

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

EFEITO DOS PEROXIDOS DE LIPÍDEOS NA DIGESTIBILIDADE
"IN VITRO" DE FARINHA DE PESCADO

Admar Costa de Oliveira
Eng^o Industrial Químico

Orientador:

Prof. Dr. Juan Alberto Coch Frugóni

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrí-
cola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do tí-
tulo de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos - Área
de Pescado.

1977

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho a meus pais,
esposa e filha.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Juan Alberto Coch Frugoni, por seu auxílio como o rientador e pela revisão dos originais.

Ao Prof. Emilio Contreras Guzman, pelas sugestões apre - sentadas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Uni versidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Química da Fundação Universidade do Rio Grande, na pessoa de seus dirigen tes, pelas facilidades oferecidas durante o Curso de Pós-Gradu ação e na execução dos trabalhos da Tese.

À Universidade Federal de Pelotas, à Universidade Católi ca de Pelotas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, na pessoa de seus dirigentes, pelo suporte financeiro oferecido.

Aos professores, colegas e a todos que, direta ou indire tamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS	vii
RESUMO	1
SUMMARY	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Importância comercial e valor nutricional da farinha de pescado	4
2.2. Oxidação dos lipídeos em farinha de pescado	4
2.3. Ação de antioxidantes	6
2.4. Interações entre os produtos de oxidação dos lipídeos e as proteínas em farinha de pescado	8
2.5. Parâmetros analisados	12
2.5.1. Extração dos lipídeos em farinha de pescado	12
2.5.2. Índice de peróxidos	13
2.5.3. Valor TBA	14
2.5.4. Digestibilidade pela pepsina	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material	16
3.1.1. Amostras de farinha de pescado	16
3.1.2. Reagentes	16
3.1.3. Aparelhos e equipamentos	16
3.2. Métodos	16
3.2.1. Preparo e acondicionamento das amostras ..	16
3.2.1.1. Farinhas com etoxiquina	19
3.2.1.2. Farinhas sem etoxiquina	19
3.2.2. Processos de oxidação das amostras	19
3.2.3. Análises químicas	20
3.2.3.1. Umidade	20
3.2.3.2. Proteína	20
3.2.3.3. Gordura extratível em benzeno ...	20

	Página
3.2.3.4. Cinzas.....	20
3.2.3.5. Extração e purificação dos lipí- deos.....	21
3.2.3.6. Índice de peróxidos.....	21
3.2.3.7. Valor TBA.....	21
3.2.4. Digestibilidade pela pepsina.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Experimento 1.....	23
4.2. Experimento 2.....	24
4.3. Experimento 3.....	25
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	42
5.1. Composição química das farinhas.....	42
5.2. Variação da digestibilidade pela pepsina, do ín- dice de peróxidos e do valor TBA em farinha de pescado sem antioxidante e oxidada sob aqueci- mento.....	43
5.3. Variação da digestibilidade pela pepsina, do ín- dice de peróxidos e do valor TBA em farinha de pescado com 0,1% EQ e oxidada sob aquecimento...	45
5.4. Variação do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido em farinha de pescado sem antioxidante e oxidada sob aquecimento.....	46
5.5. Variação do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido em farinha de pescado com 0,1% EQ e oxidada sob aquecimento.....	46
5.6. Variações das perdas relativas ao tempo zero da digestibilidade pela pepsina e do nitrogênio so- lubilizado pelo ácido e pepsina em farinha de pescado sem antioxidante e oxidada sob aquecimen- to.....	47
5.7. Variações das perdas relativas ao tempo zero da digestibilidade pela pepsina e do nitrogênio so-	

	Página
lubilizado pelo ácido e pepsina em farinha de	
pescado com 0,1% EQ e oxidada sob aquecimento....	48
6. CONCLUSÕES.....	49
7. BIBLIOGRAFIA.....	50

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

	Página
QUADROS	
1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA BÁSICA DA FARINHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 1	23
2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA BÁSICA DA FARINHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 2	24
3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA BÁSICA DA FARINHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 3	25
FIGURAS	
1. VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 100°C	27
2. VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS, E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCA DO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 100°C	28
3. VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 100°C	29
4. VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCA DO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 100°C .	30
5. VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 100°C	31
6. VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCA DO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 100°C	32

7. VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDI - CE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 75°C	33
8. VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDI- CE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCA DO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 75°C	34
9. VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 75°C	35
10. VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCA DO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 75°C ..	36
11. VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E O XIDADA A 75°C	37
12. VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCA DO COM 0,1% EQ E OXIDA- DA A 75°C	38
13. VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDI- CE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 60°C	39
14. VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 60°C	40
15. VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCA DO SEM ANTIOXIDANTE E O XIDADA A 60°C	41

RESUMO

É sabido que os produtos da oxidação dos lipídeos são capazes de interagirem com as proteínas, podendo ocasionar consideráveis perdas no valor nutricional das mesmas. Em se tratando de farinha de peixe com um conteúdo residual de gordura elevado, tais interações podem assumir graves proporções, levando em conta a natureza altamente insaturada dos lipídeos do peixe. Considerando este aspecto, o autor procurou verificar o efeito dos peróxidos de lipídeos na digestibilidade pela pepsina "in vitro" de farinha de peixe.

Para alcançar os objetivos almejados, farinhas de peixe de procedência industrial foram divididas em duas porções, sendo uma tratada com 0,1% de etoxiquina e a outra deixada sem tratamento. Ambas sofreram oxidação por ar forçado sob aquecimento durante períodos de tempo equivalentes a 0, 30, 60, 90, 180 e 300 min. Em cada tempo, foram efetuadas análises de digestibilidade pela pepsina, índice de peróxidos e valor TBA. Foram realizados três experimentos com farinhas diferentes, utilizando-se temperatura de 100°C, 75°C e 50°C, respectivamente. A composição química básica das farinhas foi também determinada.

Os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões: 1) os peróxidos formados durante a oxidação de farinha de peixe exercem um efeito inibidor na digestibilidade pela pepsina da farinha, reduzindo-a consideravelmente; 2) o efeito inibidor produzido não é irreversível, visto haver uma recuperação dos valores da digestibilidade, a partir da decomposição dos peróxidos formados; 3) a ação inibidora dos peróxidos dá-se especificamente na capacidade da pepsina quebrar as ligações peptídicas das proteínas da farinha oxidada, visto que o fator realmente afetado é o nitrogênio solubilizado pela solução ácida de pepsina, e que o nitrogênio solubilizado somente pelo ácido não apresenta variação sensível ao longo da oxidação; 4) a adição de 0,1% de etoxiquina à farinha impede a peroxidação dos lipídeos e, conseqüentemente, a ação inibidora.

SUMMARY

Lipids oxidation products are capable of interacting with proteins and cause great losses on their nutritional value. In the particular case of fish meal with a high percentual of residual oil, these interactions could assume great proportions, discounting the highly unsaturated nature of fish lipids. In considering this aspect, the author endeavored to determine the effect of lipids peroxides on "in vitro" pepsin digestibility of fish meal.

To attain the objectives desired, commercial fish meals were separated in two portions, one of which was treated with 0,1% ethoxyquin and the other left without antioxidant. Both were oxidized by heated air-blast for different periods of time, corresponding to 0, 30, 60, 90, 180 and 300 minutes. In each period, the meals were analysed for pepsin digestibility, peroxide value and TBA value. Three experiments were made with different meals, using temperatures of 100°C , 75°C and 60°C , respectively. The basic chemical composition of the meals were also determined.

On the basis of the results the following conclusions are drawn: 1) the peroxides formed during the oxidation of fish meal cause an inhibitory effect in pepsin digestibility of the meal, reducing it considerably; 2) the inhibitory effect is not irreversible, due to the fact that there is a recovery in digestibility values when peroxides decompose; 3) the inhibitory effect is acting particularly in the capacity of pepsin in breaking the peptide bonds of the oxidized fish meal proteins, because the factor really affected is the nitrogen solubilized by the pepsin solution, and the nitrogen solubilized only by acid, varies very little in the course of oxidation; 4) the addition of 0,1% ethoxyquin to the meal inhibits the lipid peroxidation and, as a consequence, its inhibitory effect.

1. INTRODUÇÃO

A farinha de peixe é o subproduto mais importante da indústria de peixe do Rio Grande do Sul. Devido ao seu alto conteúdo proteico, é largamente utilizada na fabricação de rações balanceadas para a alimentação de animais, principalmente aves e suínos. Entretanto, o conteúdo em proteínas, por si só, não reflete o real valor nutricional de uma farinha de peixe. O valor nutricional real de uma proteína está na capacidade de ser digerível pelo organismo, fornecendo ao animal os aminoácidos essenciais requeridos em quantidade suficiente para as suas necessidades metabólicas. O próprio processo de fabricação da farinha já ocasiona uma perda na digestibilidade das proteínas do peixe, visto serem utilizadas altas temperaturas no processo de redução.

No caso particular de farinhas com elevado teor de gordura residual, as possibilidades de perdas da digestibilidade das proteínas são muito grandes, devido a que os produtos da oxidação dos lipídeos são capazes de interagirem com as proteínas, tornando-as indigeríveis ao organismo animal. Este fato é particularmente notável em processos de estocagem nos quais não haja o controle de absorção de oxigênio ou a estabilização da farinha pela adição de antioxidantes, visto que os lipídeos altamente insaturados existentes no peixe fazem com que a oxidação tenha um caráter bastante violento.

Com a finalidade de fornecer mais informações sobre estes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo principal verificar a ação dos peróxidos de lipídeos produzidos durante a oxidação de farinha de peixe na digestibilidade pela pepsina "in vitro" da farinha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância comercial e valor nutricional da farinha de pescado

A farinha de pescado representa o principal sub-produto da indústria pesqueira do Rio Grande do Sul, sendo toda a sua produção destinada a fabricação de rações balanceadas para alimentação animal. A produção de farinha de pescado no Rio Grande do Sul em 1974 atingiu 5.440,5 toneladas, sendo 59% desse montante distribuído no próprio Estado e os 41% restantes exportados para outros Estados, principalmente Santa Catarina e São Paulo (Mencía-Morales e col. 36). No âmbito mundial, 31,2% da produção de pescado em 1966 foi destinada a fabricação de farinha e óleo de pescado (Neiva 39). Atualmente, existem indicações de que o percentual da produção de pescado mundial destinado a fabricação de farinha encontra-se ao redor de 30%.

O valor da farinha de pescado em nutrição animal deve-se ao fato de que, se devidamente processada, é uma excelente fonte de proteínas de elevada digestibilidade, capaz de prover todos os aminoácidos essenciais necessários para a saúde e o crescimento. A riqueza em determinados aminoácidos essenciais, como a lisina e a metionina, fez com que fosse incorporada extensivamente e com sucesso em rações destinadas a alimentação de aves e suínos (Scott e col. 49; Snyder e col. 50; March e col. 35; Sparre 52; Anônimo 1; Kariak 18; Kuzmichev 25; Kifer e col. 19, 20, 21, 22).

2.2. Oxidação dos lipídeos em farinha de pescado

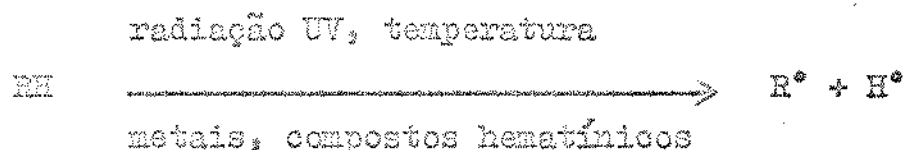
Os lipídeos de pescado apresentam séria deterioração quando expostos ao oxigênio atmosférico, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, como o eicosapentaenóico $C_{20:5}$ e o docosahexaenóico $C_{22:6}$, específicos do pescado. No óleo de anchoveta, este conteúdo atinge um percentual de 38,33% em relação ao total de ácidos graxos existentes, segundo comunicação do Instituto de Fomento Pesqueiro em 1973, citada por Contreras Gacmon e Neves Filho (8). Desta forma, o problema da inibição de

processo oxidativo dos lipídeos em produtos do pescado é um dos principais problemas da indústria de alimentos (Kaneda 17).

Em se tratando de farinha de pescado com um conteúdo de óleo residual elevado, a oxidação tem um caráter bastante violento, a ponto de poder ocorrer combustão espontânea dos depósitos de farinha, principalmente em processos de cura realizados em condições não controladas de absorção de oxigênio e de aeração para resfriamento (Olcott 41; Schmidt 47).

Schmidt (47) fez uma revisão da literatura existente e concluiu que, apesar da maioria dos trabalhos terem sido realizados com óleos de pescado puros, os resultados indicaram que o mecanismo da cura em farinhas de pescado era o mesmo que o da oxidação de lipídeos puros. Desta forma, o mecanismo de oxidação dos lipídeos de farinha de pescado correspondiam ao mecanismo dos radicais livres, pleiteado por Olcott (42) e outros pesquisadores. Neste mecanismo, a etapa de iniciação é denominada "período de indução", onde a absorção de oxigênio é muito lenta e o índice de peróxidos cresce muito pouco com o tempo. Na etapa seguinte de propagação, o índice de peróxidos cresce até atingir um máximo, onde a velocidade de decomposição dos peróxidos iguala a sua velocidade de formação. Finalmente, numa etapa final de terminação, a decomposição dos peróxidos prevalece, ocorrendo então a polimerização do óleo. As reações esquemáticas simplificadas são as seguintes, onde RH representa um lipídeo insaturado:

Iniciação

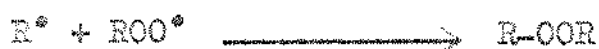


Propagação



Terminação





O período de indução é marcadamente influenciado pela temperatura. Os experimentos de Koning em 1960, conforme citação de Schmidt (47), mostraram que, em óleo de sardinha, o período de indução a 50°C foi de 5 horas e a 75°C foi nulo. Lea e col. (27), verificaram que maiores períodos de indução eram obtidos quanto menor a temperatura na estocagem de farinha de arenque.

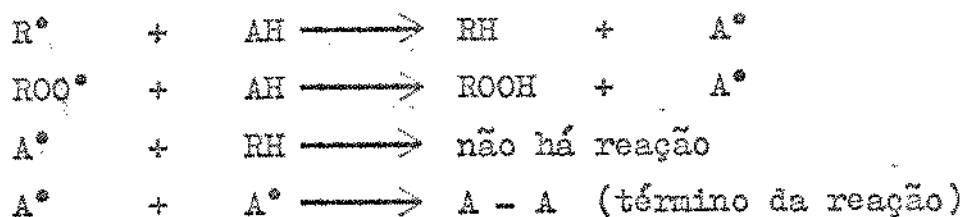
A umidade exerce um efeito inibitório na oxidação dos lipídeos em farinha de pescado. Segundo os experimentos de Lea e col. (27), a oxidação deu-se em maior extensão em uma farinha com 6,2% de umidade do que numa farinha com 11,1% nas mesmas condições de estocagem. Koch (23) informou que a umidade exercia um efeito inibitório na oxidação das gorduras de alimentos desidratados em geral. Tal fato devia-se a que a água, em tais alimentos, estaria ligada a grupos funcionais de proteínas e carboidratos, provavelmente por pontes de hidrogênio e exercendo influência em toda a superfície do alimento. Desta forma, a água protegeria o alimento da reação com o oxigênio, possivelmente evitando a adsorção direta e/ou por coordenar traços de metais e reduzir seu efeito catalítico. Também importante é o efeito mencionado por Stansby em 1963, conforme citação de Stansby (53), de que parece haver uma competição pelo oxigênio entre as bactérias e os lipídeos, de tal forma que a oxidação dos lipídeos é grandemente reprimida sempre que a deterioração bacteriológica aerobia tem lugar.

A granulometria da farinha também tem influência no processo oxidativo. Schmidt (47), trabalhando com oxidação de farinha de anchoveta a 50°C, verificou que, para uma mesma farinha, a percentagem de ácidos graxos polinsaturados era mais rapidamente diminuída quanto menor o tamanho do grão.

2.3. Ação de antioxidantes

De acordo com Olcott (42), um antioxidante pode ser definido como uma substância que, quando presente em um material oxidável em concentração relativamente reduzida, inibe, marcadamente,

a velocidade de reação com o oxigênio. Esta inibição ocorre tanto na etapa de iniciação como nos estágios primários da etapa de propagação, no processo de autooxidação dos lipídeos. A representação esquemática simplificada da ação de um antioxidante, representado pelo símbolo AH, é a seguinte:



A carne e as vísceras do pescado contém antioxidantes naturais como os tocoferóis. Entretanto, a concentração destes antioxidantes é baixa e muito pouco ou nada dos mesmos parece sobreviver ao processamento até a produção da farinha (Makie e Hardy 33). Tal fato ocasionou a utilização de antioxidantes sintéticos a fim de inibir os processos oxidativos. Provavelmente foi a fumaça da madeira no processo de defumação, o antioxidante sintético mais usado durante longo período de tempo na preservação do pescado. Atualmente, os antioxidantes sintéticos mais amplamente utilizados são fenóis e aminas aromáticas contendo grupos laterais que ativam os grupos hidroxila ou amino. Dentre os fenóis podem ser citados o BHA (butilato de hidroxianisol), BHT (butilato de hidroxitolueno), PG (propil-galato), e o NGDA (ácido nórdi hidroguairetíco). Dentre as aminas pode-se citar a EQ (etoxiquina).

Relativamente à concentração em que os antioxidantes são adicionados à farinha de pescado, Bertullo (4) informou que a indústria utiliza BHT, BHA e EQ em concentração que variam entre 0.02% e 0.1%. Clagget (7) verificou que EQ pode ser utilizada com segurança para rações de frangos até um nível aproximadamente vinte vezes àquele permitido pelos regulamentos da Food and Drugs Administration, USA.

Sob um ponto de vista comparativo, os estudos de Olcott(40) sobre a efetividade de alguns antioxidantes em amostras de óleos brutos de diversos pescados, revelaram que EQ era consideravelmente mais efetiva do que NGDA e PG. Wieckers, Eiserman e Fowler, em 1964, conforme citação de Schmidt (47), ao estudarem os efei-

tos dos antioxidantes BHT e EQ em farinha de anchoveta, verificaram que EQ e Santoquina (EQ diluída) eram mais efetivos e baratos, pois apesar de serem duas vezes mais caros, eram oito vezes mais efetivos. Os mesmos autores informam que EQ é efetivo durante um período de no mínimo 6 meses, quando adicionado em farinha de anchoveta numa concentração de 0,1%.

2.4. Interações entre os produtos de oxidação dos lipídeos e as proteínas em farinha de pescado

Farinhas de pescado com um percentual de gordura elevado são sistemas extremamente complexos, o que ocasiona dificuldades na realização de pesquisas fundamentais sobre o assunto em questão. Este fato ocasionou com que a maioria das pesquisas efetuadas com vias a caracterizar tais interações fossem realizadas em sistemas modelo, com a utilização de lipídeos e proteínas puros.

Tappel (54) emulsionou ácido linoleico e óleo de fígado de bacalhau com diversas proteínas, hidrolizados de proteína e com a glicina, sob diversas condições de oxidação. O trabalho visava efetuar estudos sobre a formação de compostos copolímeros de cor marrom-amarelada, semelhantes aos pigmentos depositados nos tecidos adiposos de ratos, martas e porcos deficientes em vitamina E e alimentados com uma dieta rica em gorduras insaturadas. O autor verificou que quantidades apreciáveis de proteína podiam ser incorporadas em tais copolímeros, com uma consequente perda de algumas propriedades físicas e químicas da proteína, tais como perda de solubilidade, resistência à hidrólise por papaina e uma perda média de 16% dos aminoácidos após hidrólise ácida. O mecanismo de formação dos copolímeros foi atribuído a que os aldeídos formados durante a oxidação da gordura insaturada, reagiram diretamente com os grupos amino de aminoácidos e proteínas através de uma ligação covalente, formando aldíminas que, por sua vez, iriam formar os copolímeros nitrogenados de cor marrom, por uma sequência de reações comumente denominada "reação de escurecimento" ou "reação de Maillard".

Narayan e Kummerow (37) examinaram a formação de complexos

formados entre albumina de ovo e ácido linoleico oxidado e verificaram haver indicações da não-existência de uma ligação covalente entre os grupos reativos da proteína e do lipídeo em complexos deste tipo. Os autores apresentaram evidências de uma possível estrutura com base num grande número de pontes de hidrogênio, existentes entre o hidrogênio dos grupos hidróxido e hidróperóxido do ácido linoleico oxidado e o oxigênio dos grupos carbonílicos da proteína como também entre o oxigênio dos grupos carbonílicos do lipídeo e o hidrogênio dos grupos amídicos da proteína. Posteriormente, Narayan e col. (38) encontraram novas indicações da existência deste tipo de estrutura, ao estudarem a formação de complexos entre diversos tipos de lipídeos oxidados e albumina de ovo.

Venolia e Tappel (57), ao investigar a oxidação de óleo de "menhaden" emulsionado com albumina de ovo aquosa, chegaram a conclusão de que a reação química entre o grupo carbonílico do lipídeo oxidado e o grupo amino da proteína deveria ser muito lenta e de relativamente pouca importância no processo de formação dos copolímeros de cor marrom. Os autores chegaram a esta conclusão devido ao fato de que a energia de ativação para a formação dos copolímeros encontrava-se muito abaixo do usual para uma reação típica de escurecimento entre um grupo amino e um açúcar. Por outro lado, tanto a acetilação dos grupos amino livres da proteína como a adição de dióxido de enxofre, embora inibidores destas reações, não inibiam a formação dos copolímeros de cor marrom, chegando mesmo a favorece-la.

Os trabalhos de Lea e col. (27) (28), investigando as alterações químicas e nutricionais sofridas por farinhas de arenque durante a estocagem sob diversas condições, apresentaram certa concordância com os resultados de Venolia e Tappel (57), visto que, apesar da rápida e extensiva oxidação dos lipídeos, a lisina disponível ficou reduzida em apenas 9% no período de um ano, em farinhas estocadas a 25°C e sem a adição de antioxidante. Posteriormente, Carpenter e col. (6) verificaram que parecia não haver grande influência da gordura oxidada e polimeriza

da de farinha de arenque estocada no valor nutricional das proteínas da farinha, principalmente quando o mesmo era determinado através de testes "in-vivo".

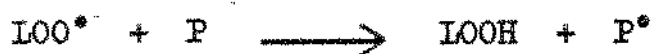
Em ausência de oxigênio e em presença de temperaturas elevadas, ocorre a polimerização térmica, não oxidativa, dos lipídeos da farinha de pescado, formando-se uma película de lipídeos polimerizados em torno da proteína. Este fato ocasiona uma limitação da digestibilidade da proteína, devido a haver um impedimento físico das enzimas digestivas atingirem as ligações peptídicas (Ousterhout e Snyder 44). Contudo, o processo não é irreversível, pois uma simples moagem destrói a película e a farinha pode recuperar grande parte de seu valor nutricional primitivo. Contreras e Romo (9) ao examinarem valores de digestibilidade pela pepsina de farinhas de anchoveta, verificaram que no caso de farinhas antigas, com tres a quatro meses de elaboração, uma moagem chegava a ocasionar um aumento na digestibilidade de até 57,5% em relação ao valor anterior à moagem.

Outro aspecto importante e que constitui o tema principal do presente trabalho é o das interações entre os peróxidos dos lipídeos e as proteínas. Tappel e Zalkin (55) verificaram que a deterioração de uma partícula sub-celular, o mitocôndria, através da peroxidação dos lipídeos catalizada por compostos hematínicos, ocasionava uma consequente perda na atividade enzimática de certas enzimas lá existentes, em conformidade com os experimentos anteriormente realizados por Bernheim e col. (3).

Desai e Tappel (11) realizaram trabalhos no sentido de determinar o mecanismo de dano às proteínas pelos radicais livres intermediários formados durante a peroxidação dos lipídeos. Para tanto, utilizaram um sistema de reação composto de ácido linolênico, citocromo C e oxigênio à temperatura de 37°C. Os autores verificaram que 70% do linolenato estava ligado ao citocromo C através de ligações peróxido e os 30% restantes através de ligações etéricas e carbono-carbono mais estáveis. Foram também sugeridos mecanismos prováveis de reação entre o linolenato peroxidado e o citocromo C, que envolviam reações de oxidação,

de adição e, em altos níveis de oxidação, reações de polimerização através de ligações "crosslinking" entre os radicais peróxido. As reações sugeridas foram as seguintes, onde $\text{LOO}^\bullet$ e $\text{LO}^\bullet$ representam respectivamente um radical peróxido e um radical alcóxido, provenientes da oxidação dos lipídeos, e P representa a proteína:

Reações de oxidação



Reações de adição



Reações de polimerização



Tais interações ocasionaram a perda quase total de solubilidade do citocromo C e uma perda em maior ou menor extensão de todos os aminoácidos, variável entre 17,2% para a lisina e 58,8% para a histidina.

A realização de outros estudos similares envolvendo reações de outros ácidos graxos insaturados, mais particularmente os ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, com outras proteínas puras, a saber, hemoglobina, catalase, albumina de ovo, pepsina, tripsina e quimiotripsina, forneceram resultados similares aos encontrados por Desai e Tappel (11), conforme citação dos próprios autores e de Tappel (56).

Quanto à influência dos peróxidos de lipídeos na digestibilidade pela pepsina em farinha de pescado, escassas são as referências encontradas na literatura. Contreras Guzman (10), ao verificar o comportamento da digestibilidade pela pepsina de farinhas de torta e integrais quando submetidas a aquecimento por ar forçado a 100°C, verificou uma queda abrupta na digestibilidade aos 30 minutos de aquecimento, sendo particularmente notável em farinhas de torta não-desengorduradas. Nestas, a perda na digestibilidade atingia 26,57% aos 30 minutos de aquecimento,

diminuindo logo após. O autor informou que este ponto correspondia ao momento de máxima peroxidação dos lipídeos e citou que Vargas, em 1968, encontrou um fenômeno semelhante, ao analisar farinhas de peixe armazenadas entre zero e cinco meses quanto à digestibilidade pela pepsina. Aos 15 dias, etapa de alta peroxidação, a digestibilidade foi mínima.

2.5. Parâmetros analisados

Nesta subdivisão, será dada ênfase àqueles parâmetros analisados mais importantes e que serviram de base para o presente trabalho, a saber: extração dos lipídeos, índice de peróxidos, valor TBA e digestibilidade pela pepsina.

2.5.1. Extração dos lipídeos em farinha de peixe

O processo de extração dos lipídeos de farinha de peixe é de fundamental importância, pois constitui a base para muitas determinações posteriores. Levando-se em conta a natureza altamente insaturada dos lipídeos de peixe e o fato dos mesmos normalmente se encontrarem, em maior ou menor extensão, ligados às proteínas provavelmente por diferentes tipos de interações, a extração dos lipídeos torna-se um problema bastante complexo. No decorrer da oxidação da farinha de peixe, a eficiência da extração com certos solventes varia, pois, por um lado, as interações entre lipídeos oxidados e as proteínas também variam e por outro lado, devido à formação de polímeros de menor solubilidade (Schmidt 47). Desta forma, torna-se necessário um método de extração eficiente, que extraia todos os lipídeos, e ao mesmo tempo suave, afim de não alterar a composição dos mesmos durante a extração. Este último requisito faz com que sejam descartados todos os métodos de extração à quente, visto que a decomposição oxidativa deve ser minimizada e principalmente os peróxidos, por serem muito reativos, poderiam sofrer fortes alterações (Bligh e Dyer 5, Schmidt 47).

Lovern (32) fez uma revisão bibliográfica sobre o assunto

e citou que Hanson, em informação não publicada, informou que o método de Bligh e Dyer (5) extraia os lipídeos seriamente oxidados de farinha de pescado danificada pelo calor tão eficientemente como os de uma farinha normal. Idêntica verificação foi realizada por Lea e col. (27) em farinha de arenque. Outra vantagem interessante do método de Bligh e Dyer é a de que, se os lipídeos extraídos forem destinados à determinação do índice de peróxidos, não é necessário evaporar o clorofórmio. Isto é particularmente útil, tendo-se em vista que a remoção do solvente, mesmo à temperatura ambiente, oxida apreciavelmente os lipídeos de pescado.

2.5.2. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos mede a quantidade de oxidantes contida numa determinada substância e se assume que todos eles são peróxidos. Usualmente é expresso em miliequivalentes de peróxido por quilo de lipídeos (meq/kg).

De acordo com Lea (26) a estimação do peróxido ou "oxigênio ativo" pelo procedimento iodométrico é o método químico mais amplamente utilizado para seguir a autooxidação de gorduras comestíveis, embora com limitações no tocante a correlações com testes organoléticos. Sobre este aspecto, pode-se salientar a informação posterior do mesmo autor Lea (29) de que analistas condenaram amostras de farinha de arenque com índices de peróxidos acima de valores arbitrários, sem tomar em consideração o fato de que, neste tipo de material, o índice de peróxidos comumente atinge seu máximo em pouco tempo após a fabricação, entrando posteriormente em declínio. Os experimentos de Lea e col. (27) já haviam demonstrado este aspecto em farinha de arenque estocada ao ar à temperatura de 25°C.

A determinação do índice de peróxidos em compostos lipídicos, apesar de execução relativamente simples, pode apresentar diversos problemas. Schmidt (47) informou que o oxigênio do ar pode oxidar o iodeto de potássio apreciavelmente, o que daria margem a obtenção de valores superiores aos reais e, por outro lado, o iodo liberado é absorvido em parte pelas duplas ligações e par

ticularmente pelas conjugadas, o que resulta na obtenção de valores inferiores aos reais.

Outro aspecto de importância é o referente ao peso da amostra a ser utilizada na determinação. Frankel (14) informou que uma das grandes limitações do método iodométrico é a obtenção de valores elevados quando a amostra é reduzida, principalmente se o oxigênio atmosférico não é cuidadosamente excluído durante a determinação. Dyer e Fraser (12) encontraram uma considerável dispersão nos valores de índice de peróxidos de bacalhau congelado e atribuíram o fato à baixa concentração de lipídeos no extrato utilizado para a análise. No entanto, existem ocasiões, e este é o caso do presente trabalho, em que a utilização de amostras de lipídeos, de tamanho relativamente grande, como no método oficial da A.O.A.C. (2), i.e. , de cinco gramas, implicaria na utilização de uma quantidade excessiva de material para a extração, tornando o trabalho oneroso e muitas vezes impraticável.

2.5.3. Valor TBA

O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) surgiu quando Bernheim e col., em 1947, conforme citação de Yu e Sinnhuber (58), demonstraram que, quando certos tecidos foram incubados com o ácido 2-tiobarbitúrico, a coloração produzida era derivada de produtos de oxidação de lipídeos insaturados. A partir dessa data vários pesquisadores utilizaram o teste para produtos lácteos, levando em consideração que ele correlacionava bem com o "flavor" oxidado do leite.

Yu e Sinnhuber (58) propuseram um método de determinação aplicável em produtos de pescado, sem a necessidade da extração preliminar dos lipídeos. Por outro lado, Lea (29) informa que o método de aplicação direta, sem a extração preliminar dos lipídeos, pode sofrer a objeção de que uma variedade de substâncias, outras que não produtos de oxidação de gorduras oxidadas, fornecem coloração similar com o reagente. Schwartz (48) informou já serem conhecidas cerca de 30 substâncias capazes de reacionarem com o TBA, fornecendo coloração típica.

O teste mede produtos de degradação secundária da oxidação de lipídeos, particularmente aldeídos. Lea (29) informou que o pigmento produzido é um produto de condensação formado entre duas moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico e uma de dialdeído malônico formado durante a autooxidação dos lipídeos.

2.5.4. Digestibilidade pela pepsina

É de suma importância, tanto para os fabricantes de rações como para os avicultores e suinocultores, o conhecimento não só da quantidade, como também da qualidade dos ingredientes constituintes de rações manufaturadas. O que normalmente ocorre é que as rações são compradas pela sua especificação quanto ao conteúdo bruto de proteína, gordura, sais minerais, umidade, fibra e conteúdo vitamínico. Estas especificações não mencionam a digestibilidade da proteína, que é um dos fatores determinantes do valor nutricional da ração (Gehrt e col. 15).

Sabendo-se que a farinha de pescado é uma ótima fonte de proteínas para rações balanceadas, como já foi dito em 2.1., o seu preço no mercado mundial está condicionado ao conteúdo de proteína bruta. Entretanto, os diferentes métodos de processamento e estocagem podem ocasionar uma diminuição do valor nutricional das proteínas, sabendo-se serem estes compostos muito suscetíveis a agentes como o calor, oxigênio e substâncias químicas. Por esta razão é que o conteúdo bruto em proteínas, por si só, não fornece o valor nutricional real de uma farinha de pescado. Para a determinação do valor nutricional real, os testes "in vivo" de alimentação de animais são que apresentam critérios e resultados mais precisos mas, por outro lado, são muito onerosos e lentos para uso corrente na indústria (Lovern 32). Isto ocasiona que outros métodos mais simples e rápidos sejam utilizados para esta finalidade. O mais antigo de todos é a digestibilidade pela pepsina "in vitro", que pretende uma simulação da digestão da proteína por um animal.

O método da digestibilidade pela pepsina sofreu diversas modificações ao longo do tempo. Wedemeyer, em 1899, conforme ci-

tação de Lovern (32), descreveu o primeiro procedimento padrão de aceitação generalizada, e a pepsina usada tinha uma força de 1:100, i.e. que 1 grama da pepsina era capaz de solubilizar 100 gramas de clara de ovo coagulada pelo calor, sob condições específicas. Com o decorrer do tempo, foram sendo produzidas pepsinas de maior força e surgindo modificações no método. Almquist, em 1935, segundo citação de Gehrt e col. (15), também utilizou uma digestão por pepsina para avaliação da qualidade proteica de rações animais. Gehrt e col. (15) sugeriram um método que serviu de base para o posterior método oficial da A.O.A.C. (2). As diferenças consistiram na utilização de HCl 0,1N em vez de HCl 0,075N e a incubação foi feita a 37°C durante 40 a 48 horas e não a 45°C durante 16 horas, como constante no método oficial. Os autores concluíram, entre outras coisas, que embora o método não representasse exatamente o processo digestivo tal como ocorre no organismo animal, era de grande utilidade em comparações de qualidade de farinha de carne. A reprodutibilidade do método era boa, apresentando menos de 1% de diferença entre amostras em duplicata. Posteriormente, Elmslie (13) apresentou um método que reduzia o tempo de incubação de 40 horas a 37°C para 16 horas a 45°C, após verificar que os resultados obtidos em ambos os processos concordavam. O autor recomendou que o método fosse adotado como primeira ação oficial da A.O.A.C.

Lovern (32) informou que pesquisadores assessores de indústrias fabricantes de farinha de pescado eram de opinião que o teste deveria ser suprimido, tendo em vista que, enquanto era capaz de distinguir uma farinha ótima de uma outra ruim, não era capaz de distinguir farinhas ótimas de farinhas de valor nutricional regular. Este fato ocasionou com que pesquisadores do Reino Unido e de outras partes do mundo revisassem o teste, utilizando concentrações extremamente reduzidas de pepsina, com vias a aumentar a sensibilidade do mesmo, em substituição à concentração de 0,2% (pepsina, HCl 0,075N) constante no método oficial da A.O.A.C. (Lovern 30; Lovern e col. 31). Foi também incluída uma prova em branco, i.e., uma digestão somente pelo HCl 0,075N,

devido ao fato de que a farinha de pescado sempre contem algum nitrogênio solúvel no ácido na ausência de pepsina, principalmente tratando-se de farinhas integrais, que sofreram a adição dos solúveis de pescado. Lovern e col. (31) verificaram que, com a utilização de uma solução pepsínica de concentração 0,0002% e do ensaio em branco para correção da digestibilidade, o teste correlacionava bem com testes "in vivo", da lisina disponível e da metionina disponível.

Outro aspecto a ser comentado é de que a utilização do fator "nitrogênio solubilizado pelo ácido" na fórmula da digestibilidade pela pepsina corrigida, tenderia a subestimar o efeito do aquecimento, visto que os experimentos de Koval'chuk (24), em conservas de bacalhau, indicaram que a esterilização afetava em maior extensão a hidrólise por pepsina das proteínas do pescado solúveis em água do que das insolúveis. Este aspecto assume importância se for levado em conta o fato de que, na fórmula da digestibilidade, é assumido que o nitrogênio solubilizado pelo ácido seja digerível pela pepsina na mesma extensão que o nitrogênio não solubilizado pelo ácido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Amostras de farinha de pescado

Para o presente trabalho foram utilizadas farinhas de peixe, de torta de prensa e de procedência industrial, fabricadas em Rio Grande, RS, e coletadas imediatamente após a saída do secador. A matéria prima utilizada para a fabricação das farinhas era extremamente variada, constando fundamentalmente de resíduos da industrialização e de pescado impróprio para consumo humano.

3.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados para as análises eram quimicamente puros para análise e de diversas procedências (Baker, Merck, Ecibra, Carlo Erba e outras). A pepsina utilizada para a digestibilidade "in vitro" procedia de The British Drug Houses Ltd., Inglaterra.

3.1.3. Aparelhos e equipamentos

Os aparelhos e equipamentos utilizados, além da vidraria e utensílios comuns de laboratório, foram os seguintes:

- Espectrofotômetro Spektromon 360;
- Estufa com ar forçado Analis;
- Centrífuga IEC, modelo CL;
- Centrífuga Metrimpex;
- Agitador Labor;
- Banho-maria Thelco, modelo 84;
- Refrigerador General Electric;
- Moinho de discos The Straub Co., modelo 4-E.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo e acondicionamento das amostras

Todas as amostras coletadas na indústria foram moídas até uma granulometria de 25 mesh, a fim de se obter uma maior homogeneidade e também aumentar a área de contato com o oxigênio nos processos oxidativos posteriores. As amostras foram separadas em duas porções, sendo uma tratada com antioxidante etoxiquina (EQ) numa concentração de 0,1% e a outra deixada sem tratamento.

3.2.1.1. Farinhas com etoxiquina

As amostras, após a moagem e a adição do antioxidante, foram acondicionadas em sacos plásticos escuros, tendo-se tido o cuidado de se efetuar a exclusão do ar quando do fechamento hermetico dos mesmos. Depois de devidamente acondicionadas, as amostras foram guardadas em lugar escuro até a realização dos trabalhos.

3.2.1.2. Farinhas sem etoxiquina

As amostras que não sofreram a adição de antioxidante foram trabalhadas imediatamente após a chegada no laboratório, tendo-se o cuidado de acondiciona-las de forma idêntica à descrita em 3.2.1.1. para o transporte da fábrica ao laboratório.

3.2.2. Processos de oxidação das amostras

De cada amostra obtida foram separadas seis porções de aproximadamente 20 gramas que foram espalhadas em camada fina em placas de Petri de tamanho grande (diâmetro=140 mm). As placas foram colocadas em dessecador com sílica-gel, ao abrigo da luz, e aí deixadas permanecer, à temperatura ambiente, durante um período de tempo de cerca de 16 horas, com vistas a reduzir a umidade da farinha caso esta fosse elevada². Após, as porções foram submetidas à oxidação por ar forçado sob aquecimento numa estu-

² No decorrer dos trabalhos, verificou-se que as farinhas possuíam percentuais de umidade bastante baixos e o tratamento no dessecador não ocasionava variação nos mesmos.

fa com circulação de ar, sendo cada placa retirada após períodos de tempo equivalentes a 30, 60, 90, 180 e 300 minutos, respectivamente. Uma das porções foi deixada como controle e não submetida a nenhum processo oxidativo, representando o tempo 0 (zero). Foram realizados tres experimentos com farinhas diferentes sendo as temperaturas de trabalho respectivamente 100°C, 75°C e 60°C, havendo os trabalhos sido realizados tanto nas amostras não-estabilizadas como nas estabilizadas pelo antioxidante.

3.2.3. Análises químicas

Nas farinhas utilizadas, foram realizadas, em duplicata, as análises que se seguem, com vias à determinação de sua composição química básica:

3.2.3.1. Umidade

Foi determinada basicamente segundo o método A.O.A.C., procedimento 22.003 (2) com adaptações para as condições de trabalho. As amostras foram levadas à estufa a 110°C até peso constante, sendo a umidade determinada por diferença de peso.

3.2.3.2. Proteína

Determinada em termos de proteína bruta, N x 6,25, sendo o teor de nitrogênio total determinado por método Kjeldahl conforme A.O.A.C., procedimento 2.044 (2) com adaptações para as condições de trabalho. Foi utilizado selênio como catalizador na digestão.

3.2.3.3. Gordura extratível em benzeno

Foi utilizado o método descrito por Sparre e col. (51).

3.2.3.4. Cinzas

O método utilizado foi o descrito por Sparre e col. (51). Nas porções correspondentes a cada tempo de oxidação foram

realizados os seguintes procedimentos e análises:

3.2.3.5. Extração e purificação dos lipídeos

Seguiu-se fundamentalmente o procedimento descrito por Bligh e Dyer (5) com adaptações para as condições de trabalho. Foi utilizada uma mistura de clorofórmio e metanol (1:1, v/v) para a extração dos lipídeos. Esta técnica já havia sido utilizada por Lea e col. (27) em estudos de farinha de arenque estocadas sob diversas condições. Utilizou-se uma relação sólido: solvente de 1:4. Desta forma, 5 gramas de farinha foram extraídas com 20 ml da mistura durante 30 minutos em agitador, a frio. A separação das fases metanólica e clorofórmica foi feita mediante a adição de 18 ml de água destilada, obtendo-se desta forma a proporção final de 1:1:1,8 de clorofórmio, metanol e água, respectivamente. Com esta proporção, permaneceu-se na "linha de retenção máxima de clorofórmio" do diagrama de fases clorofórmio-metanol-água, descrita por Bonner em 1910, conforme citação de Bligh e Dyer (5), evitando-se desta forma a passagem de compostos não-lipídicos para a fase clorofórmica. Os extratos clorofórmicos foram secados com Na_2SO_4 anidro, filtrados e acondicionados em tubos de ensaio que foram hermeticamente fechados e envoltos em papel alumínio e assim mantidos até as análises.

3.2.3.6. Índice de peróxidos

Foi realizado fundamentalmente segundo o método A.O.A.C., procedimentos 26.024 e 26.025 (2) com adaptações para as condições de trabalho. A determinação foi realizada em 3 ml de extrato clorofórmico contendo os lipídeos obtido em 3.2.3.5., o que correspondia a uma quantidade de lipídeos variável entre 136,5 e 426,0 mg, tomando-se em conta todas as farinhas utilizadas. A titulação foi realizada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.02N, utilizando-se uma microbureta Kimax, 2 ml, 1/100.

3.2.3.7. Valor TBA

Para a realização desta determinação seguiu-se fundamentalmente a técnica descrita por Yu e Sinnhuber (58), modificada posteriormente por Yu (59), com adaptações para as condições de trabalho. A análise foi efetuada em 1 ml do extrato clorofórmico obtido em 3.2.3.5.. A quantidade de lipídeos utilizada por análise variou entre 45,5 a 142,0 mg, tomando-se em conta todas as farinhas utilizadas. A leitura da absorbância dos compostos TBA-reativos foi feita a 535 nm.

3.2.4. Digestibilidade pela pepsina

O teste foi realizado em todas as porções das farinhas correspondentes a cada tempo de oxidação. O método adotado foi basicamente o descrito pela A.O.A.C., procedimentos 22.025 a 22.031 (2) para rações proteicas animais, com as modificações introduzidas por Lovern (30,32) e Lovern e col. (31) e adaptado às condições de trabalho. As amostras de farinha não foram desengorduradas por motivos óbvios relativamente ao trabalho em si. Foi utilizada uma solução de pepsina em HCl 0,075N a uma concentração de 0,0008%, visto que a força da pepsina utilizada era de 1:2.500 e não de 1:10.000 como constante no método oficial. Assim, 200mg de farinha e um volume de 30 ml da solução pepsínica foram incubados sob agitação a uma temperatura de 45°C durante 16 horas. Após o período de incubação, a mistura foi filtrada e feita a determinação do nitrogênio solubilizado no filtrado por método de Kjeldahl referido em 2.3.3.2.. Paralelamente foram realizados ensaios em branco respectivos, que consistiram de uma digestão somente pelo HCl 0,075N. A fórmula utilizada para o cálculo da digestibilidade corrigida foi:

$$\text{DIG (\%)} = \frac{\text{Na + p} - \text{Na}}{\text{Nt} - \text{Na}} \times 100$$

Sendos:

Na + p — nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina
 Na — nitrogênio solubilizado pelo ácido
 Nt — nitrogênio total

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1

Foi utilizada uma farinha de pescado cuja composição química básica, determinada segundo os métodos descritos em 3.2.3.1., 3.2.3.2., 3.2.3.3. e 3.2.3.4. está disposta no Quadro 1 abaixo. Os dados são a média de duas determinações.

QUADRO 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA BÁSICA DA FARINHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 1

Componente químico	Percentual
Umidade	5,72%
Gordura extratível em benzeno	10,38%
Proteína (N x 6,25)	60,13%
Cinzas	20,66%

As porções de farinha sem antioxidante e com a adição de 0,1% de EQ, preparadas conforme descrito em 3.2.1., 3.2.1.1. e 3.2.1.2., foram submetidas ao processo oxidativo descrito em 3.2.2., utilizando-se uma temperatura de trabalho de 100°C. As variações na digestibilidade pela pepsina, no índice de peróxidos e no valor TBA estão dispostas na Figura 1 e Figura 2, respectivamente para a farinha sem antioxidante e para a farinha contendo 0,1% de etoxiquina. Os parâmetros foram analisados conforme os métodos 3.2.3.6., 3.2.3.7. e 3.2.4. descritos anteriormente. Os pontos indicados com um símbolo x na Figura 1 representam os valores assumidos pela digestibilidade pela pepsina das amostras correspondentes aos tempos de oxidação de 30 min e 60 min, quando era efetuada a adição de 0,1% de etoxiquina imediatamente após o processo oxidativo.

Nas Figuras 3 e 4, estão representadas as variações do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido no decorrer da oxidação, para a farinha sem

antioxidante e para a farinha contendo 0,1% de EQ, respectivamente.

Nas Figuras 5 e 6, estão feitas as representações das variações das perdas relativas ao tempo zero na digestibilidade pela pepsina e no nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina no decorrer da oxidação, para a farinha sem antioxidante e para a farinha que sofreu a adição de 0,1% de EQ, respectivamente.

4.2. Experimento 2

Para este experimento foi utilizada uma farinha de peixe cuja composição química básica, determinada segundo os métodos descritos anteriormente em 3.2.3.1., 3.2.3.2., 3.2.3.3. e 3.2.3.4., encontra-se disposta no Quadro 2 abaixo. Os dados são a média de duas determinações.

QUADRO 2: COMPOSIÇÃO QUÍMICA BÁSICA DA FARINHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 2

Componente químico	Percentual
Umidade	5,57%
Gordura extratível em benzeno	11,50%
Proteína (N x 6,25)	52,69%
Cinzas	23,29%

As porções de farinha sem antioxidante e com a adição de 0,1% de EQ, preparadas conforme descrito em 3.2.1., 3.2.1.1. e 3.2.1.2., foram submetidas ao processo de oxidação descrito em 3.2.2., utilizando-se uma temperatura de trabalho de 75°C. As variações na digestibilidade pela pepsina, no índice de peróxidos e no valor TBA estão representadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente para a farinha sem antioxidante e para a farinha que sofreu a adição de 0,1% de etoxiquina. As análises dos parâmetros foram efetuadas conforme os métodos 3.2.3.6., 3.2.3.7. e 3.2.4. descritos anteriormente. O ponto marcado com um símbolo

x na Figura 5 representa o valor assumido pela digestibilidade pela pepsina da amostra correspondente a um tempo de oxidação de 60 min, quando era efetuada a adição de 0,1% de EQ após o processo oxidativo.

Nas figuras 9 e 10, estão feitas as representações das variações do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido no decorrer da oxidação, para a farinha sem antioxidante e para a farinha com 0,1% de EQ, respectivamente.

Nas figuras 11 e 12, estão representadas as variações das perdas relativas ao tempo zero na digestibilidade pela pepsina e no nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina no decorrer da oxidação, para a farinha sem antioxidante e para a farinha com 0,1% de EQ, respectivamente.

4.3. Experimento 3

Neste experimento foi utilizada uma farinha de pescado cuja composição química básica, determinada segundo os métodos descritos em 3.2.3.1., 3.2.3.2., 3.2.3.3. e 3.2.3.4., está disposta no Quadro 3 abaixo. Os dados são a média de duas determinações.

QUADRO 3: COMPOSIÇÃO QUÍMICA BÁSICA DA FARINHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 3

Componente químico	Percentual
Unidade	4,11%
Gordura extratível em benzeno	20,88%
Proteína (N x 6,25)	52,13%
Cinzas	19,34%

O experimento foi realizado somente na porção de farinha sem a adição de antioxidante, visto que o alto teor de gordura da farinha conferia-lhe características tais que impossibilitavam a aplicação homogênea da etoxiquina. A própria operação de peneiramento a 25 mesh, como descrito em 3.2.1., não pode ser levada a

término, visto que a farinha obstruía totalmente a peneira.

A porção de farinha sem antioxidante foi submetida ao processo oxidativo descrito em 3.2.2., utilizando-se uma temperatura de trabalho de 60°C. As variações na digestibilidade pela pepsina, no índice de peróxidos e no valor TBA estão dispostas na Figura 13. As análises dos parâmetros foram efetuadas conforme os métodos descritos em 3.2.3.6., 3.2.3.7. e 3.2.4.

Na Figura 14, estão representadas as variações do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado somente pelo ácido no decorrer da oxidação.

As variações das perdas relativas ao tempo zero na digestibilidade pela pepsina e no nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina no decorrer da oxidação, estão representadas na Figura 15.

FIGURA 1: VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCADADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 100°C

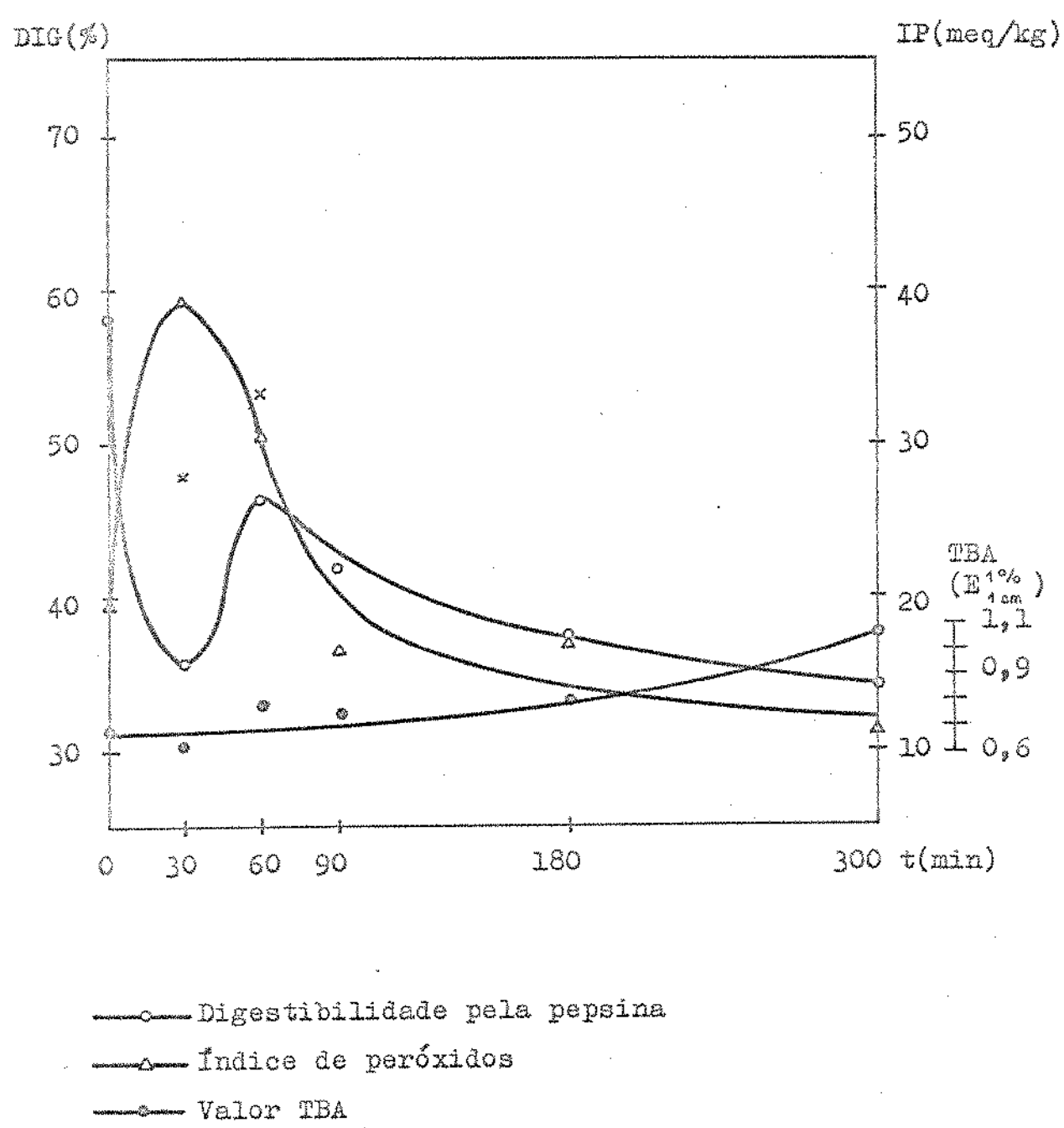


FIGURA 2: VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCADADO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 100°C

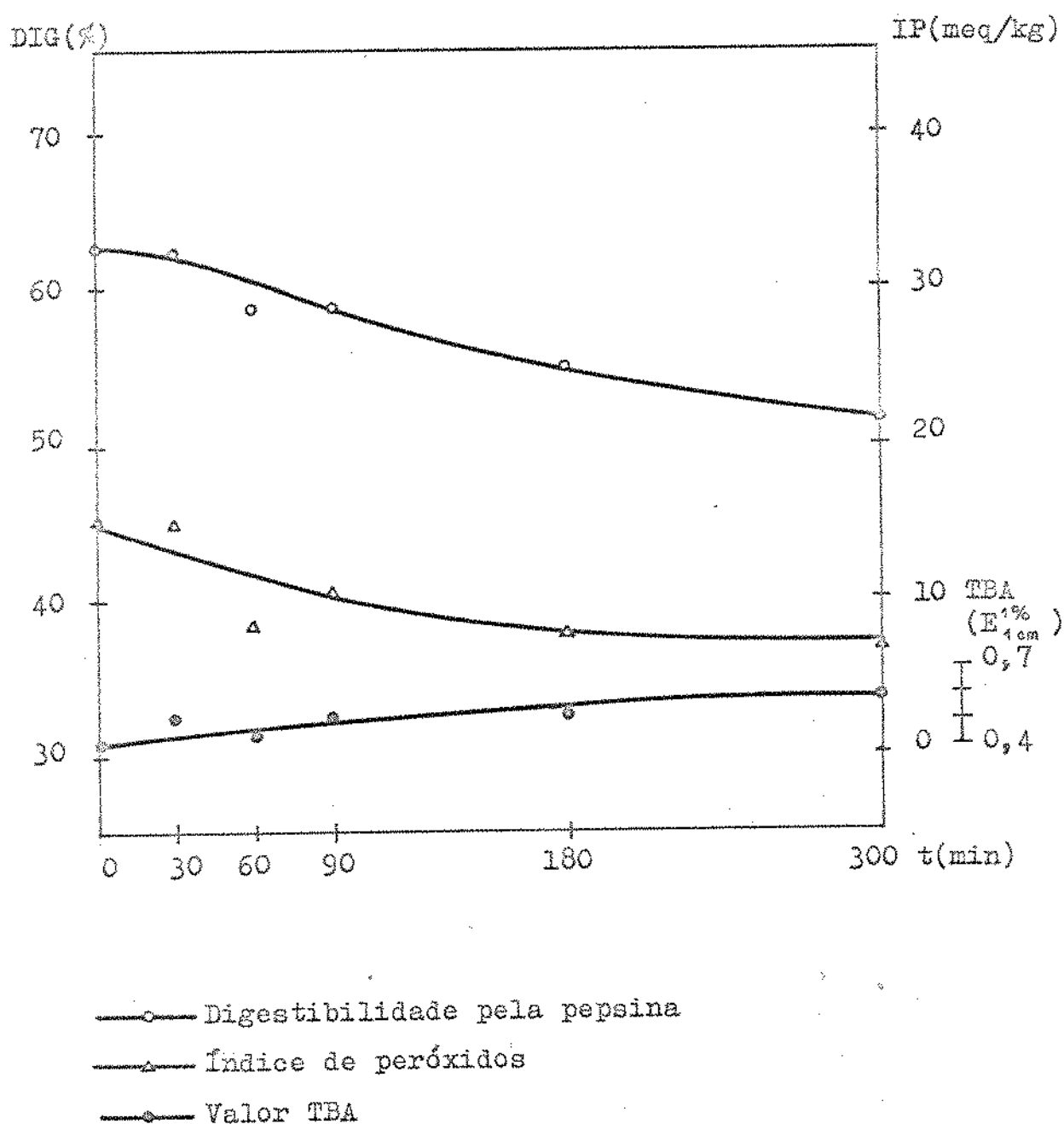
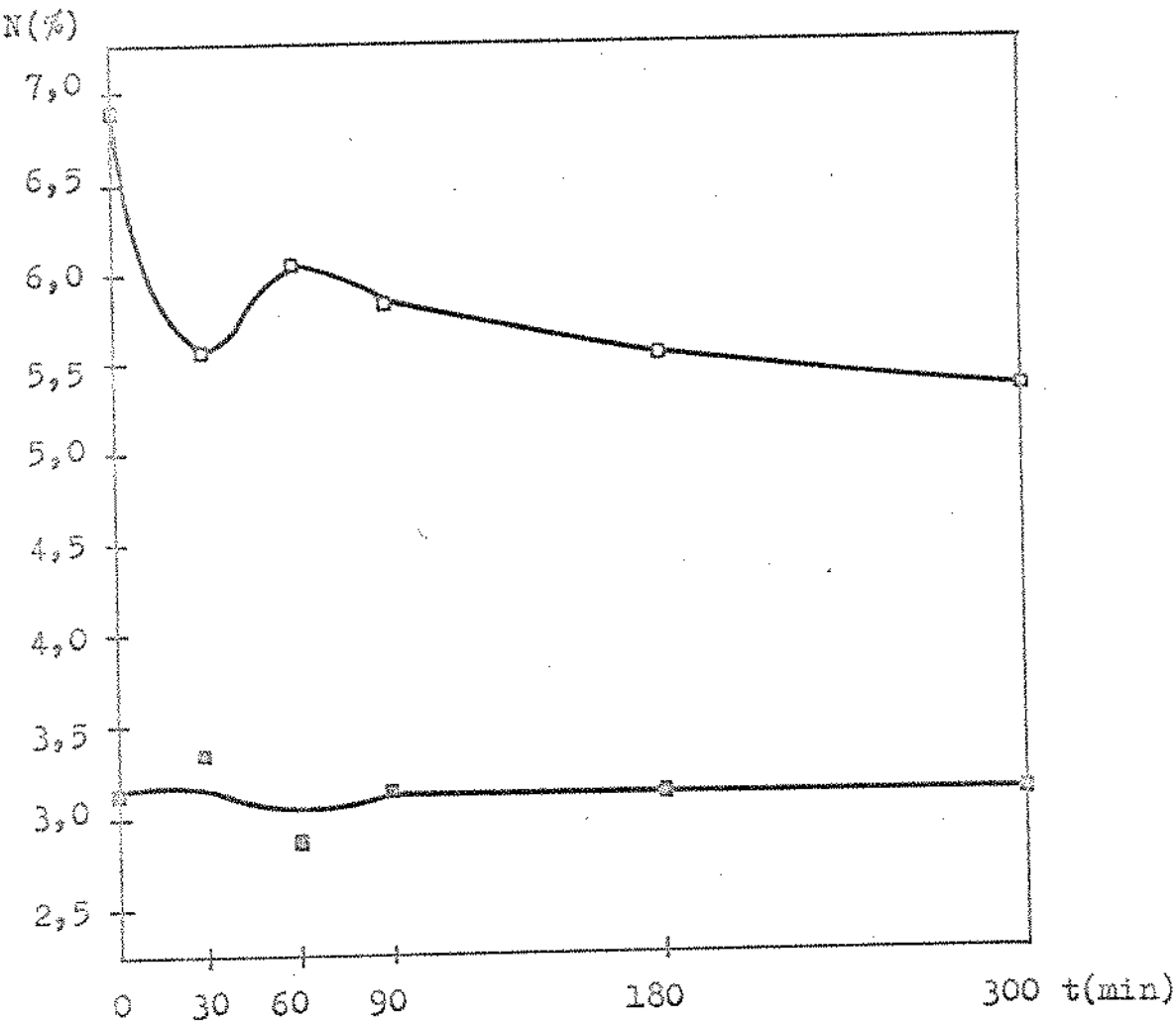


FIGURA 3: VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCAO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 100°C



—○— Nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina
—■— Nitrogênio solubilizado pelo ácido

FIGURA 4: VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCADO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 100°C

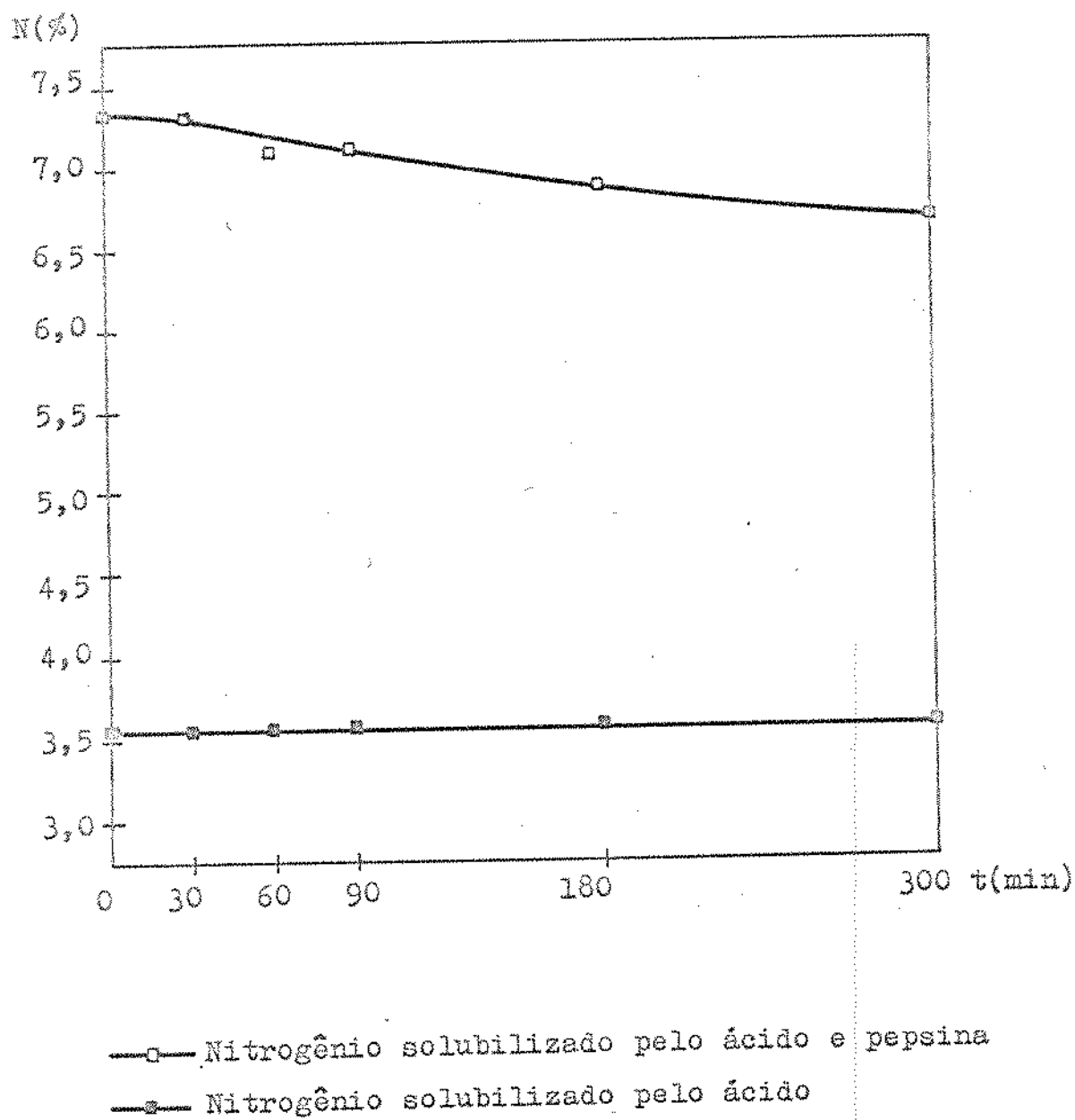


FIGURA 5: VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 100°C

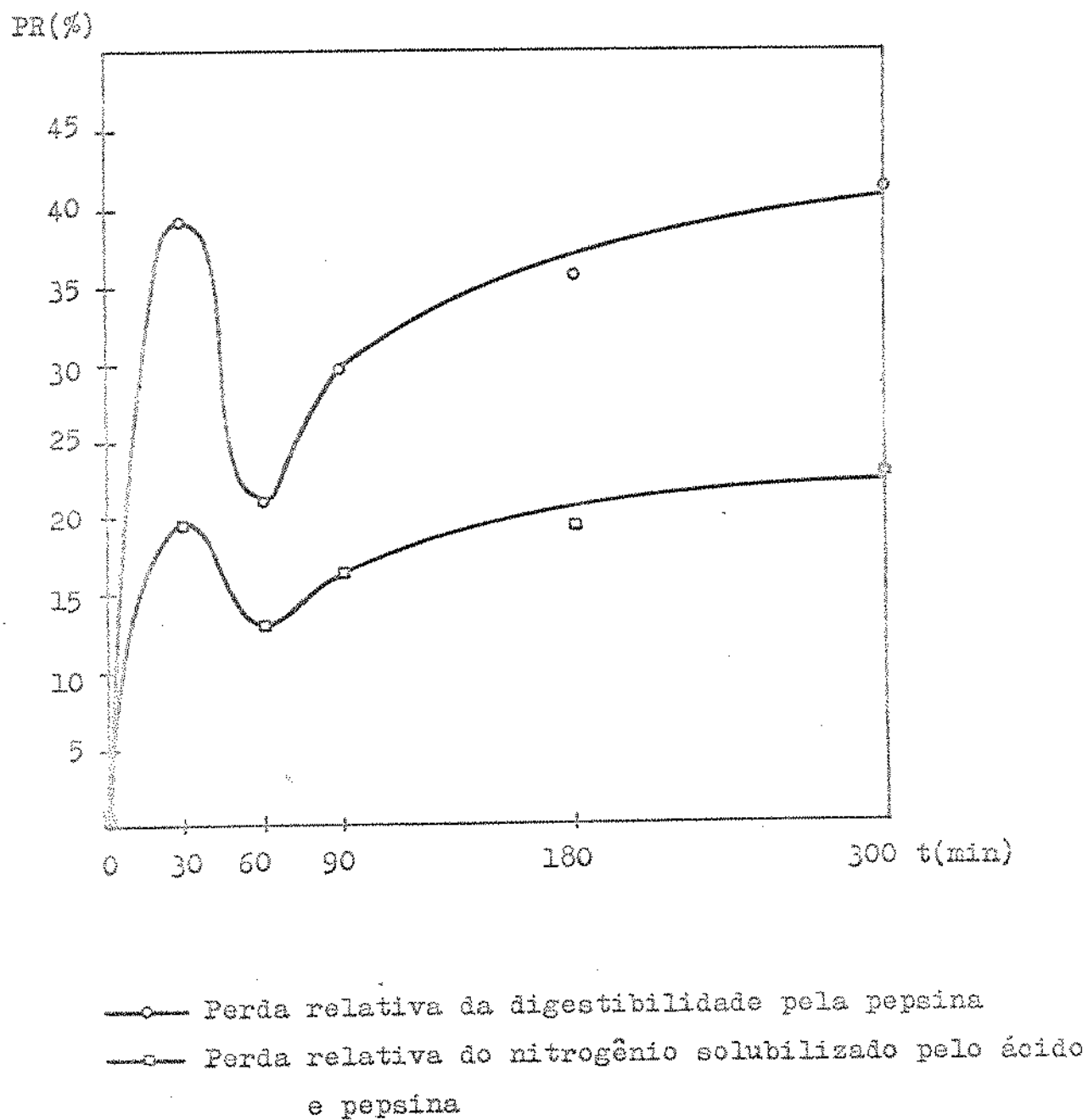


FIGURA 6: VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCAÇO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 100°C

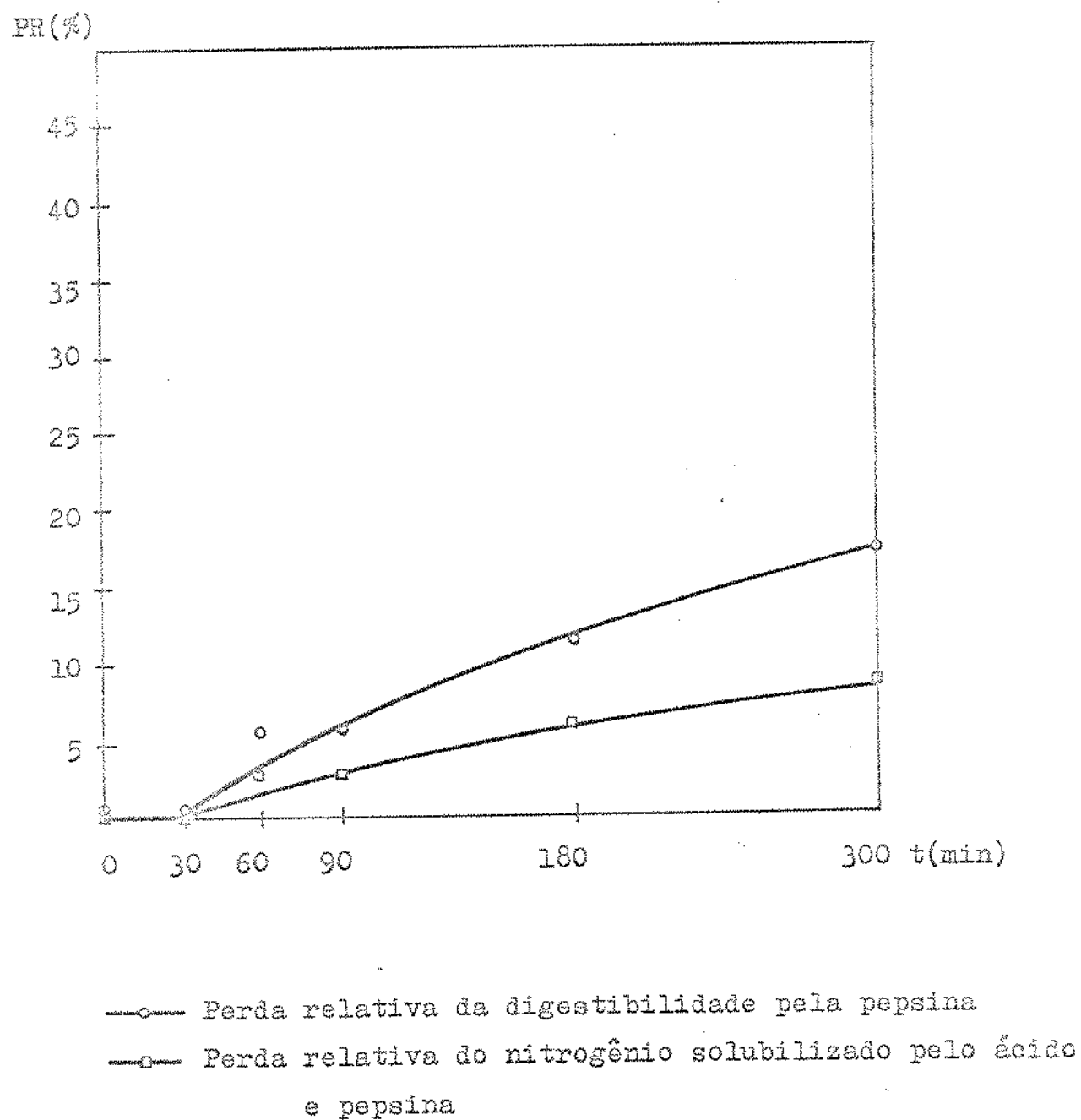


FIGURA 7: VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCADADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 75°C

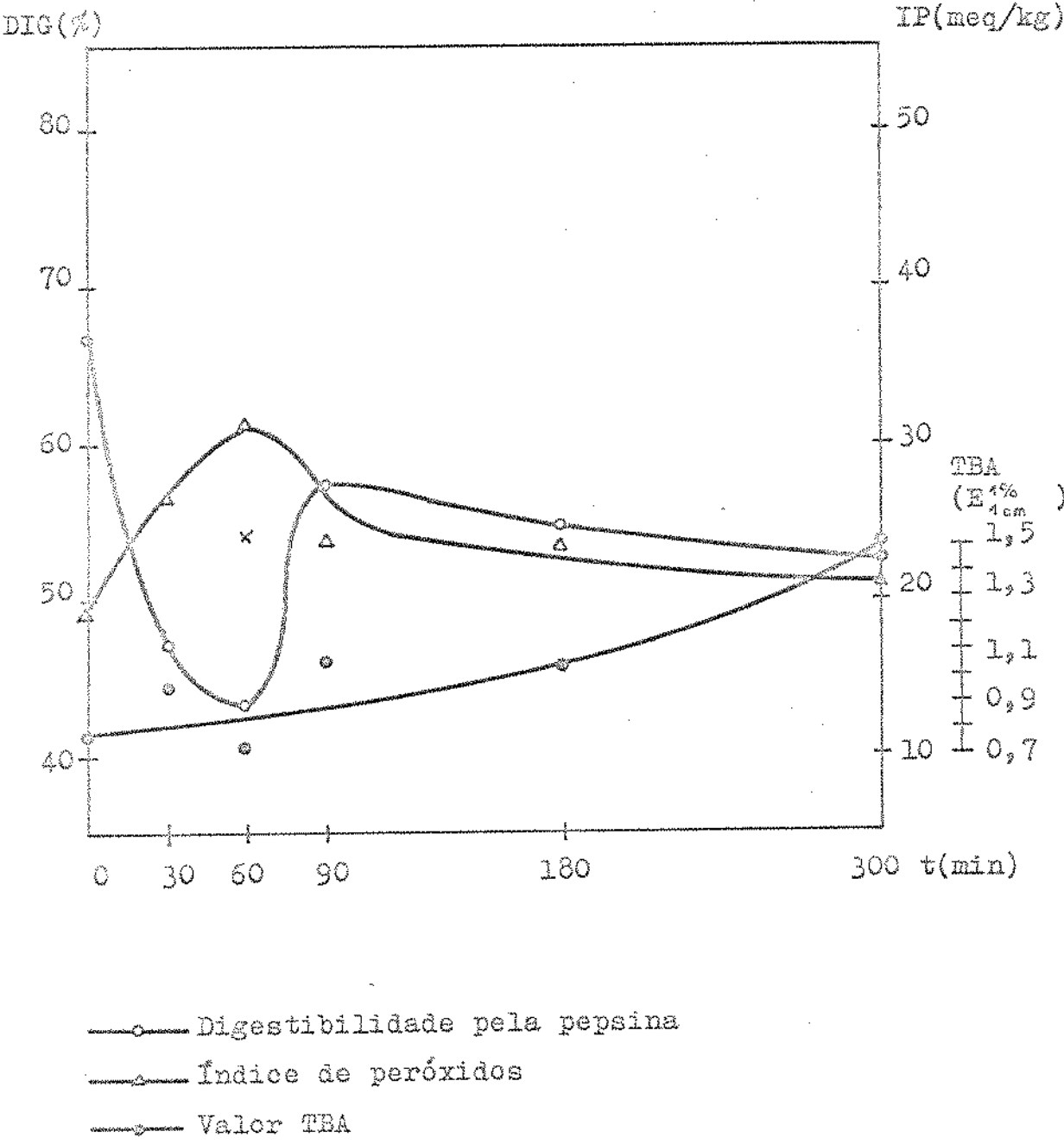


FIGURA 8: VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PERSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCADO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 75°C

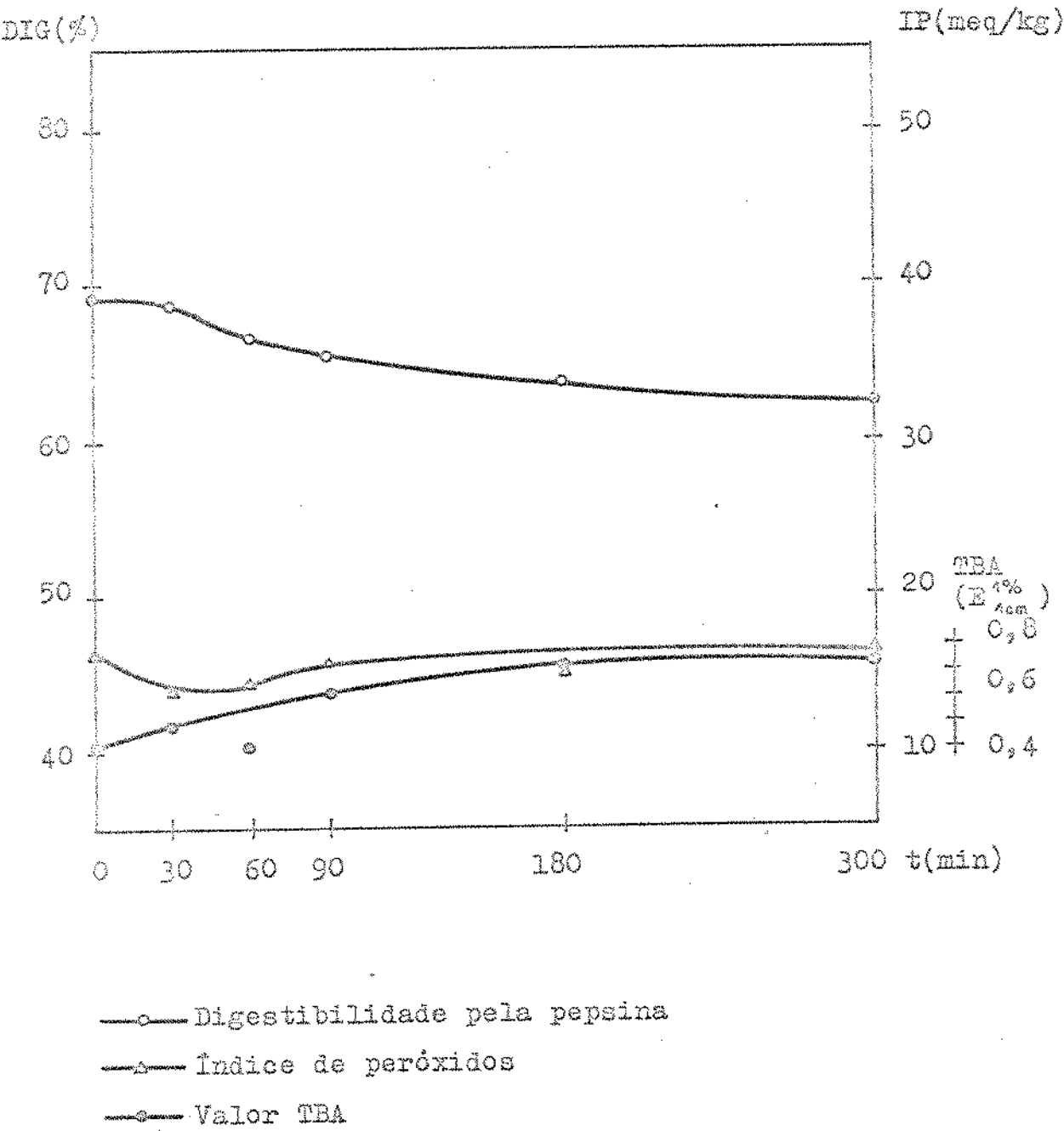


FIGURA 9: VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 75°C

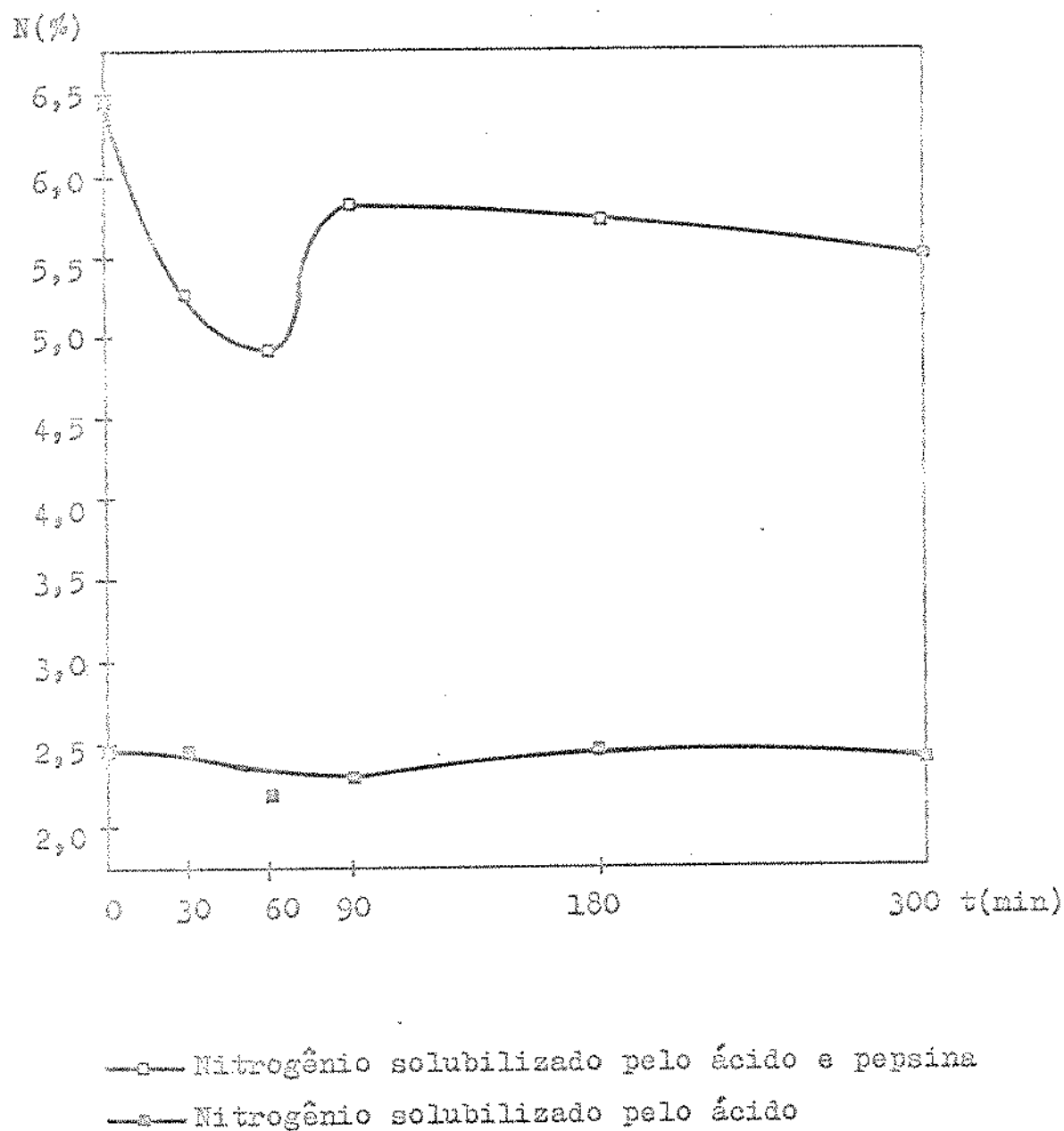


FIGURA 10: VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCADO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 75°C

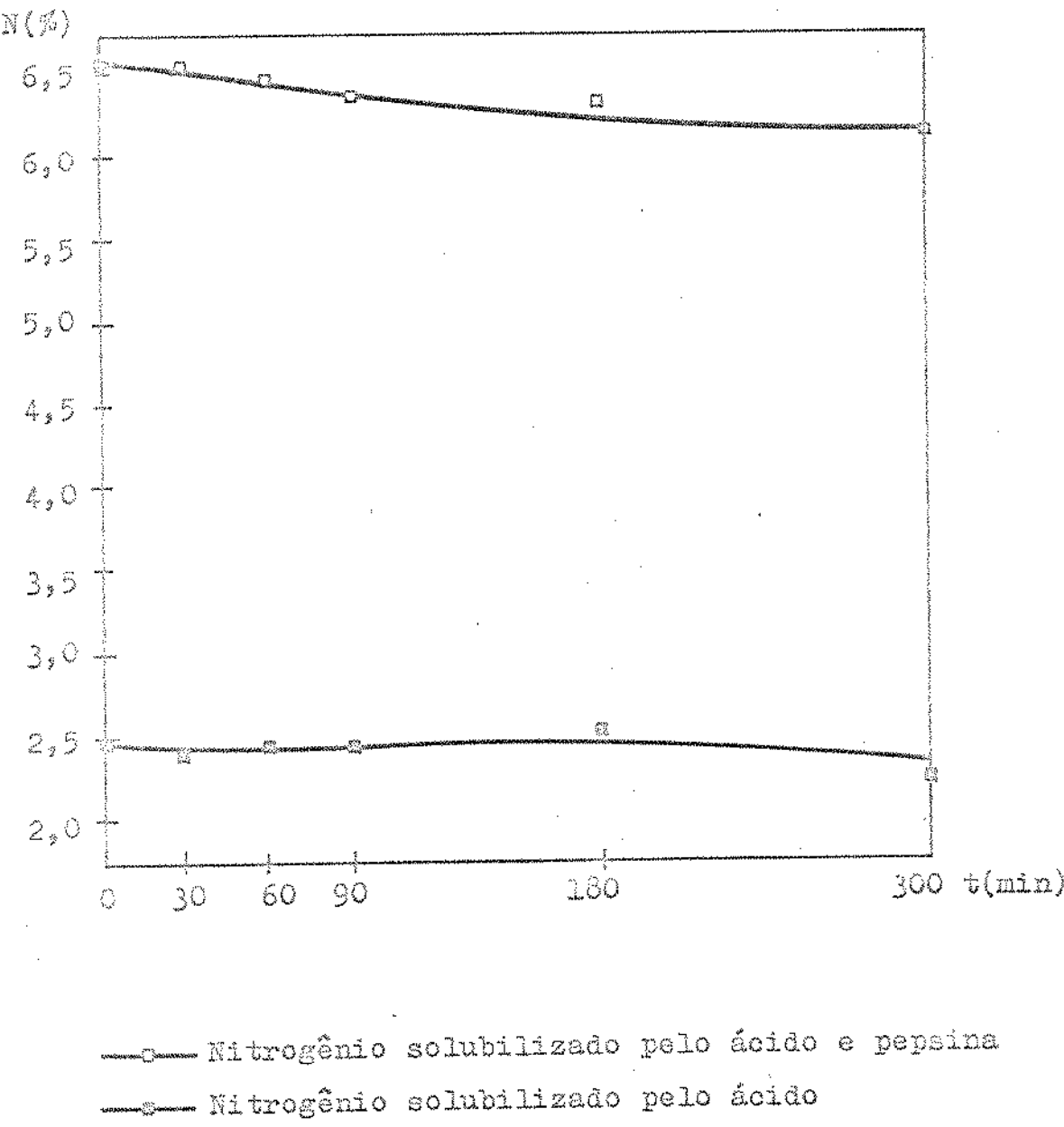


FIGURA 11: VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 75°C

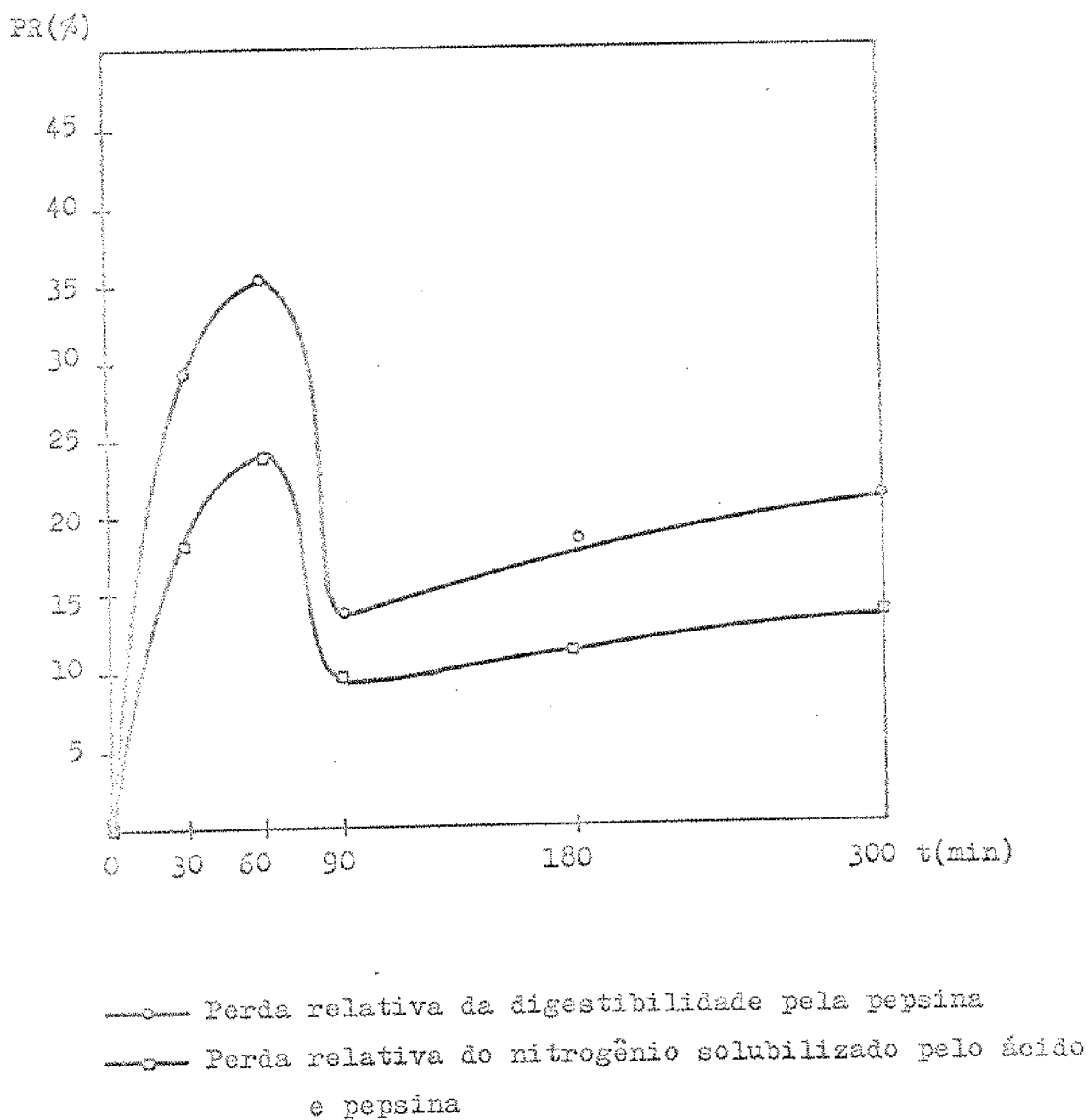


FIGURA 12: VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCADO COM 0,1% EQ E OXIDADA A 75°C

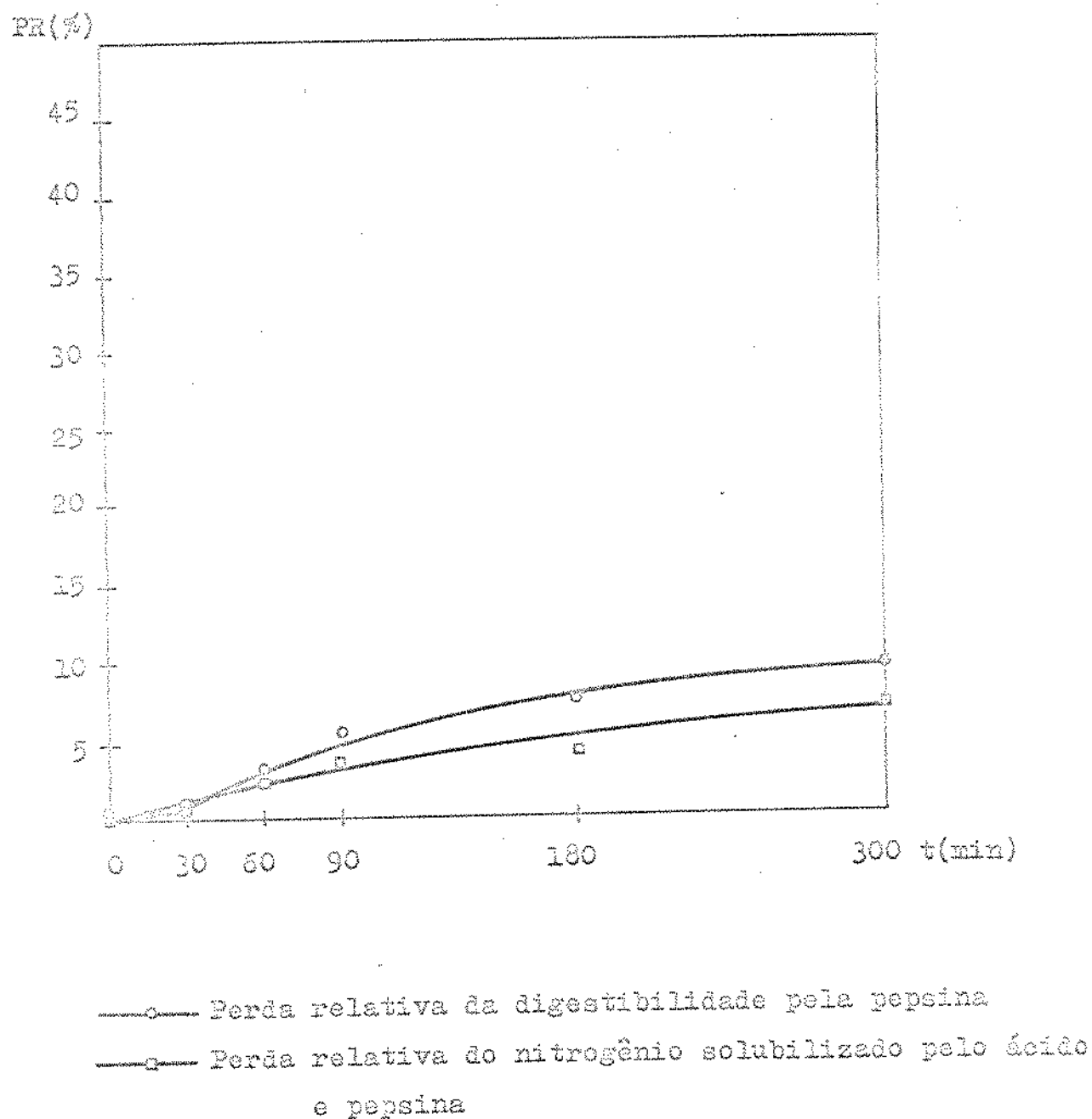


FIGURA 13: VARIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA, DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DO VALOR TBA EM FARINHA DE PESCADADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 60°C

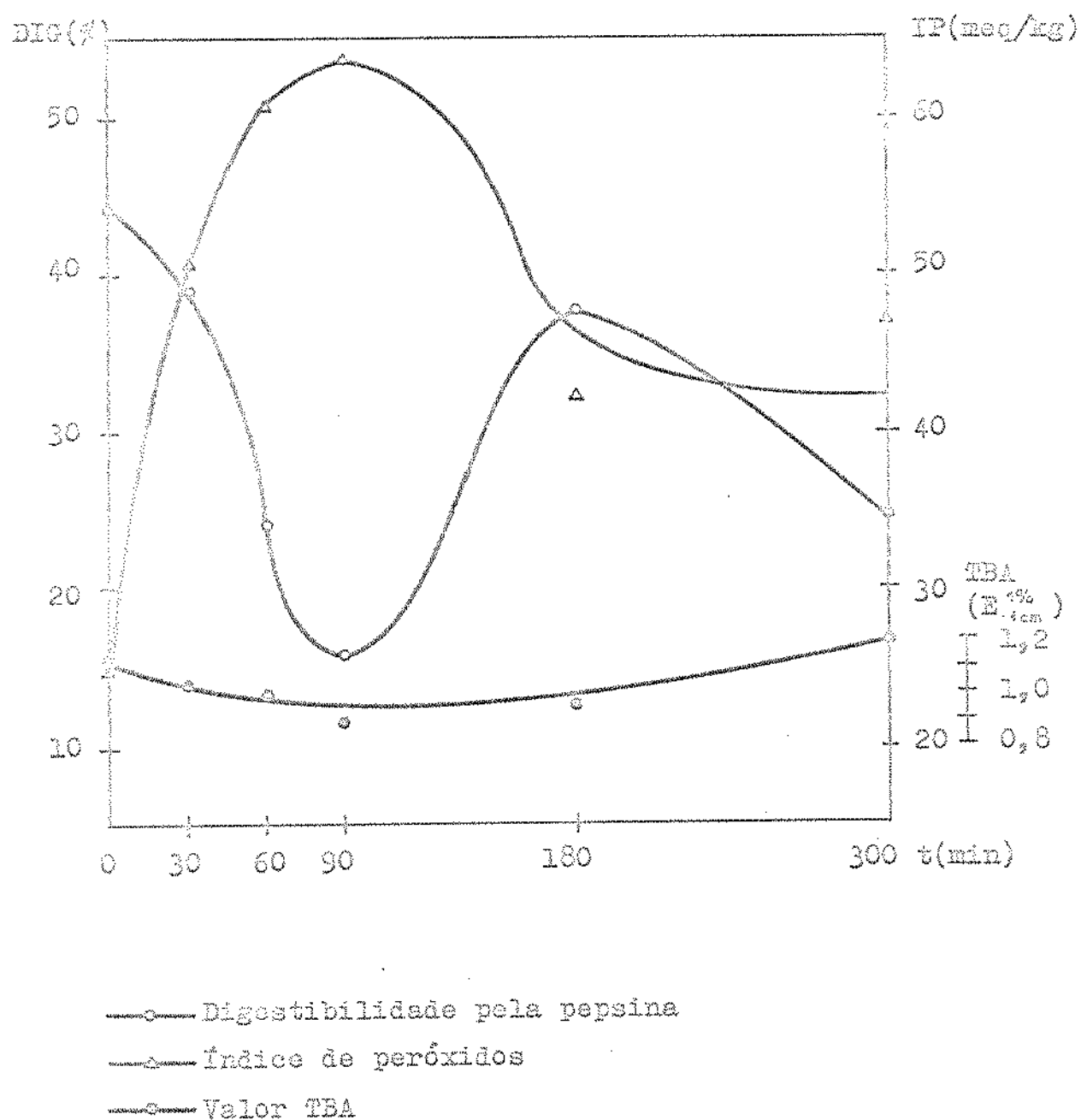


FIGURA 14: VARIAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO EM FARINHA DE PESCADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 60°C

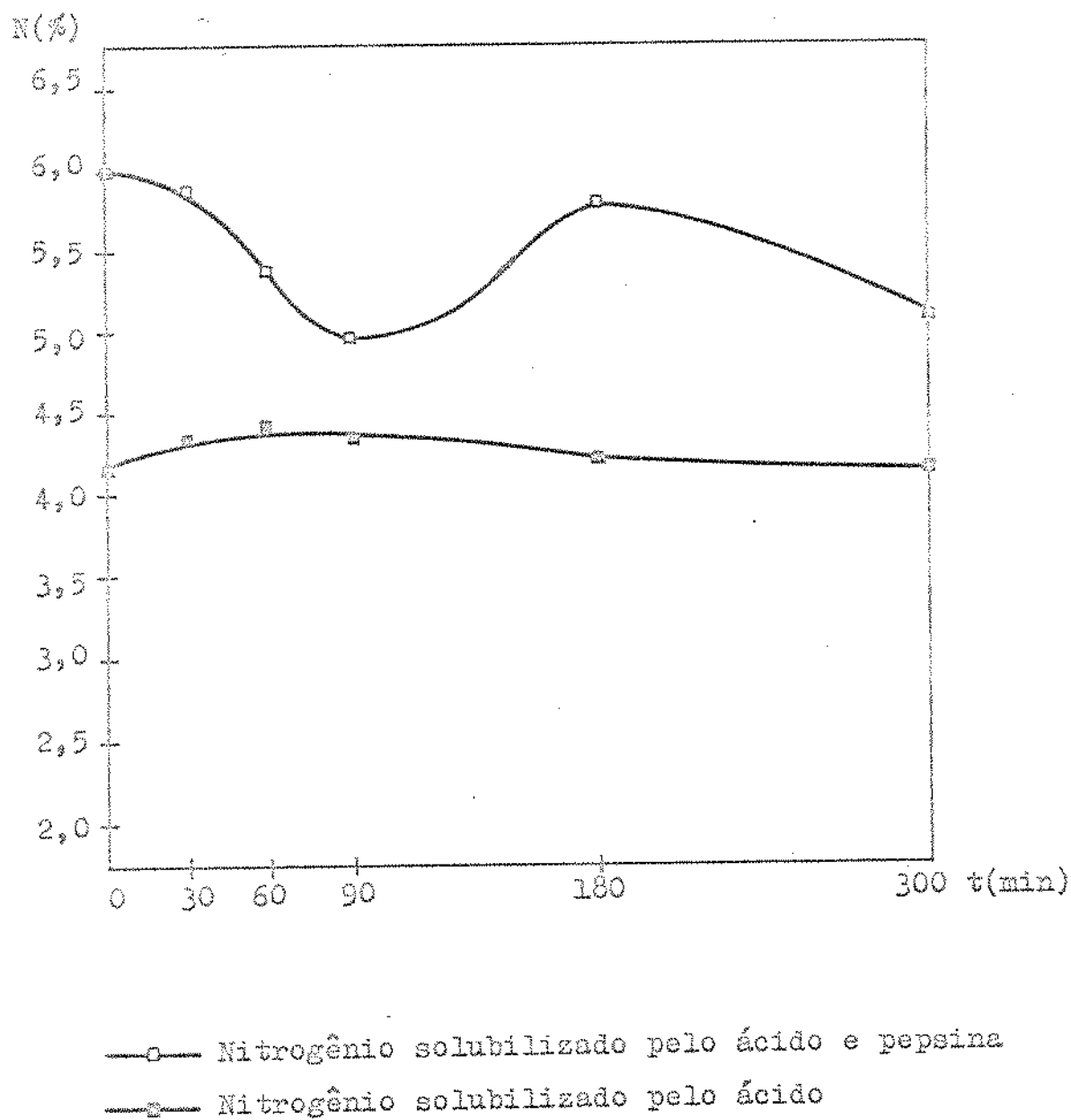
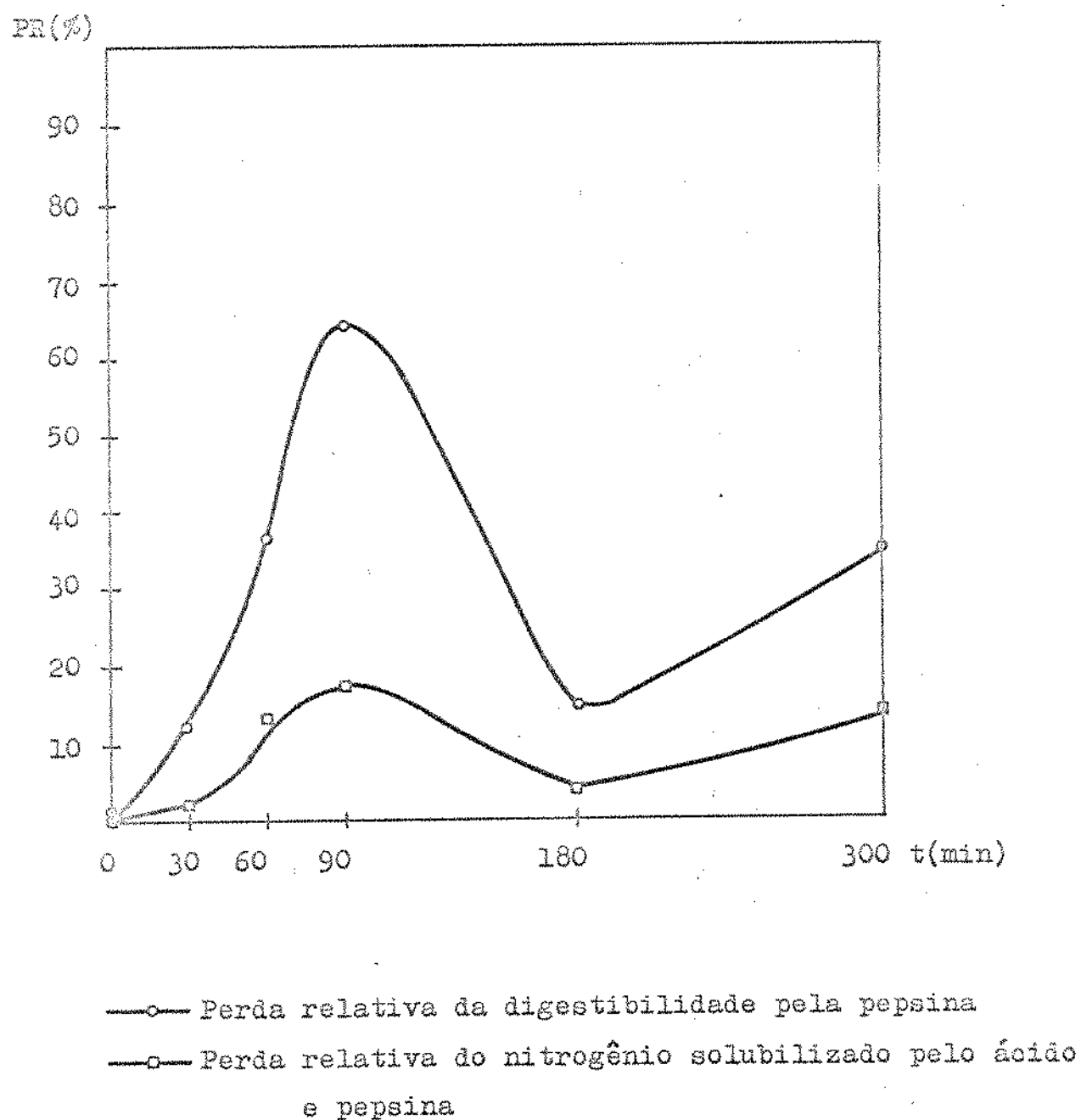


FIGURA 15: VARIAÇÃO DA PERDA RELATIVA DA DIGESTIBILIDADE PELA PEPSINA E DO NITROGÊNIO SOLUBILIZADO PELO ÁCIDO E PEPSINA EM FARINHA DE PESCADO SEM ANTIOXIDANTE E OXIDADA A 60°C



5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Composição química das farinhas

As farinhas utilizadas apresentaram uma composição química básica variável, conforme pode ser constatado através da observação dos Quadros 1, 2 e 3. Este fato pode ser considerado normal, tendo-se em vista que as matérias primas utilizadas para a sua fabricação eram extremamente variáveis, como já foi dito em 3.1.1. Por outro lado, deve ser levado em conta o fato de que as farinhas foram coletadas em diferentes épocas do ano e é sabido que o pescado apresenta marcada variação sazonal nos conteúdos de gordura e umidade (Rios 45; Ito e Watanabe 16).

A literatura existente sobre composição química de farinhas de pescado fabricadas no Rio Grande do Sul é escassa, tornando desta forma difícil a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com resultados já pré-existentes. A comparação com farinhas estrangeiras, sobre as quais existem muitas publicações, não é cabível, pois normalmente tais farinhas são elaboradas a partir de uma única espécie, utilizando peixe inteiro de boa qualidade e ainda, na maioria das vezes, tratam-se de farinhas integrais. Os resultados obtidos apresentaram uma certa correlação com os dados obtidos por Rios (46), embora com algumas diferenças, principalmente no que se refere aos teores de umidade, que no caso do presente trabalho, apresentaram-se bem mais baixos. A explicação reside no fato de que as farinhas utilizadas foram coletadas imediatamente após a saída do secador, como foi dito em 3.1.1. e após mantidas sem contato com o ar, como descrito em 3.2.1.1. e 3.2.1.2.. Desta forma, a umidade de equilíbrio da farinha com a atmosfera não chegava a ser alcançada.

Os percentuais de gordura extratível em benzeno relativamente elevados não significam que as farinhas apresentem sempre tais valores. É que para a realização deste trabalho, foram propositalmente escolhidas farinhas com elevado conteúdo em gordura, com vistas a potencializar os efeitos da oxidação dos lipídeos.

5.2. Variação da digestibilidade pela pepsina, do índice de peróxidos e do valor TBA em farinhas de pescado sem antioxidante e oxidadas sob aquecimento

Através de uma análise das Figuras 1, 7 e 13, verifica-se que os parâmetros em questão apresentaram comportamentos similares nos tres experimentos. A digestibilidade pela pepsina apresentou uma queda brusca nos valores no período inicial do processo, havendo posteriormente uma recuperação dos valores e finalmente uma queda constante e regular até o fim do processo oxidativo. Este comportamento já havia sido constatado por Contreras Guzman (10), como descrito em 2.4. anteriormente. O índice de peróxidos apresentou uma rápida elevação nos valores no período inicial do processo oxidativo até atingir um valor máximo, seguido de uma decomposição regular e constante tendendo a uma estabilização até o fim do processo. Este comportamento já havia sido referido por Lea e col. (27) e posteriormente por Lea (29), conforme foi dito em 2.5.2.. Aparentemente, para todos os experimentos, o período de indução foi nulo, o que de certa forma vem concordar com os experimentos de Koning, conforme citação de Schmiât (47), como foi dito em 2.2.. O valor TBA permaneceu praticamente constante durante o período de peroxidação dos lipídeos, só apresentando um desenvolvimento dos valores após a decomposição dos peróxidos, fato este que já havia sido citado por Tappel (56).

Evidentemente, as similaridades descritas acima são de cunho geral, visto que a temperatura exerce grande influência na oxidação dos lipídeos e que as farinhas utilizadas nos experimentos eram diferentes. Desta forma, no Experimento 1, onde a temperatura de trabalho foi de 100°C, a máxima peroxidação dos lipídeos foi encontrada num tempo de 30 min. No Experimento 2, onde a temperatura utilizada foi de 75°C, a máxima peroxidação dos lipídeos foi encontrada a 60 min e, finalmente, no Experimento 3, cuja temperatura de oxidação foi de 60°C, o momento de peroxidação máxima dos lipídeos foi encontrado num tempo de 90 min.

A digestibilidade pela pepsina também apresentou o valor

mínimo na queda brusca inicial em tempos diferentes nos 3 experimentos. No experimento 1, este valor ocorreu a 30 min, no Experimento 2 a 60 min e no Experimento 3, num tempo de 90 min. Desta forma, houve uma total concordância nos tempos de ocorrência deste valor mínimo da digestibilidade pela pepsina e os de máxima peroxidação dos lipídeos em todos os experimentos. Este fato, por si só, já é bastante indicativo de um efeito inibidor que os peróxidos de lipídeos são capazes de ocasionar na digestibilidade pela pepsina. Mais ainda, se for levado em consideração o fato de que a adição posterior de etoxiquina a 0,1% após o processo oxidativo, é capaz de recuperar parcialmente a digestibilidade perdida, sabendo-se que os radicais livres formados na peroxidação dos lipídeos são barrados pelo antioxidante. A recuperação, parcial da digestibilidade deu-se em todas as porções de farinha oxidadas que sofreram a adição de etoxiquina, o que pode ser visto nas Figuras 1 e 7. O fato da digestibilidade só se recuperar parcialmente concorda com os experimentos de March (34) e de Clagget (7) que demonstraram que antioxidantes tem sua efetividade reduzida se os lipídeos já se encontram oxidados.

Passada a etapa de alta peroxidação dos lipídeos, os valores da digestibilidade, em todos os experimentos, sofreram uma brusca elevação, indicando que o efeito inibidor dos peróxidos não é irreversível, visto que a sua decomposição possibilitou novamente a hidrólise enzimática. A posterior redução nos valores da digestibilidade pode ser ocasionada fundamentalmente por dois fatores distintos. O primeiro seria a reação entre os aldeídos formados na oxidação dos lipídeos, formação esta que ficou evidenciada pelo crescimento dos valores TBA, com o grupo amino de aminoácidos e proteínas da farinha ou da própria pepsina, através de uma reação de Maillard ou outros tipos de complexações. O outro fator seria o impedimento físico da enzima atingir as ligações peptídicas, devido a formação de uma película de lipídeos polimerizados devido ao calor. Ambos os aspectos foram descritos anteriormente em 2.4.

Os resultados obtidos permitem efetuar uma advertência so-

bre os possíveis riscos de alimentar animais com farinhas de pes-
cado como fonte proteica e que por ventura estejam no momento de
máxima peroxidação dos lipídeos, quando a digestibilidade se re-
duz violentamente, apesar de se tratar de produtos de fabricação
recente.

5.3. Variação da digestibilidade pela pepsina, do índice de peróxidos e do valor TBA em farinha de pescado com 0,1% EQ e oxidada sob aquecimento

As variações mostradas nas Figuras 2 e 8 revelam um compor-
tamento semelhante da digestibilidade pela pepsina, onde pode ser
notado que a mesma praticamente não variou nos 30 minutos iníci-
ais do processo oxidativo, após o que os valores apresentaram u-
ma queda constante e regular. Já o comportamento do índice de pe-
róxidos apresentou certa diferença entre os dois experimentos. No
experimento a 100°C, houve uma decomposição considerável dos pe-
róxidos ao longo do processo, enquanto que no experimento a 75°C
a decomposição ocorreu apenas no período inicial, havendo poste-
riormente uma tendência à estabilização dos valores em relação
ao valor inicial. Os valores TBA apresentaram, em ambos os expe-
rimentos, variações semelhantes que consistiram numa pequena as-
censão dos valores, provavelmente devida a decomposição dos peró-
xidos.

Ficou plenamente evidenciada a inibição da peroxidação dos
lipídeos através da adição de etoxiquina a uma concentração de
0,1%. Paralelamente, os valores da digestibilidade pela pepsina
não apresentaram a queda brusca inicial referida em 5.2., haven-
do inclusive um aumento nos valores do tempo zero em relação à
farinha sem antioxidante. Opstvedt (43) encontrou resultados se-
melhantes ao verificar que a estabilização por antioxidantes em
farinha comercial de arenque ocasionava um aumento de 10% no va-
lor proteico da farinha medido como PER (relação de eficiência
proteica).

A redução nos valores da digestibilidade pode ser atribuí-
da a uma reação de Maillard, ou outro tipo de complexação, tendo

-se em vista o desenvolvimento dos valores TBA, e a reações de polimerização térmica, como já descrito anteriormente em 2.4. e 5.2.

5.4. Variação do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido em farinha de pescado sem antioxidante e oxidada sob aquecimento

Através de uma análise das Figuras 3, 9 e 14, pode ser observado que o nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina apresentou uma variação semelhante àquela apresentada pela digestibilidade pela pepsina nas Figuras 1, 7 e 13, respectivamente. Já o nitrogênio solubilizado pelo ácido praticamente não variou ao longo do processo oxidativo. Estes fatos demonstram que o efeito inibidor dos peróxidos é especificamente atuante na capacidade da pepsina hidrolizar as proteínas da farinha através da quebra das ligações peptídicas.

O fato do nitrogênio solubilizado pelo ácido não ter variado ao longo da oxidação entrou de certa forma em discordância com os resultados de Koval'chuk (24) descritos em 2.5.4., embora deva ser levado em consideração o fato de que o referido autor conduziu seus trabalhos em conservas enlatadas de pescado, i.e., em ambientes praticamente sem oxigênio devido à exaustão, e onde o principal agente limitante da hidrólise pepsinica era a temperatura. Por outro lado, o fato de não ter havido variação, possibilitou o emprego da fórmula sem maiores problemas de interpretação.

5.5. Variação do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido em farinha de pescado com 0,1% EQ e oxidada sob aquecimento

As variações mostradas nas Figuras 4 e 10, mostram um comportamento semelhante do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina em relação ao da digestibilidade pela pepsina mostrado

nas Figuras 2 e 8. O nitrogênio solubilizado somente pelo HCl 0,075N não variou no Experimento 1 e praticamente não apresentou variação no Experimento 2. Através dos resultados obtidos, pode-se novamente verificar que o fator realmente afetado pelo processo oxidativo é a hidrólise enzimática das proteínas da farinha, visto que a solubilidade pelo ácido não sofreu variação sensível ao longo do processo.

5.6. Variações das perdas relativas ao tempo zero da digestibilidade pela pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina em farinha de pescado sem antioxidante e oxidada sob aquecimento.

Através da análise das Figuras 5, 11 e 15, pode ser notado a ocorrência de consideráveis perdas da digestibilidade, nos 3 experimentos realizados, ao longo do processo oxidativo. Com exceção do Experimento 1, as perdas máximas ocorreram no momento de máxima peroxidação dos lipídeos, confirmando o grande efeito inibidor dos peróxidos. A diferença é devida ao fator temperatura, que no caso do Experimento 1, foi bastante superior aos outros experimentos, favorecendo desta forma as reações de polimerização térmica dos lipídeos. É interessante ressaltar a grande perda na digestibilidade ocorrida aos 90 min no Experimento 3, que atingiu 64,44%, correspondente a um índice de peróxidos de 63,68 meq/kg.

As perdas do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina apresentaram variações de forma similar às da digestibilidade, todavia com valores absolutos menores. As curvas evidenciam o efeito da utilização da prova em branco para a correção da digestibilidade, pois, apesar de no Experimento 3, a perda no nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina na máxima peroxidação dos lipídeos ser a menor para os tres experimentos, a digestibilidade apresentou a maior perda. Tal fato deve-se a que o percentual de nitrogênio solubilizado pelo ácido na farinha utilizada no Experimento 3 era bastante superior ao das outras duas farinhas, como pode ser visto nas Figuras 3, 9 e 14.

5.7. Variações das perdas relativas ao tempo zero da digestibilidade pela pepsina e do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina em farinha de pescado com 0,1% EQ e oxidada sob aquecimento

As variações apresentadas nas Figuras 6 e 12 evidenciam o efeito da adição de etoxiquina no comportamento dos parâmetros em questão. As perdas do nitrogênio solubilizado pelo ácido e pepsina nos dois experimentos e da digestibilidade pela pepsina no Experimento 2 apresentaram-se bastante baixas, não atingindo 10% do valor original. Já no Experimento 1, a farinha estabilizada mostrou uma perda no final do processo de 17,46% do valor original, devido a uma polimerização térmica dos lipídeos em maior extensão, como já anteriormente citado em 5.6..

Novamente, as variações das duas perdas apresentaram forma similar, porém com diferentes valores absolutos. Sobre este aspecto, já foram feitos comentários na subdivisão 5.6..

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitiram concluir o seguinte:

- 6.1. Os peróxidos formados durante a oxidação de farinha de pescado exercem um efeito inibidor na digestibilidade pela pepsina da farinha, reduzindo-a consideravelmente.
- 6.2. O efeito inibidor produzido não é irreversível, havendo uma recuperação nos valores da digestibilidade a partir da decomposição dos peróxidos formados.
- 6.3. O efeito inibidor dos peróxidos atua especificamente na capacidade da pepsina quebrar as ligações peptídicas das proteínas da farinha, visto que o fator realmente afetado é o nitrogênio solubilizado pela solução ácida pepsínica e que o nitrogênio solubilizado somente pelo ácido não apresenta variação sensível ao longo da oxidação.
- 6.4. A adição de 0,1% de etoxiquina à farinha impede a peroxidação dos lipídeos e, conseqüentemente, o efeito inibidor.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ANÓNIMO. Harina y aceite de pescado. In El Pescado y las Industrias Derivadas de la Pesca, Ed. Acribia, 1965, p.229-263.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. Assoc. Offic. Agr. Chemists, Washington D. C., 1965.
3. BERNHEIM, F.; WILBUR, K.M. & KENASTON, C.B. The effect of oxidized fatty acids on the activity of certain oxidative enzymes. Arch. Biochem. Biophys. 38: 177-184, 1952.
4. BERTULLO, V.H. Subproductos de pescados, moluscos y crustaceos In Tecnologia de los Productos y Subproductos de Pescados Moluscos y Crustaceos, Ed. Hemisferio Sur, 1975, p. 445 - 463.
5. BLIGH, E.C. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959.
6. CARPENTER, K.J.; LEA, C.H. & PARR, L.J. Chemical and nutritional changes in stored herring meal. 4. Brit. J. Nutr. 17: 151-169, 1963.
7. CLAGGET, F.G. The use and application of antioxidants for control on spontaneous heating in Canadian Herring meal. Fish. Res. Bd. Canada Circ. N° 40, 1968. Abstracted in Wld. Fish. Abstr., 20(1): 43, 1969.
8. CONTRERAS GUZMAN, E. & NEVES FILHO, L. DE C. Emprego industrial do óleo de pescado. Rev. Nac. Pesca N° 138, p. 23-28, 1974.
9. CONTRERAS, E. & ROMO, C. Estudios preliminares sobre digestibilidad de harina de anchoveta en Chile, Publnes. Inst. Fom. Pesq. Santiago N° 12, 1965.
10. CONTRERAS GUZMAN, E. Informação não publicada. Instituto de Fomento Pesquero, Santiago, Chile, 1969.
11. DESAI, I.D. & TAPPEL, A. L. Damage to proteins by peroxidized lipids. J. Lipid Res. 4: 204-207, 1963.

12. DYER, W.J. & FRASER, D.I. Proteins in fish muscle. Lipid hydrolysis. J. Fish. Res. Bd. Canada, 16: 43-52, 1959.
13. EIMSLIE, W.P. Report on digestibility of proteins. Journal of the A.O.A.C. 41: 233-240, 1958.
14. FRANKEL, E.N. Hydroperoxides. In Lipids and their Oxidation, Ed. by H. W. Schultz, E.A. Day and R.O. Sinnhuber, The AVI Pub. Co. Inc., 1962, p. 418-428.
15. GEHRT, A.J.; CALDWELL, M.J. & EIMSLIE, W.P. Chemical method for measuring relative digestibility of animal protein feedstuffs. J. Agr. and Food Chem. 3: 159-162, 1955.
16. ITO, Y. & WATANABE, K. Variations in chemical composition in the fillet of "corvina" and "pescada-foguete". Controções Inst. Oceaogr. Univ. S. Paulo, sér. Tecnologia 5: 1-6, 1968.
17. KANEDA, T.A. Symposium on Oxidation of Marine Animal Lipids. Introduction, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 36: 865-875, 1970.
18. KARRICK, N.L. Nutritional value as animal feed. In Fish oils, Ed. by M.E. Stansby, The AVI Pub. Co., Inc., 1967, p.362-382.
19. KIFER, R.R.; PAYNE, W.L.; MILLER, D. & AMBROSE, M.E. The nutritive content of menhaden (Brevoortia tyrannus and patronus) fish meal evaluated by chemical methods. Feedstuffs Vol. 40, Nº 20, p. 36, 1968.
20. KIFER, R.R.; PAYNE, W.L.; BAUERSFELD, P.E. & AMBROSE, M.E.. The nutritive content of Peruvian anchovy fish meal evaluated by chemical methods. Feedstuffs Vol. 40, Nº 35, p. 32, 1968.
21. KIFER, R.R.; PAYNE, W.L.; MILLER, D. & AMBROSE, M.E. Nutritive content of Chilean anchovetta fish meal evaluated by chemical methods. Feedstuffs Vol. 41, Aug. 2, p. 24, 1969.
22. KIFER, R.R.; PAYNE, W.L. & AMBROSE, M.E. Nutritive content of Norwegian herring fish meal evaluated by chemical methods. Feedstuffs Vol. 41, Nº 17, p. 18, 1969.

23. KOCH, R.B. Dehydrated foods and model systems. In *Lipids and their Oxidation*, Ed. by H. W. Schultz, E.A. Day and R.O. Sinnhuber, The AVI Pub. Co. Inc., 1962, p. 230-251.
24. KOVAL'CHUK, G.K. Ukr. Biokhim. Zh. 26: 139-145, 1954.
25. KUZMICHEV, A.B. Industria pesquera de la URSS. In *Fundamentos de la Tecnologia de los Productos Alimenticios*, Ed. MIR, p. 282-318.
26. LEA, C.H. Recent developments in the study of oxidative deterioration of lipids. *Chemistry and Industry* Dec. 1953, p. 1303-1309.
27. LEA, C.H.; PARR, L.J. & CARPENTIER, K.J. Chemical and nutritional changes in stored herring meal. *Brit. J. Nutr.* 12: 297-312, 1958.
28. LEA, C.H.; PARR, L.J. & CARPENTER, K.J. Chemical and nutritional changes in stored herring meal. 2. *Brit. J. Nutr.* 14: 91-113, 1960.
29. LEA, C.H. The oxidative deterioration of food lipids. In *Lipids and their oxidation*, Ed. by H.W. Schultz, E.A. Day and R.O. Sinnhuber, The AVI Pub. Co. Inc., 1962, p.3-28.
30. LOVERN, J.A. Pepsin digestibility as an index of the quality of fish meal. I. *Fishing News Intern.* 3: 206, 1964.
31. LOVERN, J.A.; OLLEY, J. & PIRIE, R. Pepsin digestibility as an index of the quality of fish meal. II. *Fishing News Intern.* 3: 310, 1964.
32. LOVERN, J.A. Some analytical problems in the analysis of fish and fish products. *Journal of the A.O.A.C.* 48: 60 - 68, 1965.
33. MACKIE, P. & HARDY, R. Informação não publicada. Torry Research Station, Aberdeen, U.K.
34. MARCH, B.E.; BIELY, J.; GOODIE, C.; CLAGGETT, F. & TARR, H. L.A. The effect of storage temperature and antioxidant treatment on the chemical and nutritive characteristics of herring meal. *J. Am. Oil Chemist's Soc.* 38: 80-84, 1961.
35. MARCH, B.E.; BIELY, J. & TARR, H.L.A. Nutrient composition of British Columbia whole herring meal. *Fish. Res. Bd. Ca.*

- nada, Technological Station, Vancouver, B.C. Circular Nº 26 1962.
36. MENCIA-MORALES, F.; MACHADO, J.C.; NUNES, P.C.M.; AMADO, A. L.; SOUZA, R.R. DE; LEITE, L.W.N. Avaliação da indústria pesqueira do Rio Grande do Sul: capacidade, produção e mercado. PDP Documentos Ocasionais Nº 15, 1976.
 37. NARAYAN, K.A. & KUMMEROW, F.A. Oxidized fatty acid- protein complexes. J. Am. Oil Chemist's Soc. 35: 52-56, 1958.
 38. NARAYAN, K.A.; SUGAI, M. & KUMMEROW, F.A. Complex formation between oxidized lipids an egg albumin. J. Am. Oil Chemist's Soc., 41: 254-259, 1964.
 39. NEIVA, G. DE S. A pesca no mundo. Equipesca Jornal Nº 24 , 1968.
 40. OLCOTT, H.S. The role of free fatty acids on antioxidant effectiveness in unsaturated oils. J. Am. Oil Chemist's Soc. 35: 597-599, 1958.
 41. OLCOTT, H.S. Marine products. In Lipids and their Oxidation, Ed. by H.W. Schultz, E.A. Day and R.O. Sinnhuber, The AVI Pub. Co. Inc., 1962, p. 173-189.
 42. OLCOTT, H.S. Antioxidants. In Fish Oils, Ed. by M.E. Stansby, The AVI Pub. Co. Inc., 1967, p. 164-170.
 43. OPSTVEDT, J. Effect of antioxidant stabilization or solvent extraction on feeding value of fish meal (Norwegian), Meldinger fra SSF, 2(june): 52-65, 1970. Abstracted in Wld.Fish Abstr., 22(1): 45, 1971.
 44. OUSTERHOUT, L.E. & SNYDER, D.G. Effects of processing on the nutritive value of fish products in animal nutrition. In Fish in Nutrition, Ed. by E. Heen and R. Kreuzer, 1962, p. 303-309.
 45. RIOS, E. de C. Variação estacional da composição química do pescado. Anais da Associação Brasileira de Química. 16: 97-112, 1957.
 46. RIOS, E. de C. Segunda nota sobre a composição química de farinhas de peixe. Anais da Associação Brasileira de Química 16: 117-119, 1957.

47. SCHMIDT, J.H. Generacion de calor y factores controlantes en la oxidacion de lipideos en la harina de pescado. Memoria para optar al titulo de Ingeniero Civil Quimico, Facultad de Ciencias Fisicas y Matematicas, Universidad de Chile, 1973.
48. SCHWARTZ, K. Summary of Symposium. In Lipids and their Oxidation, Ed. by H.W. Schultz, E.A. Day and R.O. Sinnhuber, The AVI Pub. Co. Inc., 1962, p. 418-428.
49. SCOTT, H.M.; DEAN, W.F.; AGUILERA, A. & SMITH, R.E. Quality of fish meal in relation to its value as a supplement to corn-soybean meal chick diets. In Fish in Nutrition, Ed. by E. Heen and R. Krenzer, 1962, p. 366-367.
50. SNYDER, D.G.; OUSTERHOUT, L.E.; TITUS, H.W.; MORGAREIDGE, K. & KELLENBARGER, S. The evaluation of the nutritive content of fish meals by chemical methods. Poultry Sci. 41:1736-1740, 1962.
51. SPARRE, T.; SÁNCHEZ, J. & IAM, R. Métodos analíticos para el control de producción de harina y aceite de pescado. Inf. Inst. Invest. Recurs. Mar. N° 20, Callao, 1963.
52. SPARRE, T. Fish meal: manufacture, properties and utilization. In Fish as Food, Vol. III, Ed. G. Borgstrom, 1965, p. 411-444.
53. STANSBY, M.E. Misconceptions about nutritional properties of fish oils. In Fish Oils, Ed. by M.E. Stansby, The AVI Pub. Co. Inc., 1967, p. 283-288.
54. TAPPEL, A.L. Studies of the mechanism of vitamin E action. III. In vitro copolymerization of oxidized fats with protein. Arch. Biochem. Biophys. 54: 266-280, 1955.
55. TAPPEL, A.L. & ZALKIN, H. Lipide peroxidation in isolated mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 80:326-332, 1959.
56. TAPPEL, A.L. Oxidative reactions and enzymes. In The Technology of Fish Utilization, FAO Internat. Symp., 1965, p. 129-134.
57. VENOLIA, A.W. & TAPPEL, A.L. Brown-colored oxypolymers of unsaturated fats. J. Am. Oil Chemist's Soc. 35:135-138, 1958.

58. YU, T.C. & SINNHUBER, R.O. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. Food Technol. 11: 104-108, 1957.
59. YU, T.C. Informação não publicada.