Rana catesbiana), rã pimenta (Leptodactylus labyrinthicus) e rã mirim (Leptodactylus ocellatus).

Para a rã touro (Rana catesbiana) foi determinado o perfil de aminoácidos das diferentes frações protéicas: proteínas totais solúveis, proteínas sarcoplasmáticas e proteínas miofibrilares.

Para o fracionamento das proteínas do músculo partiu-se de um extrato único de proteínas totais solúveis, cuja extração foi feita com 30mg e 400ml de solução de NaHCO_3 0,02N com 5% NaCl (Dyer *et al.* 1950), como foi descrito no item 3.2.2.2.

O fracionamento foi feito a partir do extrato de proteínas totais solúveis (Khan, 1964), mediante diálise em água destilada. As determinações de composição em aminoácidos foram feitas nos extratos liofilizados.

Para o músculo fresco e congelado, assim como para as farinhas de vísceras e cabeças a determinação da composição foi feita após liofilização dos respectivos materiais.

1 - ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A análise de aminoácidos foi realizada em autoanalisador TSM da Technicon com integrador. A metodologia utilizada foi descrita por Spackman, Stein e Moore (1958), Roach e Gelrke (1970) e Lewis e Lowe (1970).

A técnica descrita nas referências supra-citadas consiste em moer-se a amostra desengordurada em micromoinho tipo Wyley, com peneira em torno de 80 mesh. A hidrólise é feita com HCl-6N contendo 0,05% de mercaptoetanol e a evaporação é feita utilizando-se um evaporador rotativo. Ao evaporado adiciona-se tampão ci-

trado de sódio com pH igual a 2,00 e solução de norleucina (2,5 micro moles/ml), na razão de 3:2 (v/v) e transfere-se para a cubeta do autoanalisador para ser eluída nas duplas colunas de resina de troca catiônica, poliestirênica, onde os eluentes tem pH igual a 3,25, 4,25 e 5,25. O eluído reage com uma solução de sulfato de hidrazina 0,002M e ninidrina 1% na proporção de 1:6:16 (v/v/v). A leitura é feita em colorímetro de duplo feixe com dois canais: filtros de 570mU e de 440mU, este último para leitura de prolina.

Os dados obtidos são comparados com dados obtidos para misturas sintéticas (2,5 micromoles/ml de cada aminoácido). Os valores encontrados devem ser corrigidos para a quantidade de amostra aplicada no aparelho, para o peso molecular em micromoles de cada aminoácido e para o teor de umidade da amostra.

A determinação de triptofano foi feita pelo método de Spies (1967) que consiste em promover a hidrólise de proteína com uma solução de NaOH 5N saturada com acetato de chumbo e contendo 50mg/ml de histidina. Os hidrolisados são analisados espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 560 mU eliminando-se a interferência dos compostos sulfurados com Ag_2SO_4 .

2 4

2 - DETERMINAÇÃO DO ESCORE QUÍMICO DOS AMINOÁCIDOS

O escore protéico (EQ) é definido como: mg de aminoácido/g proteína teste dividido por 100 mg de aminoácido/g proteína referência, multiplicado por 100.

Calculou-se o escore químico para as carnes de rã touro (*Rana catesbiana*), de rã mirim (*L. ocellatus*) e de rã pimenta (*L. labyrinthicus*), frescas e congeladas, após 182 de armazenamento, assim como para as farinhas de vísceras e cabeças das respectivas rãs.

A proteína utilizada como referência, foi a proteína referência descrita pela WHO - World Health Organization (1973), cujo padrão de aminoácidos está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Padrão de aminoácidos da proteína referência

Aminoácido	mg/proteína	mg/g Nitrogênio total
Isoleucina	40	250
Leucina	70	440
Lisina	55	340
Metionina + cistina	35	220
Fenilalanina + tirosina	60	380
Treonina	40	250
Triptofano	10	60
Valina	50	310
TOTAL	360	2250

3.2.3. - Eletroforese

A técnica de eletroforese em disco, com gel de poli-acrilamida, descrita por Davis (1964), foi usada para a separação das proteínas sarcoplasmáticas extraídas do músculo segundo a técnica descrita no item 3.2.2.2. (Dyer, 1950). A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1950).

A eletroforese foi feita em tubos verticais de 9 cm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro, contendo gel de poli-acrilamida. As soluções para preparação dos géis são descritas no Anexo 1. Uma solução com 7% de acrilamida foi usada para o gel inferior e outra solução com 3% de acrilamida tendo a riboflavina como catalizador, para o gel superior. As diferentes soluções foram colocadas nos tubos com auxílio de uma seringa. A gelificação foi feita colocando-se os tubos próximos à luz fluorescente, para acelerar a polimerização da acrilamida, por aproximadamente uma hora. Os comprimentos dos géis inferior e superior foram de 7,0 cm e 1,0 cm, respectivamente.

Os tubos, após completada a gelificação, foram colocados na cuba eletroforética. O tampão utilizado na cuba foi o tampão Tris-glicina com pH de 8,3, ao qual foi adicionada uma gota de solução aquosa de azul de bromofenol (10 mg/l), como indicadora da migração.

As amostras contendo 100 microgramas de proteína e sacarose em quantidade suficiente para aumentar a densidade da solução, foram aplicadas na superfície do gel com auxílio de uma microseringa. A eletroforese foi desenvolvida pela aplicação de uma corrente de 2,75 mA/tubo até o corante indicador atingir o início do gel inferior, quando então a corrente foi elevada para 5 mA/tubo. O tempo gasto para migração no gel inferior, de separação, foi de aproximadamente 40 minutos.

Para revelação do perfil eletroforético das proteínas, os géis retirados dos tubos foram imersos em solução de azul de coomassie cuja composição está descrita no Anexo 1, por 2 horas. A descoloração foi feita a seguir, com sucessivas lavagens com uma solução de ácido acético glacial, metanol e água na proporção de (5:10:27) (v/v/v).

Todas as amostras, de diferentes períodos de armazenamento, foram submetidas a uma corrida única para se obter iguais condições na eletroforese.

As determinações de mobilidade relativa (R_m) foram feitas com auxílio de luz fluorescente sob placa de acrílico, sobre a qual colocou-se os géis. As medidas foram feitas com uma régua graduada em milímetros.

3.2.4. Análises microbiológicas

A carne, congelada e fresca, de rãs touro (*Rana catesbiana*) foram submetidas às seguintes análises microbiológicas:

1 - Contagem total em placa (Speck, 1976).

Melo - PCA

Incubação - 30°C / 48hs.

2 - Coliformes totais (NMP), (Tatcher e Clark, 1968).

3 - Coliformes fecais (Speck, 1976).

Melo-Agar Baird Parker

Incubação - 37°C / 48hs

A confirmação foi feita pelos testes de DNase e coagulase.

5 - Pesquisa de Salmonella (Speck, 1976).

Enriquecimento em caldo tetracionato.

Não foram feitos testes sorológicos.

Meios seletivos indicadores - Ágar EMB, Ágar SS e Ágar Verde

Brilhante

3.2.5 - Análises sensoriais

Para as análises sensoriais foi utilizado um painel com 9 provadores, previamente treinados. Foram realizadas 3 sessões em dias consecutivos. Em cada sessão, o provador recebeu uma amostra de carne congelada e outra de carne fresca com aproximadamente 10g cada uma delas. O preparo das amostras foi mediante cozimento em salmoura fervente a 3%, das pernas inteiras, envoltas em papel alumínio, por 15 minutos (Dyer *et al.*, 1964).

Os provadores opinaram sobre os seguintes atributos: aparência (muito ruim, muito boa), odor estranho (ausência, muito intenso), sabor (muito ruim, muito bom), textura (não característica, característica), e impressão global (muito ruim, muito boa); e foi utilizada uma escala gráfica consistindo de uma linha de 9cm, onde os extremos correspondiam respectivamente à péssima qualidade (0) e excelente qualidade (9), exceto para odor estranho, onde foi o inverso (vide Anexo 2).

A montagem do experimento, bem como a análise estatística dos dados, foi feita segundo as recomendações da American Society for Testing and Materials (ASTM, 1968). Foi feita análise de variância e aplicou-se o teste de Tuckey para avaliar-se a diferença entre as médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - ANÁLISES FÍSICAS DA CARÇAÇA

Os dados relativos às análises de carcaça de rã touro (*Rana catesbeiana*) estão apresentados na Tabela 3. Os 6 exemplares foram escolhidos ao acaso em um lote de aproximadamente 150 animais prontos para abate, sendo 2 fêmeas e 4 machos.

Tabela 3 - Valores estimados de diferentes características em rãs touro (*Rana catesbeiana*), destinadas à comercialização

	\bar{X}	A
X1 - Peso ao abate (g)	158,34	(191,43 - 129,43)
X2 - Peso da cabeça (g)	18,80	(20,20 - 16,21)
X3 - Peso da pele (g)	17,4	(20,1 - 14,1)
X4 - Peso das vísceras (g)	17,38	(19,66 - 14,88)
X5 - Peso da carcaça limpa (g)	101,97	(115,82 - 85,37)
X6 - Peso das pernas (g)	54,39	(62,02 - 47,17)
X7 - Comprimento das pernas (g)	10,6	(12,0 - 9,5)

\bar{X} - Média de 6 determinações

A - Amplitude de variação

Alguns dados mais relevantes de rendimento foram determinados e estão tabelados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados das análises de rendimento de carcaça para rãs touro (Rana catesbeiana)

Análises de carcaça	\bar{X}	A (max.-min.)
Peso ao abate (g)	162,93	191,43 - 129,43
% cabeça*	11,68	13,89 - 10,45
% pele*	11,20	12,07 - 10,76
% vísceras*	12,42	16,07 - 13,03
% pernas*	34,16	36,44 - 32,06
% carcaça limpa*	62,04	65,96 - 59,44
% pernas**	54,40	57,89 - 50,99

* proporções expressas em porcentagem do peso total ao abate

** proporções expressas em porcentagem do peso total da carcaça limpa.

\bar{X} - média de 6 determinações.

A - amplitude de variação

Os dados relativos às características mais relevantes para produção e/ou posterior processamento de rãs touro (Rana castelhana) foram ajustados ao modelo estatístico de regressão linear. As relações observadas são entre as seguintes características: peso da carcaça (y1) e peso ao abate (x), peso das pernas (y2) e peso ao abate (x), peso das vísceras (y3) e peso ao abate (x), peso da pele (y4) e peso ao abate (x) e finalmente, peso da cabeça (y5) e peso ao abate (x); as equações gerais de regressão linear e os respectivos coeficientes de correlação estão descritos nas figuras 2 e 3. A equação de regressão linear entre as características comprimento das pernas (x1) e peso das pernas (y2) foi: $y_2 = 1,13x + 15,73$ sendo o coeficiente de correlação de 0,3099 (não significativo a nível de 5%).

Os resultados de rendimento para as diversas partes da rã, em relação ao peso ao abate e em relação ao peso da carcaça limpa, foram semelhantes aos obtidos por Fontanello *et al.* (1981) que trabalhou com rãs de um ranário de Juquitiba no Estado de São Paulo. Os valores de rendimentos obtidos por Fontanello *et al.* (1981) em relação ao peso do animal ao abate foram de 10,41% (% de pele), 16,50 (% de vísceras), 36,28 (% de pernas) e 65,40 (% de carcaça limpa). A porcentagem de pernas em relação ao peso da carcaça limpa, foi de 55,47%. A diferença mais significativa entre nossos resultados e os desses pesquisadores foi em relação à porcentagem de vísceras, e pode ser, provavelmente, atribuída à forma de limpeza da carcaça, ao estado de repleção do tubo digestivo, à eventual presença de óvulos, deve ser detectado ainda que o número de observações feito pelos referidos autores foi de 450.

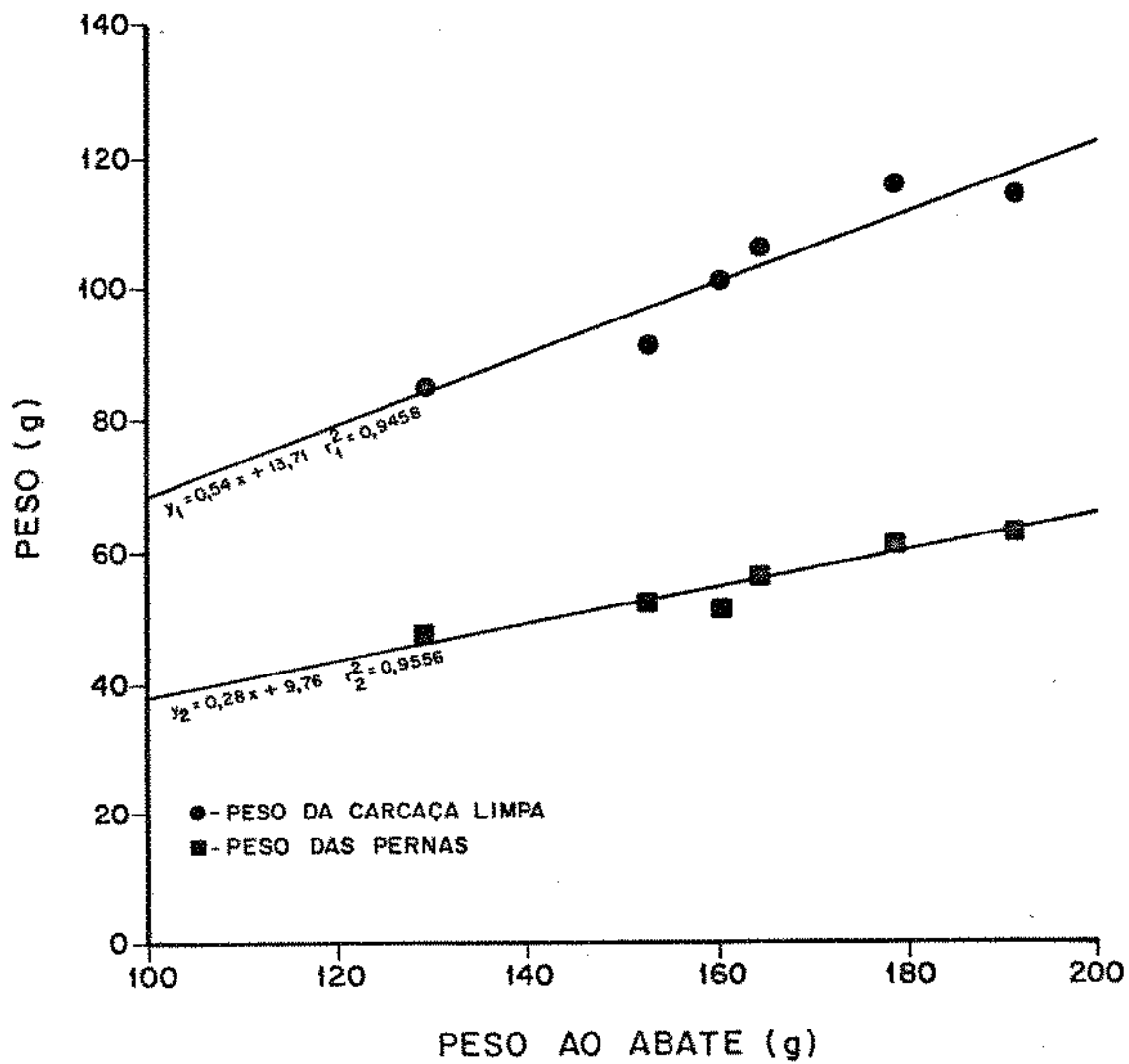


Fig. 2 - Regressão linear entre as seguintes características de rã touro (*Rana catesbeiana*): a) peso ao abate (x) e peso da carcaça (y_1), b) peso ao abate (x) e peso pernas (y_2).

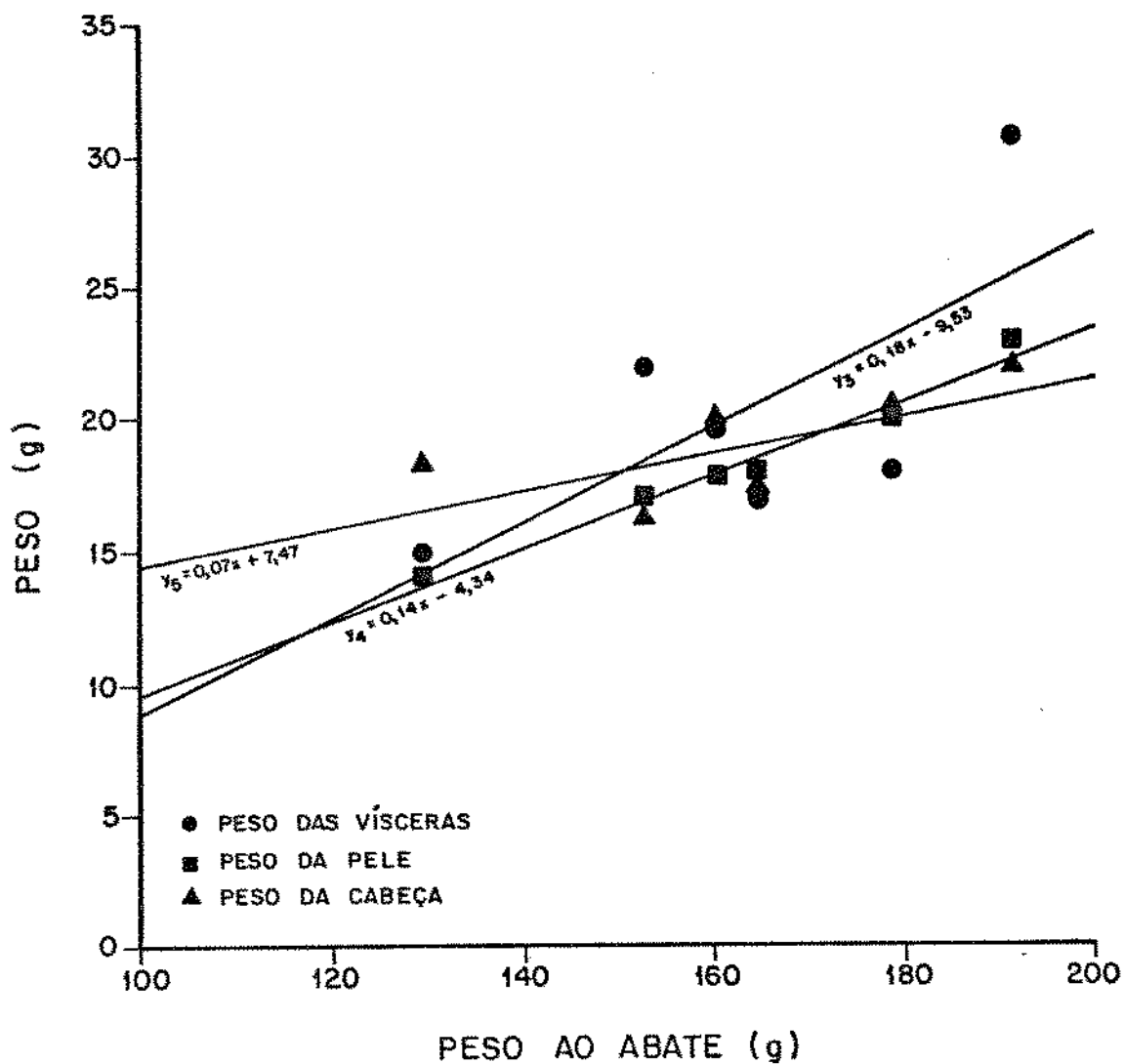


Fig. 3 - Regressão linear entre as seguintes características de rã touro (*Rana catesbeiana*): a) peso ao abate (x) e peso das vísceras (y₃), b) peso ao abate (x) e peso da pele (y₄), c) peso ao abate (x) e peso da cabeça (y₅).

Os pesos ao abate dos animais por nós observados, estão abaixo dos requeridos pelo mercado consumidor externo, no caso específico da França, já que o peso das pernas e o da carcaça limpa, encontrados na presente amostragem, excedem os padrões requeridos por aquele país (45g e 125g para as pernas e a carcaça limpa, respectivamente), de acordo com a informação fornecida pela Associação Brasileira de Criadores de Rãs (ABCR, 1986).

Os valores dos coeficientes de correlação para as diferentes características foram significativos a nível de 1%, exceto para comprimento das pernas x peso das pernas que foi de 0,3099 e para o peso ao abate x peso da cabeça que foi de 0,7005, não significativo a nível de 5%, evidenciando que não há correlação entre estas duas características como foi observado por Fontanello *et al.* (1980) que encontrou um valor de 0,7037, para o comprimento das pernas x peso das pernas considerado aceitável. Quanto às demais características analisadas, nossos resultados se mostraram semelhantes aos desses pesquisadores que obtiveram os seguintes coeficientes de correlação linear: peso da carcaça x peso ao abate (0,8645), peso das pernas x peso ao abate (0,9112).

4.2 - DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

4.2.1 - Composição química da carne

Os dados relativos à composição química centesimal do músculo das espécies Leptodactylus labyrinthicus (rã pimenta), Leptodactylus ocellatus (rã mirim) e Rana catesbeiana (rã touro), podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição química dos músculos das rãs das espécies: R. catesbeiana (rã touro), L. ocellatus (rã mirim) e L. labyrinthicus (rã pimenta).

Composição centesimal (%)	Rã touro (<u>R. catesbeiana</u>)		Rã mirim (<u>L. ocellatus</u>)		Rã pimenta (<u>L. labyrinthicus</u>)	
	X	s	X	s	X	s
Proteína bruta (Nx6,25)	15,94	(0,03)	17,59	(0,07)	17,08	(0,44)
Lipídios totais	0,79	(0,13)	0,64	(0,07)	0,60	(0,11)
Umidade	82,45	(1,57)	81,99	(0,31)	81,32	(1,10)
Cinzas	0,94	(0,05)	0,91	(0,03)	0,96	(0,06)

* As determinações foram feitas em triplicata utilizando-se os homogenados de músculos de 10 animais para rã touro, 9 animais para rã mirim e 6 animais para rã pimenta.

X - média das determinações

s - desvio padrão

Os dados obtidos para composição da carne de rã são semelhantes para as três espécies estudadas, exceto para o teor de proteínas e o teor de gordura.

O teor de gordura do músculo de rã touro (Rana catesbeiana) mostrou-se cerca de 34% superior ao obtido por Sarvaveda e Srikar (1982) para rã (R. hexadactyla) que foi de 0,59%. Para os músculos das rãs L. labyrinthicus e L. ocellatus os valores obtidos para os teores de gordura foram semelhantes aos descritos por Sarvaveda e Srikar (1982).

Ao comparar-se os nossos resultados com os da Tabela do ENDEF (1981), que calculou a composição química da carne de rã da espécie (Leptodactylus spp.), observa-se que os nossos dados se mostraram inferiores no que diz respeito aos teores de proteína e superiores em lipídios totais, já que nesta tabela os valores são de 19,9% e 0,3% para proteína total e lipídios totais, respectivamente. Segundo a Tabela supra citada, observa-se a semelhança dos nossos dados com os de peixes magros de água doce: 82,0% de umidade, 16,6% de proteína, 0,5% de lipídios e 0,9% de cinzas. As diferenças observadas na composição química das rãs do gênero Leptodactylus talvez possa ser atribuída ao fato desses animais terem jejuado por um período prolongado.

A carne de rã apresentou-se como uma carne de alto teor de proteínas e baixo teor de lipídios, ao fazermos uso da classificação de Stansby (1962) para peixes, na qual considera-se peixe

magro aqueles com 81,5% de umidade, 17,9% de proteínas, 0,6% de gordura e 1,6% de cinzas (não incluindo-se a espinha).

As pequenas diferenças entre as espécies estudadas, principalmente em relação à rã touro (R. catesbeiana), poderiam ser atribuídas a vários fatores como habitat, alimentação, época do ano e região de coleta (Estados de São Paulo e de Goiás) além da família a que pertencem, como os mais relevantes. Segundo Stanby (1962), em seu trabalho com peixes, a taxa metabólica e o exercício físico juntamente com a alimentação seriam os fatores mais importantes e isto também parecer ser aplicável para rãs.

No caso da rã touro (R. catesbeiana), criada em cativeiro, cuja alimentação incluía principalmente ração suína, o papel da alimentação teria importância como um dos fatores determinantes da composição química do músculo. As rãs selvagens (Rana occelatus e L. labyrinthicus) apresentaram teor de proteína superior, uma vez que sua alimentação é bem distinta da ração recebida pelas rãs touro (R. catesbeiana). Assim sendo pode-se provavelmente inferir que a alimentação seria um fator determinante da composição química do músculo de rãs.

4.2.2 - Composição química centesimal da farinha de vísceras e cabeça de rã touro (Rana catesbeiana)

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados relativos à composição química da farinha preparada com vísceras e cabeça de rã touro (R. catesbeiana).

Ao compararmos os resultados da Tabela 6 com os obtidos por Muralidhara et al (1976), as diferenças são marcantes quanto ao teor de proteínas e de lipídios. Estes pesquisadores obtiveram 6,4% de umidade, 34,5% de cinzas, 3% de gordura e 55% de proteína. Estas diferenças se devem provavelmente ao fato de termos trabalhado apenas com as vísceras e cabeças, enquanto o referido autor trabalhou com as carcaças sem as pernas, além das vísceras e cabeças. Neste caso o teor de gordura foi bem inferior, pois a carne incluída tem baixíssimos teores de lipídios.

4.2.3 - Composição em aminoácidos da carne de rã

A composição em aminoácidos da carne de rã das espécies R. catesbeiana, L. labyrinthicus e L. ocellatus está indicada na Tabela 7.

A Tabela 7 de composição em aminoácidos das diferentes espécies de rãs estudadas nos permite observar que não há diferenças significativa de composição entre elas. As pequenas varia-

ções observadas foram analogamente resigstradas em diferentes espécies de peixes analisados por Kinsella, 1980.

Tabela 6 - Composição química da farinha de vísceras e cabeça de rã touro (R. catesbeiana).

Análises químicas	%*	
	\bar{X}	s
Umidade	6,93	0,28
Cinzas	37,83	1,56
Lipídios	7,41	0,32
Proteína Bruta (Nx6,25)	45,99	2,04

* Os resultados são descritos em porcentagem na farinha.

\bar{X} - média de 3 determinações

s - desvio padrão

A Tabela 8 indica o Escore Químico para as carnes das três espécies analisadas. Observa-se que a carne de rã possui níveis satisfatórios dos aminoácidos necessários para seres humanos adultos. O padrão de aminoácidos foi semelhante para as três espécies estudadas.

Tabela 7 - Composição em aminoácidos da carne de rã das espécies *R. catesbeiana*, *L. pentadactylus* e *L. ocellatus* em mg de aminoácidos/100mg de matéria seca e em mg de aminoácido/g de Nitrogênio total

Aminoácidos	RÃ TOURO		RÃ MIRIM		RÃ PIMENTA	
	mg de a.a. 100mg de M.S.	mg de a.a. g de Nt	mg de a.a. 100mg de M.S.	mg de a.a. g de Nt	mg de a.a. 100mg de M.S.	mg de a.a. g de Nt
Isoleucina	4,36	331	5,00	346	5,05	344
Leucina	6,76	513	7,65	531	7,38	503
Lisina	9,28	703	10,68	740	9,40	641
Metionina	2,74	208	2,97	206	3,27	223
Fenilalanina	2,33	176	2,76	192	2,76	188
Treonina	3,69	280	4,44	308	4,22	288
Triptofano	1,13	85	1,28	89	1,19	81
Valina	4,13	313	4,89	339	4,55	311
Arginina	7,76	588	7,36	511	9,38	640
Histidina	2,76	210	3,58	248	3,67	251
Ácido Aspártico	8,69	659	9,93	689	9,47	646
Serina	4,29	325	4,45	309	4,16	284
Tirosina	2,69	204	3,00	202	3,21	219
Prolina	2,33	176	2,32	161	2,49	170
Glicina	4,17	316	4,67	324	4,83	330
Glutamina	11,73	890	13,10	908	12,63	862
Alanina	5,50	417	6,01	417	5,71	389
Cistina	-	-	-	-	-	-
Amônia	0,85	64	0,81	56	0,80	55
Proteína (g/100g M.S.)	85,17		94,89		94,17	
Umidade (g/100g M.S.)	7,44		5,15		6,29	

MS - Matéria seca
Nt - Nitrogênio total
a.a - Aminoácidos

Tabela 8 - Escore químico (EQ) para a carne de rã touro (*Rana catesbeiana*), de rã mirim (*L. ocellatus*) e de rã pimenta (*L. labyrinthicus*)

Aminoácido	mg de a.a.* g de Nt	Rã touro	Rã mirim	Rã pimenta
		Escore Químico	Escore Químico	Escore Químico
Isoleucina	250	132	138	138
Leucina	440	117	121	114
Lisina	340	207	218	188
Metionina+Cistina	220	95	94	101
Fenilalanina+Tirosina	380	100	105	107
Treonina	250	112	123	115
Triptofano	60	142	148	135
Valina	310	101	109	100
Total	2250	1,25	1,31	1,24

EQ - Escore químico

Nt - Nitrogênio Total

a.a. - amino ácido

* Padrão de aminoácidos da proteína referência, baseada nas necessidades de aminoácidos de seres humanos adultos (WHO - Technical Report Series nº 522, 1973).

O valor nutritivo da carne de rã, no que se refere à qualidade de sua proteína quanto à composição em aminoácidos, mostrou-se elevado, como todas as carnes e produtos de origem animal em geral.

4.2.4 - Composição em aminoácidos da farinha de vísceras e cabeça de rã touro (*Rana catesbeiana*)

A farinha de vísceras e cabeça de rã touro, cuja composição química centesimal pode ser vista na Tabela 6, tem sua composição em aminoácidos descrita na Tabela 9.

A farinha de vísceras e cabeças de rãs touro (*Rana catesbeiana*) mostrou teores de metionina, arginina, histidina, isoleucina, lisina, treonina e valina superiores aos observados por Muralidhara *et al.* (1976) para uma farinha feita vísceras, cabeças e carcaças desprovidas de pernas de rãs da espécie *Rana tigrina*, onde este pesquisador encontrou: 0,62 (metionina), 1,54 (arginina), 0,50 (histidina), 1,82 (isoleucina), 3,94 (leucina), 2,57 (lisina), 1,65 (treonina) e 1,62 (valina), valores estes expressos em mg de aminoácidos em 100mg de matéria seca.

Para os aminoácidos glicina, prolina, leucina, fenilalanina, triptofano, ácido aspártico, tirosina e alanina, Muralidhara *et al.* (1976) obtiveram teores superiores aos observados por nós

Tabela 9 - Composição em aminoácidos da farinha de vísceras e cabeça de rã (Rana catesbeiana) em mg de aminoácidos (a.a.)/100 mg de matéria seca (MS) e em mg de aminoácidos (a.a.)/g de nitrogênio total (Nt)

Teor de proteína		45,99 g/100g de MS
Aminoácidos	mg de a.a./100mg de M.S.	mg de a.a./g de Nt
Isoleucina	2,05	281
Leucina	3,23	443
Lisina	3,86	529
Metionina	1,27	175
Fenilalanina	1,27	174
Treonina	1,99	273
Triptofano	0,51	70
Valina	2,13	293
Arginina	4,12	565
Histidina	1,38	189
Amônia	0,60	82
Serina	2,41	331
Tirosina	3,21	219
Prolina	2,03	279
Glicina	4,16	571
Glutamina	5,36	736
Alanina	3,44	472
Cistina	-	-
Ácido aspártico	4,61	632

MS - Matéria Seca / Nt - Nitrogênio total / a.a - Aminoácidos

e foram de: 8,41 (glicina), 7,63 (serina), 2,53 (prolina), 3,94 (leucina), 1,41 (fenilalanina), 2,20 (triptofano), 5,89 (ácido aspártico), 3,50 (tirosina) e 4,08 (alanina), valores estes expressos em mg de aminoácidos em 100g de matéria seca. O alto conteúdo de glicina e serina é devido provavelmente à quantidade de ossos ser alta, proporcionalmente superior à da nossa farinha, uma vez que este pesquisador utilizou as carcaças desprovidas das pernas.

Ao compararmos a composição em aminoácidos que foram obtidas em nosso trabalho com a recomendada pelo National Research Council dos Estados Unidos (N.R.C., 1971) para frangos observa-se que nossa farinha só se mostrou deficiente em cistina estando os demais aminoácidos dentro dos níveis recomendados que são de: 0,44 (metionina), 0,39 (cistina), 1,32 (arginina), 1,10 (glicina), 0,44 (histidina), 0,83 (isoleucina), 1,54 (leucina), 1,21 (lisina), 0,77 (fenilalanina), 0,66 (tirosina), 0,77 (treonina), 0,22 (triptofano) e 0,94 (valina), valores estes expressos em mg de aminoácidos em 100mg de matéria seca, em uma dieta com 22% de proteína.

Ao compararmos nossos resultados com os obtidos para a farinha de peixe que tem sido um ingrediente muito usado no preparo de rações, observa-se que os teores de tirosina e arginina são superiores na farinha de vísceras e cabeça de rã touro uma vez que a farinha de peixe contém 2,0 (tirosina), 3,60 (arginina) e 3,30 (glicina) em mg de aminoácidos em 100mg de matéria seca

(Muraledhara et al., 1961). Quanto aos demais aminoácidos componentes da farinha de peixe, seus teores são maiores que na farinha de vísceras e cabeças de rã touro, já que para esta farinha cuja composição química centesimal indicou 60% de proteína, 10% de umidade, 20% de cinzas e 6,8% de gordura em 100g de matéria seca os teores dos demais aminoácidos foram de: 1,80 (metionina), 0,63 (cistina), 1,50 (histidina), 3,20 (isoleucina), 4,90 (leucina), 4,0 (lisina), 2,70 (fenilalanina), 2,60 (treonina), 0,69 (triptofano) e 3,10 (valina), valores estes expressos em mg do aminoácido em 100mg de matéria seca.

4.3 - ANÁLISES DA CARNE DE RÃ TOURO (RANA CATESBEIANA) DURANTE ARMAZENAMENTO A -18°C

4.3.1 - Alterações na solubilidade das proteínas

A variação do teor de proteína total solúvel do músculo tem sido usada como indicador de alterações proteicas em músculo de peixes, aves e mamíferos. Durante o congelamento as proteínas do músculo sofrem alterações que influem diretamente em suas solubilidades ou extratabilidades em soluções salinas, diminuindo sensivelmente se comparadas à solubilidade do músculo fresco (Dyer, 1961). As alterações de solubilidade da proteína total extraível, das proteínas miofibrilares (actomiosina) e das protef-

nas sarcoplasmáticas do músculo de rã touro (*Rana catesbeiana*) armazenado a -18°C por um período de 182 dias (26 semanas) são apresentadas na Tabela 10 e na Figura 5. Aproximadamente 96% da proteína total do músculo fresco pode ser extraída com a solução de NaCl a 5% e pH de 7,2, valor este semelhante ao obtido por Awad *et al* (1969) em seu trabalho com um peixe de água doce (*Coregonus clupeiformis*), onde conseguiu extrair 93% da proteína total do músculo fresco.

Dyer *et al*. (1950) e Olley *et al* (1962) trabalhando com músculos de bacalhau, extraíram acima de 95% da proteína total com uma solução similar à usada em nosso trabalho, sendo que após 16 semanas de armazenamento a -14°C , estes índices atingiram valores em torno de 43% da proteína total. Awad *et al* (1969) ao estudarem o "white fish" (*Coregonus clupeiformis*) cujo teor de gordura varia entre 3,55 e 3,84% observaram uma queda de 93% para 42% aproximadamente, após 16 semanas a -10°C , no teor de proteína total extraível. Curran *et al* (1986) ao estudarem o "sabalo" (conhecido no Brasil como Curimatá), um peixe de água doce (*Prochilodus platensis*) encontrado nos lagos bolivianos, pertencente à família Curimatidae, com teor médio de lipídios de 1,01% observaram que ao longo do armazenamento a -15°C , durante 20 meses, a solubilidade da proteína total manteve-se inalterada, indicando não ter havido desnaturação significativa durante este período. Durante o armazenamento que fizemos da carne de rã touro a -18°C por 182 dias (27 semanas), obtivemos uma queda na extratibilidade de 96% para aproximadamente 42%, em relação à proteína total do

Tabela 10 - Influência do congelamento a -18°C na solubilidade das proteínas do músculo de rã touro (Rana catesbeiana) expressa em % da proteína total do músculo*

*Solubilidade das proteínas (%)			
Tempo de Armazenamento (dias)	PTE	PM	PS
00	96,19	75,63	13,29
15	93,99	74,19	13,03
33	87,52	71,47	13,28
47	83,88	68,28	13,83
63	73,89	53,28	13,83
92	51,57	34,72	12,92
124	47,36	28,37	13,79
182	39,90	23,40	13,16

* A porcentagem foi calculada em relação à proteína total do músculo determinada por semi micro Kjeldahl utilizando-se 6,25 como fator de conversão ($15,47+0,51$ g/100g de músculo fresco).

PTE = proteína total extraível, média de 3 determinações

PM = proteínas miofibrilares, média de 3 determinações

PS = proteínas sarcoplasmáticas, média de 3 determinações

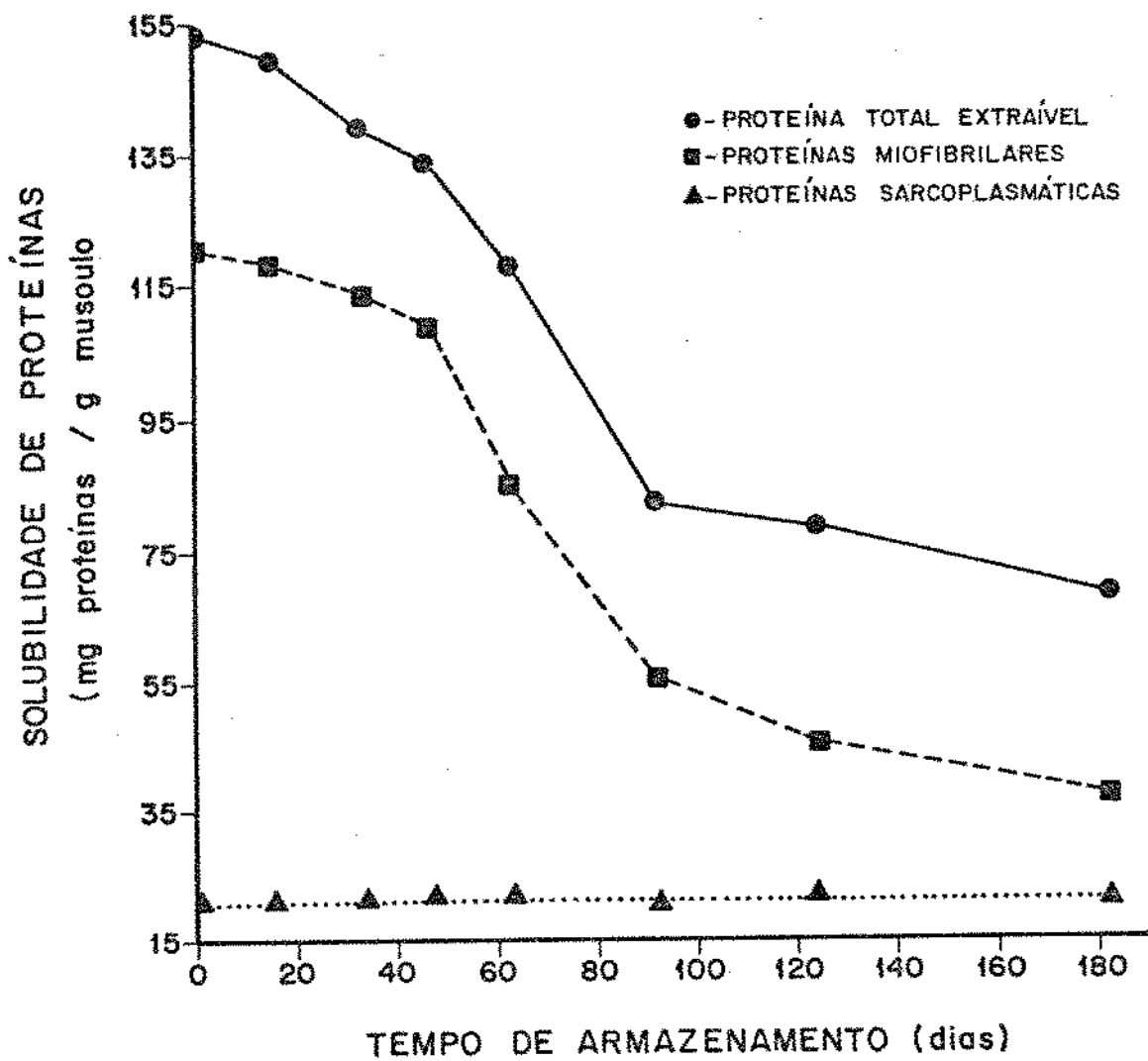


Fig. 4 - Alterações de solubilidade da proteína total extraível (PTE), das proteínas miofibrilares (PM) e das proteínas sarcoplasmáticas (PS) ao longo do armazenamento a -18°C .

músculo, já que a concentração da proteína total solúvel foi de 153 mg/g carne no músculo fresco para 67,80 mg/g carne no músculo congelado por 27 semanas. É interessante evidenciarmos que Curran et al. (1986), que trabalharam com o "sabalo", consideraram o tempo zero de armazenamento 8 dias após estocagem em gelo a 0°C, sendo que a solubilidade esteve em torno de 70% em relação à proteína total do músculo. Diversos autores observaram que a estocagem de peixes em gelo provoca decréscimo do teor de proteína total solúvel devido, principalmente, às interações entre proteínas e, em menor extensão, devido à hidrólise enzimática e ação bacteriana pois o teor de nitrogênio não proteico mantém-se constante (Wierbicki et al., 1956, Moorjani et al. 1962, Yamamoto et al. 1977.

No que se refere à fração proteica correspondente às proteínas sarcoplasmáticas, a quantidade extraída não mostrou alteração significativa ao longo do armazenamento, mantendo-se em torno de 13%, resultado este semelhante ao encontrado por Dyer et al. (1955) e Conell (1962) que trabalharam com bacalhau e Awad et al. (1969) que trabalharam com "white fish" (*Coregonus cupleifor-* *mis*) um peixe de água doce armazenado 16 semanas a -10°C. Awad et al. (1969) extraiu em torno de 16% de proteínas sarcoplasmáticas ao longo do armazenamento. Por outro lado, a fração correspondente às proteínas miofibrilares apresentou, em nosso trabalho, grande variação de solubilidade ao longo do armazenamento, diminuindo de aproximadamente 75% para valores em torno de 23% após os 182 dias de congelamento do músculo, sendo que a perda de so-

lubilidade acentuou-se após as 4 primeiras semanas de armazenamento.

A diminuição de solubilidade das proteínas miofibrilares durante o congelamento foi observada em músculo de peixes por vários pesquisadores (Dyer *et al.* (1956), Awad *et al.* (1969), Jarenbach e Liljemark (1975), Dyer e Fraser (1959), Olley *et al.* (1962), Anderson e Ravesi (1970), Matsumoto (1980), Dyer *et al.* (1959) mostraram que durante o primeiro mês de armazenamento do músculo do bacalhau a -12°C , não houve alterações significativas no teor de proteínas miofibrilares, mas nas semanas seguintes observa-se uma queda de 65% para 30% na solubilidade das proteínas miofibrilares ao longo de 4 semanas. Dyer *et al.* (1956), ao longo do armazenamento de -12°C de peixes com alto teor de lipídios, observaram que a insolubilização da actomiosina não é tão acentuada se comparada à observada em músculos de peixes magros como o bacalhau. Jarenback e Liljemark (1975) ao efetuarem o armazenamento de bacalhau em três temperaturas diferentes (-10°C , -20°C e -30°C) durante 120 semanas, após 4 dias em gelo, observaram que o teor de proteínas miofibrilares atingiu um mínimo após 30 semanas e que o decréscimo foi menos acentuado a -20°C ; por outro lado, a -30°C não houve alterações significativas de solubilidade durante as 120 semanas.

Colmenero e Borderias (1983) ao armazenarem diferentes carnes a -20°C por 8 meses observaram que a solubilidade das proteínas é menos afetada em peixes mais ricos em gordura do que em

peixes magros, que a carne do peito de frango mantém a solubilidade de suas proteínas praticamente inalterada ao longo do armazenamento e que a carne de porco apresentou perda acentuada de solubilidade de suas proteínas. Estes pesquisadores observaram ainda, que a porcentagem de proteínas solúveis no músculo fresco de peixes é cerca de 20% superior à de outras carnes mas que, o decréscimo é bem mais acentuado ao longo do armazenamento. A diferença de estabilidade das proteínas de peixes magros e gordos atribui-se principalmente ao efeito protetor exercido pelos lipídios neutros contra a ação dos ácidos graxos livres, que provocam a insolubilização proteica, já que o teor de lipídios neutros nos peixes magros não é suficiente para minimizar a ação dos ácidos graxos livres (Labuza, 1971).

O efeito do congelamento na solubilidade das proteínas do músculo bovino foi estudado por Wagner e Añon (1986) que observaram haver alterações na solubilidade das proteínas miofibrilares de acordo com a temperatura de armazenamento e o método de congelamento. Durante o armazenamento a -20°C , tanto nas amostras submetidas a congelamento rápido como nas submetidas a congelamento lento, houve um período de ligeiro aumento da solubilidade (13 semanas) seguido de um decréscimo lento nas próximas 35 semanas, sendo este de maior intensidade no congelamento lento. Nas temperaturas de -5°C e -10°C o decréscimo na solubilidade foi bem mais acentuado do que na temperatura de -20°C , sendo o método de congelamento rápido o que apresentou maior decréscimo.

Estudos sobre a insolubilização das proteínas do músculo, durante o congelamento da carne de rã, não são relatados na literatura. Devadasan e Rajendranathan Nair (1980), em um estudo preliminar realizado com músculo de rã armazenado em gelo por um período de 9 dias, observaram uma queda na solubilidade das proteínas totais extraíveis de 29,18% no músculo fresco para 24,69% no músculo após 9 dias de armazenamento, valores estes expressos em porcentagem da proteína total determinada pelo método de Kjeldahl. Estes pesquisadores ainda observaram que a fração das proteínas extraídas com tampão fosfato de força iônica igual a 0,05 (proteínas sarcoplasmáticas), não tiveram sua solubilidade alterada de maneira significativa ao longo do armazenamento em gelo, pois a solubilidade no músculo fresco foi de 23,91% e após os 9 dias de armazenamento em gelo, passou a 24,47%. Neste trabalho, a centrifugação dos extratos foi feita a 5.000 rpm (30 minutos) e não foi feita a separação das proteínas miofibrilares.

Uma comparação dos resultados obtidos em nosso trabalho com aqueles da literatura, nos sugere que as solubilidades das diferentes frações proteicas do músculo de rã têm um comportamento semelhante ao observado nos músculos de peixes magros e distintos daqueles observados em aves e mamíferos, pois em animais destas classes o decréscimo na solubilidade das proteínas totais extraíveis deve-se principalmente às proteínas sarcoplasmáticas, já que a fração correspondente às proteínas miofibrilares não apresenta alterações sensíveis de solubilidade (Briskey e Kauffman, 1971; Kang *et al.*, 1983; Colmenero e Borderias, 1983; Matsumoto, 1980).

4.3.2 - pH

Os resultados obtidos neste experimento podem ser vistos na Tabela 11. Não foi notada nenhuma variação significativa de pH ao longo do armazenamento.

A literatura é conflitante com respeito às alterações do pH durante o armazenamento congelado. Em carnes bovinas observa-se decréscimo do pH ao longo do armazenamento congelado e isto afeta a capacidade de retenção de água da carne e sua maciez (Hamm, 1960). Para peixes, alguns autores observaram não ocorrer alterações de pH ao longo do congelamento (Conell e Howgate, 1968, 1969) ao passo que outros observaram um leve decréscimo (Kelly *et al.*, 1966; Mac Callum *et al.*, 1968; Lauder *et al.*, 1970, Ota *et al.*, 1973) enquanto outros observaram um leve aumento do pH (Vorob'eva, 1969).

Atribui-se estas diferenças ao fato de se medir o pH do músculo de peixes congelado ou após descongelamento, quando o pH é medido no músculo congelado geralmente observa-se um leve decréscimo (Mills, 1975).

No nosso trabalho o pH do músculo, ao longo do armazenamento, foi medido após descongelamento o que ocasionaria a pouca variação observada. Mills, 1975, considera que estas observações conflitantes não devem surpreender, uma vez que as reações produzindo ácidos e bases são inúmeras ao longo do congelamento.

Tabela 11 - Variação do pH do músculo de rã (*Rana catesbeiana*) armazenado a -18°C por 182 dias.

Tempo de armazenamento (dias)	pH	
	\bar{X}	s
0	6,28	(0,08)
1	6,35	(0,12)
7	6,32	(0,08)
15	6,42	(0,15)
33	6,51	(0,12)
47	6,38	(0,10)
63	6,35	(0,08)
92	6,40	(0,11)
124	6,46	(0,09)
182	6,32	(0,04)

\bar{X} - média de 3 determinações

s - desvio padrão

4.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi empregada para detectar-se as eventuais alterações da fração correspondente às proteínas sarcoplasmáticas no músculo de rã touro ao longo do armazenamento a -18°C .

Os diferentes perfis eletroforéticos das proteínas sarcoplasmáticas ao longo do congelamento, podem ser vistos na Figura 5.

A observação dos perfis eletroforéticos mostra que não ocorreram muitas alterações ao longo do armazenamento, nos sugerindo que o congelamento do músculo de rã não acarretaria maiores dificuldades para identificação da espécie pelo método eletroforético, se esse fosse utilizado como um dos critérios para identificação da espécie na carne congelada. As diferenças observadas:

- a) aparecimento de uma banda nova (IA) no início do gel após 47 dias de armazenamento, podendo sugerir desnaturação de uma proteína de alto peso molecular após este período;
- b) desaparecimento de uma banda (V) aos 92 dias de armazenamento e outra (III) aos 124 dias, o que nos sugere uma provável desnaturação proteica produzindo uma subunidade com mobilidade relativa próxima à da banda VI ou IV, respectivamente para as bandas V e III;
- c) aparecimento de uma banda nova (VII) no final do gel, sugerindo mais uma provável desnaturação proteica após 182 dias de armazenamento. A banda (VIa), observada após 92 dias de armazenamento poderia ser considerada um artefato ou ainda uma subunidade da banda VI uma vez que a intensidade da banda VI sofreu uma diminuição bem visível após 47 dias de armazenamento.

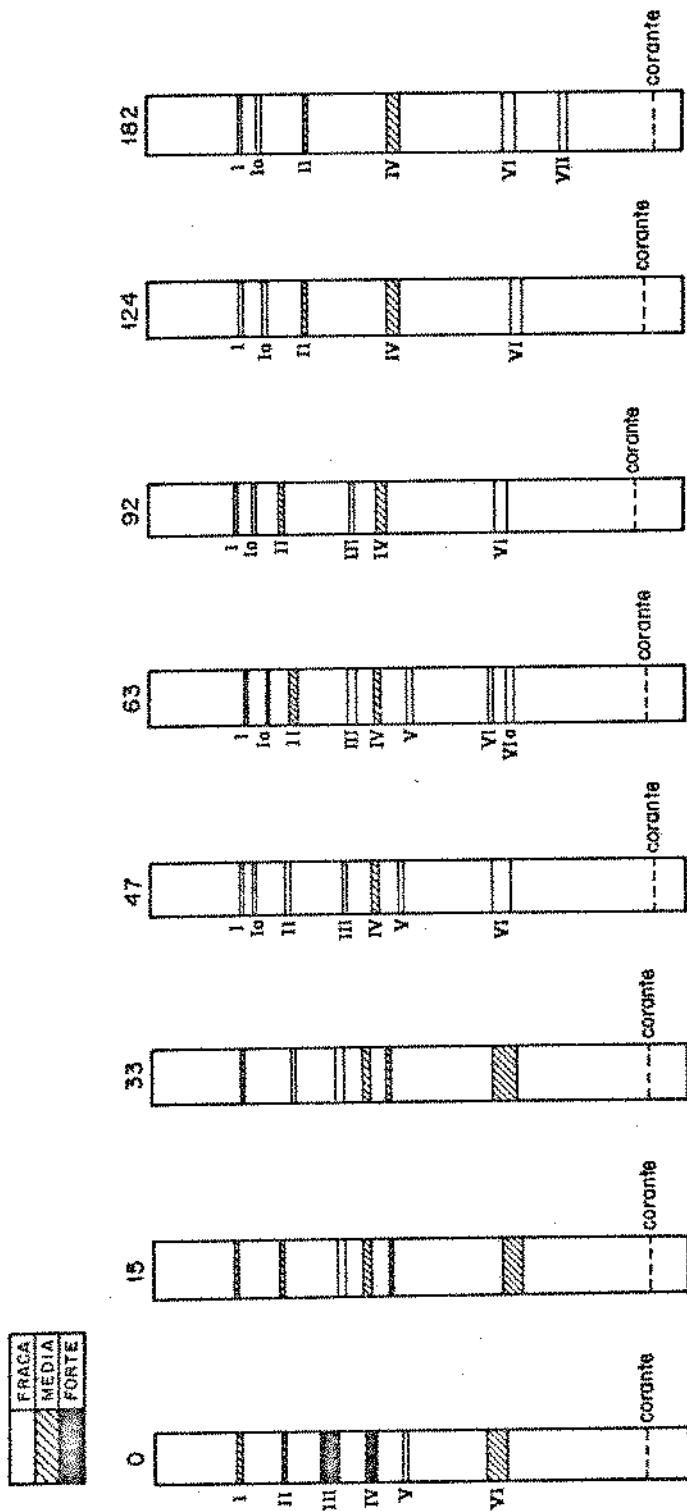


Fig. 5 - Perfil eletroforético das proteínas sarcoplasmáticas do músculo de Rã Touro (*Rana catesbeiana*) ao longo do armazenamento a -18°C .

Estas pequenas alterações nos perfis eletroforéticos das proteínas sarcoplasmáticas não mostraram constituir-se impedimento na identificação da espécie pelo método eletroforético aplicado ao músculo congelado, principalmente se este for utilizado durante os três primeiros meses de armazenamento a -18°C .

Apesar da eletroforese em gel de poliacrilamida ter se mostrado um método provavelmente viável para identificação da espécie durante armazenamento congelado, observamos que embora a solubilidade da fração proteica correspondente às proteínas sarcoplasmáticas não tenha sofrido alterações significativas, nota-se que houve pequenas alterações no perfil eletroforético, nos sugerindo que houve desnaturação de proteínas nesta fração proteica ao longo do armazenamento congelado a -18°C . Assim sendo, como foi observado por inúmeros pesquisadores (Mackie, 1969; Machie, 1972; Sumner e Mealy, 1983; Damiani e Rossi, 1985; Frouin, 1975), a eletroforese poderia ser aplicada para identificação da espécie de rã (*Rana catesbeiana*): esses pesquisadores trabalharam com o extrato aquoso, ao passo que nós trabalhamos com o extrato de proteínas sarcoplasmáticas após diálise, este procedimento por nós utilizado mostrou-se igualmente viável.

4.3.4 - Composição em aminoácidos do músculo fresco e congelado

A composição em aminoácidos do músculo fresco e congelado de rã touro (*Rana catesbeiana*) pode ser visto na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição em aminoácidos da carne de rã touro (*Rana catesbeiana*) fresca e congelada

Teor de proteína (g/100g de matéria seca)	Fresca		Congelada	
	75,77	75,29		
	mg de a.a. 100mg de MS	mg de a.a. g de Nt	mg de a.a. 100mg de MS	mg de a.a. g de Nt
Lisina	9,28	703	9,19	697
Histidina	2,76	210	3,72	280
Arginina	7,76	588	6,18	465
Ácido aspártico	8,69	659	10,71	806
Ireonina	3,69	280	3,74	282
Serina	4,29	325	4,42	333
Ácido glutâmico	11,73	890	11,12	837
Prolina	2,33	176	2,13	160
Glicina	4,17	316	4,56	343
Alanina	5,50	417	4,53	341
Cistina	-	-	-	-
Valina	4,13	313	4,14	312
Metionina	2,74	208	2,69	202
Isoleucina	4,36	331	4,34	327
Leucina	6,76	513	8,15	614
Tirosina	2,69	204	2,76	208
Fenilalanina	2,33	176	2,41	181
Triptofano	1,13	85	1,09	82
Amonia	0,85	64	0,82	62

a.a. - aminoácido
MS - matéria seca
Nt - nitrogênio total

Não foram observadas alterações relevantes na composição em aminoácidos da carne fresca e congelada, que possam ser indicativas de modificações ao longo do armazenamento congelado por um período de 182 dias.

A análise das diferentes frações proteicas, quanto à composição em aminoácidos, pode ser vista na Tabela 13.

Observamos que a cistina esteve presente apenas na fração correspondente às proteínas sarcoplasmáticas, ao passo que o triptofano foi encontrado apenas na fração correspondente às proteínas miofibrilares. Em relação ao armazenamento congelado não houve alterações relevantes na composição em aminoácidos da carne fresca e congelada.

4.3.5 - Alterações lipídicas no músculo de rã touro (Rana catesbeiana)

Os lipídios extraídos do músculo de rã fresco e congelado foram analisados para determinar-se as possíveis deteriorações químicas por ele sofridas ao longo do armazenamento a -18°C .

Os resultados das análises de lipídios podem ser vistos na Tabela 12. O teor de lipídios médio do músculo fresco foi de 0,79% do peso total. Os resultados da Tabela 14, indicam que o conteúdo total de lipídios do músculo não sofreu alterações durante o armazenamento por um período de 182 dias a -18°C .

Tabela 13 - Composição em aminoácidos das seguintes frações proteicas extraídas do músculo fresco e congelado: proteína total (PTE), proteínas miofibrilares (PM) e proteínas sarcoplasmáticas (PS), expressas em mg de aminoácidos//g de nitrogênio total

Teor de aminoácidos (mg de a.a./g de Nt)	PTE		PM		PS	
	F	C	F	C	F	C
Lisina	781	722	710	731	756	738
Histidina	144	219	174	152	197	225
Arginina	586	468	531	581	449	523
Ácido aspártico	701	865	693	740	785	815
Trionina	284	298	299	307	291	241
Serina	301	319	347	322	364	354
Ácido glutâmico	939	917	941	973	810	704
Prolina	149	166	152	141	190	166
Glicina	240	274	257	252	326	334
Alanina	417	420	436	432	439	407
Cistina	-	-	-	-	56	60
Valina	348	355	367	362	423	355
Metionina	243	228	241	255	214	236
Isoleucina	346	358	360	379	346	329
Leucina	550	554	559	551	578	545
Tirosina	211	211	233	228	165	164
Fenilalanina	195	205	193	196	278	319
Triptofano	114	114	120	17	-	-
Amônia	59	57	62	56	60	60

a.a. - aminoácido

Nt - Nitrogênio total

F - carne de rã fresca

C - carne de rã congelada

Sarvaveda e Srikar (1982), trabalhando com rãs de espécies Rana hexadactyla encontraram 0,59% para o teor de lipídios totais e este valor não se alterou até o final do armazenamento a -18°C por 150 dias.

Tabela 14 - Influência do congelamento a -18°C na fração lipídica do músculo de Rã Touro (Rana catesbeiana)

Tempo de armazenamento	% de lipídios totais*		% de fosfolipídios		% AGL		IP (meq/Kg de lipídios)	
	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
	0	0,79	(0,02)	91,3	(2,1)	6,5	(1,2)	14,2
15	0,81	(0,03)	90,1	(1,7)	9,2	(1,7)	18,8	(0,3)
33	0,93	(0,05)	89,6	(1,9)	13,1	(0,9)	29,5	(0,5)
47	0,75	(0,02)	87,9	(2,0)	15,2	(1,0)	39,9	(0,7)
63	0,77	(0,03)	86,8	(2,3)	19,9	(0,7)	47,1	(1,8)
92	0,88	(0,06)	80,6	(1,6)	21,8	(1,8)	41,5	(1,3)
124	0,86	(0,04)	73,4	(1,4)	24,8	(1,9)	22,2	(0,5)
182	0,81	(0,02)	49,2	(0,9)	47,8	(0,7)	8,8	(0,3)

* Não houve variação significativa a nível de 1% na porcentagem de lipídios totais no músculo.

AGL - Ácidos graxos livres.

IP - índice de peróxidos

\bar{X} - média de 3 determinações

s - desvio padrão

4.3.5.1 - Fosfolipídios

Como pode ser visto na Tabela 12, os lipídios da carne de rã mostraram possuir um conteúdo de fosfolipídios elevado (91,3%). Durante o armazenamento, o teor de fosfolipídios diminuiu e o de ácidos graxos aumentou sensivelmente. Isto nos sugere que houve uma hidrólise de fosfolipídios resultando em liberação de ácidos graxos. Sabe-se que as enzimas, fosfolipases A e B, além de outras fosfolipases presentes nos tecidos animais, promovem a liberação de ácidos graxos dos fosfolipídeos por hidrólise dos mesmos. A hidrólise de fosfolipídios por nós observada, indica que houve atividade das fosfolipases nos tecidos ao longo do congelamento. Assim, Olley e Lovern (1967), Blygh e Scott (1966) em músculo de bacalhau, Davidkova e Khan (1967), em músculo de galinha e Awad *et al.* (1969), trabalhando com um peixe de água doce e Sarvaveda e Srikar (1982), com músculo de rã, todos observaram queda no teor de fosfolipídios e concomitante aumento do teor de ácidos graxos livres, durante o armazenamento congelado.

Para a carne de rã, Sarvaveda e Srikar (1982), obtiveram um decréscimo de 90,2% para 85,2% no teor de fosfolipídios após 150 dias de armazenamento; a análise em cromatografia gasosa da fração de lipídios neutros, antes e depois do congelamento, revelou o aparecimento de ácidos graxos de cadeia curta C10:0 que não tinham se apresentado no cromatograma do músculo fresco, corroborando a hipótese de hidrólise dos fosfolipídios, dando origem a esses ácidos graxos livres.

Durante o armazenamento a -18°C por um período de 182 dias, observamos um decréscimo de fosfolipídios de 91,3% para 68,22% sendo que até 63 dias de congelamento este decréscimo não foi tão acentuado quanto o que ocorrera anteriormente, indicando que a ação das fosfolipases é mais acentuada após os dois primeiros meses de armazenamento a -18°C .

4.3.5.2 - Ácidos graxos livres

O teor de ácidos graxos livres esteve em torno de 6,5% do total de lipídios no músculo fresco. Com 33 dias de congelamento o teor de ácidos graxos livres praticamente duplicou, como pode ser visto na Tabela 13, atingindo 47,8% após 182 dias de armazenamento.

Awad *et al.* (1969), ao congelarem a -10°C um peixe de água doce (*Coregonus cupleiformis*), com teor de gordura em torno de 3,8% sendo 20,7% fosfolipídios, observaram um aumento de 4,6% para 7,7% do teor de ácidos graxos livres em porcentagem dos lipídios totais, após 45 dias de armazenamento, atingindo 21,6% no final de 16 semanas. Estes pesquisadores trabalharam a uma temperatura superior à do nosso experimento, mas a composição do peixe utilizado apresentou um teor de lipídios neutros superior ao do músculo de rã, o que dificultaria a hidrólise enzimática dos fosfolipídios, como foi sugerido por Ke *et al.* (1976).

A influência dos ácidos graxos livres na estabilidade das proteínas miofibrilares ainda não é conclusiva. Provavelmente estes ácidos graxos livres se fixem à actomiosina presente nas fibras musculares. Dyer *et al.* (1956), foram os primeiros pesquisadores a sugerirem a existência de uma relação entre a insolubilização da actomiosina e a liberação de ácidos graxos no músculo de peixe armazenado congelado. Pesquisas posteriores confirmaram a hipótese em questão (Dyer 1959; Hanson e Olley, 1965). Os possíveis mecanismos de insolubilização da proteína, seriam a destruição de lipídios que contribuiriam à estabilização da actomiosina e/ou à interação entre ácidos graxos e actomiosina, promovendo conseqüentemente, o aparecimento de grupos hidrofóbicos na superfície das proteínas (Dyer *et al.*, 1959). Utilizando sistemas modelo, King *et al.* (1962), demonstraram que pequenas quantidades de ácido linoleico ou linolênico, diminuíam a solubilidade da actomiosina no músculo de bacalhau.

As condições para a interação entre linoleato e proteínas miofibrilares foram estudadas por Anderson *et al.* (1963, 1964, 1965) e por Hanson e Olley (1965). A força iônica e o pH da solução de actomiosina, bem como a concentração de linoleato, se mostraram fatores particularmente críticos. Quantidades mínimas de linoleato já foram suficientes para iniciar a insolubilização proteica em sistemas modelo (Hanson *et al.*, 1965). A quantidade de linoleato necessária para promover-se a insolubilização, se mostrou relacionada ao teor de lipídios no músculo de peixe. Desta forma, Hanson e Olley (1965) sugeriram que os lipídios neutros

talvez exerçam um fator protetor contra a insolubilização proteíca. A forma de ação dos lipídios neutros como agente protetor contra a insolubilização proteica no interior das fibras musculares ainda não tem nenhuma explicação conclusiva.

Os ácidos graxos livres devem estar envolvidos, pelo menos parcialmente, com a insolubilização das proteínas miofibrilares no músculo de rã touro (*Rana catesbeiana*). O decréscimo de solubilidade das proteínas miofibrilares e concomitante aumento do teor de ácidos graxos liberados, pode ser visto na Figura 6. No caso do músculo de rã touro, existe uma alta correlação entre o teor de ácidos graxos livres no músculo congelado e a insolubilização das proteínas miofibrilares.

O decréscimo no teor de fosfolipídios e concomitante aumento do teor de ácidos graxos livres nos sugere que esses ácidos graxos sejam originários da hidrólise dos fosfolipídios que constituem a fração mais expressiva dos lipídios presentes no músculo de rã, como foi observado em peixes por vários pesquisadores (Olley e Lovern, 1960; Olley, Pirie e Watson, 1962; Bligh e Scott, 1966). Alguns trabalhos mostram ainda que em peixes magros, os ácidos graxos livres são derivados dos fosfolipídeos presentes nas membranas (Hanson e Olley, 1965; Addison, Ackman e Hingley, 1968).

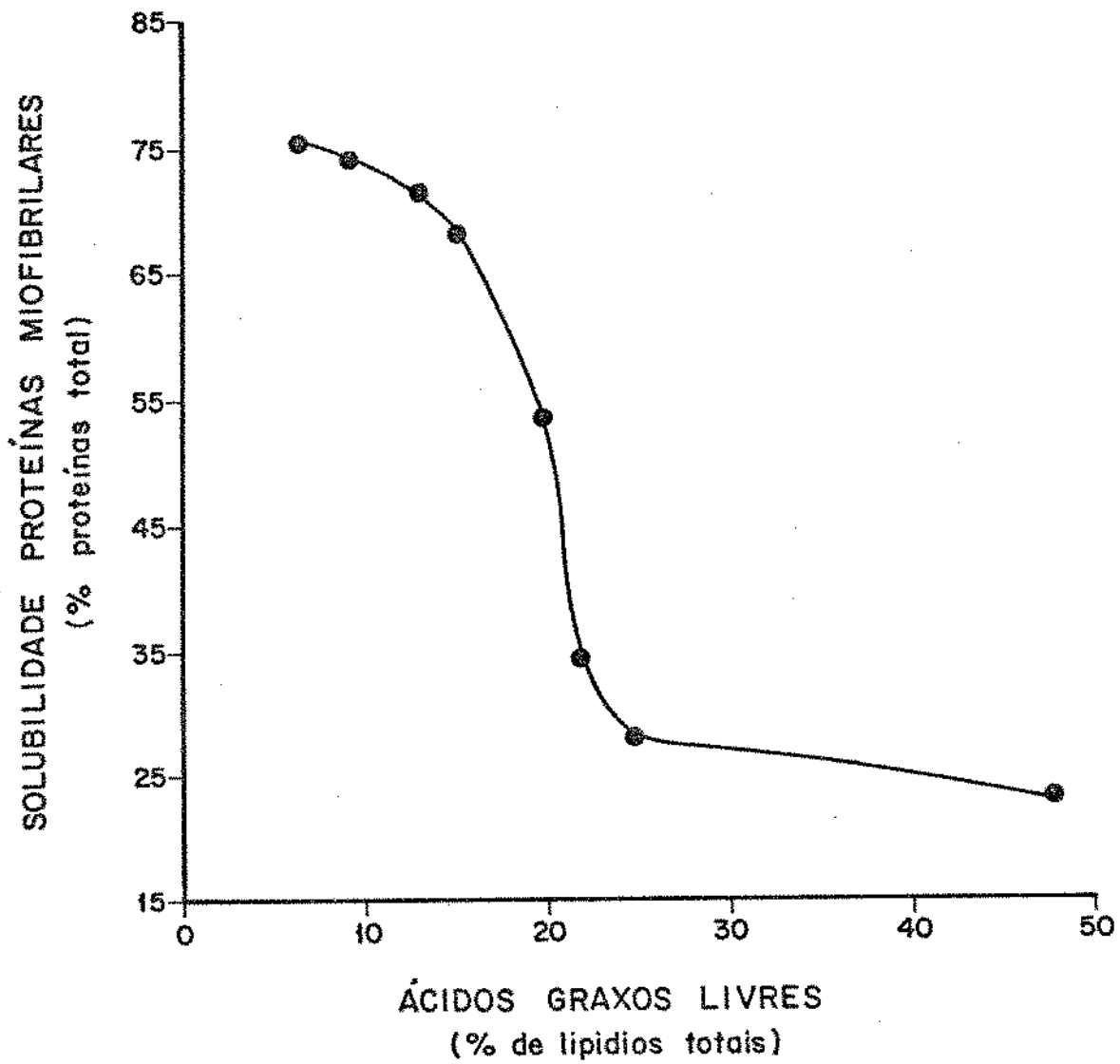


Fig. 6- Decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares (P.M.) e aumento da concentração de ácidos graxos livres (A.G.L.).

4.3.5.3 - Índice de peróxidos

O índice de peróxidos tem sido utilizados para detectar-se a presença de produtos de autoxidação de lipídios, que são responsáveis pelo aparecimento do odor de ranço em produtos que contenham gordura. Além do índice de deterioração oxidativa dos lipídios, os produtos de autoxidação de lipídios teriam um papel na insolubilização das proteínas miofibrilares ao interagirem com as mesmas.

Desai e Tappel (1963) e Roubal e Tappel (1963), usando estes mesmos modelos com proteínas de natureza preferencialmente globulares, observaram que a solubilidade das proteínas diminuía quando ácidos graxos polinsaturados sofriam oxidação em sistemas contendo proteínas e lipídios. Muitos pesquisadores observaram a interação entre lipídios autoxidados e proteínas (Andrews *et al.*, 1965; Narayan e Kummerow 1958, Narayan *et al.*, 1964; Nishida e Kummerow 1960). Jarenback e Liljemark (1975) ao estudarem as alterações ultraestruturais de bacalhau (*Gadus morhua*) ao longo do congelamento, compararam os efeitos do ácido linoleico e de seu peróxido sobre as proteínas miofibrilares e observaram que o hidroperóxido tem um efeito mais intenso que o ácido linoleico, provavelmente devido à reação dos hidroperóxidos com grupamentos amina das proteínas o que leva a um aumento de hidrofobicidade dos filamentos facilitando a interação entre e eles e causando a formação de um precipitado gelatinoso com os filamentos alinhados paralelamente. Braddock e Dugan (1973) observaram ainda que em um

sistema oxidante modelo com miosina e hidroperóxidos do ácido linoleico, os aminoácidos mais facilmente perdidos eram metionina, lisina e histidina.

A variação do índice de peróxidos no músculo de rã touro (*Rana catesbeiana*) ao longo do armazenamento a -18°C pode ser visto na Figura 7. Observa-se que houve um crescimento acelerado do índice de peróxidos até 63 dias de armazenamento e a partir de então houve um decréscimo pequeno até 92 dias, atingindo valores mínimos, em torno de 8,80 mEq/kg de lípidios com 182 dias. Como foi descrito por Awad *et al.* (1969), para pescados de água doce, no início da armazenagem ocorre um período de indução (teor mínimo de hidroperóxidos), a seguir atinge-se um máximo e subsequentemente declina a um mínimo. Esta etapa de decréscimo justifica-se pelo fato de os hidroperóxidos se decomporem mais rapidamente do que são formados.

Apesar do índice de peróxidos ter sido considerado o método químico mais sensível e confiável para detectar-se alterações oxidativas incipientes (Banks, 1966), os valores de índice de peróxido não são suficientes para determinar-se a vida útil da carne de rã armazenada congelada a -18°C . Dessa forma, necessitaríamos de análises sensoriais realizadas simultaneamente às análises químicas. No caso da carne de rã, como veremos mais detalhadamente no item referente à análise sensorial, após 182 dias de armazenamento a carne mostrou-se aceitável, embora fosse possível detectar-se um leve odor de ranço.

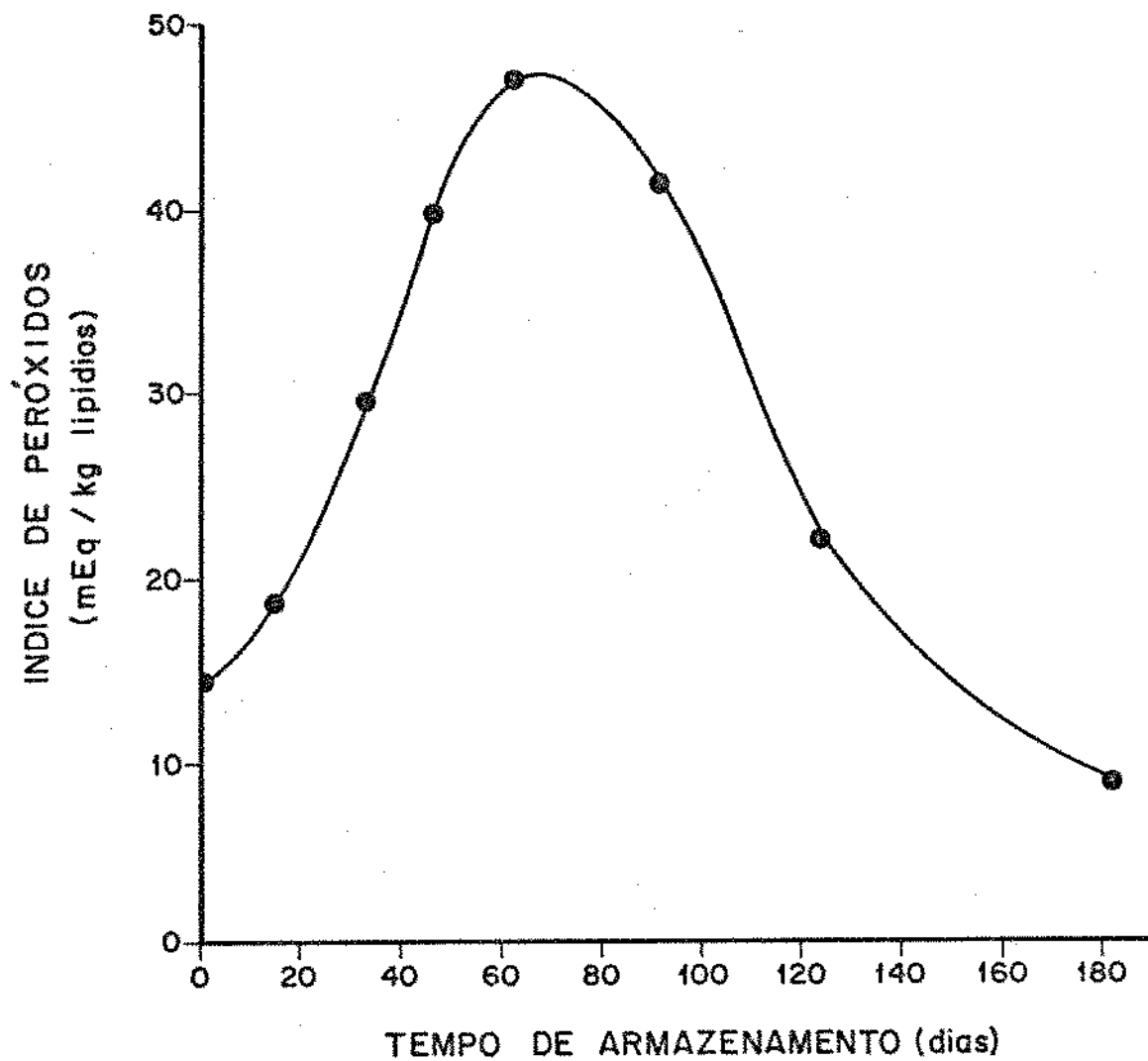


Fig. 7 - Variação do índice de peróxidos (IP) ao longo do armazenamento a -18 °C.

4.5 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os resultados das análises microbiológicas podem ser vistos na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise microbiológica do músculo de rã fresco e após armazenamento a -18°C por um período de 182 dias

	Fresco	Congelado
Contagem total de microrganismos	$2,56 \times 10^3$	$6,96 \times 10^1$
Coliformes	200 (5MPN/100ml)	200 (9MPN/100ml)
Coliformes fecais	ausência	ausência
<u>Staphylococcus aureus</u>	ausência	ausência
<u>Salmonella</u> (teste presuntivo)	ausência	presença*

* Foi encontrada Salmonella pelo teste presuntivo em uma das três amostras analisadas, todas provenientes do mesmo lote.

Normalmente verifica-se uma redução na atividade bacteriana em carnes bovinas e pescados submetidos à armazenagem congelada. Watanabe (1965) observou em Sardinella aurita armazenada

congelada a -18°C , que o número de bactérias diminuiu de 10^4 para 10^3 , estes números correspondem respectivamente ao início e ao final do congelamento.

Considerando-se que não existem limites fixados para contagem total de microorganismos em carne de rã e que Lane (1970) definiu o número máximo para rejeição de pescados congelados ou acondicionados em gelo quando fosse atingido o nível de $2,0 \times 10^6$ colônias/g, podemos admitir que a carne de rã estava nos níveis aceitáveis quanto à contagem total de microorganismos.

Em relação às quantidades de coliformes totais na carne, os níveis são elevados, isto se deve provavelmente ao fato das carcaças terem sido lavadas em água corrente, no próprio ranário e esta água não era clorada.

A ausência de coliformes fecais, embora não possa ser considerada um índice de qualidade da carne, manteve-se, no caso da carne de rã, em níveis considerados aceitáveis para a maioria das carnes.

Staphylococcus aureus, responsável por inúmeros casos de intoxicações alimentares (Bryan, 1974), esteve ausente na carne de rã fresca e congelada.

A presença de Salmonella em rãs foi documentada por Nickelson et al. (1975), que isolou Salmonella em 35% das amos-

tras analisadas, e citou outros pesquisadores que evidenciaram a presença de Salmonella em até 60% das amostras que analisaram. A fonte de Salmonella no animal foi considerada por muitos pesquisadores como sendo o conteúdo intestinal e o fígado (Wells et al., 1974; Koopman e Jansen, 1973; Ang et al., 1973); assim sendo, a alta incidência de Salmonella em coxas de rãs processadas, sugere que há contaminação do tecido durante o processamento (Nickelson et al. 1975). Nas amostras analisadas, foi detectada a presença de Salmonella em uma amostra congelada, o que já limita a carne para exportação. As rãs que forneceram as amostras frescas foram abatidas no laboratório, lavadas em água clorada e não foi administrado alimento nas 24 horas que antecederam o abate, para que o conteúdo intestinal fosse mínimo. O fato de não termos detectado a presença de Salmonella na carne fresca, nos sugere que as condições de abate seriam de grande importância para a obtenção de um produto de qualidade aceitável sob o ponto de vista microbiológico, como foi evidenciado por Nickelson et al. (1975).

Observamos ainda que, como para a maioria das carnes, a baixa contagem de coliformes fecais na carne de rã, não assegura sua qualidade sob o ponto de vista microbiológico, uma vez que detectou-se a presença de salmonella em uma das amostras congeladas.

Como não foram feitos testes sorológicos nada pode ser afirmado a respeito da patogenidade da Salmonella observada no teste presuntivo.

As amostras utilizadas para análise sensorial foram servidas após cozimento em salmoura a 3% por 15 minutos, não havendo assim perigo de contaminação dos provadores, uma vez que Belolan e Schlosser (1963), observou que alimentos cozidos cuja temperatura do centro atinja 71% °C estão livres de Salmonella, principalmente quando é utilizada calor úmido.

4.6 - Análise sensorial

Os resultados das análises sensoriais efetuadas com as duas amostras de carne de Rã touro, sendo uma congelada por um período de 182 dias a -18°C e a outra fresca, estão na Tabela 15.

A aparência não se mostrou útil para a detecção das alterações na carne de rã durante o armazenamento a -18°C, pois não houve diferença significativa entre as médias a nível de 5%, sendo ainda os valores das médias bem elevados; o que nos sugeriu que a qualidade de ambas as carnes quanto à aparência foi considerada muito boa.

O odor, o sabor e a textura se mostraram atributos sensoriais bastante representativos das mudanças na qualidade da carne de rã armazenada a -18°C por 182 dias, uma vez que a diferença entre as médias das avaliações se mostrou significativa a nível de 1%.

Tabela 16 - Resultados das análises sensoriais efetuadas com a carne de Rã Touro (*Rana catesbeiana*) fresca e armazenada a -18°C por 182 dias. Foi utilizada uma escala hedônica não estruturada de 9 cm (0 - pior qualidade, 9 - melhor qualidade, exceto para odor estranho onde foi o inverso).

Atributos (*)	Carne fresca		Carne congelada	
	X	s	X	s
Aparência (b)	8,9	(1,3)	8,0	(1,8)
Odor estranho (c)	1,5	(0,8)	4,0	(1,7)
Sabor (c)	8,7	(1,2)	6,7	(1,7)
Textura (c)	8,7	(1,1)	5,8	(1,3)
Impressão global (c)	8,9	(1,0)	6,6	(1,3)

(*) Aparência (0 = muito ruim; 9 = muito boa)

Odor estranho (0 = ausência; 9 = muito intenso)

Sabor (0 = muito ruim; 9 = muito bom)

Textura (0 = Não característica; 9 = característica)

Impressão global (0 = muito ruim; 9 = muito boa)

X média

s desvio padrão

(b) Não houve diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey

(c) Houve diferença significativa entre as médias ($p < 0,01$) pelo teste de Tuckey.

Alguns autores fixaram arbitrariamente o limite de aceitabilidade de um produto como o tempo no qual ocorre uma redução de 50% do sensoriais (Shaw e Botta, 1975); Botta e Shaw, 1975). Ao nos basearmos neste critério, valores inferiores a 4,6 para aparência, sabor, textura e impressão global, assim como valores superiores a 4,6 para aparência, sabor, textura e impressão global, assim como valores superiores a 5,6 para odor estranho, seriam os limites de aceitabilidade da carne de rã congelada a -18°C . Desta forma, poderíamos dizer que a carne de rã congelada a -18°C por 182 dias ainda se mantinha em níveis aceitáveis sob o ponto de vista organoléptico.

A impressão global refletiu de forma coerente os resultados das avaliações de odor, sabor e textura.

A textura foi o atributo que apresentou maior alteração durante o congelamento da carne de rã a -18°C por 182 dias, seguida pelo odor.

Apesar de termos feito algumas inferências a respeito da aceitabilidade da carne de rã congelada por um período de 182 dias a -18°C , nada pode ser afirmado a este respeito, uma vez que aos provadores não foi pedido que se especificasse a aceitabilidade do produto.

5. CONCLUSÕES

- 1) As análises físicas de carcaça evidenciaram que o peso ao abate é de aproximadamente 160 g, sendo o rendimento de carcaça limpa de 62% e o das pernas separadas das carcaças, de 34% em relação ao peso ao abate. O rendimento das pernas em relação à carcaça limpa foi de 54%. As vísceras e cabeças juntas completaram 23% do peso ao abate o que incentivaria seu aproveitamento.
- 2) Houve boa correlação a um nível de significância de porcentagem entre: peso ao abate x peso da carcaça limpa, peso ao abate x peso das pernas e peso ao abate x peso da pele mas entre peso ao abate x peso das vísceras e peso ao abate x peso da cabeça a correlação não foi significativa a nível de 5%.
- 3) As rãs das três espécies estudadas apresentaram teor de proteína total bruta entre 16 e 17%, sendo o teor de lipídios entre 0,6 e 0,8%, evidenciando uma carne magra com bom teor de proteína. O escore químico para o músculo das rãs das três espécies estudadas demonstrou tratar-se de uma carne apresenta níveis satisfatórios de aminoácidos essenciais, sendo o padrão de aminoácidos semelhante para as 3 espécies estudadas.

- 4) A farinha de vísceras e cabeças das rãs touro apresentou em torno de 46% de proteína total bruta. O perfil de aminoácidos evidenciou ausência de cistina e a comparação com farinha de peixe, ingrediente muito comum em rações, nos leva a crer que embora os teores de alguns aminoácidos tenham se mostrado ligeiramente inferiores, esta possa ser usada como ingrediente de rações após ensaios biológicos com diferentes animais.
- 5) O perfil eletroforético das proteínas sarcoplasmáticas não apresentou alterações significativas ao longo do armazenamento, podendo ser provavelmente usado para identificação da espécie congelada, embora tenham sido evidenciadas pequenas alterações após 47 dias de armazenamento congelado a -18°C .
- 6) Houve decréscimo na solubilidade da proteína total extraível e na das proteínas miofibrilares mas não houve alteração na fração das proteínas sarcoplasmáticas durante a estocagem congelada a -18°C .
- 7) Ao longo do congelamento o teor de ácidos graxos livres aumentou concomitantemente à diminuição da solubilidade das proteínas miofibrilares.
- 8) A curva de variação do índice de peróxidos evidenciou as 3 fases da rancificação oxidativa: iniciação, propagação e terminação, como tem sido observado para outros tipos de carnes.

- 9) O pH do músculo congelado não mostrou variações sensíveis ao longo do congelamento.

- 10) Houve redução da atividade bacteriana ao longo do congelamento, uma vez que no músculo fresco a contagem total de microorganismos foi da ordem de 10^1 e no músculo congelado da ordem de 10^3 . A qualidade microbiológica da carne de rã mostrou-se adequada, no músculo fresco e congelado.

- 11) As análises sensoriais evidenciaram perda de qualidade da carne congelada para os seguintes atributos: odor, sabor, textura e impressão global. A textura e o odor se mostraram os mais indicativos de alteração. Apesar das diferenças detectáveis a nível organoléptico, as médias mantiveram-se em níveis elevados o que nos sugere que a carne estava aceitável após 182 dias de congelamento a -18°C .

BIBLIOGRAFIA

- ABCR (Associação Brasileira dos Criadores de Rãs), 1986, Comunicação Pessoal, São Paulo, Brasil.
- ACKMAN, R.G., 1974, Marine lipids and fatty acids in human nutrition. In: "Fishing Products", ed. Kreuzer, R. Fishing News (Books), London, pp. 112-131.
- ADDISON, R.F.; ACKMAN, R.G. e HINGLEY, J. 1969, Free fatty acids of herring oils. Possible derivation from both phospholipids and triglycerides in fresh herring. J. Fish. Res. Bd. Can. 26: 1577-1583.
- AGGARWAL, S.J. e RIGGS, A. 1969. The hemoglobins of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. I. Purification, aminoacid composition and oxygen equilibria. J. Biol. Chem. 244(9), 2372-2383.
- ANDERSON, M.L. e RAVESI, E.M. 1970. On the nature of the association of protein in frozen stored cod muscle. J. Food. Sci. 35: 551-558.
- ANDERSON, M.L. e STEINBERG, M.A. 1964. Effect of lipid content on protein-sodium linolenate interaction in fish muscle homogenates. J. Food Sci. 29(3): 327-330.

ANDERSON, M.L.; STEINBERG, M.A. e KING, F.J. 1965. Some physical effects of freezing fish muscle and their relation to protein - fatty acid interaction", ed., KREUZER, R. Fishing News (Books) Ltd., London.

ANDERSON, M.L.; KING, F.J. e STEINBERG, M.A. 1963. Effect of linoleic and oleic acids on measuring protein extractability from cod skeletal muscle with the solubility test. J. Food Sci. 28(3): 286-288.

ANLACHER, E. 1961. Rigor mortis in fish. In: "Fish as Food", ed. Borgstrom, G. AP, New York, 725 pp.

ANDREWS, F.; BJORKSTEIN, J. e TRENK, F.B. 1965. The reaction of autoridized lipids with proteins. J.Am. Oil Chem. Soc. 42(9): 779-781.

ANG, O.; OZEK, O.; CELTIN, E.T. e TORECI, K. 1963. Salmonella serotypes isolated from tortoises and frogs in Instambul. J. Hygiene, 71-75.

AOAC (Association of the Official Agricultural Chemists) 1980a Total nitrogen (method n^o 24027). In: Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists. 13th, Washington, 1018 pp.

AOAC (Association of the Official Agricultural Chemists) 1980b
Total nitrogen (method n^o 31012 - 31013). In: Official Methods
of Analysis of the Association of the Official Analytical Chem-
mists. 13th, Washington, 1018 pp.

ARAÚJO, G.A. 1985. Qualidade de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) enlatada elaborada a partir de matéria-prima congelada. Tese mestrado. Fac. Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

ASTM (American Society for Testing and Materials) 1968. Manual on
Sensory Testing Methods, ed. ASTM, pp. 77.

AWAD, A.; POWRIE, W.D. e FENNEMA, O. 1969. Deterioration of fresh
water white fish muscle during frozen storage at -10°C. J.
Food Sci. 34(1): 1-9.

BAINES, C.R.; CONNELL, J.J.; GIBSON, D.M.; HOWGATE, P.F.; LINGS-
TONE, E.I. e SHEWAN, J.M. 1967. In: Freezing and Irradiation
of Fish", ed. KREUZER, R. Fishing News (Books), London, p.
361.

BANKS, A. 1938. The storage of fish with special referenceto the
onsit of rancidity. I - the cold storageof herring. J. Soc.
Chem. Ind. 57: 124-128.

BANKS, A. 1966. In: "Fish oils, their chemistry, technology, sta-
bility, nutritional prosperties and uses", ed. Stansby, M.E.,
AVI Publishing Co., Westport, Conn, p. 148.

- BENDALL, J.R. 1960. Post mortem changes en muscle. In: "The structure and function of muscle", ed. Bourne, G.H. Academic Press, New York, vol. 3, pp. 227.
- BLIGH, E.G. e SCOTT, M.A. 1966. Lipids of cod muscle and the effect of frozen storage. J. Fish. Res. Bd. Can. 23(7): 1025-1036.
- BELONIAN, A. e SCHLOSSER, G.C. 1963. Adequacy of cooking procedures for the destruction of salmonellae. Am. J. Publ. Health 53: 782-791.
- BLIGH, E.G. e DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- BODWELL, C.E. e McCLAIN, P.E. 1971. Chemistry of animal tissues In: "The science of meat and meat products", ed. Price, J.F. e Schweight, B.S.; W.H. Freeman and Company, San Francisco, p. 73-74.
- BOTTA, J.R.; NOONAN, P.B. e LAUDER, J.T. 1978. Chemical and sensory analysis of ungutted offshore (nonspawning) capelin (Malloties villosus) stored in ice. J. Fish. Res. Bd. Can 35: 976-980.

- BRADDOCK, R.J. e DUGAN, L.R. Jr. 1973. Reaction of autoxidizing linoleate with Coho salmon miosin. J. Am. Oil. Chem. Soc. 50(9): 343-347.
- BREMNER, H.A. e VAIL, A.M.A. 1983. Eletrophoretic identification of fish species, or salmon on Friday but barra (on) mundi. Food Technology in Australia 35(7): 322-326.
- BRISKEY, E.J. e KAUFFMANN, R.G. 1971. Chemistry of animal tissues In: "The science of meat and meat products", ed. Price, J.F. e Schweigert, B.S. 2nd ed., Freeman, San Francisco, pp. 78-133.
- BRYAN, F.L. 1974. Microbiological food hazards today - based on epidemiological information. Food Technol. 28(9): 52-59.
- BUTTKUS, H.J. 1963. Red and white muscle of fish in relation to rigor mortis. J. Fish. Res. Bd. Can. 20(1): 45-58.
- BUTTKUS, H.J. 1967. Reaction of myosin with malonaldehyde. J. Fd. Sci. 32(4): 432-434.
- CASSENS, R.G. 1966. General aspects of post-mortem changes. In: "The physiology and biochemistry of muscle as food. Univ. of Wisconsin Press, Maddison, Wisconsin, pp. 181-196.
- CASTELL, C.H. 1971. Metal catalysed lipid oxidation and changes of proteins in fish. J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 645-649.

- CHEFTEL, J.C. e CHEFTEL, H. Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments. Vol. I, pp. 63-100, Technique et Documentation, Paris, France.
- CHEN, P.S. 1967. Separation of serum proteins in different amphibian species by polyacrilamide gel electrophoresis *Experientia* 23(6): 483:485.
- COLMENERO, F.J. e BORDERIAS, a.J. 1983. A study of effects of frozen storage on certain functional properties of meat and fish proteins. *J. Fd. Technol.* 18:731-737.
- CONNELL, J.J. 1962. Changes in amount of myosin extractable from fresh cod during storage at -14°C. *J. Sci. Fd. Agric.* 13(11): 607-617.
- CONNELL, J.J. e HOWGATE, P.F. 1968. Sensory and objective measurements of the quality of frozen stored cod of different initial freshness. *J. Sci. Food Agric.* 19(6): 342-354.
- CONNELL, J.J. e HOWGATE, P.F. 1968. Sensory and objective measurements of the quality of frozen stored haddock of different initial freshness. *J. Sci. Food Agric.* 20(8): 469-476.
- CONNELL, J.J e HOWGATE, P.F. 1969. In: *Fish Inspection and quality control*", ed. Kreuzer, R. Fishing News (Books), London, pp. 221.

- COWIE, W.P. e LITTLE, W.T. 1966. The relationship between toughness of cod stored at -29°C and its muscle protein solubility and pH. *J. Fd. Technol.* 1: 335-343.
- CURRAN, C.A.; AMES, G.R. e JONES, N.S.D. 1986. Frozen storage life of the Bolivian fish, sabalo (*Prochilodus platensis*). *J. Fd. Technol.* 21: 471-475.
- DAMIANI, P. e ROSSI, A. 1985. Modificazioni dei traccianti elettroforetici delle proteine caratterizzanti le specie ittiche, in campioni parzialmente avariati. *Industrie Alimentari* 1:93-97.
- DAVIDKOVA, E. e KHAN, A.W. 1967. Changes in lipid composition of chicken muscle during frozen storage, *J. Food. Science* 32(1): 35-37.
- DAVIS, B.I. 1964. Disc electrophoresis - Parte II - Method and application to human serum proteins. *Ann, N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- DE FREMERY, D. e POOL, M.F. 1960. Biochemistry of chicken muscle related to rigor mortis and tenderization. *Food. Res.* 25: 73-87.
- DESAI, I.D. e TAPPEL, A.L. 1963. Damage to protein by peroxidized lipids. *J. Lipid Res.* 4(2): 204-207.

- DEVADASAN, K. e RAJENDANATHAN NAIR, M. 1980. A note on the proteins of frog leg muscle. *Science and Culture*. 46(2): 51-52.
- DUGAN, Jr., L.R. 1976. Lipids In: "Principals of Food Science", ed. Fennema, O.R., Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 161-171.
- DYER, W.J. 1951. Protein denaturation in frozen and stored fish. *Food Res.* 16: 522-527.
- DYER, W.J. e FRASER, D.I. 1959. Proteins in fish muscle. 13 Lipid hydrolysis. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 16(1): 43:52.
- DYER, W.J.; FRASER, D.I.; MAC INTOSH, R.G. e MYER, M. 1964. Cooking method and palatability of frozen cod fillets on various qualities. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 21(3): 577-589.
- DYER, W.J.; FRENCH, H.V. e SNOW, J.M. 1950. Proteins in fish muscle. I. Extraction of protein fractions in fresh fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 7(3): 585-593.
- DYER, W.J. e MORTON, M.L. 1956. Storage of frozen plaice fillets. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 13(1) 129-134.
- DYER, W.J.; MORTON, M.L.; FRASER, D.I. e BLIGH, E.G. 1956. Storage of frozen rosefish fillets. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 13(4): 569-579.

ESKIN, N.A.M.; HENDERSON, H.M. e TOWNSEND, R.J. 1971. Biochemical changes in foods: meat and fish. In: "Biochemistry of Foods". Academic Press (London), pp. 3-7.

FARBER, L. 1965. Freshness test. In: "Fish as food", ed. Borgstrom, G. Academic Press, New York, vol. IV, parte, pp. 70-93.

FENNEMA, O.R. 1976. Principals of Food Science, Part 1 - Food chemistry. Marcel Dekker, Inc., New York, 792 pp.

FENNEMA, O.R. e POWRIE, W.D. 1964. Fundamentals of low temperature food preservation. Advan. Food Res. 13: 219-347.

FENNEMA, O.R.; POWRIE, W.D. e MARTH, E.L. 1973. Characteristics of food myosystems and their behaviour during freeze preservations. In: "Low temperature preservation of food and living matter". Marcel Dekker Inc., New York, pp. 282-351.

FIBGE, 1981. Tabela de composição de alimentos. ENDEF (Estudo Nacional da Despesa Familiar), IBGE.

FONTANELLO, D.; ARRUDA SOARES, H. e CORRÊA DA SILVA NETO, B. 1981. Avaliação e rendimento de carcaças de rãs touro (*Rana catesbeiana*) provenientes de Juquitiba e destinadas à comercialização. Bol. Inst. Peca. 8: 111-118.

FROST, D.R. 1985. Amphibian species of the world a taxonomic and geographical reference. pp. 245-247.

- FROUIN, A. 1975. Analyse des protéines par électrophorese. Revue Française de Corps Gras. 4:199-204.
- GORGALA, D.L. e HURST, A. 1963. The survival of food poisoning bacteria in frozen food. J. Appl. Bact., 26: 346-358.
- GOULD, E. e PETERS, J.A. 1971. On testuting the freshness of frozen fish. Fishing News (Books), London, pp. 366.
- GREIG, R. A. 1968. Extending the shelf life of frozen white bass (*Roccus chrysops*) through the use of ascorbic acid dips. Fish. Ind. Res. 4: 23-27.
- GUNDERSON, M.F. e ROSE, K.D. 1948. Survival of bacteria in a pre-cooked fresh-frozen food. Food Res. 13: 254-263.
- HAMM, R. 1960. Biochemistry in meat hydration. Advan. in Food Res. 10: 355-463.
- HAMOIR, G. e REUTER, A. 1956. Isolement et propriétés de la myosine de grenouille. Biochim. e Biophys. Acta 21: 24-34.
- HANSON, S.W.F. e OLLEY, J. 1965. Observations on the relationship between lipids and protein deterioration. In: "Technology of Fish Utilization". ed. KREUZER, R. Fishing News (Books), London.

- HIRABAYASHI, T. e HAYACHI, Y. 1970. Studies on muscle differentiation. I. Isolation and purification of structural proteins from leg muscles of the frog, *Rana nigromaculata*. *Develop. Growth Diff.* 12(2): 89-107.
- INGRAM, M. 1951. The effect of cold on microorganisms in relation to food. *Proc. Soc. Appl. Bact.* 14: 243-273.
- JARENBACK, L. e LILJEMARK, A. 1975. Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua* L.) III Effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxides on myofibrillar proteins. *J. Fd. Technol.* 10: 437-452.
- JAY, J.M. 1978. Food preservation by use of low temperatures. In: "Modern Food Microbiology" ed. Jay, J.M. D. Van Nostrand Co., New York, pp. 219-222.
- JEBSEN, J.W. Proteins in fish muscle. In: "Fish in Nutrition". Ed. Kreuzer, R. Fishing News (Books), London, pp. 68-72.
- KANG, J.O., ITO, T. e FUZUZAWA, T. 1983. Effect of frozen storage on the structure and enzymatic activities of myofibrillar proteins of rabbit skeletal muscle. *Meat Science*, 9: 131-144.
- KAREL, M. 1975. Water activity and food preservation. In: "Principals of food science", part II, ed. Karel, M.; Fennema, O.R. e Lund, D.B.; Marcel Dekker Inc., New York, 474 pp.

- KE, P.J.; ACKMAN, R.G.; LINKE, B.A. e NASH, D.M. 1977. Oxidative rancidity in frozen mackerel J.Fd. Technol 12(1): 37-47.
- KELLY, K.O.; JONES, N.R.; LOVE, R.M. e OLLEY, J. 1966. Texture and pH in fish muscle related to "cell fragility" measurements. J. Fd. Technol. 1: 9-15.
- KERSHAW, S.J. 1986. Comparasion of two standards methods for determination of free fatty acids content in oils extracted from oil seed and vegetable oils. J. Sc. Food. Agric. 37(3): 267-272.
- KHAN, A.W. e VAN DEN BERG, L. Changes in chicken muscle proteins during aseptic storage at above freezing temperatures. J. Fd. Sci. 29(1), 49-52.
- KINSELLA, J.E.; KAN, T.M.; SHETTY, J.K. e MAI, J. 1980. Protein and aminoacid composition of select freshwater fish. J. Agric. Food Chem. 28: 884-885.
- KING, F.J.; ANDERSON, M.L. e STEINBERG, M.A. 1962. Reaction of cod actomiosin with linolenic and linoleic acid. J. Food Sci. 27(4): 363-366.
- KIRIAKOPOULOU - SKLAVAVOUNOV, P. 1980. Plasma albumin patterns of the species *Rana cildibunda* in Greece. Experientia 36(10): 1171-1172.

- KISLAITIS, L.M.; STEINFELD, M.I. e SIEDLER, A.J. 1962. Nutrient content of variety meats. I. Vitamin A, vitamin C, iron and proximate composition. J. Food Sci. 27 (5): 459-462.
- KOOPMAN, J.P. e JANSEN, F.G.S. 1973. The occurrence of salmonellas and lactose - negative Arizonas in reptiles in the Netherlands, and a comparison of three enrichment methods used in their isolation. J. Hygiene 71: 363-369.
- KUKENTHAL, W., MATTHES, E. e RENNER, M. 1969. Guia dos Trabalhos Práticos de Zoologia. Atlântica Edit. S.A.R.L., Coimbra, 15a. Ed. XVI, 472.
- KUWON, T.W. e OCCOTT, H.S. 1965. Reactivity of malonaldeyde with food constituents. J. Fd. Sci. 30(6): 808-813.
- LABUZA, T.P. 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. CRC Critical Reviews in Food Technology 2(3): 355-405.
- LANE, J.P. 1966. Finne - temperature tolerance of low temperature food preservation. Adwan. Food. Res. 13: 219-347.
- LAUDER, J.T.; MacCALLUM, W.A. e IDLER, D.R. 1970. Keeping time of frozen redfish (*sibastes_marinuss_mentella*) fillets in relation to handling of the raw material and storage temperatures after processing and freezing. J. Fish. Res. Bd.Can. 27: 1589-1609.

LANE, J.P. 1970. Recommendations for the sanitary operation of plants that process fresh and frozen fish. Fishing Ind. Res. 5(2): 63-82.

LEWIS, C.W. 1968. Myosin, heavy meromyosin, and actomyosin of the frog, *Rana pipilins*; a biochemical and immunological characterization. Diss. Abstr. B., 29(5): 1560.

LEWIS e LOWE, 1970. Automated aminoacid analysis of feed stuff using the Thec NC-2P. New South Wales Dep. of Agriculture.

LIMA, S.L. 1982. Comunicação oral. 34a. Reunião da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progreso da Ciência), Campinas, SP.

LOWRY, D.H.; ROSEBOROUGH, N.J.; FARR, A.L. e RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

MACCALLUM, W.A., JAFFRAY, J.I; CHURCHILL, D.N. e IDLER, D.R. 1968. Condition of new foundland trap caught cod and its influence on quality after single and double freezing. J. Fd. Res. Bd.Can. 25(4): 733-755.

- MAC DONALD, V.W. 1974. Spectrophotometric studies on the pH of frog skeletal muscle. Diss. Abstr. Int. B34 (11). 5634-5 (Chemical Abstracts 133/25, 1981).
- MACKIE, I.M. 1969. Identification of fish species by a modified polyacrylamide disc electrophoresis Technique J. Assoc. Publ. Anal. 7:83-87.
- MACKIE, I.M. 1972. Some improvements in the polyacrylamide disc electrophoretic method of indentifying the species of cooked fish. J. Assoc. Publ. Anal. 10:18-20.
- MC NULLIN, G.F.; SMITH, S.C. e WRIGHT, P.A. 1966. Tissue fatty acid composition in four diverse vertebrate species. Comp. Biochem. Physiol. 26:211-217.
- MATSUMOTO, J.J. 1980. Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. In: "Advances in Chemistry Series", nº 180, pp. 205-224.
- MELNICK, R.L. e HULTIN, H.O. 1973. Studies on the nature of the subcellular localization of lactate dehydrogenase and glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase in chicken skeletal muscle. J. Cell. Physiol. 81(1): 139-147.

- MILLS, A. 1975. Measuring changes that occur during frozen storage of fish - a review - J. F. Technol. 10: 483-496.
- MOORJANI, M.N.; MONTGOMERY, W.A. e COOTE, G.G. 1960. Correlation of taste panel gradings with salt-extractable protein of frozen.
- MORRISON, W.R. 1964. A fast, simple and reliable method for the microdetermination of phosphorus in biological materials. Anal. Biochem. 7:218-222.
- MURALIDHARA RAO, N.; PADMABAI, R.; NARASIMHAN, K.; THOMAS JOSEPH, K.; SANTAPPA, M. e NAYUDAMMA, Y. 1976. Studies on growth response of broiler chicken to frog meal as a substitute to fish meal. J. of Poultry Sci. 11(2): 102-107.
- MIYAUCHI, D. 1962. Application of centrifugal method for measuring shrinkage during the thawing and heating of frozen cod fillets. Food. Technol. 16(1): 70-72.
- MIYAUCHI, D. 1963. Drip formation in fish. I- A review of factors affecting drips. Fishing Ind. Res. 2: 61-79.
- NARAYAN, K.A. e KUMMEROW, F.A. 1958. Oxidized fatty acid - protein complexes. J. Am. Oil. Chem. Soc. 35(1): 52-56.

- NARAYAN, K.A.; SUGAL, M. e KUMMEROW, F.A. 1964. Complex formation between oxidized lipids and egg albumin. J. Am. Oil Chem. Soc. 41: 254-259.
- NEUBOLD, R.P. 1966. Changes associated with rigor mortis. In: "The physiology and biochemistry of muscle as food", ed. Briskey, E.J., Cassens, R.G. e Trautman, J.C. Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, pp. 213-224.
- NICKELSON, R.; LAWRENCE, E.W. e VANDERZANT, C. 1975. Reduction of Salmonella contamination in commercially processed frog legs. J. Food. Sci. 40(6): 1239-1241.
- NIKKILX, O.E. e LINKO, R.R. 1956. Freezing, packaging frozen storage of fish. Fd. Res. 21(2): 42-46.
- NISHIDA, T. e KUMMEROW, F.A. 1960. Interaction of serum lipid proteins with the hydroperoxides of methyl linoleate. J. Lipid Res. 1(5): 450-458.
- N.R.C. (National Research Council - U.S.) 1971. Nutritional Requirements of Domestic Animals, ed. National Academy of Science, Washington D.C., no 1, pp. 15.
- OLLEY, J. e DUNCAN, W.R.H. 1965. Lipids and protein denaturation in fish muscle. J. Sci. Food. Agric. 16(2): 99-104.

- OLLEY, J. e LOVERN, J.A. 1960. Phospholipid hydrolysis in cod flesh stored at various temperatures. J. Sci. Food Agric. 11(11): 644-651.
- OLLEY, J.; PIRIE, R. e WATSON, H. 1962. Lipase and phospholipase activity in fish skeletal muscle and its relationship to protein denaturation. J. Sci. Food. Agric. 13(10): 501-516.
- OTA, F.; HASHIMO, K. e MURAKAKAMI, T. 1973. The nature of liquid portion in frozen fish muscle. Refrigeration 48(543): 25-30.
- PARTMAN, W. 1963. Post mortem changes in chilled and frozen muscle. J. Food. Sci. 28(1): 15-27.
- PATHAK, S.P. e AGRAWAL, B.C.L. 1966. Component fatty acids of body, depot, liver and visceral fats of the Indian frog (Rana tigrina). Indian J. of Exp. Biol. 4(4):248-249.
- PAWAR, S.S. e MAGAR, N.G. 1966. Chemical changes during frozen storage of pomphrets, mackerel and sardines. J. Food Sci. 31(1): 87-93.
- PEARSON, D. 1973. Laboratory techniques in food analysis Halsted Press, John Wiley and Sons, Inc., New York, 315 pp.
- PEDRAJA, J.J. 1970. Change of composition of shrimp and other marine animals during processing. Food Technol. 24: 1355-1360.

- PEDRAJA, J.J. 1972. Quality aspects of refrigerated and frozen fishery products. ASHRAE Journal, nov., 52-57.
- PETERS, J.A.; MACCALLUM, W.A.; DYER, W.J.; IDLER, D.R.; SLAVIN, J.W.; LANE, J.P.; FRASER, D.I. e LAISHLEY, E.J. 1968. Effect of stage of rigor and of freezing thawing processes on storage quality of refrozen cod. J. Fish, Res. Bd. Can. 25(2): 299-320.
- PRIDY, J.M. e CULLEY Jr., D.D. 1971. A indústria da cultura da rã - passado e presente. In: "Proceedings of the Animal Conference South - Eastern Association of Game and Fish Commissioners", 25, Charleston, South Carolina, pp. 597-601.
- RAMAKRISHNAN, Y. e BARNABAS, J. 1967. Species similarity and variation in hemoglobin. Indian J. Biochem. 4(2): 103-106.
- REICHEL, A. 1969. Investigations of lymph proteins of amphibian, *Rana esculenta*, by zone electrophoresis on several supporting media. Comp. Biochem. Physiol. 28: 1367-1375.
- ROACH, D. e GEHRKE, C.W. 1970. The hydrolysis of proteins. J. Chromatography 52: 393-404.
- ROUBAL, W.T. e TAPPEL, A.L. 1966. Polymerization of proteins induced by free radical lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys 113(1): 150-154.

- SARVAVEDA, A. e SRIKAR, L.N. 1982. Changes in fatty acids of frog legs during frozen storage. J. Fd. Technol, India 17(1): 79-85.
- SAYRE, R.N. e BRISKEY, E.J. 1963. Protein solubility as influenced by physiological condition in the muscle. J. Food. Sci. 28(6): 675-679.
- SCOPES, R.K. 1964. The influence of post mortem conditions on the solubilities of muscle proteins. Biochem. J. 91: 201-207.
- SHEWAN, J.M.; MACINTOSH, R.G.; TUCKER, C.G. e ERENBERG, A.S.C. 1953. The development of a numerical scoring system for the sensory assessment of the spoilage of wet white fish stored in ice, J. Sci. Food. Agric. 4: 238-298.
- SHAW, D.H. e BOTTA, J.R. 1975. Preservation studies of inshore male capelin (Mallotus villosus) stored in ice. J. Fish. Res. Bd. Can. 32(11): 2039-2046.
- SHIDU, G.S.; MONTGOMERY, W.A. e BROWN, M.A. 1974. Post mortem changes and spoilage in rock lobster muscle. I. Biochemical changes and rigor mortis in Jasus hollandiae. J. Fd. Technol. 9:357-370.
- SNEDCOR, G.W.; COCHRAN, W.G. 1967. Estatistical Methods. 6a. Ed. The Iowa State Univ. Press. U.S.A., pp. 172-198, 557.

- SNOW, J.M. 1950. Proteins in fish muscle. II - Colorimetric estimation of fish muscle protein. J. Fish. Res. Bd. Can. 7(10): 594-598.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. e MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30(7): 1190-1206.
- SPECK, M.L. 1976. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA, pp. 107-118, 301-327, 374-385.
- SPIES, P.G. 1967. Determination of triptophan in proteins. Anal. Chem. 39(12): 1412-1416.
- STANSBY, M.E. 1944. Determining volatile bases in fish (comparison of precision of certain methods). Ind. Eng. Chem. 16: 593:596.
- STANSBY, M.E. 1962. Proximate composition of fish. In: "Fish in Nutrition", ed. Hern, E. e Kreuzer, R., London, Fishing News (Books), pp. 55-57.
- SUMNER, J.L. e NEALY, S.W. 1983. A survey of substitution of fish fillets in Melbourne. Food Technology in Australia. 35(7): 332-334.

- TANESCU, D. 1967. Separation of sarcoplasmatic proteins of frog gastrocnemius on DEAE - sephadex and their ultraviolet absorption spectra. Rev. Roum. Biochem. 4(2): 143-154.
- TARR, H.L.A. 1966. Post mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates and sugar in fish muscles. A review. J. Food Sci. 31(6) 846-854.
- TATCHER, F.S. e CLARK, D.S. 1968. Microorganisms in Foods. Univ. of Toronto Press, pp. 25-29.
- TENTORI, L. 1968. Hemoglobins of *Amblyostoma tigrinum* and of *Rana esculenta*. Comparative study on their primary structure. Biologia (Bratislava) 23(12): 945-948.
- TENTORI, L.; VIVALDI, G.; CARTA, S. e SORCINI, M. 1967. Hemoglobin of Amphibia. VI - Peptide composition of *Rana esculenta* hemoglobin. G. Biochem. 16(2) 83-91.
- TORRY RESEARCH STATION. 1967. Cold storage of frozen fish Torry Advisory Note 28: 1-11, Aberdeen, Escocia.
- UMEMOTO, S. 1972. "Fundamentals of chemical experiments. In: "Utilization of marine products" ed. Okada, M., Tokyo, Oversean Technical Cooperation Agency, pp. 147-159.

USHAKOV, B.P. 1966. The problem of associated changes in protein thermostability during the process of speciation. *Meiresunter-suchgen.* 14: 466-481.

VIZOTTO, L.D. 1975. *Ranicultura.* São José do Rio Preto. 41 p.

VOROB'EVA, T.M. 1969. *Rybnoe Khozjajstvo* 47(4)77. *Food. Sci. Technol. Abst.* 3, 12R 533.

VYNKE, W. 1973. Evaluation of the direct thio-barbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scomber* L.). Expert Committee on Fish and Shellfish Hygiene, FAO/WHO, Geneva, september, 1973.

YAMAMOTO, K.; SAMEJIMA, K. e YASUI, T. 1977. A comparative study of the changes in hen pectoral muscle during storage at 4°C and -20°C. *J. Fd. Sci.* 42(6): 1642-1645.

WATANABE, K. 1965. Sardinha congelada: alterações durante o armazenamento a -18°C. *Inst. Ocean. USP,* 207: 1-12.

WELLS, J.G.; CKARK, G. C. e MORRIS, G.K. 1974. Evaluation of methods for isolating *Salmonella* and *Arizona* microorganismos from pet turtles. *Appl. Microbiol.* 27(1): 8-10.

WIERBIKI, E.; KUNKLE, L.E., CAHILL, V.R. & DEATHERAGE, F.E. 1956.

Post rigor changes in meat and their possible relation to tenderness together with some comparisons of meat from heifers, bulls, steers and diethylestebestriol - treated bulls and steers. *Fd. Technol.* 10: 80-86.

ZATSEV, V.; KIZEVETTER, I.; LAGUNOV, L.; MARAKOVA, T.; MINDER, L.; PODSEVALOV, V. Characteristics of fish as a raw material for industry. In: "Fish curing and processing". MIR Publishers, Moscow, 1969, pp. 17-97.

ANEXO 1

Eletroforese

Soluções utilizadas:

- | | | |
|---|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| a | - Hcl 1N - 48 ml
TRIS - 36,6 g
TEMED - 0,23 ml | Completar com água para 100 ml
Ajustar o pH para 8,9 |
| b | - Hcl 1N - 48 ml
TRIS - 5,98 g
TEMED - 0,46 ml | Completar com água para 100 ml
Ajustar o pH para 6,7 |
| c | - Acrilamida - 28 g
BIS - 0,735 g | Completar o volume para 100 ml |
| d | - Acrilamida - 10 g
BIS - 2,5 g | Completar para 100 ml |
| e | - Riboflavina - 4 mg | Completar o volume para 100 ml |
| f | - Solução de sacarose 40% | |

Persulfato de amônia - 0,14%

Corante 1,25 g Comassie blue
454 ml de metanol 50%
46 ml de ácido acético glacial

Solução para descolorir 75 ml de ácido acético glacial
250 ml de metanol
675 ml de água destilada

Preparação dos géis

Gel inferior	1 parte de A 2 partes de C 1 parte de H ₂ O	Colocar a mesma quantidade de persulfato de amônia
Gel superior	1 parte de B 2 partes de D 1 parte de E 4 partes de F	

ANEXO 2

Nome _____ Data _____

Por favor, prove as amostras abaixo e dê sua opinião a respeito da aparência, odor, sabor, textura e impressão global, usando um traço vertical na escala correspondente.

1- APARENCIA	Muito Ruim	Muito Boa
_____	_____	_____
_____	_____	_____
2- ODOR ESTRANHO	Ausência	Muito Intenso
_____	_____	_____
_____	_____	_____
3- SABOR	Muito Ruim	Muito Bom
_____	_____	_____
_____	_____	_____
4- TEXTURA	Não Característica	Característica
_____	_____	_____
_____	_____	_____
5- IMPRESSAO GLOBAL	Muito Ruim	Muito Boa
_____	_____	_____
_____	_____	_____