

Composição em Nutrientes e  
Caracterização das Proteínas  
do Filé do Pacu  
(*Colossoma mitrei*, Berg 1895)

30/89

Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Composição em Nutrientes e  
Caracterização das Proteínas  
do Filé do Pacu  
(*Colossoma mitrei*, Berg 1895)

Maristela Gonçalves Sousa Machado  
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título  
de Mestre em Ciências de Alimentos

Campinas - SP  
1989

Pacu  
Este exemplar corresponde a edição final da  
tese defendida por Maristela Gonçalves Sousa  
Machado e aprovada pela comissão julgadora  
em 06-12-89.  
Campinas, 06 de dezembro de 1989.

Valdemiro C. Sgarbieri

## Banca Examinadora



---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
orientador

---

Prof. Dra. Délia Rodriguez-Amaya  
membro



---

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira  
membro



---

Prof. Dr. Emilio Segundo Contreras  
membro

Campinas, de dezembro de 1989.

Há uma idade em que se ensina o que se sabe; mas surge em seguida uma outra em que se ensina o que se não sabe: a isso se chama *procurar*. Chega agora, talvez, a idade de uma outra experiência: a de *desaprender*, de deixar germinar a mudança imprevisível que o esquecimento impõe à sedimentação dos saberes, das culturas, das crenças que atravessamos. Essa experiência tem, creio eu, um nome ilustre e fora de moda que ousarei aqui arrebatrar, sem complexos, à própria encruzilhada de sua etimologia: *Sapientia*: nenhum poder, um pouco de *saber*, um pouco de *sabedoria* e o máximo de *sabor* possível.

*Roland Barthes*

## Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pela orientação desta tese, pela oportunidade de aprendizado e por ter demonstrado compreensão e solidariedade em vários momentos particularmente difíceis.

Gostaria de agradecer a contribuição valiosa dos Professores Doutores Délia Rodriguez-Amaya, Admar Costa de Oliveira, Emílio Segundo Contreras, Regina B. Franco e Aloísio José Antunes, os quais através de sugestões e idéias muito colaboraram para a realização deste trabalho em diferentes etapas.

Desejo expressar a minha gratidão ao Prof. Everardo Lima Maia pela estimulante troca de idéias e inúmeras informações técnicas, à Roseli Aparecida Ferrari, pela assistência na cromatografia gasosa, bem como aos funcionários e colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, particularmente do Laboratório de Bioquímica Nutricional, que contribuíram para a realização desta tese. A Liana Dawood, em especial, agradeço pela atenção de grande companheira.

Ao Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura de Pirassununga (SP), ao Dr. Laerte Batista de Oliveira, seu diretor geral e em especial ao Dr. José Oswaldo Junqueira Mendonça e ao Dr. José Augusto Ferraz de Lima o meu reconhecimento pelo fornecimento de amostras, assim como ao Frigorífico Tavares na pessoa de seu diretor-presidente, o Sr. Antônio Tavares.

Ao CNPq e à FAPESP expresso minha gratidão pela concessão de bolsas de estudos e à ABIA pela colaboração na impressão deste trabalho.

A Manuel, Ivone e Manuel, três vértices do meu horizonte, dedico o meu agradecimento por serem, sempre, a expressão viva da energia, da cumplicidade e do amor incondicional.

Ao Aluísio, agradeço por, simplesmente, saber ser tudo em todos os momentos.

# Índice

Lista de Tabelas	vi
Lista de Figuras	vii
Resumo	viii
Summary	x
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Revisão da Literatura</b>	<b>4</b>
2.1 Aspectos gerais do pacu . . . . .	4
2.2 Composição química . . . . .	5
2.2.1 Composição centesimal . . . . .	5
2.2.2 Composição em minerais . . . . .	8
2.2.3 Composição em ácidos graxos . . . . .	8
2.2.4 Composição em aminoácidos . . . . .	10
2.3 Caracterização físico-química e nutricional das proteínas de pescado . . . . .	12
2.3.1 Extração e fracionamento das proteínas do filé . . . . .	12
2.3.2 Digestibilidade protéica <i>in vitro</i> . . . . .	13
2.3.3 Eletroforese . . . . .	14
2.3.4 Experimentos biológicos . . . . .	15
<b>3 Materiais e Métodos</b>	<b>17</b>
3.1 Material . . . . .	17
3.2 Preparação da amostra . . . . .	17
3.3 Determinação da composição química . . . . .	17
3.3.1 Determinação da composição centesimal aproximada . . . . .	17
3.3.2 Determinação da composição em minerais . . . . .	18
3.3.3 Determinação da composição em ácidos graxos . . . . .	18
3.3.3.1 Extração e concentração dos lipídios . . . . .	18
3.3.3.2 Metilação dos ácidos graxos . . . . .	18
3.3.3.3 Cromatografia gasosa . . . . .	18
3.3.3.4 Quantificação e identificação dos ácidos graxos . . . . .	19

3.3.4	Determinação da composição em aminoácidos . . . . .	20
3.3.4.1	Hidrólise . . . . .	20
3.3.4.2	Cromatografia de troca iônica . . . . .	20
3.3.4.3	Identificação e quantificação dos aminoácidos	20
3.4	Caracterização físico-química e nutricional das proteínas . . .	20
3.4.1	Extração e fracionamento das proteínas do filé . . . . .	20
3.4.2	Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i> . . . . .	21
3.4.3	Eletroforese . . . . .	22
3.4.3.1	Eletroforese simples em gel de poliacrilamida	22
3.4.3.2	Eletroforese em gel contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) . . . . .	23
3.4.4	Experimentos biológicos . . . . .	24
3.4.4.1	Preparo das dietas . . . . .	24
3.4.4.2	Índices baseados no balanço metabólico . . .	27
3.4.4.3	Quociente de eficiência protéica (PER) . . . .	28
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>29</b>
4.1	Determinações químicas . . . . .	29
4.1.1	Composição centesimal aproximada . . . . .	29
4.1.2	Composição em minerais . . . . .	31
4.1.3	Composição em ácidos graxos . . . . .	32
4.1.4	Composição em aminoácidos . . . . .	36
4.2	Extração e fracionamento das proteínas do filé . . . . .	36
4.3	Digestibilidade <i>in vitro</i> da proteína total do filé de pacu . . . .	38
4.4	Eletroforese . . . . .	38
4.5	Experimentos biológicos . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>50</b>
	<b>Apêndice 1</b>	<b>60</b>
	<b>Apêndice 2</b>	<b>63</b>

## Lista de Tabelas

1	Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos. . . . .	25
2	Formulação da mistura salina utilizada nos ensaios biológicos, segundo Hegsted et alii (1941). . . . .	25
3	Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo a <i>Nutritional Biochemicals Corporation</i> (1977-78). . . . .	26
4	Dados sobre os espécimes ( <i>Colossoma mitrei</i> ) utilizados na determinação centesimal aproximada do filé. . . . .	30
5	Composição centesimal aproximada do filé do pacu ( <i>Colossoma mitrei</i> ). . . . .	30
6	Composição em minerais do filé do pacu ( <i>Colossoma mitrei</i> ). . . . .	32
7	Composição dos principais ácidos graxos do filé do pacu ( <i>Colossoma mitrei</i> ). . . . .	33
8	Composição em aminoácidos (g/16gN) da proteína do filé do pacu ( <i>Colossoma mitrei</i> ) e do padrão de referência para uma proteína de alta qualidade, segundo o <i>National Research Council</i> (1980). . . . .	37
9	Porcentagem das frações sarcoplasmática e miofibrilar do pacu ( <i>Colossoma mitrei</i> ). . . . .	38
10	Digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do filé do pacu ( <i>Colossoma mitrei</i> ). . . . .	39
11	Balanço de nitrogênio, digestibilidade aparente, valor biológico, taxa de utilização líquida da proteína (NPU), quociente de eficiência protéica (PER) em ratos Wistar alimentados com caseína, farinha integral de filé de pacu e farinha desengordurada como fonte de proteína. . . . .	44

## Lista de Figuras

1	Cromatograma dos ácidos graxos do pacu. . . . .	34
2	Eletroforese simples em gel de poliacrilamida das proteínas sarcoplasmáticas do filé do pacu. . . . .	41
3	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) das proteínas da fração sarcoplasmática do filé do pacu. . . . .	42
4	Curva padrão (reta de regressão) obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS entre pesos moleculares e mobilidades relativas. . . . .	43
5	Variação do peso médio dos ratos Wistar recém-desmamados em dietas à base de caseína, farinha integral e farinha desengordurada de pacu em experimento ao longo de 28 dias. . . .	47
6	Consumo médio de dietas à base de caseína, farinha integral e farinha desengordurada de pacu dos 3 grupos de ratos Wistar recém-desmamados em experimento ao longo de 28 dias. . . .	48

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo obter algumas informações sobre a composição centesimal e de nutrientes e caracterização das proteínas do filé do pacu (*Colossoma mitrei*, Berg 1895) visando uma ampliação dos conhecimentos desta espécie que vem sendo bastante visada pela piscicultura brasileira.

A composição centesimal obtida de 6 amostras obtidas em diferentes épocas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura de Pirassununga (SP) e em frigoríficos comerciais de Campinas (SP) foi a seguinte: umidade,  $67,7 \pm 0,9$ ; proteínas,  $13,0 \pm 0,3$ ; lipídios totais,  $17,2 \pm 0,6$  e cinzas,  $1,3 \pm 0,1$ .

Fósforo, potássio e cálcio foram os minerais predominantes com 121,5; 118,4 e 55,2 mg/100g de filé.

Por cromatografia gasosa foram encontrados como principais ácidos graxos da fração lipídica os ácidos oléico (42,85%), palmítico (22,68%), linoléico (10,30%), palmitoléico (8,95%), esteárico (8,15%), mirístico (2,72%) e linolênico (1,76%).

A composição em aminoácidos determinada por cromatografia de troca iônica destaca o pacu como boa fonte de histidina (2,24g/16gN), lisina (10,05g/16gN), leucina (8,75g/16gN), isoleucina (4,25g/16gN), treonina (3,82g/16gN), fenilalanina (4,29g/16gN) e metionina (2,79g/16gN).

A extração das proteínas do filé com uma solução de NaCl 5% e pH 7,2 foi de 92,0% da proteína total, sendo que, desta fração, 64,3% era constituída por proteínas miofibrilares e 25,0% por proteínas sarcoplasmáticas, em relação à proteína total.

A digestibilidade *in vitro* da proteína determinada pela incubação seqüencial com pepsina e pancreatina forneceu um valor de 84,3%.

A eletroforese simples das proteínas sarcoplasmáticas em gel de poli-acrilamida revelou 6 bandas e a eletroforese em gel de poli-acrilamida contendo SDS (dodecil sulfato de sódio), 8 bandas cujos pesos moleculares encontram-se entre 4 e 150 Kd.

A avaliação nutricional foi feita em farinha de músculo integral e desengordurado de pacu, utilizando-se ratos em crescimento de linhagem Wistar. Esta avaliação foi realizada através da determinação do PER e do balanço de nitrogênio. Os valores encontrados para a farinha integral foram: PER, 2,94; digestibilidade aparente da proteína, 90,0%; valor biológico (VB),

82,8% e utilização líquida da proteína (NPU), 74,6%. Para a farinha desengordurada: PER, 3,00; digestibilidade aparente, 84,3%; VB, 82,5% e NPU, 69,5%.

A partir destes resultados concluiu-se que o pacu pode ser considerado como um alimento protéico e energético, não constituindo uma boa fonte de minerais.

Sua fração lipídica apresenta os ácidos oléico, palmítico e linoléico como os ácidos graxos de maior concentração, sendo que a proporção entre teores de ácidos graxos insaturados e saturados é de 1,9. Tal perfil enquadra-se no que é característico dos peixes de água doce.

Quanto à fração protéica, o pacu revela-se uma boa fonte de aminoácidos essenciais, particularmente de lisina e metionina. A partir de experimentos biológicos constatou-se que, considerando o nível de significância de 5%, os quocientes de eficiência protéica (PER) calculados para rações à base de farinha de filé integral e farinha de filé desengordurado não diferiram daqueles calculados para a caseína. Comparativamente à caseína, a farinha de filé integral apresentou valor biológico inferior, sendo que os demais índices baseados no balanço de nitrogênio (digestibilidade aparente e utilização líquida da proteína) não mostraram diferença significativa. A farinha de filé desengordurado apresentou valores inferiores aos da caseína para todos os índices baseados no balanço de nitrogênio.

## Summary

The present work was undertaken with the aim of obtaining some information about pacu (*Colossoma mitrei*, Berg 1895) in terms of its chemical composition, protein characterization and nutritional evaluation. This fish is visualized as a very interesting species in Brazilian aquaculture programs.

The proximate composition of the edible portion of pacu, based on 6 samples collected at different periods from the Pirassununga Fish Culture Research Station (SP) and from a local fish wholesale distributor was: moisture,  $67.7 \pm 0.9$ ; protein,  $13.0 \pm 0.3$ ; lipids,  $17.2 \pm 0.6$  and ash,  $1.3 \pm 0.1$ .

Phosphorus, potassium and calcium averaging 121.5, 118.4 and 55.2 mg/100g filet were the predominant mineral components.

Fatty acids were detected by gas chromatography of which the principal components were oleic (42.85%), palmitic (22.68%), linoleic (10.30%), palmitoleic (8.95%), stearic (8.15%), miristic (2.72%) and linolenic (1.76%).

The aminoacid composition determined by ion exchange chromatography revealed that pacu is a good source of histidine (2.24g/16gN), lysine (10.05g/16gN), leucine (8.75g/16gN), isoleucine (4.25g/16gN), threonine (3.82g/16gN), phenylalanine (4.29g/16gN) and methionine (2.79g/16gN).

The extraction and fractionation of the proteins of the edible portion with a 5% NaCl solution allowed the extraction of 92.0% soluble protein. From this portion myofibrillar fraction and sarcoplasmatic fraction accounted for 64.3% and 25.0%, respectively, in relation to the total muscle protein.

*In vitro* digestibility of the muscle proteins was determined by hydrolysis with pepsin and pancreatin and was found to be 84.3%.

The electrophoresis of the sarcoplasmatic proteins of the muscle in polyacrylamide gel and the electrophoresis with SDS showed patterns of 8 bands with molecular weights estimated in the range of 4 to 15 Kd.

The protein nutritive value was determined by PER and nitrogen balance using rat assays. The rats were fed *ad libitum* and the diets were prepared to contain 10% protein of the freeze-dried edible portion of the fish in its integral form and defatted. The integral flour gave the following results: PER, 2.94; apparent protein digestibility (AD), 90.0%; biological value (BV), 82.8% and net protein utilization (NPU), 74.6%. For defatted flour, results of the same determinations were: 3.00; 84.3%; 82.5% and 69.5%, respectively.

From these results we are able to conclude that pacu can be considered as a protein and energy rich food and relatively poor as a source of minerals.

The lipid fraction presents as main components oleic, palmitic and linoleic acids. The ratio of insaturated to saturated fatty acids is 1.9. This pattern is characteristic of fresh water fish.

The protein fraction was high in lysine and methionine. Rat assays showed that (considering a significance level of 5%) the PER values were not different for diets prepared with casein, integral flour and defatted flour obtained from the freeze-dried edible portion of the fish. When compared to casein, integral flour showed lower biological value, but apparent protein digestibility and net protein utilization were not significantly different. For these determinations defatted flour presented lower values compared to casein.

# 1 Introdução

A utilização do pescado pelo homem data da pré-história e, desde então, sua preservação foi um desafio. A secagem e a defumação, originadas nesse período, foram desenvolvidas com o decorrer do tempo nas grandes civilizações surgidas ao longo de grandes rios, como no Egito e na Mesopotâmia. Na Grécia Antiga estabeleceu-se o comércio de peixes salgados, secos e curados e a prática da evisceração. Em Roma, o uso de neve e gelo para a conservação já era difundido.

Na era moderna, os esforços foram concentrados no sentido de manter o pescado fresco entre a captura e o consumo. O enlatamento surgiu como alternativa por volta de 1810. Em nosso século, a partir da base empírica existente, estudos científicos de problemas bacteriológicos, técnicas de preservação, criação intensiva e aproveitamento tecnológico de pescados vêm sendo efetuados. Observa-se, no entanto, a necessidade de estudos mais detalhados a respeito do valor nutritivo de várias espécies, bem como no sentido de preservar ao máximo a qualidade nutricional e sensorial.

A participação do pescado como fonte de proteína na dieta de seres humanos assume grande importância devido à sua boa qualidade (Guha, 1962; Mayer, 1962) e viabilidade econômica. Ainda assim, tende-se a considerá-lo apenas um substituto da carne, o que se reflete até mesmo em rituais religiosos judaicos e cristãos que permitem o consumo do pescado em ocasiões em que a carne é proibida.

No pós-guerra, várias nações tentaram contrabalançar suas limitações agrícolas com a pesca oceânica. Em função disso, o antigo conceito de que os mares representavam um potencial inesgotável foi ultrapassado pela realidade de um limite já atingido ou, como afirmam muitos, ultrapassado (Costa, 1978). Nas águas doces concentram-se os planos mais importantes para um aumento substancial na produção de pescado, visto serem mais acessíveis a um controle humano e o seu potencial estar longe de ser alcançado.

Segundo a FAO (1968), uma das maiores limitações para o aumento de produção de peixes de água doce tem sido a falta de reconhecimento de sua importância, que vem aumentando com o desenvolvimento da piscicultura. Desenvolvida há dois mil anos a partir do oriente e em regiões de alta densidade demográfica, a criação de peixes encontra-se integrada, em mui-

tos países da Ásia e Europa oriental, a sistemas de produção agrícola e de pecuária.

Temos no Brasil um consumo médio de produtos de origem animal de 26 kg per capita/ano, que, comparado ao consumo de 48,4 kg considerado desejável pela Organização Mundial da Saúde (Alzuguir, 1981) representa um deficit considerável. O pescado não aparece entre os alimentos que mais contribuem para o fornecimento de proteína para a população brasileira os quais são representados em 70% pelo feijão, carne bovina e arroz (Sgarbieri, 1987).

Nossa produção e consumo de pescado estão pautados sobretudo em recursos marinhos e em menor escala, na exploração artesanal das bacias hidrográficas. A importância da aquicultura brasileira ainda é relativamente pequena assim como a da América Latina cuja produção contribui com apenas 0,87% da produção mundial de 8,7 milhões de toneladas (Saint-Paul, 1986).

Entre os peixes mais estudados para utilização em piscicultura estão os do gênero *Colossoma* (Saint-Paul, 1986). Tal gênero, inserido na ordem *Cypriniforme*, sub-ordem *Characoidei*, família *Characidae*, subfamília *Myliinae*, é constituído por peixes de grande porte e rápido crescimento com características de rusticidade e hábito alimentar que fizeram-nas objeto de atenção de biólogos de pesca na América Latina (Barbosa, 1986).

No Brasil, 3 destas espécies deste gênero são utilizadas em piscicultura: o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a pirapitinga (*Colossoma brachypomum*), originários da Bacia Amazônica e o pacu (*Colossoma mitrei*), originário da Bacia do Paraná-Uruguai. Tais espécies vêm sendo estudadas pelo CEPTA (Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura) através do Projeto Aquicultura/Brasil firmado entre os governos do Brasil e Canadá, tendo como órgãos executores a SUDEPE e o Centro Internacional de Investigação para o Desenvolvimento. As pesquisas se concentraram até o momento em estudos de reprodução e larvicultura, nutrição e alimentação, sistemas de cultivo, ictiopatologia e acompanhamento limnológico com objetivo de contribuir para o desenvolvimento tecnológico do cultivo das espécies do gênero *Colossoma*.

Do ponto de vista da comercialização, o pacu atinge quantidades de 10 toneladas por ano em Cuiabá. A espécie vem sendo cultivada em várias estações experimentais e propriedades rurais e grande número de trabalhos

vem sendo publicado sobre as condições de cultivo e reprodução (Ferraz de Lima et alii, 1988; Mendonça et alii, 1988; Paiva et alii, 1985; Torloni et alii, 1984; Castagnoli e Donaldson, 1981 entre muitos outros). Além disso, a viabilidade econômica do cultivo intensivo dessa espécie, bem como a comparação entre o valor comercial do pacu capturado e cultivado vêm sendo estudadas (Chabalin et alii, 1988a,b). Evidencia-se assim, a importância dessa espécie no mercado brasileiro e no desenvolvimento da piscicultura.

Considerando que poucas pesquisas de caráter bioquímico e avaliação nutricional foram realizadas com peixes de água doce do Brasil e notadamente com o pacu, este trabalho objetivou o levantamento de dados de composição e caracterização físico-química e nutricional das proteínas do filé desta espécie. Especificamente, foram realizados os seguintes estudos com o filé do pacu:

- a. determinação da composição centesimal,
- b. determinação da composição em minerais,
- c. determinação da composição em ácidos graxos,
- d. determinação da composição em aminoácidos,
- e. extração e fracionamento das proteínas,
- f. determinação da digestibilidade *in vitro*,
- g. eletroforese das proteínas sarcoplasmáticas,
- h. experimentos biológicos, para avaliação da qualidade protéica.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Aspectos gerais do pacu

O pacu é um peixe que pertence à ordem *Cypriniforme*, subordem *Characoidei*, família *Myleinæ*, gênero *Colossoma* e espécie *Colossoma mitrei*. Foi classificado por Berg em 1895.

É importante mencionar também a classificação de *Piaractus mesopotamicus* dada por Holmberg, 1887, ao pacu, discutida por Géry (1986) em seu artigo sobre a sistemática dos gêneros *Colossoma* e *Piaractus* e atualmente adotada em muitos trabalhos.

O pacu encontra-se distribuído pelos rios que compõem a Bacia do Prata. É uma espécie de desova total, com reprodução ocorrendo no período em que as águas dos rios apresentam maior volume. Realiza movimento migratório reprodutivo no sentido das cabeceiras dos rios, movimento este denominado *piracema*. Apresenta alta prolificidade. Em cativeiro só se reproduz através de indução hormonal. A primeira maturação sexual ocorre por volta do quarto ano de idade.

Trata-se de uma espécie de boas características culinárias, apreciada por sua carne firme, de bom sabor, contando com elevada importância na pesca comercial em suas regiões de origem onde é capturado por redes, tarrafas e anzol. Sua captura apresenta sazonalidade, geralmente incidindo no segundo trimestre do ano o período de maior captura.

O pacu apresenta dentição robusta especializada para fragmentar e triturar alimentos, principalmente frutos, sementes, folhas de vegetação e restos de peixes, sendo tais hábitos alimentares propícios para utilização em piscicultura (Silva, 1987).

A literatura disponível sobre o pacu tem se concentrado em estudos sobre seu ciclo reprodutivo, reprodução induzida e condições de cultivo intensivo. Entre muitos destes trabalhos, pode-se mencionar os de Castagnoli e Donaldson (1981), Romagosa et alii (1985) e toda a série realizada pelo Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura (Pirassununga - SP) relatada na síntese de trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma* de março/82 a abril/86 publicada por este centro. Além disso, há estudos citogenéticos (Almeida Toledo et alii, 1987) e de análise econômica de cultivo intensivo (Chabalin et alii, 1988a,b).

Finalmente é válido mencionar que, sendo muito visado pela pesca e com a diminuição dos habitats propícios para sua alimentação e reprodução, o pacu tem recebido atenção de pesquisadores preocupados com a preservação dessa espécie, bem como de outras espécies do Pantanal (Silva, 1987). A construção de represas hidrelétricas vem determinando a escassez da pesca do pacu provavelmente devido à interferência no seu comportamento migratório (Torloni et alii, 1984). Assim, sua criação intensiva bem como o repovoamento dos rios e reservatórios têm recebido atenção no sentido de se colaborar para a adoção de uma política conservacionista.

## 2.2 Composição química

### 2.2.1 Composição centesimal

O músculo ou filé representa a principal parte comestível do pescado e consiste de músculos corporais, além de tecidos conectivo e adiposo e pequenos ossos intermusculares (Zaitsev et alii, 1969). Constitui, em geral, a metade do peso total do pescado.

A composição centesimal do músculo do pescado varia com a espécie, entre peixes da mesma espécie e entre as diferentes partes do peixe (Stansby, 1962). As causas desta variabilidade são função da idade, sexo, habitat, época do ano (Zaitsev et alii, 1969), alimentação, mobilidade do peixe (Stansby, 1962), além de outras causas não determinadas (Jacquot, 1961). Esta variabilidade torna difícil determinar a composição média do músculo de uma determinada espécie. No entanto, para fins comerciais, com uma certa padronização de idade e tamanho e capturas realizadas em épocas e locais definidos, pode-se estabelecer valores médios com precisão suficiente para fins práticos (Zaitsev et alii, 1969). Segundo Jacquot (1961), em geral, o teor de gordura aumenta com a idade. Quanto ao sexo, devido à presença de gônadas, pode haver diferenças pelo fato do sêmen dos machos apresentar mais proteínas do que as ovas das fêmeas, o que não exerce, em relação à carne, influência significativa. Quanto à época do ano, o teor de minerais e proteínas se apresenta constante, ao passo que a gordura apresenta variação cíclica com menores teores durante a fase anterior à desova. O teor de umidade mantém geralmente uma relação inversa com o teor de gordura. O habitat exercerá influência em função da disponibilidade de alimentos.

Segundo Zaitsev et alii (1969), o teor de umidade varia de 53 a 81%, proteína de 5 a 22%, lipídios de 0,3 a 30% e cinzas de 1,0 a 1,5%. Observa também que, como os pescados apresentam, em sua maioria, um teor constante e alto de proteína (15 a 20%), são considerados fundamentalmente um alimento protéico. Jacquot (1961) estabelece teores de umidade que variam de 66 a 84%, proteína de 15 a 24%, lipídios de 0,1 a 22% e substâncias minerais de 0,8 a 2%. Lembra que a composição geral de pescados é relativamente próxima à de animais terrestres. Ainda segundo o mesmo autor, os peixes contêm quantidades mínimas de açúcar.

Stansby (1962) elaborou uma classificação arbitrária de peixes segundo os seguintes critérios:

- Categoria A: baixo teor de gordura ( $< 5\%$ ) e alto teor protéico (15 – 20%).
- Categoria B: médio teor de gordura (5 – 15%) e alto teor protéico (15 – 20%).
- Categoria C: alto teor de gordura ( $> 15\%$ ) e baixo teor protéico ( $< 15\%$ ).
- Categoria D: baixo teor de gordura ( $< 5\%$ ) e muito alto teor protéico ( $> 20\%$ ).
- Categoria E: baixo teor de gordura ( $< 5\%$ ) e baixo teor protéico ( $< 15\%$ ).

Segundo Stansby (1962), as categorias A e B abrangem a maioria das espécies, sendo que algumas delas mudam de categoria ao longo do ano, como é o caso do salmão e da carpa.

Um grande número de trabalhos realizados no exterior sobre a composição de peixes de água doce pode ser encontrado na literatura. Kinsella et alii (1977a) estudaram várias espécies de água doce no esforço de examinar o seu potencial como fonte de nutrientes.

Thurston et alii (1959) pesquisaram a composição centesimal de 21 espécies de lagos e rios norte-americanos encontrando grandes variações entre os teores de umidade, proteína, lipídios e cinzas entre as diferentes espécies e entre indivíduos da mesma espécie. Outras espécies encontradas

também nos Estados Unidos foram estudadas por Mustafa e Medeiros (1985) e Kinsella et alii (1977a). Afolabi et alii (1984a) pesquisaram 5 espécies nigerianas. Khalil et alii (1980) realizaram estudos com o "boliti fish" (*Tilapia nilotica*) uma espécie importante na economia do Egito; Moorjani et alii (1962) pesquisaram 3 espécies da Índia; Ramachandran Nair e Gopakumar (1981) levantaram dados sobre a *Tilapia mossambica* também da Índia.

Sobre a composição centesimal de peixes de água doce do Brasil, algumas referências foram encontradas. Camargo et alii (1973) determinaram as características dos extratos etéreos das seguintes espécies: piava, dourado, mandiuva, curimatã e piapara, cujos teores médios de gordura foram respectivamente 11,22%, 6,49%, 14,88%, 2,79% e 6,18%. Uma relação inversa entre umidade e lipídios foi constatada.

Maia et alii (1983) obtiveram teores médios de 76,5% de umidade, 20,41% de proteína, 2,3% de lipídios e 1,3% de cinzas para o curimatã.

Moraes et alii (1984) estudaram a correlação entre a composição química e alguns parâmetros biológicos do saguiri, bem como a sua variação mensal. Constataram relação inversa entre os teores de umidade (em média 78,04%) e de lipídios (em média 3,03%), não havendo relação entre o teor de umidade e proteína bruta (17,66%). Enquadraram a espécie na categoria A estabelecida por Stansby. O teor de cinzas médio foi de 1,27%.

Estudando aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia, Rocha et alii (1982) determinaram os conteúdos de umidade, cinzas, proteína e gordura. As espécies pesquisadas foram: aracu, pacu, jaraqui, sardinha, branquinha, curimatã, matrinhã, tambaqui, pescada, pirarucu e tucunaré. O pacu citado no trabalho é classificado como *Mylossoma spp* e provavelmente não se trata do *Colossoma mitrei* originário do Pantanal. Trata-se de um peixe gordo com 8,0% de gordura, 71,5% de umidade, 18,3% de proteína e 2,2% de cinzas. Para as demais espécies o teor de gordura variou entre 1,3% e 15,5%; umidade entre 62,5% e 77,5%; proteína entre 21,0% e 18,3%; cinzas entre 1,0% e 2,2%. Concluiu-se que os peixes herbívoros e/ou onívoros apresentam maior teor de gordura que os peixes carnívoros.

Ríos (apud Maia, 1980) determinou a composição centesimal do jundiá, pintado, tambicu, traíra, acará e carpa, obtendo valores de 61,78 a 80,82% para a umidade, 14,77 a 19,60% para a proteína, 0,81 a 22,61% para a gordura e 0,87 a 1,31% para cinzas. Os valores encontrados para 8 espécies do rio Mogi Guaçu por Lessi (1968) apresentaram faixas de 63,69% a 77,66%

de umidade, 18,12 a 22,37% de proteína, 1,37 a 16,79% de gordura e 1,39 a 3,25% de cinzas.

Informações concernentes à composição centesimal e à presença de outros nutrientes são consideradas relativamente escassas na literatura (Kinsella et alii, 1977a) apesar da sua importância para melhor aproveitamento das espécies, para pesquisas ecológicas e desenvolvimento da aquicultura.

### 2.2.2 Composição em minerais

Zaitsev et alii (1969) apontam como os principais constituintes minerais do filé de pescado o fósforo, cálcio, potássio, sódio, magnésio e cloro. Observam também que o teor de minerais no tecido muscular do peixe é afetado pela composição e concentração de sais na água. Assim, o músculo de peixes marinhos tem uma maior concentração de sais que o dos peixes de água doce. Além disso, este contém menores quantidades de cloro e praticamente nenhum iodo e bromo. A maior parte do fósforo e cálcio está nos ossos na forma de fosfato de cálcio. Parte do magnésio também encontra-se nos ossos. No músculo, o fósforo ocorre principalmente na forma de fosfatídeos, fosfoproteínas, nucleotídeos, creatina fosfato e outros compostos. Sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloro ocorrem como sais solúveis no sarcoplasma das células musculares, no líquido intercelular, sangue e plasma.

Pesquisando alterações na composição de minerais do "catfish" (*Ictalurus punctatus*) motivadas pela época do ano, pelo cozimento e fritura, Mustafa e Medeiros (1985) concluíram que os níveis de potássio, fósforo, magnésio e ferro apresentaram diferenças significativas.

Em seu trabalho com 11 espécies da Amazônia, Rocha et alii (1982) encontraram teores de zinco entre 0,3 e 1,2 mg/100g de filé. Considerando o papel importante do peixe na alimentação amazonense e uma pesquisa que acusava a ingestão de zinco como a mais baixa entre os nutrientes consumidos pela população de Manaus, os autores determinaram o teor de zinco das espécies mais consumidas pela população.

### 2.2.3 Composição em ácidos graxos

Com a crescente importância da aquicultura, uma quantidade considerável de pesquisas vêm sendo realizadas sobre o metabolismo de lipídios

de peixes de água doce relacionando-o com seu crescimento nas condições de cultivo (Henderson e Tocher, 1987). Ao lado destes estudos, trabalhos fazendo comparações entre composição de ácidos graxos de peixes de água doce e peixes marinhos mostram que o estudo dos ácidos graxos de pescado vem recebendo considerável atenção na literatura estrangeira.

Comparados aos peixes marinhos, os peixes de água doce apresentam proporção mais alta de ácidos graxos saturados e ácidos graxos polinsaturados de 18 carbonos com níveis mais baixos de polinsaturados de 20 e 22 carbonos. Tais diferenças são apontadas por Henderson e Tocher (1987), Gruger et alii (1964), Viswanathan Nair e Gopakumar (1978). A dieta é apontada como a principal causa desta distinção. A temperatura ambiente também se relaciona com a variação da composição de ácidos graxos.

Viswanathan Nair e Gopakumar (1978) analisaram 5 espécies de água doce, 3 marinhas e 7 estuarinas. Os ácidos graxos C16:0 e C18:0 foram mais abundantes nas espécies de água doce, C20:5 e C22:6 mais altos para as espécies marinhas. Quanto às espécies estuarinas não houve um padrão definido, sendo sua composição uma média dos outros dois grupos.

Cinco espécies nigerianas foram analisadas na forma de peixe fresco e seco por diferentes processos por Afolabi et alii (1984b). C16:0 e C18:1 foram os ácidos graxos mais abundantes não havendo alterações importantes com o processamento.

Mustafa e Medeiros (1985) estudaram os efeitos de variações sazonais, cozimento e fritura na composição em ácidos graxos do "catfish" (*Ictalurus punctatus*). As variações sazonais tiveram influência mínima, sendo que os ácidos graxos mais abundantes foram C18:1 (52,9%), C16:0 (18,9%) e C18:2 (16,0%). No peixe cozido, a alteração deste perfil foi mínima e no peixe frito houve um aumento substancial de C18:2 atribuindo-se tal mudança à influência do óleo de milho que é muito rico em C18:2.

O efeito da dieta na composição em ácidos graxos da *Tilapia mosambica* foi constatado por Ramachandran Nair e Gopakumar (1981), mostrando que a inclusão de peixes marinhos, como a sardinha, como fonte de lipídios na dieta induz um aumento de ácidos graxos insaturados como o C22:6 no perfil de ácidos graxos do peixe de água doce.

Kinsella et alii (1977b) determinaram a composição em ácidos graxos de 18 espécies de água doce do estado de Nova Iorque encontrando variação conforme a localização anatômica dos lipídios, bem como grande

diferença entre a composição de várias espécies. Os ácidos graxos C16:0, C16:1, C18:1, C20:5, C22:6 foram os mais abundantes, sendo que os autores chamam a atenção para a dificuldade da comparação com outros dados publicados em função de numerosos fatores que podem afetar o teor de lipídios de peixes, bem como sua composição em ácidos graxos. Entre tais fatores estão a origem, sexo, dieta, estado fisiológico, variações sazonais, porção analisada, habitat.

Não há disponibilidade de muitos dados no Brasil. Andrade (apud Maia, 1980) analisou os lipídios do mandi encontrando 28 ácidos graxos sendo 16 identificados. Os teores médios anuais dos principais foram: oléico (33,26%), palmítico (21,07%), palmitoléico (11,17%), esteárico (10,49%), linoléico (7,48%), linolênico (5,48%) e mirístico (3,32%).

Maia et alii (1983) encontraram teores de 32,6% de ácido palmítico, 23,1% de ácido oléico, 14,1% de ácido palmitoléico, 7,8% de ácido esteárico, 7,6% de ácido linolênico e 5,4% de ácido linoléico para o curimatá.

#### 2.2.4 Composição em aminoácidos

O pescado é, em geral, considerado uma fonte de proteína de boa qualidade e a determinação de aminoácidos tem sido feita no sentido de estimar o seu valor nutritivo. Segundo Geiger e Borgstrom (1962), tal análise vem sendo efetuada desde o início do século por pesquisadores que empregaram métodos químicos, microbiológicos e cromatográficos.

Para Guha (1962), o pescado é um alimento altamente nutritivo, sendo particularmente importante por fornecer proteínas de alta qualidade comparáveis com aquelas da carne, leite ou ovos. Essa similaridade é indicada por experimentos biológicos, bem como pela análise da composição em aminoácidos. As proteínas de diferentes espécies de peixe diferem nas concentrações dos aminoácidos e os resultados podem variar dependendo do método empregado, havendo, no entanto, um padrão comum. Também aparecem diferenças entre pescados marinhos e de água doce. Em geral, as proteínas de pescado tendem a ser mais ricas em lisina e mais pobres em triptofano do que a carne. Geiger e Borgstrom (1962) também aponta semelhanças entre a composição em aminoácidos de peixes e de mamíferos, ressaltando o nível superior de lisina e histidina dos pescados, bem como sua composição inferior em metionina e triptofano.

Deas e Tarr (1947) e Terri et alii (1957), citados por Khalil et alii (1980), também apontam que o teor de lisina do músculo de pescado excede freqüentemente o de outras proteínas animais.

Venkataram e Chari (1957), apud Khalil et alii (1980), relatam que os peixes do leste da Índia como pobres em metionina, o que é confirmado por Bose et alii (apud Geiger e Borgstrom, 1962).

A composição em aminoácidos de 6 espécies de água doce, coletadas no estado de Nova Iorque, foi determinada por Mai et alii (1980) e apresentou valores em gramas de aminoácido por 16 gramas de nitrogênio de 0,76 a 1,00 de triptofano, 3,19 a 4,14 de treonina, 3,93 a 4,93 de valina, 2,27 a 3,21 de metionina, 3,26 a 4,27 de isoleucina, 6,56 a 8,52 de leucina, 3,28 a 4,19 de fenilalanina, 1,22 a 2,49 de histidina e 6,06 a 8,46 de lisina.

O perfil de aminoácidos para as ovas da truta arco-íris cultivada e para o arenque obtido por Kaitaranta et alii (1980) ao longo de vários estádios de maturação mostrou que não houve alterações neste perfil entre os períodos. O aminoácido limitante para a truta foi o triptofano e para o arenque foram os aminoácidos sulfurados.

Khalil et alii (1980) determinaram a composição em aminoácidos das proteínas da *Tilapia nilotica* ("boliti fish") e obtiveram concentrações (em gramas por 16 gramas de nitrogênio) de 12,4 de leucina e isoleucina; 10,6 de lisina; 3,3 de fenilalanina; 1,1 de metionina; 3,9 de treonina; 5,4 de valina e 1,8 de histidina.

As 5 espécies nigerianas de água doce estudadas por Afolabi et alii (1984b) não mostraram alterações substanciais no seu perfil de aminoácidos quando submetidas a processo de secagem e defumação, sendo que apenas a lisina teve um decréscimo.

O curimatá analisado por Maia et alii (1983) mostrou-se rico em lisina (11,8 g/16 gN) e metionina (2,96 g/16 gN). Os valores obtidos para os demais aminoácidos essenciais, em gramas por 16 gramas de nitrogênio, também foram altos: 5,44 de treonina, 6,78 de valina, 5,74 de isoleucina, 9,67 de leucina, 5,19 de fenilalanina, 2,97 de histidina.

## 2.3 Caracterização físico-química e nutricional das proteínas de pescado

### 2.3.1 Extração e fracionamento das proteínas do filé

As proteínas do tecido muscular do pescado são classificadas por Zaitsev (1969) em:

- A) Proteínas miofibrilares – representam aproximadamente 65% do total das proteínas, fornecem ao peixe seu poder de contração e são extraíveis com solução salina. São constituídas pela miosina, actina, actomiosina e tropomiosina.
- B) Proteínas sarcoplasmáticas – representam de 20 a 25% do total das proteínas, são constituídas pelas enzimas do metabolismo muscular, são extraíveis com água. São constituídas por proteínas do tipo albumina, miogênio, mioalbumina e globulina.
- C) Proteínas estromáticas – representam de 2 a 4% do total de proteínas ou até 10% em alguns peixes cartilagosos. Formam o tecido conectivo e são insolúveis. São constituídas principalmente pelo colágeno.

Segundo Dyer et alii (1950) a miosina do pescado é praticamente igual à de outros animais, diferindo pelo fato de ser mais susceptível à desnaturação. Isso acarreta problemas tecnológicos no pescado congelado, por exemplo, no qual o indesejável enrijecimento da textura se deve à desnaturação da miosina.

A baixa quantidade de colágeno do pescado contribui para uma melhor qualidade nutritiva, uma vez que se trata de uma proteína de difícil digestão, além de não conter triptofano, cisteína, cistina e apresentar baixas concentrações de metionina.

Dyer et alii (1950) desenvolveram métodos de extração da proteína bem como de fracionamento em seus principais componentes com o intuito de detectar mudanças ao longo da estocagem do pescado. A partir disso, um grande número de autores procurou fixar a extratibilidade da proteína do músculo como um critério de avaliação tecnológica (Cowie e Little, 1967;

Dingle e Hines, 1975; Kolakowski et alii, 1977; Kim et alii, 1977; Hak-Kyon et alii, 1977) sobretudo para o pescado congelado.

Uma diminuição considerável da extratibilidade das proteínas do músculo de peixes em solução de NaCl 5% acontece quando são feitas análises ao longo do armazenamento do pescado congelado (Shenouda, 1980), assim como no pescado conservado em gelo (Moorjani et alii, 1962). Tal alteração é devida à perda de solubilidade do grupo das proteínas miofibrilares (Scopes, 1964; Shenouda, 1980), sendo que a fração sarcoplasmática extraída do músculo mantém-se estável. A miosina é a proteína mais sensível à desnaturação, sendo que a actina mostra uma pequena alteração na solubilidade ao longo da estocagem.

Moorjani et alii (1962) determinaram as frações protéicas de 4 espécies de água doce com intenção de detectar mudanças na solubilidade ao longo do armazenamento em gelo. Os valores obtidos para a fração sarcoplasmática no início do experimento foram de 29,0%, 22,0%, 35,0% e 35,7% em relação à proteína total e para a fração miofibrilar de 65,0%, 73,1%, 60,6% e 59,7%.

Uma fração sarcoplasmática de 24,8% e uma fração miofibrilar de 66,7% em relação à proteína total foram obtidas por Khalil et alii (1980) para a *Tilapia nilotica*.

A determinação das diferentes frações protéicas de um peixe em boas condições constitui um dado importante para avaliação de suas qualidades tecnológicas e acompanhamento de mudanças ao longo da estocagem. Nesse sentido, uma padronização das condições de extração (tipo de sal, pH, força iônica, concentração) seria de grande interesse (Shenouda, 1980).

### 2.3.2 Digestibilidade protéica *in vitro*

A utilização de ensaios biológicos para determinação de digestibilidade protéica mostra-se muitas vezes inconveniente em função de seu custo, longa duração e necessidade de grande quantidade de amostra. Assim, utiliza-se muitas vezes a digestibilidade *in vitro*. Geralmente os valores obtidos nos experimentos *in vitro* estão próximos aos resultantes de experimentos biológicos (Geiger e Borgstrom, 1962).

De acordo com Sgarbieri (1987), a digestibilidade *in vitro* da proteína estima a porção da proteína que pode ser hidrolisada por enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão, em condições de pH semelhan-

tes às do estômago e do intestino. Tal porção estaria, portanto, biologicamente disponível, desde que não houvesse nenhuma interferência na absorção dos aminoácidos pelo organismo humano ou animal.

Com o objetivo de caracterizar a qualidade da proteína de 5 espécies marinhas do sul da Nova Inglaterra, Jhaveri et alii (1984) determinaram sua digestibilidade *in vitro* usando pepsina e obtiveram valores que variaram entre 83,1% e 92,2%.

Poulter e Lawrie (1977) investigaram as conseqüências nutricionais do congelamento de 5 espécies marinhas estocadas ao longo de 20 meses sendo que a digestibilidade *in vitro* não foi afetada pela estocagem nestas condições.

### 2.3.3 Eletroforese

A eletroforese vem sendo usada freqüentemente na identificação de espécies de pescados quando não se pode utilizar características morfológicas, sobretudo no caso do peixe filetado (Bremner e Vail, 1983) e até mesmo cozido (Mackie, 1969). O método vem sendo largamente utilizado em muitos laboratórios para identificar espécies de peixes ou produtos derivados, sendo considerado importante na diferenciação de espécies zologicamente distintas (Mackie e Jones, 1978).

O perfil eletroforético das proteínas sarcoplasmáticas é específico para cada espécie e é obtido geralmente através de eletroforese com gel de poliacrilamida, que segundo vários autores, é mais simples, rápida, necessitando de pequena quantidade de músculo (Bremner e Vail, 1983; Mackie, 1969; Kenan e Shaklee, 1985). Essencialmente, envolve a extração das proteínas sarcoplasmáticas e sua aplicação em uma pequena coluna de gel de poliacrilamida a qual é submetida a uma corrente elétrica. As proteínas migram, separam-se e sua presença torna-se evidente pela aplicação de um corante. O padrão de bandas, sua densidade ou distância de migração fornecem uma característica particular de cada espécie.

Uma outra utilização da eletroforese é na avaliação do estado de conservação do pescado. Moore et alii (1970) detectaram o aparecimento de novas bandas em função do tempo de estocagem do arenque. Da mesma forma, Damiani e Rossi (1974) verificaram a modificação do perfil eletroforético das proteínas de várias espécies de água doce segundo o seu estágio de deterioração.

Pode-se encontrar na literatura um grande número de espécies cujas proteínas foram caracterizadas eletroforéticamente. Cowie (1968) apresentou os padrões eletroforéticos de 20 espécies comercialmente importantes da Grã Bretanha. Espécies relacionadas à merluza (*Merluccius sp*) foram diferenciadas por Mackie e Jones (1978). A identificação eletroforética de peixes das famílias *Gadidæ* e *Scomberidæ* foi realizada por Cantoni et alii (1981). Keenan e Shaklee (1985), usando o "barramundi" (*Lates calcarifer*), investigaram variáveis como o tamanho, sexo, método e duração de estocagem, condições de extração da amostra e sua influência no padrão eletroforético. Draetta et alii (1985) investigaram padrões eletroforéticos na identificação de extratos de peixes crus, cozidos e enlatados obtidos de atum, bonito, cavalinha, corvina, merluza, pescada branca, pescada cambucu, sardinha e tainha.

#### 2.3.4 Experimentos biológicos

Pode-se determinar índices indicativos do valor nutritivo de um alimento através de ensaios biológicos com animais de laboratório, sendo que os ratos têm sido largamente utilizados para este fim (Hackler, 1977). Ensaios biológicos vêm sendo usados com propósitos regulatórios do valor nutricional de alimentos por órgãos oficiais e indústrias.

O valor destes índices estão relacionados com a composição do alimento, a biodisponibilidade de seus nutrientes essenciais e a presença ou ausência de componentes tóxicos. Os métodos empregados para a determinação do valor protéico baseiam-se no balanço metabólico e no crescimento. No primeiro caso destacam-se o balanço de nitrogênio, digestibilidade, valor biológico aparente e índice de utilização líquida da proteína. A determinação da digestibilidade, baseada no cálculo da absorção de nitrogênio através da determinação do nitrogênio ingerido e do nitrogênio excretado pelos ratos (Wolzak et alii, 1981), pode ser feita sem levar em conta um grupo de ratos recebendo dieta aprotéica. Neste caso, é chamada de digestibilidade aparente, (Pellet e Young, 1980), já que não foi corrigida a perda de nitrogênio endógeno. Baseado no crescimento tem-se o quociente de eficiência protéica, reconhecido como método de controle nos Estados Unidos e descrito pela AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*).

Trabalhos concernentes à determinação destes índices em pescados não foram encontrados em grande número.

Segundo Guha (1962), testes biológicos com animais e humanos confirmaram o alto valor nutricional das proteínas do pescado, as quais mostraram-se eficientes como a caseína na regeneração das proteínas do plasma em ratos em estado de depleção e superiores à caseína na promoção da regeneração da hemoglobina.

Jhaveri et alii (1984) determinaram valores do quociente de eficiência protéica (PER) para cinco espécies marinhas da Nova Inglaterra (EUA) encontrando valores na faixa de 3,25 a 4,0 comparados a 2,98 para caseína. Meinke et alii (1982) investigaram os valores de PER, digestibilidade e escore químico para filés inteiros e moídos de "Alaska pollock" (pescada polaca) e 3 espécies subutilizadas do Golfo do México. Os PER encontrados estão na faixa de 3,38 a 3,63 e os valores da digestibilidade entre 93,2% e 95,9%. Afolabi et alii (1984a) obtiveram PER, valor biológico aparente, digestibilidade e índice de utilização líquida da proteína para 5 espécies da Nigéria submetidas a diferentes processos de secagem com o intuito de avaliar a qualidade nutricional destas espécies e as modificações provocadas.

Tais dados são de grande importância para países como a Nigéria, onde os peixes de água doce constituem 69,6% do total do pescado disponível o qual por sua vez representa a principal fonte de proteína animal. O mesmo ocorre em vários estados brasileiros, como Mato Grosso e Amazonas onde, em Manaus, tem-se um consumo de peixe até 7 vezes maior que em outras capitais brasileiras (Shrimpton e Giugliano, 1979).

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Material

Os peixes analisados neste trabalho foram obtidos no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura de Pirassununga (SP) e em frigoríficos comerciais de Campinas (SP). Aqueles obtidos junto ao Centro de Aqüicultura foram coletados vivos, sacrificados no laboratório e analisados num prazo de 24 horas. O material de frigoríficos comerciais foi adquirido sob encomenda e no melhor estado de frescor possível dentro das condições normais de comercialização. As amostras utilizadas para as diversas análises eram compostas de lotes de 3 a 5 exemplares cada um.

### 3.2 Preparação da amostra

Após a lavagem do peixe inteiro, procedeu-se à filetagem do músculo, seguida de trituração em liquidificador até obter-se uma "polpa" homogênea. O filé utilizado para a determinação da composição centesimal incluía músculo das regiões dorsal e ventral. Essa "polpa" foi utilizada para as seguintes determinações químicas, bioquímicas e biológicas: composição centesimal, composição em minerais, ácidos graxos e aminoácidos, extração fracionada de proteínas, determinação da digestibilidade protéica *in vitro*, eletroforese das proteínas sarcoplasmáticas e experimentos biológicos com ratos.

### 3.3 Determinação da composição química

#### 3.3.1 Determinação da composição centesimal aproximada

Todas as determinações foram feitas em triplicata.

- **Umidade:** determinada pelo método de secagem em estufa a 100-105°C até peso constante (AOAC, 1975).
- **Proteína Bruta:** determinou-se o nitrogênio total pelo método semimicro-Kjeldahl (AACC, 1976) e multiplicou-se o valor obtido por 6,25 como fator de conversão para proteína total.

- **Lipídios Totais:** determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959).
- **Cinzas:** determinadas por incineração em mufla a 550–600°C até peso constante (AOAC, 1975).

### 3.3.2 Determinação da composição em minerais

Foram determinados cálcio, magnésio, ferro, zinco, potássio, sódio e manganês através da espectrofotometria de absorção atômica (UNICAM SP 90A SERIES 2) em amostras previamente mineralizadas a 400–500°C (Perkin-Elmer, 1976). A determinação de fósforo foi feita por método colorimétrico de acordo com a *American Public Health Association* (1975).

### 3.3.3 Determinação da composição em ácidos graxos

#### 3.3.3.1 Extração e concentração dos lipídios

Os lipídios foram extraídos pelo método de Bligh e Dyer (1959). Aliquotas do extrato clorofórmico contendo de 50 a 100 mg de lipídios foram colocadas em tubos de ensaio e o solvente evaporado pela aplicação de nitrogênio gasoso.

#### 3.3.3.2 Metilação dos ácidos graxos

Realizada de acordo com a técnica de Metcalfe et alii (1966). O extrato lipídico concentrado foi saponificado com NaOH metanólico e os ácidos graxos foram metilados com BF<sub>3</sub>-metanol. Os ésteres metílicos foram extraídos com éter de petróleo (30–60°C) e injetados no cromatógrafo.

#### 3.3.3.3 Cromatografia gasosa

Realizada no cromatógrafo Perkin Elmer Sigma 3B com integrador LCI 100 Perkin Elmer com detector de ionização de chama tendo uma coluna de aço inoxidável de 1,80 metro de comprimento por 1/8 pol. de diâmetro interno, empacotada com 15% DEGS – Chromosorb W, AW 80/100mesh.

O cromatógrafo foi operado nas seguintes condições:

FLUXO:                   nitrogênio = 25 mL/min  
                              ar                = 500 mL/min  
                              H<sub>2</sub>             = 35 mL/min

TEMPERATURA:    detector = 250°C  
                          injetor    = 250°C  
                          coluna     = 190°C

### 3.3.3.4 Quantificação e identificação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos foram quantificados pelo integrador e identificados com o auxílio de ácidos graxos padrões através da comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos com os tempos de retenção dos padrões e através da equação aplicável a séries homólogas de compostos sob condições de temperatura constante (Kates, 1972) segundo a qual o tempo tomado por um componente com  $n$  carbonos para emergir da coluna (tempo de retenção  $t_n$ ) mantém uma relação com o tempo de retenção ( $t_{n+1}$  e  $t_{n-1}$ , respectivamente) do componente com  $n+1$  e  $n-1$  átomos de carbono como se segue:

$$\frac{t_{n+1}}{t_n} = \frac{t_n}{t_{n-1}} = F.$$

Em geral temos que:

$$\frac{t_{n+x}}{t_n} = F^x,$$

onde  $x = 1, 2, 3$ .

Os padrões utilizados foram: laurato (12:0), miristato (14:0), palmitato (16:0), palmitoleato (16:1), estearato (18:0), oleato (18:1), linoleato (18:2), linoleneato (18:3) e araquidato (20:0).

### 3.3.4 Determinação da composição em aminoácidos

#### 3.3.4.1 Hidrólise

Utilizou-se como material o resíduo sólido da polpa obtido depois da extração de lipídios, o qual foi liofilizado e finamente moído. Uma amostra contendo aproximadamente 20 mg de proteína foi hidrolisada com HCl 6 N por 22 h a 110°C em tubo de ensaio com tampa rosqueada de teflon. Após a hidrólise o HCl foi eliminado imediatamente através de roto-evaporador.

#### 3.3.4.2 Cromatografia de troca iônica

Realizada em analisador automático Beckman, modelo 119 CL, de acordo com os procedimentos recomendados no manual do aparelho (Beckman Instruments, 1977).

#### 3.3.4.3 Identificação e quantificação dos aminoácidos

A identificação foi feita pela comparação da posição e forma dos picos do cromatograma da amostra com o cromatograma da mistura padrão. A concentração de cada aminoácido ( $C_i$ ) da amostra foi calculada mediante a relação entre a área do pico desconhecido ( $A_i$ ) e a área do pico padrão ( $A_p$ ) e a concentração do aminoácido padrão ( $C_p$ ):

$$C_i = C_p \times \frac{A_i}{A_p}.$$

## 3.4 Caracterização físico-química e nutricional das proteínas

### 3.4.1 Extração e fracionamento das proteínas do filé

As frações sarcoplasmática, miofibrilar e estromática foram separadas de acordo com o método de Dyer et alii (1950) pela extração com uma solução de NaCl 5% e centrifugação em centrífuga refrigerada. O nitrogênio protéico insolúvel (i.e., proteínas estromáticas e proteínas desnaturadas) foi determinado no precipitado enquanto que no sobrenadante permaneceram as frações sarcoplasmática e miofibrilar. Essas duas últimas frações foram separadas pela diluição do sobrenadante 10 vezes com água destilada, seguida

de permanência de 24 horas em uma temperatura de 0-4°C. Procedeu-se em seguida à centrifugação. O nitrogênio protéico da fração miofibrilar foi determinado no precipitado e o nitrogênio da fração sarcoplasmática no sobrenadante.

### 3.4.2 Determinação da digestibilidade *in vitro*

O método baseia-se na hidrólise das proteínas por ação das enzimas pepsina (Sigma Chemical Co. 1:10.000, preparada em solução de ácido clorídrico 0,1N) e pancreatina (Merck, 350 FIP-U/g protease, 7.500/g lipase, 7.500/g amilase, preparada em tampão fosfato 0,1M pH 8), adicionadas à amostra de acordo com o procedimento descrito por Akesson e Stahmann (1964), interrompendo-se a hidrólise com ácido tricloroacético 10% e determinando-se os nitrogênios digeridos pelo método Kjeldahl. As soluções das enzimas foram preparadas no dia do ensaio. Usou-se a caseína como proteína padrão (a mesma utilizada no ensaio com ratos).

O cálculo da digestibilidade é feito determinando-se a porcentagem de nitrogênio que foi digerido pelo sistema enzimático (Nd) corrigido pelo nitrogênio produzido pela autodigestão do sistema enzimático (Ne) e também pelo nitrogênio originalmente solúvel na amostra (Na).

$$D = \frac{Nd - Ne - Na}{Nt - Na}$$

onde:

Nd = porcentagem de N digerido pelo sistema enzimático,

Ne = porcentagem de N produzido pela autodigestão do sistema enzimático,

Na = porcentagem de N originalmente solúvel na amostra,

Nt = nitrogênio total da amostra.

### **3.4.3 Eletroforese**

#### **3.4.3.1 Eletroforese simples em gel de poliacrilamida**

O método de Davis (1974) foi empregado com algumas modificações (Galeazzi, 1978).

##### **– Preparação do gel**

O gel inferior foi preparado com 8% de poliacrilamida conforme o Apêndice 1, sendo colocado em tubos de 9,5 cm com auxílio de uma seringa até atingir 2 cm do topo. A fim de evitar a tensão superficial foram adicionados lentamente 0,3 ml de água destilada sem diluir a superfície do gel. Após a gelificação a água foi retirada.

O gel superior foi preparado com 3% de poliacrilamida a partir das soluções descritas no Apêndice 1, sendo adicionado no topo do gel inferior, já polimerizado, até uma altura de 1 cm. O mesmo procedimento anterior foi adotado com relação à adição de água. A polimerização foi auxiliada pela incidência de luz fluorescente no tubo.

##### **– Preparação da amostra**

As proteínas sarcoplasmáticas foram extraídas do músculo por homogeneização na proporção de 1:4 (peso/volume) em água destilada (Netto, 1984). O homogenado foi centrifugado em centrífuga refrigerada e filtrado. A solução obtida foi diluída na proporção 1:9 com água destilada e colocada com seringa no topo dos tubos verticais.

##### **– Procedimento para corrida**

Os eletrodos dos compartimentos superior (onde se inseriram os tubos) e inferior contendo uma solução tampão tris-glicina pH 8,2 e 2 gotas de uma solução 0,1% de azul de bromofenol foram conectados à fonte elétrica. A preparação do tampão e da solução indicadora de migração está descrita no Apêndice 1.

Nos primeiros 30 minutos de corrida utilizou-se corrente de 3 mA por tubo e em seguida de 5 mA até o final. A corrida se deu a temperatura ambiente e só foi interrompida quando a banda de corante atingiu a parte inferior do tubo.

#### **– Revelação das proteínas**

Os géis retirados dos tubos foram imersos em solução corante de amido de Schwartz (Apêndice 1). A descoloração para revelação das bandas foi feita através de sucessivas lavagens com ácido acético a 7%.

#### **3.4.3.2 Eletroforese em gel contendo dodecil sulfato de sódio (SDS)**

Foi usada com a finalidade de determinar o peso molecular aproximado das unidades estruturais das proteínas da fração sarcoplasmática do pacu e executada de acordo com Weber e Osborn (1969) com adaptações introduzidas por Galeazzi (1978). Usou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), comparando-se a mobilidade relativa (MR) das proteínas da amostra com a das proteínas usadas como padrão. As proteínas usadas como padrão, provenientes da Sigma Chemical Co. foram: pepsina (36.000 daltons), ovalbumina (45.000 daltons), albumina de soro bovino (66.000 daltons) e inibidor de tripsina (10.400 daltons).

#### **– Preparação do gel**

O gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio foi preparado conforme descrito no Apêndice 2 e inserido em tubos verticais até 0,5 cm do topo. O mesmo procedimento usado na eletroforese simples foi adotado com relação à adição de água destilada.

#### **– Preparação da amostra**

Às amostras de proteínas da fração sarcoplasmática extraídas, conforme descrito no item anterior, assim como às proteínas usadas como padrão, adicionou-se uma solução composta de SDS, mercaptoetanol e tampão fosfato de sódio seguindo-se incubação de 2 horas a 37°C e adição de solução indicadora de migração.

A preparação detalhada das amostras e demais soluções encontra-se descrita no Apêndice 2.

#### **– Procedimento para corrida**

Terminada a polimerização do gel, as amostras foram adicionadas juntamente com o tampão (Apêndice 2). Os reservatórios superior e inferior,

contendo a solução tampão, foram conectados à fonte elétrica. Na corrida, que foi efetuada a temperatura ambiente, utilizou-se uma corrente elétrica lentamente ajustada até 5mA por tubo até que a banda do corante atingisse a parte inferior do tubo de gel.

#### – Revelação das proteínas

Os géis foram corados com uma solução de azul de Coomassie, metanol e ácido acético, conforme descrita no Apêndice 2, e posteriormente descorados com uma solução contendo 7,5% de ácido acético e 5% de metanol.

A mobilidade relativa é dada pela relação entre o percurso percorrido pela banda de proteína após a descoloração e o da banda de corante.

### 3.4.4 Experimentos biológicos

Na avaliação da qualidade nutricional das proteínas do pacu realizou-se o balanço de nitrogênio e a determinação do quociente de eficiência protéica (PER). Utilizou-se ratos da linhagem Wistar, recém desmamados (22 dias), de ambos os sexos, pesando entre 40 e 50 gramas, provenientes do biotério da Escola Paulista de Medicina. Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, com água e ração *ad libitum*. Em todos os ensaios a caseína comercial contendo 81,52% de proteína foi utilizada como proteína padrão.

#### 3.4.4.1 Preparo das dietas

Na realização dos ensaios biológicos foram preparadas dietas cuja composição centesimal está basicamente especificada pela AOAC (1975). As proporções usadas neste trabalho estão representadas na Tabela 1. A mistura salina foi preparada segundo Hegsted et alii (1941) e a mistura vitamínica foi preparada de acordo com a *Nutritional Biochemicals Corporation* (1977-1978) e estão descritas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Além da dieta de referência usando a caseína foram fornecidas 2 dietas com a fração protéica suprida pelas proteínas do pacu. A polpa homogeneizada do filé cru foi liofilizada e finamente moída obtendo-se uma farinha. Em uma das dietas o músculo usado como fonte de proteínas foi antes desengordurado pela extração com éter etílico a 35°C. Na outra dieta

Tabela 1: Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

Componentes	Porcentagens
Proteína	10
Gordura <sup>1</sup>	11
Mistura salina	4
Mistura vitamínica	2
Fibra	1
Carboidrato <sup>2</sup>	q.s.p. 100

<sup>1</sup> Óleo de milho comercial e do próprio pacu.

<sup>2</sup> Fornecido 25% na forma de açúcar refinado comercial e 75% como amido de milho comercial.

Tabela 2: Formulação da mistura salina utilizada nos ensaios biológicos, segundo Hegsted et alii (1941).

Componentes	Fórmula	Porcentagens
Carbonato de cálcio	$\text{CaCO}_3$	29,974
Fosfato di-potássico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	32,222
Fosfato mono-cálcico	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,493
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,191
Cloreto de sódio	$\text{NaCl}$	16,735
Citrato férrico	$\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}(\text{sic})$	2,747
Iodeto de potássio	$\text{KI}$	0,079
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,499
Cloreto de zinco	$\text{ZnCl}_2$	0,024
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,029

Tabela 3: Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo a *Nutritional Biochemicals Corporation* (1977/1978).

Componentes	Porcentagens
Concentrado de vitamina A (200000 UI/g)	2,948
Concentrado de vitamina D (400000 UI/g)	0,163
Alfa-tocoferol	3,276
Ácido ascórbico	29,486
Inositol	3,276
Cloreto de colina	49,144
Menadiona	1,474
Ácido p-aminobenzóico	3,276
Niacina	2,948
Riboflavina	0,655
Hidrocloreto de piridoxina	0,655
Hidrocloreto de tiamina	0,655
Pantotenato de cálcio	1,965
Biotina	0,013
Ácido fólico	0,058
Vitamina B-12	0,001

adicionou-se a farinha integral como fonte de proteína e lipídios. As três dietas foram preparadas de forma a conter 10% de proteína. Houve uma modificação do teor de gordura de 8% proposto pela AOAC (1975) para 11%. Isso foi feito para adequar este teor àquele apresentado pela farinha de filé integral. Segundo Burnette & Rusof (1978) e Hackler (1978) as dietas controle, assim como as dietas teste, devem apresentar quantidades iguais de gordura, até um máximo de 20%, nos casos de produtos contendo altos níveis deste componente.

### 3.4.4.2 Índices baseados no balanço metabólico

De acordo com Sgarbieri (1987), os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais providas de dispositivos que permitem a coleta de fezes e urina. A duração do teste foi de 10 dias, sendo os 5 primeiros de adaptação e nos demais foram coletadas fezes e urina, cujo teor de nitrogênio foi dosado posteriormente. Foram utilizados 6 ratos (4 machos e 2 fêmeas) para cada uma das 3 dietas.

Os índices calculados foram:

$$BN = NI - (NF + NU)$$

onde: BN = balanço de nitrogênio  
NI = nitrogênio ingerido  
NF = nitrogênio fecal total  
NU = nitrogênio urinário total

$$DA = \frac{NI - NF}{NI} = \frac{NA}{NI} \times 100$$

onde: DA = digestibilidade aparente  
NA = nitrogênio absorvido

$$VB = \frac{NI - NF - NU}{NI - NF} = \frac{NR}{NA} \times 100$$

onde: VB = valor biológico  
NR = nitrogênio retido

$$NPU = \frac{NI - NF - NU}{NI} = \frac{NR}{NI} \times 100$$

onde: NPU = utilização líquida da proteína

#### 3.4.4.3 Quociente de eficiência protéica (PER)

Para cada dieta, 6 ratos (4 machos e 2 fêmeos) foram mantidos durante 28 dias em gaiolas individuais. Os animais tiveram seus pesos individuais registrados 2 vezes por semana no decorrer do experimento. O consumo de dieta individual também foi cuidadosamente registrado.

O cálculo do quociente de eficiência protéica (PER) se fez, para cada animal, pela relação:

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso em gramas}}{\text{proteína consumida em gramas}}$$

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Determinações químicas

#### 4.1.1 Composição centesimal aproximada

Os dados relativos à data de obtenção, número de exemplares, rendimento em filé e procedência das amostras analisadas estão na Tabela 4. Tais amostras apresentaram composição centesimal aproximada mostrada na Tabela 5.

Suzuki (1981) aponta valores de rendimento da porção comestível de pescado na faixa entre 45-50%, sendo que no caso de algumas espécies estes valores atinge até 65%.

A umidade teve a maior variação em torno da média, sendo que o desvio padrão da proteína total foi menor que o dos lipídios totais.

Umidade e principalmente lipídios são apontados como os constituintes que apresentam maior variabilidade no músculo de pescado, em contraste com as proteínas (Zaitsev, 1969). Tais variações em uma mesma espécie são devidas a uma série de fatores como idade, estado fisiológico, dieta, região e época do ano da captura. No caso dos experimentos realizados neste trabalho não foi verificada uma diferença relevante entre os teores de umidade e lipídios quanto à sua amplitude, apesar de procedências e datas de obtenção distintas. Para o mandi (*Pimelodus claria*), um peixe gorduroso como o pacu, Henderson e Tocher (1987) apontam uma faixa que vai de 8,3% a 20,5% de lipídios dependendo da época do ano. Não se dispondo de dados precisos sobre o histórico de cada lote, nem de amostragem sistemática ao longo do ano, é difícil precisar as razões das diferenças entre esses dados de composição centesimal.

Quanto à variação observada no teor de proteínas, podemos encontrar em Moraes et alii (1984) um comportamento semelhante para as proteínas do saguiri (*Curimatus elegans*) cujo teor variou ao longo das análises de 16,2% a 18,9%. O mesmo ocorreu com o curimbatá (*Prochilodus scrofa*) cuja variação esteve entre 19,0% e 21,5% (Maia, 1980). O mesmo não ocorreu em outros trabalhos como o de Netto (1984) no qual o teor em proteínas para o híbrido da tilápia manteve-se praticamente constante ao longo dos experimentos (18,5% a 18,6%).

Tabela 4: Dados sobre os espécimes (*Colossoma mitrei*) utilizados na determinação centesimal aproximada do filé.

Amostra	Data	Número de exemplares	Peso médio em gramas	Rendimento em filé (%)
A <sup>1</sup>	10/05/84	5	1050	48,6
B <sup>1</sup>	05/06/84	4	2200	50,2
C <sup>2</sup>	15/07/84	4	3200	55,1
D <sup>2</sup>	10/05/85	6	3840	52,0
E <sup>2</sup>	15/06/85	4	3600	54,6
F <sup>2</sup>	06/02/86	3	3800	55,6

<sup>1</sup> Amostra proveniente da Estação de Piscicultura de Pirassununga - SP.

<sup>2</sup> Amostra proveniente de frigoríficos comerciais de Campinas - SP.

Tabela 5: Composição centesimal aproximada do filé do pacu (*Colossoma mitrei*)<sup>1</sup>.

Amostra	Umidade (%)	Proteína total (%)	Lipídios totais (%)	Cinzas (%)
A	68,6	12,7	16,6	1,3
B	67,6	12,8	17,0	1,4
C	68,5	12,9	16,9	1,4
D	66,4	13,5	18,2	1,3
E	68,3	13,1	17,3	1,3
F	66,9	13,3	17,6	1,3
Amplitude	66,4-68,6	12,2-13,5	16,6-18,2	1,3-1,4
Média±dp	67,7±0,9	13,0±0,3	17,2±0,6	1,3±0,1

<sup>1</sup> Valores médios obtidos a partir de 3 repetições das determinações para cada amostra especificada na Tabela 4.

Aparentemente a relação inversa entre o teor de umidade e o teor de lipídios apontada por diversos autores (Stansby, 1962; Thurston et alii, 1959) foi observada assim como a relação inversa entre o teor de umidade e o tamanho do peixe (Suzuki, 1981). Ainda que as variações nos valores de umidade e lipídios entre os vários lotes não tenha sido grande, estas relações foram observadas nas amostras A e D. Os valores de cinzas permaneceram praticamente constantes da mesma forma que os obtidos para peixes de água doce por Morais et alii (1968), Maia (1980) e outros.

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, o pacu se enquadra na categoria de pescado de alto teor de gordura (>15%) e baixo teor protéico (<15%) estabelecida por Stansby (1962). Seu alto teor lipídico pode ser explicado pelo fato de se ter analisado como parte do filé também a região muscular ventral, onde se deposita a gordura cavitária. Essa variação nas várias secções do filé foi constatada por Kinsella et alii (1977b) e relatada por Henderson e Tocher (1987) que, em sua revisão, ressaltam que os valores do teor de lipídios mencionados para várias espécies dizem respeito ao filé como um todo.

#### 4.1.2 Composição em minerais

A Tabela 6 mostra a composição do filé de pacu em cálcio, magnésio, zinco, ferro, fósforo, sódio e potássio. Os valores encontrados incluem-se nas faixas apontadas por Causeret (1962) e Zaitsev (1969) para o teor desses minerais em peixes de água doce. Em ambos os autores constata-se a ampla faixa de valores em que estes minerais podem estar presentes. O pacu apresentou teores de cálcio e magnésio próximos aos da média desses minerais apresentada por Causeret (1962), sendo que o seu teor em fósforo (121,5 mg%, isto é, por 100g de filé) é inferior à média de 220 mg%. O baixo teor de ferro (0,4 mg%) corresponde ao teor mínimo apontado por Zaitsev (1969) para peixes de água doce.

As concentrações encontradas para o zinco estão próximas das obtidas por Rocha et alii (1982) para alguns peixes da amazônia. Fósforo e potássio aparecem em maior quantidade; zinco e ferro estão em menor concentração, o que coincide com os dados levantados para 15 espécies de água doce analisadas por Kinsella et alii (1977a) e para a enguia analisada por Mustafa e Medeiros (1985).

Tabela 6: Composição em minerais do filé do pacu (*Colossoma mitrei*).

Componente mineral	Amostra <sup>1</sup>			média	d.p.
	1	2	3		
Ca	51,0	59,6	55,1	55,2	4,3
Mg	20,1	24,3	25,8	23,4	3,0
Zn	0,9	1,2	0,5	0,9	0,4
Fe	0,3	0,7	0,1	0,4	0,3
Na	29,2	30,1	29,5	29,6	0,5
P	121,2	120,8	122,5	121,5	0,9
K	120,1	117,3	117,9	118,4	1,5

<sup>1</sup> Amostras obtidas em frigoríficos comerciais compostas de 3 exemplares cada uma.

#### 4.1.3 Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos de pescado é bastante estudada na literatura havendo muita discussão sobre as diferenças entre espécies marinhas e de água doce, bem como sobre os fatores que determinam tais diferenças. O estudo desta composição é importante à medida em que as propriedades do peixe e seus derivados dependem em grande parte do seu teor de lipídios e do grau de insaturação de seus ácidos graxos.

Descrevendo a ocorrência geral de ácidos graxos em peixes de água doce, Henderson e Tocher (1987) dizem que a porcentagem de ácidos graxos saturados varia entre 9 e 36% dos ácidos graxos totais. Para peixes tropicais esta faixa apresenta limites mais elevados podendo atingir até 45%. Dentre os saturados, o ácido palmítico (C16:0) predomina e, em proporções menores, os ácidos esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0) estão sempre presentes. O ácido láurico (C12:0) também ocorre às vezes, mas em proporções menores que 2%. O ácido araquídico (C20:0) tem sido reportado como um componente menor em várias espécies. Os ácidos graxos saturados com número de carbono ímpar perfazem geralmente menos que 2,4% dos ácidos graxos do músculo sendo o ácido pentadecanóico, C15:0, e o ácido margárico, C17:0, os principais. Entre os monoinsaturados predominam o ácido oléico (C18:1)

Tabela 7: Composição dos principais ácidos graxos do filé do pacu (*Colossoma mitrei*).

Pico	Ácido graxo	% $\pm$ d.p. <sup>1</sup>
1	14:0	2,72 $\pm$ 0,2
3	16:0	22,68 $\pm$ 0,4
4	16:1	8,95 $\pm$ 0,8
5	18:0	8,15 $\pm$ 0,5
6	18:1	42,85 $\pm$ 1,2
7	18:2	10,30 $\pm$ 0,3
9	18:3	1,76 $\pm$ 0,3

<sup>1</sup> Valores médios obtidos de 2 amostras provenientes de frigorífico comercial e estação de piscicultura.

seguido pelo palmitoléico (C16:1) e eicosamonoenóico (C20:1). Os demais foram reportados em pequenas quantidades. O ácido linoléico (C18:2) é o ácido dienóico presente em maior proporção.

Foram detectados como principais ácidos graxos do pacu (Tabela 7) os ácidos oléico (42,85%), palmítico (22,68%), linoléico (10,30%), palmitoléico (8,95%), esteárico (8,15%), mirístico (2,72%) e linolênico (1,76%). Os demais picos encontrados estão em quantidades menores que 1%. Entre eles puderam ser identificados os ácidos pentadecanóico (C15:0, pico 2) e eicosamonoenóico (C20:1, pico 8). O cromatograma dos ácidos graxos encontra-se na Figura 1.

O filé do pacu apresenta 33,55% de ácidos graxos saturados e 63,86% de ácidos graxos insaturados, considerando os ácidos graxos identificados. As proporções de cada ácido graxo encontrado enquadram-se nas observações encontradas na literatura já mencionada.

No estudo de Maia (1980) sobre o curimatá, revelaram-se como principais os ácidos palmítico (32,6%), oléico (23,1%), e palmitoléico (14,1%). Para o mandi, segundo Andrade, 1978 (apud Maia, 1980), apareceram como principais os ácidos oléico (33,3%), palmítico (21,5%) e palmitoléico (11,2%). Observa-se que no mandi, como no pacu, o ácido oléico precede o palmítico,

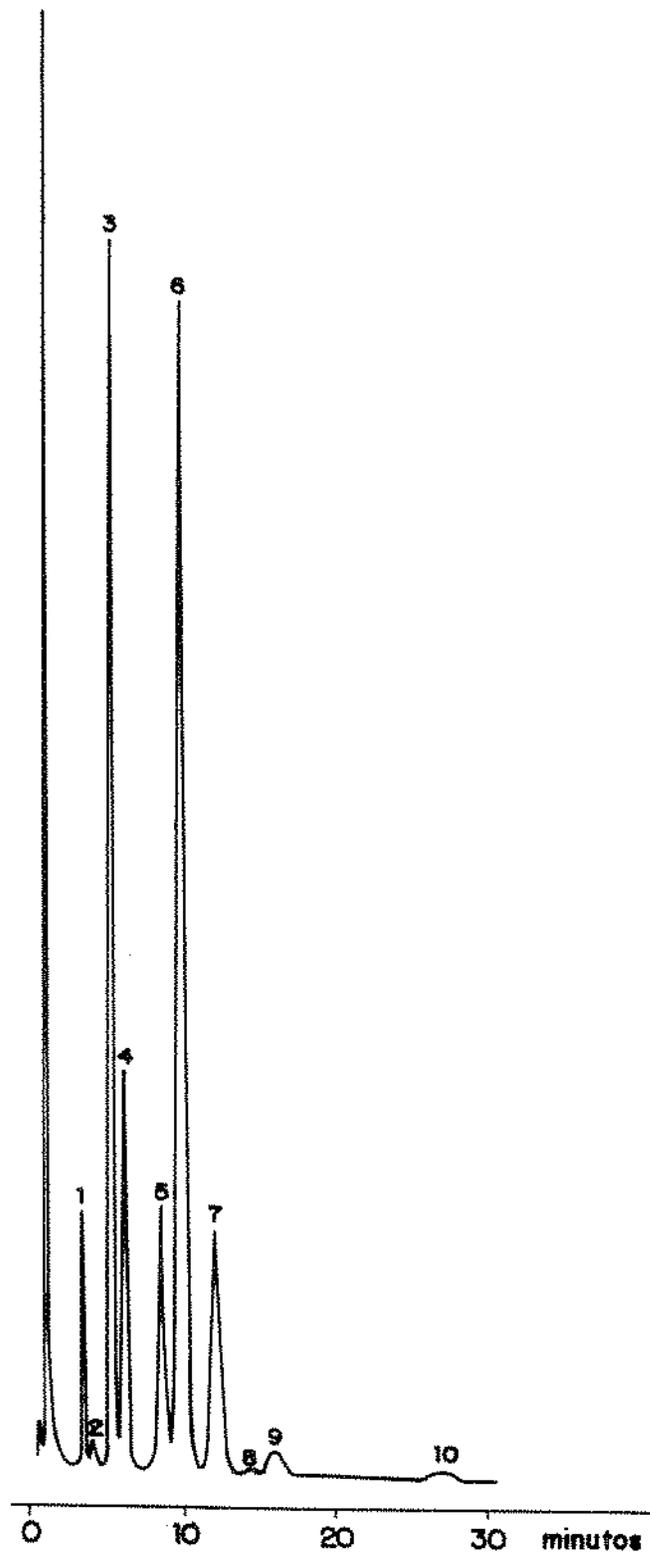


Figura 1: Cromatograma dos ácidos graxos do pacu.

ao contrário do que ocorre no curimatã. Quanto ao teor de ácido linoléico, o pacu apresenta valores superiores aos do mandi (7,5%) e do curimatã (5,4%).

Investigando 10 espécies de água doce comercializadas em Manaus, Maia e Rodriguez-Amaya (1974) encontraram o ácido palmítico como o principal ácido graxo de 7 espécies: branquinha, curimatã, jaraqui, pescada, pirarucu, surubi e tucunaré. Para o pacu, sardinha e tambaqui, o ácido oléico apareceu em primeiro lugar. Além destes 2 ácidos graxos também estavam presentes os ácidos palmitoléico, linoléico e araquídico, em diferentes ordens de quantidade.

Entre as 6 espécies de água doce da Índia analisadas por Viswanathan Nair e Gopakumar (1978) aparecem com maiores teores os ácidos oléico, palmítico e esteárico. Sen et alii (1976) encontraram os mesmos três ácidos graxos como os mais abundantes em 4 espécies também provenientes da Índia, sendo que em apenas uma delas o ácido araquidônico foi o mais abundante.

Ackman (1967) determinou os ácidos graxos de 5 espécies de água doce do Canadá com a predominância dos ácidos oléico, palmitoléico e eicosapentaenóico (C20:5). Para as 18 espécies de água doce do estado de Nova Iorque, Kinsella et alii (1977b) encontraram os ácidos palmítico, palmitoléico, oléico, docosahexanóico (C22:6) e eicosapentaenóico (C20:5), sendo os mesmos ácidos graxos encontrados por Gruger et alii (1964) para 3 espécies do estado de Washington.

As semelhanças observadas entre os peixes de diferentes proveniências refletem a influência exercida pelo habitat, temperatura e principalmente as dietas na composição em ácidos graxos. Assim, a razão entre a porcentagem de ácidos graxos insaturados e a porcentagem de ácidos graxos saturados é de 1,9 para o pacu, 1,6 para o mandi (Andrade, 1978 apud Maia, 1980), 1,2 para o curimatã (Maia, 1980), 1,3 para as 6 espécies indianas (Viswanathan Nair e Gopakumar, 1978), 3,0 para as 18 espécies americanas (Kinsella et alii, 1977b) e 3,2 para as espécies canadenses (Ackman, 1967). Constata-se a afirmação de que o grau de insaturação dos ácidos graxos do pescado está diretamente relacionado com a temperatura, sendo que a proporção de ácidos graxos insaturados aumenta com o decréscimo da temperatura (Henderson e Tocher, 1987).

#### 4.1.4 Composição em aminoácidos

A composição em aminoácidos das proteínas do pacu, em termos de gramas de aminoácidos por 16 gramas de nitrogênio (ou seja, por 100 gramas de proteína total), aparece na Tabela 8.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Mai et alii (1980) para 6 espécies de peixe de água doce dos Estados Unidos, com exceção do teor mais elevado de lisina encontrado para o pacu. Os valores encontrados por Maia et alii (1983) para o curimatá também são elevados para a lisina (11,38 g/16gN) assim como os da tilápia (10,6 g de lisina/16gN) investigada por Khalil et alii (1980). Quanto à metionina, o pacu apresenta valores superiores aos dos peixes mencionados acima, revelando-se uma boa fonte deste aminoácido.

Em relação aos aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano que não foi determinado neste trabalho, o pacu apresenta valores elevados. Comparado com um padrão (NRC, 1980), tem como único aminoácido deficiente a valina (Tabela 8).

## 4.2 Extração e fracionamento das proteínas do filé

A determinação quantitativa das frações protéicas do pescado fresco é de grande interesse como ponto de referência para estudos de conservação e de aproveitamento tecnológico. A extratibilidade das proteínas do músculo tem sido considerada um critério para avaliação de mudanças das propriedades do músculo de pescados congelados ou conservados em gelo por vários autores (Snow, 1950; Dyer e Dingle, 1962; Kolakowski et alii, 1977; Kim et alii, 1977).

Na Tabela 9 encontram-se as porcentagens relativas às frações sarcoplasmáticas e miofibrilares das proteínas do pacu.

Aproximadamente 92% da proteína total do pacu pôde ser extraída com solução de NaCl a 5% a pH 7,2. Este valor é semelhante ao de 93% obtido por Awad et alii (1969) em seu trabalho com um peixe de água doce (*Coregonus clupeiformis*). Curran et alii (1986) encontraram um valor de 96% para o "sabalo" dos lagos bolivianos.

Khalil et alii (1980) encontraram valores de 66,7% para a fração de proteínas miofibrilares e 24,8% para a fração de proteínas sarcoplasmáticas

Tabela 8: Composição em aminoácidos (g/16gN) da proteína do filé do pacu (*Colossoma mitrei*) e do padrão de referência para uma proteína de alta qualidade, segundo o *National Research Council* (1980).

Aminoácido	Pacu <sup>1</sup>	Proteína Padrão (NRC 1980)
ácido aspártico	10,49	
treonina	3,82	3,5
serina	4,83	
ácido glutâmico	19,83	
prolina	4,73	
glicina	4,85	
alanina	5,08	
valina	3,88	4,8
1/2 cistina	0,81	
metionina	2,79	
sulfurados totais (1/2 cys + met)	3,60	2,6
isoleucina	4,52	4,2
leucina	8,75	7,0
tirosina	3,83	
fenilalanina	4,29	
aromáticos totais (tyr + phe)	8,12	7,3
histidina	2,24	1,7
lisina	10,05	5,1
arginina	6,65	

<sup>1</sup> Valores médios de duas amostras compostas de 3 exemplares cada uma.

Tabela 9: Porcentagem das frações sarcoplasmática e miofibrilar do pacu (*Colossoma mitrei*).

Frações	Porcentagens <sup>1</sup>
Proteína total extraível	92,0
Proteínas miofibrilares	64,3
Proteínas sarcoplasmáticas	25,0

<sup>1</sup> A porcentagem de extração foi calculada em relação à proteína total do músculo determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, sendo descartado o nitrogênio não protéico.

para a *Tilapia nilotica*. Moorjani et alii (1962) estudaram 4 espécies de água doce da Índia e encontraram para a proteína total extraível valores de 90,7%, 77,8%, 90,0% e 86,0% e para as proteínas sarcoplasmáticas teores de 29,0%, 22,0%, 35,0% e 35,7%.

#### 4.3 Digestibilidade *in vitro* da proteína total do filé de pacu

Os valores obtidos na determinação da digestibilidade *in vitro* da proteína total do filé estão dispostos na Tabela 10.

O valor médio de 84,3% está abaixo da digestibilidade de 91,5% da caseína testada. Jhaveri et alii (1984) determinaram as digestibilidades de 5 espécies marinhas, sendo que a mais elevada foi a de 92,2% encontrada para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), seguida por 91,3% do "monkfish" (*Lophius piscatorius*), 89,8% da pescada (*Merluccius bilinearis*), 89,2% do "saup" (*Stenotomous chrysops*) e 83,1% da lula (*Loligo pealei*).

#### 4.4 Eletroforese

O perfil eletroforético das proteínas sarcoplasmáticas do filé do pacu obtido por eletroforese simples em gel de poliacrilamida e em SDS (dodecil sulfato de sódio) aparece na Figura 2 e na Figura 3, respectivamente.

Tabela 10: Digestibilidade *in vitro* das proteínas do filé do pacu (*Colossoma mitrei*).

Amostra <sup>1</sup>	% proteína digerida
1	83,5
2	85,0
3	85,6
4	83,2
Média ± d.p.	84,3 ± 1,2

<sup>1</sup> Amostras compostas de 2 e 3 exemplares.

A separação eletroforética das proteínas hidrossolúveis do músculo do pescado foi descrita por vários autores (Cowie, 1968; Mackie e Jones, 1978; Keenan e Shaklee, 1985) e resulta na obtenção de padrões específicos para cada espécie uma vez que cada espécie de peixe apresenta um só conjunto de diferentes tipos de proteínas com bandas de diferentes intensidades, larguras e mobilidades. Assim, a identificação de uma espécie pode ser viabilizada pela comparação eletroforética com os padrões estabelecidos para espécies conhecidas. Além de ser um meio de identificação de espécies, também pode ser usada para estimar o grau de parentesco genético entre espécies, bem como com a finalidade de inspeção. Segundo Bremner e Vail (1983), o método é reconhecido pela AOAC e tem sido empregado pela *Food and Drug Administration* há muitos anos para detectar classificações equivocadas e substituições ilícitas de pescados.

Segundo Cowie (1968), a eletroforese em gel de poliacrilamida também pode ser utilizada para identificar peixes congelados e estocados em gelo, já que estes fornecem padrões eletroforéticos semelhantes aos do pescado fresco evidenciando uma larga aplicação comercial para o método. Damiani e Rossi (1974) observaram diferenças marcantes entre os eletroforetogramas de pescado fresco e no início de deterioração. Com produtos processados, como farinhas de pescado, o problema de identificação também se coloca. Keenan e Shaklee (1985) desenvolveram uma técnica para a identificação de filés cozidos e no mesmo trabalho citam Mackie e Taylor (1972) que estenderam o

uso da eletroforese para o pescado enlatado, assim como Draetta et alii (1985) que estudaram extratos de peixes crus, cozidos e enlatados obtidos de atum, bonito, cavalinha, merluza, pescada branca, pescado cambucu, sardinha e tainha. Seria de grande interesse a comparação das bandas resultantes da eletroforese simples em gel de poliacrilamida das proteínas do pacu com as de outras espécies da mesma família, como o tambaqui e a pirapitinga, assim como com as do híbrido "tambacu".

Observa-se pelas Figuras 2 e 3 que na eletroforese com SDS um número superior de bandas foi obtido, uma vez que, com o tratamento com o mercaptoetanol, as ligações dissulfídicas intra e intercadeia são rompidas e as proteínas são convertidas em seus monômeros. Weber e Osborn (1969) mostraram que há uma relação linear entre o logaritmo do peso molecular do monômero de muitas proteínas conhecidas e a mobilidade dos monômeros em relação ao azul de bromofenol. Na Figura 4 está a curva padrão de pesos moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS obtida pelo ajuste de um modelo de regressão linear simples. A reta encontrada tem a seguinte equação:

$$\log(\text{Peso Molecular}) = 5,52 - 2,00 \times \text{Mobilidade Relativa},$$

com  $R^2$  de 98,75% e  $p = 0,0062$ . A partir das mobilidades relativas obtidas, temos que os pesos moleculares estimados das 8 subunidades encontradas, pela substituição na fórmula acima, são, em ordem decrescente, 149.190, 127.083, 66.909, 52.724, 38.257, 21.874, 6.119 e 4.089 daltons.

## 4.5 Experimentos biológicos

Na Tabela II estão relacionados o quociente de eficiência protéica (PER), o balanço de nitrogênio (BN), a digestibilidade aparente (DA), o valor biológico (VB) e a taxa de utilização líquida da proteína (NPU) obtidos nos ensaios biológicos com dietas de caseína, farinha integral e farinha desengordurada de pacu preparadas conforme o item 3.4.4.1.

Os métodos de avaliação nutricional de proteínas que se baseiam no balanço metabólico são afetados por fatores que influem na absorção e retenção do material ingerido. O balanço de nitrogênio encontrado nas dietas foi positivo, ou seja, o nitrogênio ingerido foi superior à soma do nitrogênio

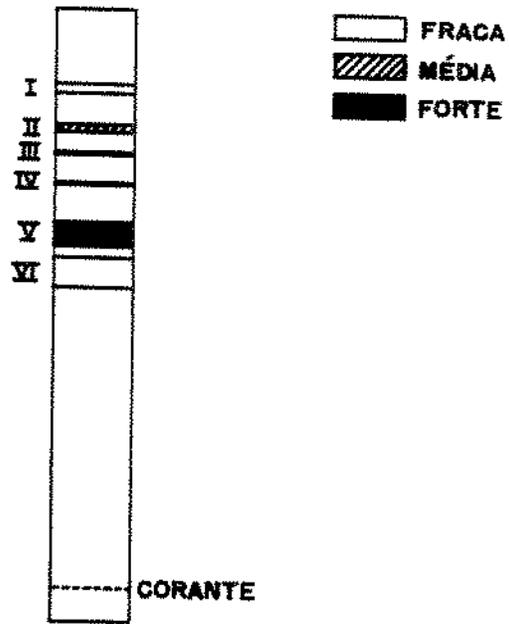


Figura 2: Eletroforese simples em gel de poliacrilamida das proteínas sarcoplasmáticas do filé do pacu.

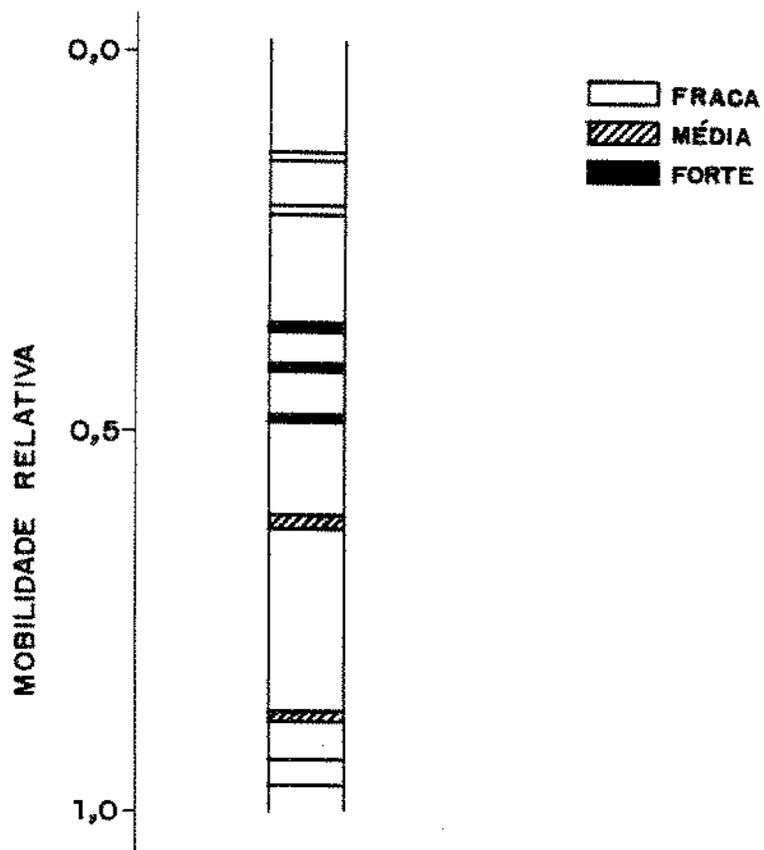
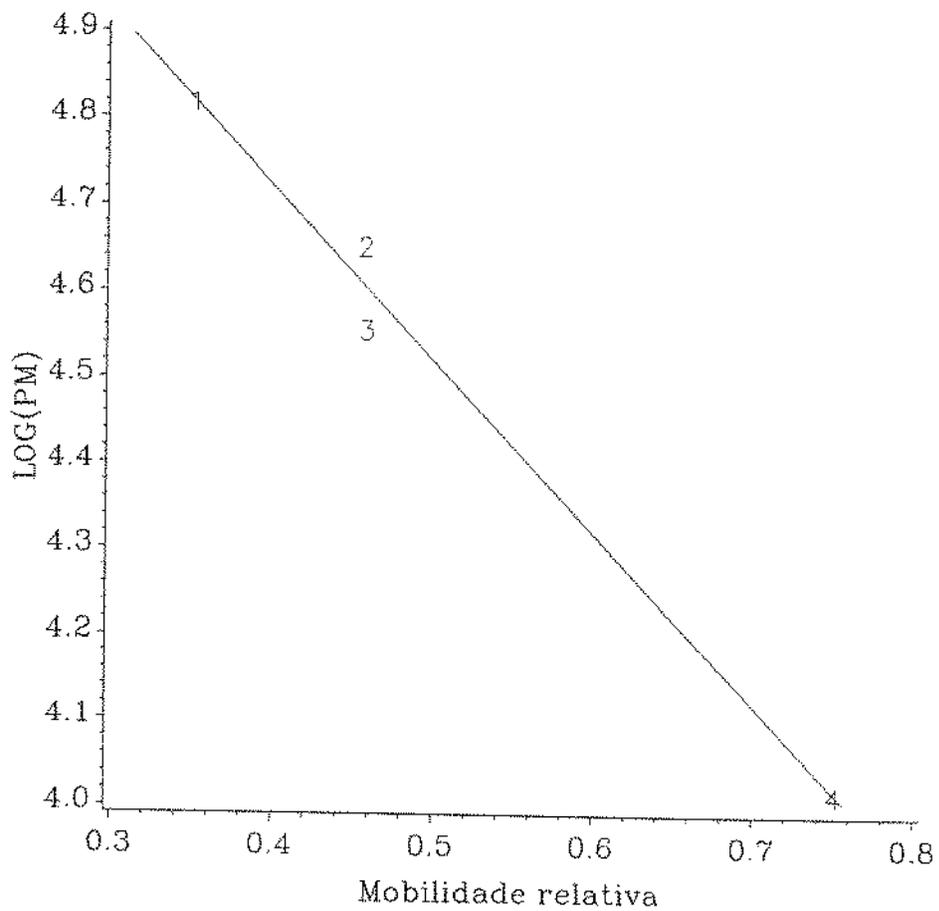


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) das proteínas da fração sarcoplasmática do filé do pacu.



Regressao: Peso Mol. = 5,52 - 2,00 x Mob. Rel.

Figura 4: Curva padrão (reta de regressão) obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS entre pesos moleculares e mobilidades relativas. 1 - albumina de soro bovino, PM 66.000. 2 - ovalbumina, PM 45.000. 3 - pepsina, PM 36.000. 4 - inibidor de tripsina, PM 10.400 daltons.

Tabela 11: Balanço de nitrogênio, digestibilidade aparente, valor biológico, taxa de utilização líquida da proteína (NPU), quociente de eficiência protéica (PER) em ratos Wistar alimentados com caseína, farinha integral de filé de pacu e farinha desengordurada como fonte de proteína.

Determinação		Fontes de proteína		
		caseína	far. integral	far. desengord.
Nitrogênio ingerido	média	0,9761	0,7728	0,6361
	d.p.	0,0855	0,0481	0,0163
Nitrogênio fecal	média	0,1000	0,0763	0,1001
	d.p.	0,0186	0,0043	0,0090
Nitrogênio urinário	média	0,0746	0,1181	0,0936
	d.p.	0,0105	0,0202	0,0466
Balanço de nitrogênio	média	0,8014 <sup>a</sup>	0,5782 <sup>b</sup>	0,4424 <sup>c</sup>
	d.p.	0,0793	0,0709	0,0523
Digestib. aparente	média	89,78 <sup>a</sup>	90,05 <sup>a</sup>	84,28 <sup>b</sup>
	d.p.	1,50	1,40	1,22
Valor biológico	média	91,40 <sup>a</sup>	82,79 <sup>b</sup>	82,47 <sup>b</sup>
	d.p.	1,57	4,36	8,97
NPU	média	82,06 <sup>a</sup>	74,59 <sup>ab</sup>	69,55 <sup>b</sup>
	d.p.	1,79	4,76	7,97
Consumo de ração	média	288,00	284,20	272,00
	d.p.	25,34	17,99	6,96
Ganho de peso	média	81,80	82,80	79,00
	d.p.	4,49	9,23	4,64
PER	média	2,82 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>
	d.p.	0,10	0,32	0,13

<sup>1</sup> Os valores representam a média para 5 ratos. Médias na mesma linha com o mesmo índice a, b ou c não são significativamente diferentes, a um nível de 95% de confiança, pelo teste de Duncan.

excretado pelas vias urinária e fecal. No caso, isto se verifica pelo fato de os ratos estarem em crescimento, havendo necessidade de formação de novos tecidos pelo organismo. A digestibilidade aparente para a dieta de farinha integral foi superior à da dieta de farinha desengordurada, o que reflete uma absorção mais eficiente dos aminoácidos resultantes da hidrólise das proteínas ingeridas pelas enzimas digestivas no caso da primeira. Os valores da utilização líquida das proteínas da farinha integral e da farinha desengordurada não apresentaram diferenças significativas. Isso demonstra que, levando em conta a digestibilidade, o nitrogênio da proteína de ambas está sendo retido com igual eficiência. Da mesma forma, os valores biológicos não se mostraram significativamente diferentes, ou seja, em ambas as dietas as substâncias nitrogenadas estão chegando às células em proporção adequada para a síntese.

Levando em conta que a proteína fornecida pelas dietas de farinha integral e farinha desengordurada deveria ser a mesma, poder-se-ia levantar hipóteses para os motivos da obtenção de digestibilidade aparente mais elevada para a primeira. Entre elas, a da influência de fatores inerentes ao grupo de animais utilizados e interferência de algum resíduo de solvente utilizado no desengorduramento. Burnette e Rusoff (1978) consideraram inapropriada a extração da gordura do alimento a ser testado neste tipo de experimento, uma vez que a presença de resíduos de solvente pode provocar alterações na proteína. Assim, uma possível desnaturação da proteína poderia ter causado uma absorção menos eficiente dos aminoácidos da farinha desengordurada. Bender (1978) menciona que o tratamento da farinha de pescado com solvente na preparação de concentrados e isolados pode reduzir o valor nutricional ou dar origem a produtos tóxicos a partir de resíduos do solvente, sobretudo quando esse processo se dá a altas temperaturas. A avaliação precisa desse efeito negativo torna-se difícil uma vez que o crescimento dos ratos do grupo alimentado com a dieta de farinha desengordurada foi normal, como se vê pela Figura 5.

Uma série de experimentos com ratos foram descritos por Toyama e Kaneda (1962) no sentido de comparar o suprimento calórico fornecido por óleos de várias espécies de pescado com aqueles fornecidos por gorduras animais e vegetais. Houve consenso quanto à eficiência do óleo de pescado que se mostrou equivalente ou superior aos demais. Os mesmos autores reportam altos valores de digestibilidade para óleos de pescado.

Quanto aos índices baseados no balanço metabólico, tivemos que,

comparativamente à caseína, os valores obtidos para a farinha de filé integral foram inferiores somente quanto ao valor biológico. Digestibilidade aparente, quociente de eficiência protéica e balanço de nitrogênio não apresentaram diferenças significativas.

Em relação ao PER, não houve diferença significativa entre as 3 dietas, sendo que os valores encontrados para as 2 farinhas de pacu foram altos. O ganho de peso dos 3 grupos ao longo do tempo está registrado na Figura 5 e o consumo de dieta em função do tempo na Figura 6.

De maneira geral, o pescado é considerado um alimento de alto valor nutritivo. Geiger e Borgstrom (1962) mencionam o fato do peixe ser tradicionalmente considerado um alimento de alta digestibilidade e reportam uma série de trabalhos realizados com humanos e ratos os quais fornecem altos valores de digestibilidade (quase sempre superiores a 90%) para uma série de espécies. Segundo estes autores a relativa facilidade com que o pescado é digerido poderia ser explicada pela natureza do seu músculo que contém um baixo teor de tecido conectivo ou ainda pela fraca associação de seus elementos estruturais.

Isso se comprova em trabalhos como o de Afolabi et alii (1984a) que tomaram 5 espécies de água doce nigerianas e, determinando seu valor nutritivo, compararam o pescado fresco ao defumado e seco por diversos processos. Os índices obtidos para o valor biológico aparente, digestibilidade verdadeira, taxa de utilização líquida da proteína e quociente de eficiência protéica, para o peixe fresco liofilizado variaram entre 85,72-98,72; 95,10-98,71; 82,84-96,01 e 2,2-2,9, respectivamente. Ressalta-se que o NPU foi calculado através do nitrogênio da carcaça e a digestibilidade verdadeira foi determinada. Os valores da digestibilidade verdadeira foram superiores aos encontrados para a caseína.

Trabalhando com 5 espécies marinhas da Nova Inglaterra, Jhaveri et alii (1984) encontraram valores de PER de: 3,50; 3,53; 4,00 e 3,25 considerados bastante altos quando comparados a 2,98 para a caseína.

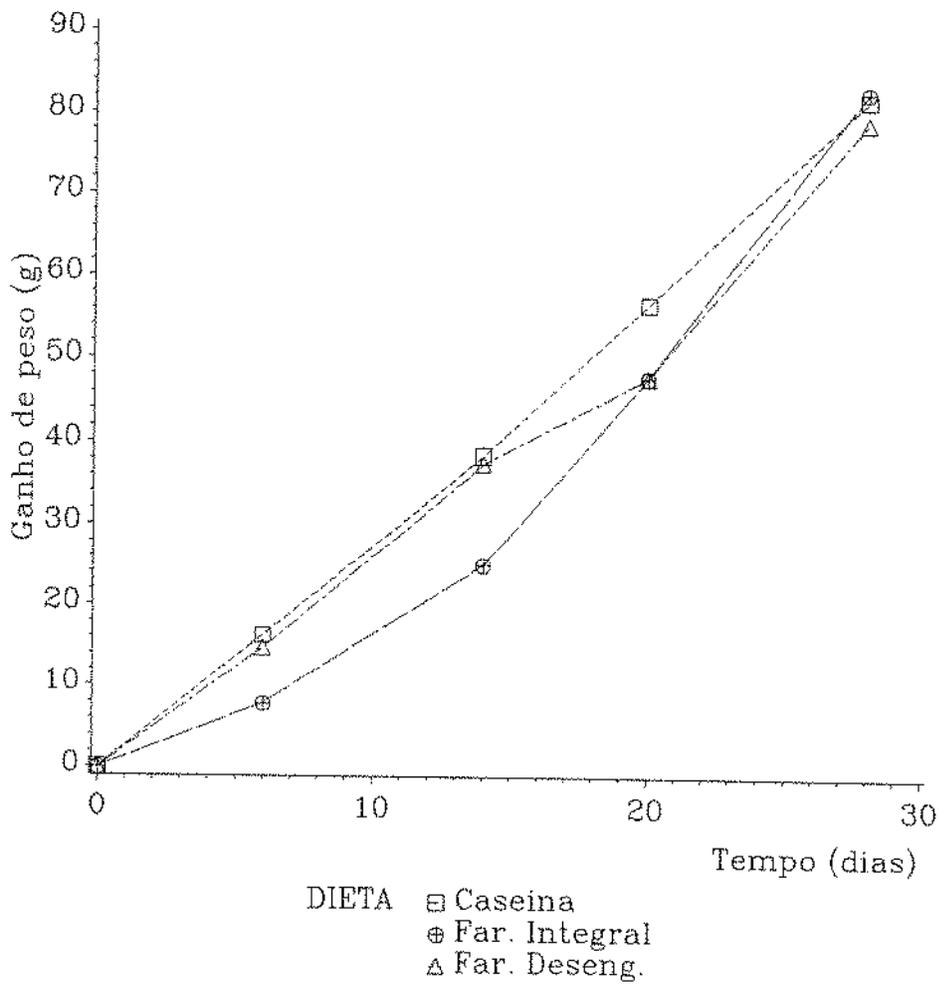


Figura 5: Variação do peso médio dos ratos Wistar recém-desmamados em dietas à base de caseína, farinha integral e farinha desengordurada de pacu em experimento ao longo de 28 dias.

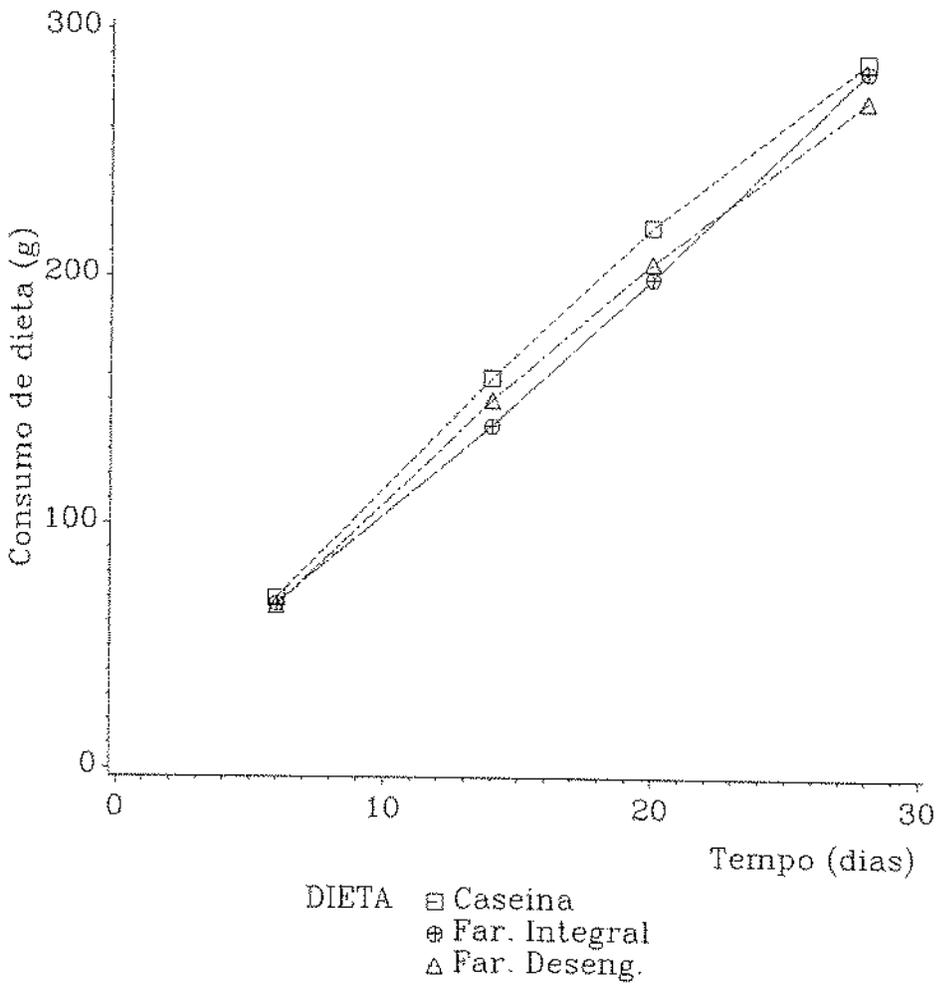


Figura 6: Consumo médio de dietas à base de caseína, farinha integral e farinha desengordurada de pacu dos 3 grupos de ratos Wistar recém-desmamados em experimento ao longo de 28 dias.

## 5 Conclusões

Nas condições em que foi realizado este trabalho concluiu-se que:

1. O pacu enquadra-se na categoria de pescado de alto teor de lipídios e baixo teor protéico.
2. Oléico, palmítico, linoléico, palmitoléico e esteárico são os ácidos graxos que ocorrem em maior concentração. A relação entre os teores de ácidos graxos insaturados e saturados do pacu é de 1,9 e sua composição em ácidos graxos enquadra-se no perfil de ácidos graxos para peixes de água doce.
3. O filé do pacu deve ser considerado um alimento protéico e energético, não sendo considerado uma boa fonte de minerais.
4. A fração protéica apresenta-se como uma boa fonte de aminoácidos essenciais, particularmente de lisina e metionina.
5. A extração e o fracionamento das proteínas do filé mostraram que, em relação à proteína total do músculo 64,3% compunham a fração miofibrilar e 25,0% a fração sarcoplasmática. A proteína total extraível com solução de NaCl 5% a pH 7,2 foi de 92,0%.
6. A caracterização eletroforética das proteínas sarcoplasmáticas do filé do pacu através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS evidenciou a presença de 8 bandas de proteínas de pesos moleculares na faixa de 4 a 150 Kd.
7. Considerando o nível estatístico de significância de 5%, os quocientes de eficiência protéica (PER) não diferiram da caseína. Quanto aos índices calculados a partir do balanço de nitrogênio para a farinha de filé integral, a retenção de nitrogênio e o valor biológico (VB) foram inferiores enquanto que a digestibilidade aparente (DA) e a utilização líquida da proteína não diferiram da caseína. Para a farinha desengordurada todos os índices (exceção ao PER) foram inferiores aos da caseína.

## 6 Referências Bibliográficas

- AACC (*American Association of Cereal Chemists*) Approved Methods of the AACC. vol 2, St. Paul, Minnesota, USA, 1976.
- ACKMAN, R. G. Characteristic of the fatty acid composition and biochemistry of some freshwater fish oils and lipid in comparison with marine oils and lipids. *Comp. Biochem. Physiol.* 22: 907-922, 1967.
- AFOLABI, O. A.; ARAKOWO, O. A. & OKE, O. L. Quality changes of Nigerian traditionally processed freshwater fish species. II. Chemical composition. *J. Food Technol.* 19: 341-348, 1984b.
- AKESON, W. R. & STAHMANN, M. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.* 83: 257-261, 1964.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO, S. A.; BERNARDINO, G.; FERRARI, W. & ALCANTARA, R. C. G. Cytogenetic studies of *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their inter-specific hybrid. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol. I. Berlin, 1987.
- ALZUGUIR, F. Difusão da Aqüicultura. In Simpósio Brasileiro sobre aqüicultura II e Encontro Nacional de Ranicultura II, Jaboticabal, 1980. Anais. Brasília, Sudepe, 1981. p.53-68.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Standard Methods for the examination of water and wastewater. 14<sup>th</sup> ed. Washington D.C., USA, 1975. p.476.
- AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) Official Methods of Analysis. 11<sup>th</sup> ed. Washington D.C., USA, 1975.
- AWAD, A.; POWRIE, W. D. & FENNEMA, O. Deterioration of fresh water white fish muscle during frozen storage at -10°C. *J. Food Sci.* 34: 1-9, 1969.
- BARBOSA, J. M. Espécies do gênero *Colossoma* (Pisces, *Characidæ*) importantes para piscicultura em regiões tropicais. In Síntese dos trabalhos realizados com espécies do Gênero *Colossoma*. Março/82 a Abril/86. Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura. p.8.

- BECKMAN INSTRUMENTS, Inc. Amino Acid Analyser's Instruction Manual. Spinco Division Palo Alto, CA, USA, 1977.
- BENDER, A. E. Effects on nutrients. In: *Food Processing and Nutrition*. Academic Press, London, 1978. p.72.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- BREMNER, H. A. & VAIL, A. M. A. Eletrophoretic identification of fish species of salmon but barra (on) mundi. *Food Tech. in Australia* 35: 322-326, 1983.
- BURNETTE III, M. A. & RUSOF, I. I. GMA test protocol for protein quality assays. *Food Tech.* 20: 66-68, 1978.
- CAMARGO, L. A. A.; YASAKA, W. J. & OGA, S. Constantes físicas e químicas dos extratos etéreos de alguns peixes brasileiros. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 23(1): 135-144, 1973.
- CANTONI, C.; CATTANEO, P.; CREMAGNANI, A. & MANZONI, P. Identificazone eletroforetica di Gadidi e di Scomberidi. *Industrie Alimentari* 4: 533-538, 1981.
- CASTAGNOLLI, N. & DONALDSON, E. M. Induced ovulation and rearing of the pacu (*Colossoma mitrei*). *Aquaculture* 25: 275-279, 1981.
- CAUSERET, J. Fish as a source of mineral nutrition. In: Borgstrom, G. ed., *Fish as Food*, Academic Press, New York, 1962. v.2., p.205-234.
- CHABALIN, E.; FERRAZ DE LIMA, J. A.; ALVES, L. B. O. Análise comparativa entre o valor comercial do pacu (*Colossoma mitrei*) capturado e cultivado - mercado de peixes de Cuiabá. *Boletim Técnico do CEPTA - vol 1 n<sup>o</sup> 1* (jan/jun 1988) Pirassununga, SP: CEPTA, 1988a. p.49-60.
- CHABALIN, E.; FERRAZ DE LIMA, J. A.; ALVES, L. B. O. Análise econômica de um cultivo intensivo do pacu (*Colossoma mitrei*) no Centro-oeste do Brasil. *Boletim Técnico do CEPTA - vol 1* (jan/jun 1988) Pirassununga, SP: CEPTA, 1988b. p.61-65.
- COSTA, A. F. Pesca e aqüicultura em águas continentais. Projetos 3. Recursos hídricos. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Publicação para distribuição interna, SP. 1978. p.85-92.

- COWIE, W. P. Identification of fish species by thin slab polyacrylamide gel electrophoresis of the muscle myogens. *J. Sci. Food Agric.* 19: 226-229, 1968.
- COWIE, W. P. & LITTLE, W. T. The relation between the toughness of cod stored at  $-7^{\circ}\text{C}$  and  $-14^{\circ}\text{C}$  its muscle protein solubility and muscle pH. *J. Food Tech.* 2: 217-222, 1967.
- CURRAN, C. A.; AMES, G. R. & JONES, N. S. D. Frozen storage life of the Bolivian fish, sabalo (*Prochilodus platensis*). *J. Food Tech.* 21: 471-475, 1986.
- DAMIANI, P. & ROSSI, A. Modificazioni del tracciati elettroforetici delle proteine caratterizzanti le specie ittiche, in campioni parzialmente avariati. *Industria Alimentare* 106: 93-97, 1974.
- DAVIS, B. J. Disk electrophoresis II. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404, 1974.
- DINGLE, J. R. & HINES, J. A. Protein instability in minced flesh from fillets and frames of several commercial Atlantic fishes during storage at  $-5^{\circ}\text{C}$ . *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 775-783, 1975.
- DRAETTA, I. S.; IADEROZA, M.; BALDINI, V. L. S.; LOBO FILHO, M. Padrões eletroforéticos na identificação de espécies padrões de peixes. *Col. Ital Campinas* 15: 171-184, 1985.
- DYER, W. J. & DINGLE, J. R. Fish proteins with special reference to freezing. In: Borgstrom, G. ed., *Fish as Food*, Academic Press, New York, 1962. v.1., p.275-320.
- DYER, W. J.; FRENCH, H. V. & SNOW, J. M. Proteins in fish muscle I. Extraction of protein fractions in fresh fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 7: 585-593, 1950.
- FAO (*Food and Agricultural Organization*) The role of FAO in the development of inland fishery resources. Rome, FAO, 1968.
- FERRAZ DE LIMA, J. A.; FERRARI, V. A.; COLARES DE MELO, J. S.; GASPAR, L. A.; CHAMBALIN, E. & SANTOS, E. P. Comportamento do pacu, *Colossoma mitrei*, em um cultivo experimental, no Centro-Oeste do Brasil. Boletim Técnico do CEPTA - vol 1, nº 1 (Jan/Jun 1988), Pirassununga, SP: CEPTA, 1988. p.15-21.

- GALEAZZI, M. A. M. Extração, purificação e propriedades da polifenoloxidase da banana nanica *Musa cavendishii*, L. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. p.43-47. Tese (doutorado) Unicamp, 1978.
- GEIGER, E. & BORGSTROM, G. Fish protein - Nutritive Aspects. In: Borgstrom, G. ed., *Fish as Food*, Academic Press, New York, 1962. v.2., p.29-78.
- GÉRY, J. Notes de characologie néotropicala 1. Progrès dans la systématique des genres *Colossoma* et *Piaractus*. *Revue Fr. Aquariol.* 12: 96-102, 1986.
- GRUGER JR., E. H.; NELSON, R. W. & STANSBY, M. E. Fatty acid composition of oils from 21 species of marine fish, freshwater fish and shellfish. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 41: 662-667, 1964.
- GUHA, B. C. The role of fish in human nutrition. In: Heen, E. & Kreuzer, R., ed., *Fish in nutrition*. London, Fishing News, 1962. p.39-42.
- HACKLER, L. R. Methods of measuring protein quality: a review of bio-assay procedures. *Cereal Chem.* 54: 984-955, 1977.
- HACKLER, L. R. An overview of the AACC/ASTM collaborative study on protein quality evaluation. *Food Tech.* 20: 62-64, 1978.
- HAK-KYON, K.; ROBERTSON, I. & LOVE, R. M. Changes in muscle of Lemon Sole (*Pleuronectes microcephalus*) after long cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 28: 699-700, 1977.
- HEGSTED, M. D.; MILLS, R. C.; ELVEHJEIN, C. A. & HART, E. B. Choline in the nutrition of the chicks. *J. Biol. Chem.* 138: 459-466, 1941.
- HENDERSON, R. J. & TOCHER, D. R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progr. Lipid Res.* 26: 281-347, 1987.
- JACQUOT, R. Organic constituents of fish and others aquatic foods. In: Borgstrom, G. ed., *Fish as Food*, Academic Press, New York, 1961. v.1., p.164.
- JHAVERI, S. N.; KARAKOLTSIDIS, P. A.; MONTECALVO, J. & CONSTANTINIDES, S. M. Chemical composition and protein quality of

- some southern New England marine species. *J. Food Sci.* 49: 110-113, 1984.
- KAITARANTA, J. K.; LAMPPU, R. & LINKO, R. R. Amino acid content of Baltic Herring and Rainbow Trout Roe. *J. Agric. Food Chem.* 28: 911-916, 1980.
- KATES, M. Separation of lipid mixtures. In: *Techniques of Lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids*. North-Holland Publishing Co. Amsterdam, 1972. p.457-459.
- KEEN, C. P. & SHACKLEE, J. B. Electrophoretic identification of raw and cooked fish fillets and other marine products. *Food Tech. in Australia* 37: 117-127, 1985.
- KEENAN, C. P. & SHACKLEE, J. B. Electrophoretic identification of raw and cooked fish fillets and other marine products. *Food Tech. in Australia* 37: 117-127, 1985.
- KHALIL, M. E.; MOUSTAFA, E. K. & OSMAN, H. O. A. Composition of Bolti (*Tilapia nilotica*) muscle protein. *Food Chem.* 5: 175-184, 1980.
- KIM, H. K.; ROBERTSON, I. & LOVE, R. M. Changes in the muscle of Lemon Sole (*Pleuronectes microcephalus*) after very long cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 28: 699-670, 1977.
- KINSELLA, J. E.; SHIMP, J. L., MAI, J. & WEIHRAUCH, J. Sterol, phospholipid, mineral content and proximate composition of filets of selected freshwater fish species. *J. Food Biochem.* 1: 141-152, 1977a.
- KINSELLA, J. E.; SHIMP, J. L., MAI, J. & WEIHRAUCH, J. Fatty acid content and composition of freshwater finfish. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54: 424-429, 1977b.
- KOLAKOWSKI, E.; SZYBOWICZ, Z. & RACZEK, K. Extractability of muscle protein as criterion for technological evaluation of sea fish. *Die Nahrung* 21: 485-489, 1977.
- LESSI, E. Determinação da composição centesimal e identificação dos aminoácidos da fração protéica de alguns peixes da bacia do rio Mogi-Guaçu, São Paulo. *Rev. Fac. Farm. Odont. Araraquara* 2: 197-203, 1968.

- MACKIE, I. M. Identification of fish species by a modified polyacrylamide disc electrophoresis technique. *J. Ass. Pub. Anal.* 7: 83-87, 1969.
- MACKIE, I. M. & JONES, B. W. The use of electrophoresis of the water soluble (sarcooplasmatic) proteins of fish muscle to differentiate the closely related species of hake (*Merluccius sp.*). *Comp. Biochem. Physiol.* 59B: 95-98, 1978.
- MAI, J.; SHETTY, J. K.; KAN, T. M. & KINSELLA, J. E. Protein and amino acid composition of selected freshwater fish. *J. Agric. Food Chem.* 28: 884-885, 1980.
- MAIA, E. L. Composição, conservação e utilização do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachmer 1881. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 1980, p.42. Tese (mestrado) Unicamp.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Composição em ácidos graxos de peixes de água doce do estado do Amazonas. VII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, Ceará, 1984. Resumos. p.226-227.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & AMAYA-FARFAN, J. Proximate fatty acid and amino acid composition of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Food Chem.* 12: 275-276, 1983.
- MAYER, J. Fish proteins in nutrition and their importance in the prevention of protein malnutrition. In Heen, E. & Kreuzer, R., ed. *Fish in nutrition*. London, Fishing News, 1962. p.248.
- MEINKE, W. W.; FINNE, G.; NICKELSON II, R. & MARTIN, R. Nutritive value of fillets and minced flesh from Alaska Pollock and some underutilized finfish species from the Gulf of Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 30: 477-480, 1982.
- MENDONÇA, J. O. J.; FERRARI, V. A.; COLARES DE MELO, J. S.; GASPAR, L. A.; CHABALIN, E. & SANTOS, E. P. Comportamento do pacu, *Colossoma mitrei*, em um cultivo experimental, no Centro-Oeste do Brasil. *Boletim Técnico do CEPTA* - vol 1, nº 1 (Jan/Jun 1988), Pirassununga, SP: CEPTA, 1988. p29-36.

- METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A. & PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Ann. Chem.* 38: 514-515, 1966.
- MOORE, G. S.; PETER, H. A. & LEVIN, R. E. Alterations in the electrophoresis protein patterns of refrigerated fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 27: 31-38, 1970.
- MOORJANI, M. N.; BALIGA, B. R.; VIJAYARANGA, B. & LAHIRY, N. C. Post rigor changes in nitrogen distribution and texture of fish during storage in crushed ice. *Food Tech.* 20: 80-84, 1962.
- MORAES, M. N.; SANCHEZ, L.; CEREDA, M. P.; FERREIRA, A. E. & MARTINS, J. A. Variação química do saguiru *Curimatus elegans* Steindacher, em relação a alguns parâmetros biológicos. *B. Inst. Pesca, São Paulo*, 11: 81-91, 1984.
- MOREY, L. S.; SATERLEE, L. D. & BROWN, W. D. Protein quality of fish in modified atmosphere as predicted by the C-PER assay. *J. Food Sci.* 47: 1399, 1982.
- MUSTAFA, F. A. & MEDEIROS, D. M. Proximate composition mineral content and fatty acids of catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) for different seasons and cooking methods. *J. Food Sci.* 50: 585-588, 1985.
- NETTO, F. M. Modificações químicas, bioquímicas e sensoriais do híbrido de tilápia estocado em gelo. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 1984, p.21. Tese (mestrado) Unicamp.
- NUTRITIONAL BIOCHEMICAL CORPORATION. INC Diet Catalog. NBC, Cleveland, Ohio, p.18, 24, 1977 e 1978.
- NUTRITIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON DIETARY ALLOWANCES. Recommended Dietary Allowances, 9<sup>th</sup> Revised Edition. National Academy of Sciences, Washington D.C.. 1980. p.39-54.
- ODALAPO, A. A.; OMOSOLA, A. A. & OLUSEGUN, L. O. Quality changes of Nigerian traditionally processed freshwater fish species. I. Nutritive and organoleptic changes. *J. Food Technol.* 19: 333-340, 1984a.
- PAIVA, P.; ROMAGOSA, E.; GODINHO, H. M.; STORFER, E. B.; CERVENKA, C.; DONOLA, E. & TORLONI, C. E. C. Ciclo reprodutivo

- do pacu, *Colossoma mitrei*, Berg 1895, mantidos em condições de cultivo intensivo. *Ciências da vida*, 37 (supl): 849, 1985.
- PELLET, P. L. & YOUNG, V. R. Evaluación nutricional de alimentos proteínicos. La Universidad de las Naciones Unidas, 1980. p.69.
- PERKIN-ELMER Analytical methods in Atomic Absorption Spectrophotometry, Nowalk. The Perkin-Elmer, 1976.
- POULTER, R. G. & LAWRIE, R. A. Studies on fish muscle protein. Nutritional consequences of the changes occurring during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 28: 701-709, 1977.
- RAMACHANDRAN NAIR, K. G. & GOPAKUMAR, K. Effect of dietary fat on deposition of fat and fatty acid composition of Tilapia (*Tilapia mossambica*). *J. Food Sci. and Technol.* 18: 108-111, 1981.
- ROCHA, Y. R.; AGUIAR, J. P. L.; MACHADO, H. A. & SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 12: 787-794, 1982.
- ROGERS, Q. R. & HARPER, A. E. Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J. Nutrition*, 87: 267-273, 1965.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P. de; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M. Reprodução induzida do pacu, *Colossoma mitrei* Berg 1885, mantido em condições de cultivo intensivo. *Ciências da Vida. Zoologia* 37: 849, 1985.
- SAINT-PAUL, U. Potencial for aquaculture of South America freshwater fishes: a review. *Aquaculture* 54: 205-240, 1986.
- SCOPES, R. K. The influence of post mortem condition on the solubilities of muscle proteins. *Biochem. J.* 91: 201-207, 1964.
- SEN, P. C.; GHOSH, A. & DUTTA, J. Fatty acid of the lipids of murrels. *J. Sci. Food Agric.* 27: 811-818, 1976.
- SGARBIERI, V. C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: *Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. Campinas: Ed. da UNICAMP, São Paulo: Almed, 1987. p.245, 250-255, 380.

- SHENOUDA, S. Y. K. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Adv. Food Res.* 26: 255-311, 1980.
- SHRIMPSON, R. & GIUGLIANO, R. Consumo de alimentos e alguns nutrientes em Manaus, Amazonas. *Acta Amazônica* 9: 117-141, 1979.
- SILVA, A. J. da Aspectos da alimentação do pacu adulto *Colossoma mitrei* (Berg, 1885) no Pantanal do Mato Grosso. Cuiabá, IEL, 1987, p.26-35. Tese (mestrado) UFMT.
- SNOW, J. M. Proteins in fish muscle III. Denaturation of myosin by freezing. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 7: 599-605, 1950.
- STANSBY, M. E. Proximate composition of fish. In: Heen, E. & Kreuzer, R., ed. *Fish in nutrition*. London, Fishing News, 1962, p.55-56.
- SUZUKI, T. Characteristics of fish meat and fish protein. In: *Fish and Krill Protein*. Applied Science Publishers, ed. London, 1981. p.5-7.
- TERRI, A. E.; LONGHLIN, M. E. & JOSSELYN, D. Nutritive value of fish I. Nicotinic acid, riboflavin, vitamin B12 and amino acid of various salt-water species. *Food Res.* 22: 145-150, 1957.
- THURSTON, C. E.; STANSBY, M. E.; KARRICK, N. L.; MIYAUCHI, D. T. & CLEGG, W. C. Composition of certain species of freshwater fish II. Comparative data for 21 species of lake and river fish. *Food Res.* 24: 493-502, 1959.
- TORLONI, C. E. C.; SILVA FILHO, J. A.; VERANI, J. R. & PEREIRA, J. A. Estudos experimentais sobre o cultivo intensivo do pacu, *Colossoma mitrei*, no sudeste do Brasil in *An. Simp. Bras. Aqüicul. III São Carlos - SP*. p.559-573, 1984.
- TOYAMA, Y. & KANEDA, T. Nutritive aspects of fish oils. In: Borgstrom, G. ed., *Fish as Food*, Academic Press, New York, 1962. v.2., p.149.
- VISWANATHAN NAIR, P. G. & GOPAKUMAR, K. Fatty acid composition of 15 species of fish from tropical water. *J. Food Sci.* 43: 1162-1164, 1978.
- WEBER, K. & OSBORN, M. The reability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406, 1969.

- WOLZAK, A. A.; BRESSANI, R. & BRENER, R. G. A comparison of *in vivo* and *in vitro* estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. *Quality Plantarum of Plant Food in Human Nutrition* 31: 31-43, 1981.
- ZAITSEV, V.; KIEVETTER, I.; LAGUNOV, L.; MAKAROVA, T.; MINDER, L. & PODSEVALV, V. Characteristics of fish as a raw material for industry. In: *Fish curing and processing*. Moscow, MIR, 1969, p.52, 53, 55, 58, 59, 74.

## Apêndice 1

### Eletoforese em gel de poliacrilamida

#### 1. Soluções para o preparo dos géis

##### Solução A

- 48 ml de HCl 1 N
- 36,6 g de tampão tris (2 amino-2(hidroximetil)-1propanodiol)
- 0,23 ml de TEMED (N-N-N'-N' tetrametilenodiamina)
- completar o volume para 100 ml

##### Solução B

- 48 ml de HCl 1 N
- 5,98 g de tampão tris
- 0,46 ml de TEMED
- completar o volume para 100 ml

##### Solução C

- 60 g de acrilamida
- 0,5g de bisacrilamida (N-N'-metilenobisacrilamida)
- completar para 100 ml

##### Solução D

- 10 g de acrilamida
- 2,5 g de bisacrilamida em 100 ml de água destilada

##### Solução E

- 4 mg de riboflavina em 100 ml de água destilada

### **Solução F**

- 0,14 g de persulfato de amônia em 100 ml de água destilada

### **Solução tampão**

- 6 g de tris
- 28,8 g de glicina
- adicionar água destilada completando o volume de 1000 ml
- ajustar o pH para 8,2–8,4
- diluir de 1:9 com água destilada no momento de uso

## **2. Preparação dos géis**

### **Gel inferior**

- 1,63 ml da Solução A
- 1,75 ml da Solução C
- 1,63 ml de água destilada
- 5,00 ml da Solução F

### **Gel superior**

- 1,0 ml da Solução D
- 0,5 ml da Solução E
- 0,4 ml de água destilada
- 0,5 ml da Solução tampão

## **3. Solução indicadora de migração**

- azul de bromofenol (solução aquosa) 0,1%

4. Solução corante

- Amido de Schwartz 1 g
- Solução de ácido acético 7% em água destilada 100 ml

5. Solução descorante

- Solução de ácido acético 7% em água destilada

## Apêndice 2

### Eletrforese em SDS

#### A. Reagentes

1. Dissolver 15,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 38,2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 1,5 l de água destilada, e então elevar o volume para 2 l com água destilada. Colocar a solução em um béquer grande. Dissolver 4 g de SDS na solução, agitando levemente e impedindo a formação de espuma. Ajustar o pH a 7,0.
2. Dissolver 11,1 g de acrilamida e 0,3 g de bisacrilamida em 25 ml de água destilada e filtrar a solução em papel Whatman nº 1.
3. Dissolver 1 g de SDS em 25 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, e a seguir adicionar 1 ml de mercaptoetanol na solução.
4. Dissolver 100 mg de persulfato de amônio em 10 ml de água destilada. Esta solução deve ser feita no dia de uso.
5. Misturar 2,5 ml de azul de bromofenol 0,05% em água destilada, 100 gotas de glicerol, 0,5 ml de mercaptoetanol e 5 ml de tampão fosfato 0,001 M, pH 7,0.
6. Preparar 3 litros de 5% (v/v) de metanol, 7,5% (v/v) de ácido acético glacial em água destilada.
7. Dissolver 0,375 g de azul de Coomassie R250 (CBB) em 150 ml de metanol 5% e 7,5% de ácido acético e então filtrar em papel Whatman nº 1. Dissolver 0,375 g de CBB em 150 ml de uma mistura 5:5:1 (v) de metanol:água:ácido acético, filtrar através de papel Whatman nº 1. A solução final é preparada misturando 125 ml de cada solução CBB.
8. Solução de proteína: preparar 1 mg/ml de soluções de proteína padrão com peso molecular do manômetro conhecido em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0; 1 ml de cada será suficiente.

## B. Procedimento

### 1. Preparação das amostras

Colocar 450 microlitros das soluções padrão de proteínas, e das soluções de proteínas da amostra, e 150 microlitros da solução 3 em tubos de ensaio, e deixar incubando por 1-2 horas a 37°C. Após incubação misturar 0,5 ml de cada solução de proteína incubada com 1,50 ml de solução 5 em um tubo de ensaio.

### 2. Preparação dos géis

Misturar 7,5 ml de solução 1 e 6,75 ml de solução 2 22,5 microlitros de TEMED. A seguir adicionar 0,75 ml de uma solução de persulfato de amônio (10 mg/ml). Misturar rapidamente a solução. Encher o tubo até 0,5 cm do topo. Adicionar lentamente água na superfície da mistura polimerizada. A polimerização se efetuará em 25 minutos. Retirar com papel absorvente a água remanescente na superfície.