

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA
EM FILÉS E HAMBÚRGUERES DE PACU (*Colossoma mitrei*)
ARMAZENADOS SOB CONGELAMENTO E O SEU EFEITO NA
FUNCIONALIDADE DAS PROTEÍNAS**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Márcia Cristina Marques
Médica Veterinária

Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Orientador

PARECER

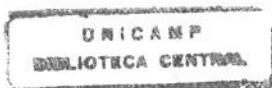
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Márcia Cristina Marques, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de junho de 2000.

Campinas, 20 de junho de 2000.


Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP
2000



187070002

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
M348a
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 41812
 PROC. 278/00
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 05-08-00
 N.º CPD

CM-00143155-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M348a Marques, Márcia Cristina
 Avaliação do desenvolvimento da oxidação
 lipídica em filés e hambúrgueres de pacu
 (*Colossoma mitrei*) armazenados sob
 congelamento e o seu efeito na funcionalidade das
 proteínas. / Márcia Cristina Marques. – Campinas,
 SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Aloísio José Antunes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

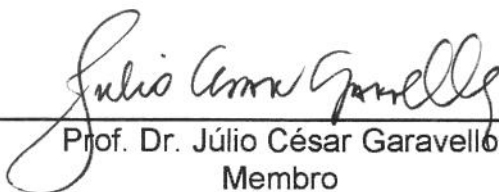
1.Oxidação. 2.Lipídios. 3.Proteínas. 4.Pacu
 (Peixe) 5.Músculos. I.Antunes, Aloísio José.
 II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em _____ de _____ de 2000, pela banca examinadora constituída pelos professores



Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Orientador


Prof. Dr. Júlio César Garavello
Membro

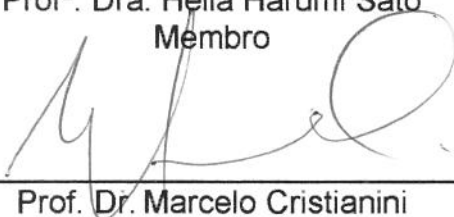
UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

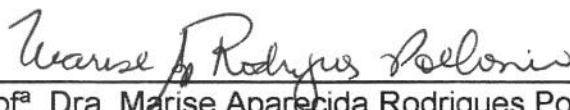
SEÇÃO CIRCULANTE



Profª. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro



Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Membro



Profª. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio
Membro

Profª. Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos
Membro

Prof. Dr. Yong Kun Park
Membro

**Ao meu marido Leandro,
pelo permanente apoio, colaboração,
compreensão e amor nos momentos mais difíceis.**

AGRADECIMENTOS

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Dr. Aloísio José Antunes, pela orientação.

Ao Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura, CEPTA-IBAMA, em Pirassununga, pela doação da matéria-prima.

Aos técnicos de laboratório Soely, Liana, Francisco, Beth, Ana Paula, José Roberto, Dirce, Raquel e Eunice, pela colaboração e amizade.

À amiga Eliana Motta pelo apoio técnico, amizade e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Carmona de São Clemente, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE <i>COLOSSOMA MITREI</i>	3
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	4
2.2.1 <i>Lipídeos</i>	6
2.2.2 <i>Umidade</i>	8
2.2.3 <i>Minerais</i>	8
2.2.4 <i>Proteínas</i>	9
2.3 PROTEÍNAS SARCOPLASMÁTICAS.....	9
2.4 PROTEÍNAS ESTROMAIS.....	11
2.5 PROTEÍNAS MIOFIBRILARES.....	11
2.5.1 <i>Actina</i>	12
2.5.2 <i>Troponina e tropomiosina</i>	12
2.5.3 <i>Miosina</i>	13
2.6 FRAÇÕES PROTÉICAS EM MÚSCULO DE PESCADO.....	15
2.7 CONGELAMENTO.....	16
2.7.1 <i>Desnaturação protéica</i>	17
2.7.2 <i>Oxidação de lipídeos</i>	25
2.7.3 <i>Alterações da cor</i>	32
2.7.4 <i>Alterações de sabor/odor</i>	36
2.7.5 <i>Modificações na textura</i>	37
2.8 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	42
2.8.1 <i>Solubilidade</i>	44
2.8.2 <i>Capacidade de gelatinização</i>	51
2.8.3 <i>Capacidade de retenção de água</i>	57
2.8.4 <i>Umidade espremível</i>	61

3 ESTUDO 1- OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>)	62
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 <i>Matéria-prima</i>	67
2.2 <i>Métodos analíticos</i>	67
2.2.1 <i>Caracterização química</i>	67
2.2.2 <i>Determinação das frações protéicas</i>	68
3 RESULTADOS	69
4 DISCUSSÃO	70
5 CONCLUSÕES	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
4 ESTUDO 2- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO	77
1 INTRODUÇÃO	77
2 MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1 <i>Matéria-prima</i>	83
2.2 <i>Métodos analíticos</i>	83
2.2.1 <i>Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</i>	83
2.2.2 <i>Extração das proteínas miofibrilares</i>	84
2.2.3 <i>Determinação da atividade Ca-ATPásica</i>	84
2.2.4 <i>Eletroforese</i>	85
2.2.5 <i>Análise estatística</i>	86
3 RESULTADOS	86
4 DISCUSSÃO	89
5 CONCLUSÕES	90
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

5 ESTUDO 3- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	97
1 INTRODUÇÃO.....	97
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1 Matéria-prima.....	103
2.2 Métodos analíticos.....	103
2.2.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	103
2.2.2 Extração das proteínas miofibrilares.....	104
2.2.3 Determinação da solubilidade protéica.....	104
2.2.4 Determinação da atividade Ca-ATPásica.....	105
2.2.5 Análise estatística.....	105
3 RESULTADOS.....	105
4 DISCUSSÃO.....	108
5 CONCLUSÕES.....	109
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
6 ESTUDO 4- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA SOBRE A DUREZA E UMIDADE ESPREMÍVEL DE GÉIS OBTIDOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	114
1 INTRODUÇÃO.....	114
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1 Matéria-prima.....	120
2.2 Métodos analíticos.....	120
2.2.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	120
2.2.2 Extração das proteínas miofibrilares.....	120
2.2.3 Formação de géis protéicos.....	121
2.2.4 Determinação de umidade espremível.....	121
2.2.5 Análise estatística.....	122

3 RESULTADOS.....	122
4 DISCUSSÃO.....	126
5 CONCLUSÕES.....	128
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
7 ESTUDO 5- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS E SENSORIAIS DE HAMBÚRGUER DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	134
1 INTRODUÇÃO.....	134
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	142
2.1 <i>Matéria-prima</i>	142
2.2 <i>Métodos analíticos</i>	142
2.2.1 <i>Caracterização química</i>	142
2.2.2 <i>Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</i>	143
2.2.3 <i>Avaliação da cor</i>	143
2.2.4 <i>Avaliação do perfil de textura</i>	143
2.2.5 <i>Avaliação da perda de peso no cozimento</i>	144
2.2.6 <i>Avaliação sensorial</i>	144
2.2.7 <i>Análise estatística</i>	144
3 RESULTADOS.....	145
4 DISCUSSÃO.....	151
5 CONCLUSÕES.....	156
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	163
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166

ÍNDICE DE TABELAS

3 ESTUDO 1- OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>).....	62
<i>Tabela 1.</i> Composição química de músculo de pacu.....	69
4 ESTUDO 2- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	77
<i>Tabela 1.</i> Avaliação da desnaturação (atividade Ca-ATPásica) das proteínas miofibrilares durante a estocagem sob congelamento de músculo de pacu.....	87
<i>Tabela 2.</i> Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento.....	88
5 ESTUDO 3- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	97
<i>Tabela 1.</i> Avaliação da solubilidade das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento.....	106
<i>Tabela 2.</i> Avaliação da oxidação de lipídeos em músculo de pacu armazenado sob congelamento.....	107
<i>Tabela 3.</i> Coeficientes de correlação entre a solubilidade das proteínas miofibrilares, oxidação lipídica e atividade Ca-ATPásica de músculo de pacu armazenado a -20° C por 180 dias.....	108

6 ESTUDO 4- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA SOBRE A DUREZA E UMIDADE ESPREMÍVEL DE GÉIS OBTIDOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (*Colossoma mitrei*) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....114

Tabela 1. Avaliação da dureza de géis de proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado a -20° C.....123

Tabela 2. Avaliação da oxidação de lipídeos em músculo de pacu armazenado sob congelamento.....124

Tabela 3. Coeficientes de correlação entre a dureza de géis protéicos, oxidação lipídica e propriedades funcionais em músculo de pacu armazenado a -20° C por 180 dias.....125

Tabela 4. Avaliação da umidade espremível de géis obtidos de proteínas miofibrilares de músculo de pacu armazenado a -20° C.....126

7 ESTUDO 5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS E SENSORIAIS DE HAMBÚRGUER DE PACU (*Colossoma mitrei*) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....134

Tabela 1. Composição química de hambúrguer de pacu.....145

Tabela 2. Avaliação da oxidação de lipídeos em hambúrguer de pacu armazenado a -20° C estocado a -20° C.....146

Tabela 3. Avaliação da cor (L, a, b) em hambúrguer de pacu estocado a -20° C....142

Tabela 4. Coeficientes de correlação entre a oxidação de lipídeos e os parâmetros de cor (L, a, b) em hambúrguer de pacu mantido a -20° C por 150 dias.....148

Tabela 5. Avaliação da perda de peso no cozimento de hambúrguer de pacu estocado a -20° C.....149

Tabela 6. Avaliação do perfil de textura de hambúrguer armazenado sob congelamento (-20° C).....150

<i>Tabela 7.</i> Coeficientes de correlação entre a dureza, perda de peso no cozimento e a coesividade em hambúrguer de pacu armazenado a -20° C por 150 dias.....	150
<i>Tabela 8.</i> Coeficientes de correlação entre a oxidação de lipídeos e o perfil de textura de hambúrguer de pacu armazenado a -20° C.....	150
<i>Tabela 9.</i> Avaliação sensorial triangular de hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento.....	151

ÍNDICE DE FIGURAS

3 ESTUDO 1- OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>)	62
<i>Figura 1.</i> Filé de pacu fresco.....	69
<i>Figura 2.</i> Composição das frações protéicas de músculo de pacu.....	70
4 ESTUDO 2- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO	77
<i>Figura 1.</i> Avaliação da atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	86
<i>Figura 2.</i> Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	87
<i>Figura 3.</i> Perfil eletroforético das proteínas miofibrilares de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	88
5 ESTUDO 3- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO	97
<i>Figura 1.</i> Avaliação da solubilidade das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	105
<i>Figura 2.</i> Avaliação da atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	106
<i>Figura 3.</i> Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	107

6 ESTUDO 4- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA SOBRE A DUREZA E UMIDADE ESPREMÍVEL DE GÉIS OBTIDOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE MÚSCULO DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	114
<i>Figura 1.</i> Gel protéico a 5%.....	122
<i>Figura 2.</i> Avaliação da dureza de géis obtidos de proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu mantido sob congelamento (-20° C).....	123
<i>Figura 3.</i> Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	124
<i>Figura 4.</i> Avaliação da umidade espremível de géis obtidos de proteínas miofibrilares músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	125
 7 ESTUDO 5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS E SENSORIAIS DE HAMBÚRGUER DE PACU (<i>Colossoma mitrei</i>) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO.....	 134
<i>Figura 1.</i> Hambúrguer de pacu fresco.....	145
<i>Figura 2.</i> Avaliação da oxidação lipídica em hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	146
<i>Figura 3.</i> Avaliação da luminosidade (L) em hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	147
<i>Figura 4.</i> Avaliação da cor (a e b) em hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	147
<i>Figura 5.</i> Avaliação da perda de peso no cozimento de hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C).....	149

RESUMO

O armazenamento sob congelamento de carne e produtos cárneos, favorece o desencadeamento da oxidação de lipídeos, sendo esta alteração indesejável freqüente em pescado, devido principalmente ao alto grau de lipídeos insaturados que apresenta. A oxidação lipídica origina compostos que interagem com as proteínas miofibrilares, causando modificações traduzidas em decréscimo das propriedades funcionais do material.

A escassez de pesquisas enfocando o aspecto tecnológico de peixes de água doce no Brasil, aliada ao controle total das condições de pesca, transporte, armazenamento e processamento, permitindo a excelente qualidade da matéria-prima inicial, foram os fatores principais que motivaram o desenvolvimento deste estudo, cujos objetivos gerais foram avaliar o efeito da oxidação lipídica sobre as propriedades funcionais das proteínas miofibrilares de músculo de pacu (*Colossoma mitrei*) armazenado a -20°C por 180 dias e avaliar a influência da oxidação de lipídeos nas propriedades de cor e textura de hambúrgueres de pescado, estocados a -20°C por 150 dias.

O pacu foi caracterizado como um peixe com alto teor protéico e médio teor de lipídeos, apresentando a seguinte composição química: umidade ($74,90\%\pm 0,18$), proteína ($18,46\%\pm 0,08$), lipídeos ($5,09\%\pm 0,04$), cinzas ($1,27\%\pm 0,01$). O tecido muscular apresentou 60,37% de proteínas miofibrilares, 31,54% de proteínas sarcoplasmáticas e 5,04% correspondentes à fração estromal.

A atividade Ca-ATPásica da miosina decresceu 55% ao longo do armazenamento sob congelamento dos filés de pescado paralelamente ao desenvolvimento da oxidação de lipídeos. A atividade Ca-ATPásica e a oxidação

lipídica apresentaram correlação negativa significativa, e a análise eletroforética das proteínas miofibrilares mostrou significativa diminuição das cadeias leves da miosina e leve decréscimo da cadeia pesada ao longo do período de estocagem sob congelamento. A solubilidade protéica também sofreu a influência da oxidação de lipídeos diminuindo com o aumento dos níveis da oxidação, avaliada pelo teste de TBA (Thiobarbituric Acid Test). A mínima concentração de proteína requerida para a formação do gel foi de 3% a pH 6,0. A análise da textura dos géis protéicos evidenciou decréscimo da dureza dos géis simultaneamente ao aumento dos valores de TBA, estabelecendo-se alta correlação negativa entre a redução da força dos géis e a oxidação de lipídeos. Foi observado que a utilização de pescado em estado de *pre-rigor mortis* possibilitou menores percentuais de umidade espremível dos géis protéicos.

O efeito da oxidação na modificação na cor original de hambúrgueres de pacu foi significativa, sendo possível estabelecer altas correlações entre os parâmetros L, a, b, e o processo de oxidação, entretanto, modificações expressivas no perfil de textura do produto reestruturado, mantido sob congelamento por 150 dias, não foram observadas.

SUMMARY

The frozen storage of meat and meat products favors the development of lipid oxidation. Fish and fish products are particularly susceptible to this reaction due to their high content of unsaturated lipids. Lipid oxidation gives rise to several intermediate compounds which can interact with myofibrillar proteins, changing their functional properties.

The lack of researches focusing on the technological aspects of fresh water fishes and the adequate control of capturing conditions, transportation, storage and processing causing a good quality of the fresh product motivated the present study. The aim of this work was to study the effect of lipid oxidation on the functional properties of myofibrillar proteins from pacu's (*Colossoma mitrei*) muscle during frozen storage at -20°C for 180 days and to investigate the influence of lipid oxidation on color and texture of fish hamburgers, stored at -20°C for 150 days.

Pacu typically shows a high and medium protein and fat content, respectively. The proximate composition of the muscle shows moisture ($74,90\%\pm 0,18$), protein ($18,46\%\pm 0,08$), lipid ($5,09\%\pm 0,04$) and ash ($1,27\%\pm 0,01$). The muscle tissue contains 60,37% of myofibrillar proteins, 31,54% of sarcoplasmic proteins and 5,04% of stromal proteins.

The Ca-dependent ATPase activity decreased by 55% during frozen storage while lipid oxidation increased in a similar pattern. Ca-dependent ATPase activity and lipid oxidation had a significant negative correlation and the eletroforetic examination of the myofibrillar proteins showed an intense decrease of the myosin light-chain and a slight decrease of the myosin heavy-chain during frozen storage. Protein solubility decreased as the oxidation levels increased (measured by TBA-

thiobarbituric acid test). The minimal protein concentration for gel formation was 3% at pH 6,0; gel hardness decreased with the increase in TBA values, showing a strong correlation. It was observed that the utilization of muscle in the *pre-rigor mortis* stage produced gels with lower values of expressible moisture.

The effect of lipid oxidation on color was detected and high correlations between L, a and b parameters and oxidation process was observed. Frozen storage for 150 days did not change the texture profile of hamburgers significantly.

1 INTRODUÇÃO

O congelamento do pescado é um importante método para a preservação de sua qualidade, uma vez que este processo determina o controle do crescimento bacteriano e de algumas alterações de origem química. Contudo, alguns constituintes musculares, como os lipídeos e proteínas sofrem alterações indesejáveis, não sendo inibidas pela utilização e estocagem da matéria-prima em baixas temperaturas (SHENOUDA, 1980).

Proteínas, especialmente as miofibrilares, constituem-se nos principais componentes estruturais e funcionais do músculo, apresentando excelentes propriedades de gelatinização, emulsificação, capacidade de retenção de água, formação de espuma e solubilidade (KINSELLA, 1982).

As propriedades funcionais têm sido definidas por KINSELLA (1982) como propriedades físico-químicas que afetam o processamento e comportamento das proteínas em sistemas de alimentos, durante a preparação, processamento, estocagem e consumo, sendo influenciadas pela natureza e extensão das interações das proteínas entre si, com outros componentes e com a água no sistema de alimentos. A compreensão das propriedades funcionais das proteínas é importante, uma vez que permite a produção de fontes cárneas de menor custo, a utilização de fontes protéicas não tradicionais e o aperfeiçoamento dos produtos existentes (KINSELLA, 1982).

A utilização da temperatura de congelamento atua como agente desnaturante das proteínas miofibrilares, provocando prejuízos às propriedades funcionais, constituindo-se em um problema de ordem tecnológica (SIKORSKI *et al.*, 1976; ZIEGLER & ACTON, 1984). Estes prejuízos são causados por alterações nas proteínas, durante a estocagem sob congelamento, resultando na

formação de ligações cruzadas intermoleculares e conseqüentemente agregação e desnaturação da actomiosina. (SHENOUDA, 1980).

Os peixes contém ácidos graxos altamente insaturados, o que lhes confere maior susceptibilidade à oxidação de lipídeos. Este processo leva a alterações da qualidade através de modificações no aroma, cor, sabor e consistência do pescado, além de influenciar negativamente a funcionalidade das proteínas (HSIEH & KINSELLA, 1989; XIONG, 1995).

Diferentes autores têm relatado a interferência da oxidação lipídica nas propriedades funcionais das proteínas miofibrilares, assumindo que ocorre polimerização e agregação protéica, resultante da presença e interação de lipídeos oxidados ou compostos resultantes da oxidação de lipídeos, acarretando a formação de um polímero lipoprotéico, caracterizado por insolubilidade (KHAYAT & SCHWALL, 1983; KELLEHER *et al.*, 1994).

Deterioração na textura, *flavor* (sabor/aroma) e cor constituem sérios problemas, especialmente quando práticas inadequadas de congelamento são empregadas, gerando produtos de qualidade inferior. As modificações indesejáveis no *flavor* ocorrem devido à formação de compostos de baixo peso molecular, resultantes da oxidação lipídica ou da degradação protéica. As modificações na cor e aparência decorrem de alterações irreversíveis nas proteínas musculares, proteínas ligadas a pigmentos ou a certas proteínas pigmentadas (SHENOUDA, 1980; SUZUKI, 1981).

O potencial de produção de peixe em cativeiro de água doce é muito grande no Brasil, devido às suas características hídricas e geográficas, porém, a piscicultura de água doce é uma atividade relativamente recente como exploração econômica. O beneficiamento/industrialização de peixes de água doce é

insignificante, sendo na sua maioria adquiridos e consumidos após a despesca (GOMES *et al.*, 1994).

MAIA *et al.* (1982) e GOMES *et al.* (1994) realizaram pesquisas enfocando o aspecto tecnológico de peixes de água doce, obtendo bons resultados quanto às propriedades sensoriais e funcionais nos produtos processados, porém não existe no Brasil volume algum expressivo de produto que empregue esta matéria-prima.

Entre os peixes mais estudados para utilização em piscicultura estão os do gênero *Colossoma*, incluído o pacu, identificado como *Colossoma mitrei*. Tal gênero é constituído por peixes de grande porte e rápido crescimento, com características de rusticidade e hábito alimentar que tornaram-nas objeto de atenção de biólogos de pesca da América Latina (BARBOSA, 1986).

A importância desta pesquisa justifica-se então, na necessidade de estabelecer a correlação do desenvolvimento da oxidação lipídica com possíveis modificações nas propriedades funcionais das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu (*Colossoma mitrei*) e a correlação entre as alterações na textura, cor e características sensoriais de hambúrgueres de pacu estocados sob congelamento, com a oxidação de lipídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da espécie *Colossoma mitrei*

O pacu é um peixe que pertence à ordem *Characiformes*, sub ordem *Characoidei*, família *Serrasalminidae*, gênero *Colossoma* e espécie *Colossoma mitrei* (Berg, 1895).

O pescado da presente tese foi inicialmente identificado por Holmberg, em 1887, como *Piaractus mesopotamicus* e mais tarde por Berg, em 1895, como *Colossoma mitrei* (GÉRY, 1986).

Esta espécie tem como habitat os rios Paraguai-Uruguai, e se estende também ao Pantanal do Mato-Grosso, Brasil. Tem porte grande, e alta prolificidade tornando-se uma espécie adequada para a prática da criação de peixes em cativeiro (SILVA, 1987).

O pacu é vulgarmente conhecido como “porco d’água”, uma vez que durante a época das cheias alimenta-se de matéria-prima de origem animal e vegetal, desde pequenos peixes e crustáceos até folhas e frutos. Nesta ocasião, o pacu invade os campos, a fim de aumentar as suas reservas, em forma de gordura, para enfrentar o período das secas (SILVA, 1987).

Trata-se de uma espécie que apresenta boas características culinárias, apreciada por sua musculatura com boa textura, de bom sabor, contando com elevada importância na pesca comercial em suas regiões de origem (SILVA, 1987).

2.2 Composição química

O músculo ou filé representa a principal parte comestível do pescado e consiste de músculos corporais, além de tecido conectivo, adiposo e pequenos ossos intermusculares (OGAWA & MAIA, 1999).

Segundo SUZUKI (1981) e SANCHEZ (1989) a composição química do pescado varia de acordo com a espécie, e dentro de uma mesma espécie. Tem-se

observado que tais variações individuais estão relacionadas com fatores como a estação do ano em que foi realizada a captura, região geográfica, temperatura da água, e com particularidades como: idade, sexo, zona do corpo, tipo de músculo, desenvolvimento gonadal, estado nutricional e tamanho do pescado.

O pescado, de acordo com STANSBY (1962), pode ser classificado 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.

A composição do músculo de pescado é aproximadamente 68-84% água, 15-24% proteína, 0,1-22% lipídeos, 1-3% carboidratos, 0,8-2% substâncias inorgânicas (SUZUKI, 1981).

Sobre a composição química de peixes de água doce do Brasil, algumas referências foram encontradas. MAIA *et al.* (1983) obtiveram teores médios de 76,5% de umidade, 20,41% de proteína, 2,3% de lipídeos e 1,3% de cinzas para o curimbatá (*Prochilodus scrofa*).

MORAES *et al.* (1984) estudaram a correlação entre a composição química e alguns parâmetros biológicos em saguiri (*Curimatus elegans*), bem como a sua variação mensal. Constataram relação inversa entre os teores de umidade (em média 78,04%) e de lipídeos (em média 3,03%), não havendo relação entre o teor

de umidade e proteína bruta (17,66%). O teor médio de cinzas foi de 1,27%. Os autores enquadraram a espécie na categoria A estabelecida por STANSBY (1962).

Estudando aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia, ROCHA *et al.* (1982) determinaram a composição química de pacu, identificado como *Mylossoma spp*, não se tratando da espécie *Colossoma mitrei* originária do Pantanal, caracterizado como um peixe gordo com 8,0% de gordura, 71,5% de umidade, 18,3% de proteína e 2,2% de cinzas.

MACHADO (1989) estabeleceu a seguinte composição química após estudo com músculo de pacu (*Colossoma mitrei*): água ($67,7 \pm 0,9\%$), proteína ($13,0 \pm 0,3\%$), lipídeos ($17,2 \pm 0,6\%$) e cinzas ($1,3 \pm 0,1\%$).

2.2.1 Lipídeos

O teor de gordura é utilizado como critério prático para comparação entre as espécies. Assim mencionam-se espécies gordas, semi-gordas e magras (STANSBY, 1962).

De acordo com as suas funções, os lipídeos podem ser classificados em lipídeos de depósito, principalmente os triacilgliceróis, e os lipídeos tissulares, que são constituídos pelos fosfolipídeos, glicolipídeos e esteróis. O conteúdo de lipídeos tissulares não varia significativamente entre as espécies, por isso, as grandes diferenças devem-se aos lipídeos de depósito. Os lipídeos de pescado variam com as condições ambientais (temperatura da água, profundidade, habitat, etc.), condições fisiológicas (idade, sexo, grau de maturação), alimentação (tipo e volume da dieta), razões pelas quais o conteúdo de lipídeos varia dentro de uma

mesma espécie, quando o peixe é capturado em diferentes áreas e períodos de pesca (OGAWA & MAIA, 1999).

Em algumas espécies, a composição de lipídeos do músculo de pescado varia em relação à localização anatômica no corpo do animal. A musculatura correspondente à região mais próxima à cabeça, geralmente, tende a acumular mais gordura do que a localizada próximo à região da cauda (SANCHEZ, 1989).

MORAES *et al.* (1984) verificaram alteração na fração lipídica de saguiru (*Curimatus elegans*) de acordo com a época do ano, relatando maior teor de lipídeos no verão quando comparado à estação do inverno. HENDERSON & TOCHER (1987) também encontraram variações quanto ao teor de lipídeos em peixe de água doce mandi (*Pimelodus claria*), de 8,3 a 20,5% dependendo da estação do ano.

Relação inversa entre o conteúdo de água e lipídeos tem sido relatada por vários autores (STANSBY, 1962; SUZUKI, 1981; MORAES *et al.*, 1984).

MACHADO (1989) classificou o pacu (*Colossoma mitrei*), como um peixe com alto teor de gordura (maior do que 15%) e baixo conteúdo protéico (menor do que 15%). O alto conteúdo de gordura pode ser explicado pela inclusão no filé dos músculos ventrais, onde se concentra a gordura cavitária, ou pela retirada parcial da enorme quantidade de gordura que existe sob a pele do pacu.

Os peixes são constituídos por duas classes de músculos: os *claros*, que são os mais abundantes, e os *escuros*, que comumente se encontram abaixo da pele e da linha lateral. Existe diferença na composição química destes dois tipos de músculo, possuindo a carne escura maior teor de lipídeos e menor conteúdo de proteínas miofibrilares, quando comparada à musculatura clara (STANSBY, 1962; SUZUKI, 1981).

Segundo SUZUKI (1981), o músculo escuro tem maior proporção de proteínas sarcoplasmáticas e estromais do que o músculo claro, e é rico em hemoproteínas (principalmente a mioglobina).

Os peixes de um modo geral, contêm alta proporção de ácidos graxos insaturados, o que repercute desfavoravelmente à resistência ao armazenamento sob congelamento, devido à possibilidade do desencadeamento do ranço oxidativo (SANCHEZ, 1989).

MACHADO (1989) detectou como principais ácidos graxos do pacu os ácidos oléico (42,85%), palmítico (22,68%), linoléico (10,30%), palmitoléico (8,95%), esteárico (8,15%), mirístico (2,72%) e linolênico (1,76%).

Relatos de MACHADO (1989) e MAIA *et al.* (1995) indicam que filés de pacu apresentam 33,55% de ácidos graxos saturados e 63,86% de ácidos insaturados.

2.2.2 Umidade

O conteúdo de umidade dos peixes, em geral, está em torno de 60 a 85% variando inversamente com o teor de lipídeos (SUZUKI, 1981).

2.2.3 Minerais

ZAITSEV *et al.* (1969) apontaram como os principais constituintes minerais do filé de pescado, o fósforo, cálcio, potássio, sódio, magnésio e cloro. Observaram também que o teor de minerais no tecido muscular de peixes é afetado pela composição e concentração de sais na água. Assim, o músculo de

peixes marinhos possui maior concentração de sais que o de peixes de água doce. Além disso, este último contém menor quantidade de cloro e praticamente não contém iodo e bromo. A maior parte do fósforo e cálcio encontra-se nos ossos na forma de fosfato de cálcio. Parte do magnésio também se encontra 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.

MACHADO (1989) em estudo com pacu (*Colossoma mitrei*), verificou teor de ferro de 0,4 mg%, caracterizado como baixo, aproximando-se do encontrado em espécies marinhas de músculo predominantemente claro.

2.2.4 Proteínas

As proteínas musculares são classificadas de acordo com a solubilidade em proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e do estroma (SUZUKI, 1981).

2.3 Proteínas sarcoplasmáticas

São as proteínas que estão em solução no fluído intracelular (sarcoplasma), solúveis em baixa força iônica (0,1M ou menos) e pH neutro, e ainda contribuem para o metabolismo celular. Possuem forma globular, com peso molecular na faixa de 20.000-100.000 daltons, ponto isoelétrico entre pH 6,0 e 7,0 e representam 20-25% do total das proteínas (ZAITSEV *et al.*, 1969; MORRISEY *et al.*, 1982).

São classificadas em quatro frações: nuclear, mitocondrial, microssomal e citoplasmáticas. Incluídas nesta classe estão enzimas glicolíticas, creatina-quinase

e mioglobina, como também enzimas essenciais à realização da síntese protéica e outras funções celulares (MORRISEY *et al.*, 1982).

O conteúdo de proteínas sarcoplasmáticas varia com a espécie, sendo maior nos peixes pelágicos (peixes que habitam a superfície, velozes), que nos demersais (peixes que vivem em águas mais profundas, pouco velozes). O músculo escuro contém maior percentual destas proteínas do que o músculo claro (SUZUKI, 1981).

Segundo SUZUKI (1981) e LANIER (1986) as proteínas sarcoplasmáticas interferem na propriedade de gelatinização, fazendo necessária a sua remoção quando se realiza a extração de proteínas para esta finalidade. A realização de lavagens sucessivas durante o processamento do surimi têm também por objetivo a retirada destas proteínas, devido ao fato de serem deletérias do ponto de vista funcional e incluírem compostos contendo grupos heme, que geralmente levam a alterações indesejáveis na cor, e catalisam a oxidação lipídica durante a estocagem.

OKADA *et al.* (1973) relatam que as proteínas solúveis em água diminuem a elasticidade de géis de pescado, e sugerem que estas proteínas interrompem a malha íntima de ligações cruzadas das proteínas miofibrilares e introduzem atividade proteolítica à mistura.

As proteínas sarcoplasmáticas apresentam baixa propriedade de viscosidade e capacidade de retenção de água (MORRISEY *et al.*, 1982).

Segundo CONNELL (1960a) as proteínas sarcoplasmáticas são mais estáveis do que as miofibrilares e mantêm a sua solubilidade, após longo período de estocagem sob congelamento.

2.4 Proteínas estromais

As proteínas do estroma representam até 2-10% das proteínas totais e apresentam-se insolúveis em soluções aquosas neutras (ZAITSEV *et al.*, 1969; SUZUKI, 1981).

O colágeno é a principal proteína do estroma, mas esta classe também inclui a elastina e lipoproteínas das membranas celulares (membrana plasmática, retículo sarcoplasmático e mitocôndria), presentes em menor quantidade (JUDGE *et al.*, 1989a).

O colágeno forma um tipo de gel denominado de gelatina, estabilizado por interações não covalentes, e por isso termicamente reversível (TEJADA, 1994).

OGAWA & MAIA (1999) mencionam que a dureza do músculo está associada às frações das proteínas do estroma (tecido conectivo). O músculo do pescado caracteriza-se por possuir textura mais frágil que o bovino devido ao menor conteúdo de proteínas estromais, além do fato da estruturação das fibras musculares nos peixes ser menos compacta.

2.5 Proteínas miofibrilares

Segundo MORRISEY *et al.* (1982) as proteínas miofibrilares constituem as proteínas associadas aos filamentos grossos (miosina e proteína C); filamentos finos (actina, tropomiosina e troponina); linha M (creatina-quinase e proteína M); linha Z (α -actinina e desmina) e linha N (nebulina). São solúveis em soluções de força iônica 0,5-0,6M NaCl ou KCl.

Representam 60-75% das proteínas totais do músculo e estão diretamente comprometidas com as propriedades de gelatinização, solubilidade, atividade Ca-ATPase, emulsificação, viscosidade e capacidade de formação de espuma (ZAITSEV *et al.*, 1969; MORRISEY *et al.*, 1982).

2.5.1 Actina

Segundo MORRISEY *et al.* (1982) a actina constitui componente fundamental dos filamentos finos e representa 15-30% das proteínas miofibrilares. Possui baixo conteúdo de estrutura α -hélice (29-39%), decorrente do teor relativamente alto de prolina, comparada às outras proteínas miofibrilares, e peso molecular de aproximadamente 42.000 daltons.

A actina possui duas formas, a actina-G, com forma globular e a actina-F, constituída pela agregação, associação das estruturas globulares da actina-G, assumindo a forma fibrosa. A actina-G polimeriza-se a fim de formar a actina-F na presença de sais e ATP. O Mg^{2+} atua como ponte, ligando as moléculas de actina no sítio do ATP. O filamento fino de actina forma uma α -hélice pela torção de duas actinas-F.

2.5.2 Troponina e Tropomiosina

A tropomiosina é uma proteína filamentosa que possui cerca de 100% de α -hélice, sendo constituída por duas subunidades, com peso molecular de 34.000 daltons cada. Está envolvida na regulação da contração muscular, juntamente com a troponina (BECHTEL, 1986).

A troponina é uma proteína globular com peso molecular entre 50.000 a 60.000 daltons, com três cadeias polipeptídicas (estrutura terciária) que se ligam com a actina-F, através da tropomiosina. As três cadeias de polipeptídeos têm ações diferentes, atuando sobre a formação da ligação com a tropomiosina (troponina T), inibição da atividade de Mg-ATPase da actomiosina (troponina I) e ligação com o Ca^{2+} (troponina C). A troponina T, além de ligar-se à tropomiosina, liga-se também a outros componentes da troponina. A troponina I interfere na reação mútua entre a miosina e actina, e a troponina C elimina esta interferência na reação, quando se liga ao Ca^{2+} (OGAWA & MAIA, 1999).

2.5.3 Miosina

A miosina constitui aproximadamente 50-65% das proteínas miofibrilares. Caracteriza-se por ser uma proteína fibrosa, predominante nos filamentos grossos, e tem a estrutura de um bastão longo com uma porção mais espessa no final (cabeça da miosina). Contém cerca de 50-60% de α -hélice e é composta por duas cadeias de polipeptídeos chamadas cadeias pesadas, cada uma com peso molecular de 200.000 daltons e três a quatro cadeias menores, denominadas de cadeias leves, com peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons (ZAITSEV *et al.*, 1969; BECHTEL, 1986).

A maioria das proteínas em seu estado nativo estão unidas, fechadas em uma estrutura tridimensional, geralmente rígida. Para a maioria das proteínas esta estrutura é compacta e globular, porém, a miosina caracteriza-se por possuir estrutura mista, constituída por uma porção filamentosa e outra globular (TANFORD, 1968a, JUDGE *et al.*, 1989a).

Estruturalmente, cada cadeia polipeptídica consiste de uma região globular, denominada cabeça, a qual se liga a um apêndice espiralado, originado das duas cadeias polipeptídicas em α -hélice, denominado de cauda. As subunidades leves (L_1 , L_2 , L_3) localizam-se na cabeça e na junção entre a cauda e a cabeça. A disposição espacial de cada polipeptídeo pesado, com suas respectivas cadeias leves contribui para a formação da estrutura terciária, enquanto o arranjo espacial da duas cadeias enroladas entre si ("coiled coil"), forma a estrutura quaternária da miosina (BECHTEL, 1986; OGAWA & MAIA, 1999).

Quando a miosina é submetida à degradação enzimática, é dividida em dois fragmentos (meromiosina leve e meromiosina pesada) que diferem, em seus pesos moleculares. A meromiosina pesada consiste das duas cabeças globulares e uma pequena porção do bastão, e a meromiosina leve é constituída pela parte restante do bastão (porção caudal) (JUDGE *et al.*, 1989a; OGAWA & MAIA, 1999).

A miosina possui três importantes características: (1) sob força iônica fisiológica, forma o filamento grosso por associação; (2) como enzima ATPase, decompõe o ATP em ADP e ácido fosfórico, gerando energia para contração muscular; e (3) reage com a actina formando a actomiosina na contração muscular (OGAWA & MAIA, 1999).

A miosina possui capacidade de ligar fortemente o ATP ou ADP, sendo capaz também de ligar íons K^+ , Ca^{++} , Na^+ e Mg^{++} (BECHTEL, 1986).

A miosina hidrolisa o ATP à ADP e fosfato. O pH ótimo para atividade enzimática situa-se entre 6,3-9,0. Os íons cálcio ativam a reação, enquanto íons magnésio em baixa concentração, atuam inibindo a reação (OGAWA & MAIA, 1999).

Acredita-se que as características e propriedades da miosina estão fortemente relacionadas aos grupos SH que esta possui, particularmente àqueles localizados próximos à cabeça globular das cadeias leves. As propriedades da miosina de ATPase e de ligar-se à actina, residem nas cabeças globulares (BECHTEL, 1986).

A miosina e actomiosina constituem as proteínas responsáveis pela capacidade de gelatinização do músculo de pescado (TEJADA, 1994).

2.6 Frações protéicas em músculo de pescado

MACHADO (1989) reportou teores de 64,3% para proteína miofibrilar, 25,0% para sarcoplasmática, 8,0% para proteína estromal e 2,7% para nitrogênio não-protéico em filés de pacu. AWAD *et al.* (1969) também obtiveram similares valores (71,91% para a fração miofibrilar e 16,16% para a fração sarcoplasmática), extraíndo 93,0% de proteínas em pescado de água doce (*Coregonus clupeiformis*). KHALIL *et al.* (1980) relataram valores em *Tilapia nilotica* de 66,7 e 24,8% para proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, respectivamente. MOORJANI *et al.* (1962) relataram valores de proteínas sarcoplasmáticas que variaram de 22 a 35,7%, em quatro diferentes espécies de pescado.

LAN *et al.* (1995) encontraram valores de 64,0% para proteínas miofibrilares e 31,0% para proteínas sarcoplasmáticas extraídas de "catfish".

A determinação das diferentes frações protéicas do pescado, constitui um dado importante para a avaliação de sua qualidade tecnológica e acompanhamento de mudanças ao longo da estocagem. Nesse sentido, uma padronização das condições de extração (tipo de sal, pH, força iônica, concentração, temperatura) seria de grande interesse (SHENOUDA, 1980).

2.7 Congelamento

O congelamento é um dos melhores métodos de preservação empregados em produtos de origem animal, sendo utilizado para aumentar o tempo de vida útil destes. Entretanto, mesmo após a estocagem em temperaturas em torno de -20°C , ocorrem modificações indesejáveis na matéria-prima, ficando a vida de prateleira limitada por alterações nas frações lipídica e protéica, denominadas, respectivamente de oxidação lipídica e desnaturação protéica, ambas levando à alterações nas propriedades funcionais das proteínas miofibrilares, especialmente da miosina e actina (SIKORSKI *et al.*, 1976).

O estado da matéria-prima, o manuseio e o método (taxa e tipo) de congelamento adotado, influem na qualidade do músculo de pescado, durante a estocagem sob congelamento (NEVES, 1985; HAARD, 1992).

A taxa de congelamento (lento ou rápido) influi nas dimensões e localização dos cristais de gelo. A utilização do congelamento lento, provoca a formação de cristais externos às fibras musculares, provocando um processo de osmose pela solução mais concentrada e retirando água das células. Tais cristais, atingem grandes dimensões, às custas deste deslocamento da água da célula, modificando a concentração de sólidos, fenômeno que será responsável por alterações irreversíveis. Além disso, há o rompimento das paredes das células, que influem nestas alterações e oferecem um produto, após o descongelamento, com estrutura inferior à desejada (NEVES, 1985).

Quando o congelamento é rápido, ocorre a formação de pequenos cristais de gelo, localizados tanto nas áreas intra como extracelulares, reduzindo os

efeitos deletérios nas paredes das células e os decorrentes do descongelamento (NEVES, 1985).

O monitoramento de flutuações da temperatura de estocagem é importante a fim de evitar o fenômeno conhecido por recristalização, que provoca mudanças na concentração, favorecendo o crescimento de cristais de gelo, acelerando certas reações que irão reduzir o nível da qualidade desejada, como reações oxidativas e exsudação (BURGESS *et al.*, 1967; NEVES, 1985).

Para levar o produto à temperatura desejada são empregados congeladores, que podem ser classificados em cinco grupos: circulação forçada de ar, placas, criogênico, imersão e por refrigerante líquido. O congelador de placas, amplamente utilizado para o congelamento rápido de alimentos, tem como princípio básico a transferência de calor por condução entre o produto e as superfícies de duas placas metálicas, entre as quais é disposto o produto. No interior destas placas é circulado o refrigerante à baixa temperatura, usualmente a -30 a -40° C (BURGESS *et al.*, 1967; NEVES, 1985).

2.7.1 Desnaturação protéica

A desnaturação pode ser definida como um fenômeno complexo que envolve modificações nas estruturas secundária e terciária das proteínas, devido à quebra de ligações que contribuem à estabilidade da conformação nativa da proteína, sem ruptura das ligações entre átomos de carbono, comprometidos com os enlaces peptídicos, implicados na estrutura primária (FERRY, 1948; TANFORD, 1968b; SIKORSKI *et al.*, 1976).

Segundo KINSELLA (1976), a desnaturação pode ter caráter indesejável, resultando em propriedades físico-químicas alteradas, particularmente, em diminuição/perda da solubilidade, extractabilidade e propriedades funcionais do material.

Fatores como o nível de cristalização do gelo, decorrente do tipo de congelamento utilizado (lento ou rápido) e/ou de variações na câmara de estocagem, danificando as células e suas membranas, aumento da concentração de solutos na fase não-congelável, desidratação, atividade enzimática, e reação das proteínas com produtos da oxidação lipídica, podem causar a desnaturação durante a estocagem do músculo sob congelamento (BURGESS *et al.*, 1967; LOVE, 1968; SIKORSKI *et al.*, 1976; SHENOUDA, 1980; SMITH, 1987).

O congelamento causa a cristalização de grande parte da água presente no músculo do pescado. A distribuição e tamanho dos cristais de gelo dependem da condição do músculo e da taxa de congelamento. No estado de *pre-rigor*, a cristalização ocorre intracelularmente, independente da taxa de resfriamento utilizada. Entretanto, no estado *post-rigor*, quando o pescado é congelado lentamente, os cristais formam-se no tecido extracelular e crescem às custas da água que difunde-se para fora das células, danificando-as. Quando o congelamento é realizado rapidamente, cristais menores são gerados dentro e fora das células (LOVE, 1968).

De acordo com SHENOUDA (1980), a estabilidade da estrutura tridimensional das proteínas é altamente dependente das pontes de hidrogênio, muitas das quais são mediadas por moléculas de água. Então, a desidratação das moléculas protéicas pelo frio, que consiste da migração das moléculas de água a fim de formar cristais de gelo, resulta numa ruptura do sistema de pontes de hidrogênio e acarreta na exposição das regiões de superfície (hidrofóbica ou

hidrofílica). Conseqüentemente, estas regiões tornam-se desprotegidas e vulneráveis. Interações hidrofóbicas-hidrofóbicas e hidrofílicas-hidrofílicas podem então acontecer, até mesmo na mesma molécula protéica, ou entre moléculas protéicas adjacentes, induzindo interações proteína-proteína, e conseqüentemente agregação.

Parâmetros bioquímicos com modificações (decréscimo) na atividade enzimática do músculo de pescado, ou na susceptibilidade das proteínas aos efeitos de várias enzimas proteolíticas, são sensíveis indicadores para o monitoramento da desnaturação protéica, como conseqüência de mudanças na conformação, que podem ocorrer durante a estocagem sob congelamento (SHENOUDA, 1980).

Segundo SHENOUDA (1980), entre as poucas enzimas endógenas que refletem a correlação entre os prejuízos pelo frio e o tempo de estocagem, estão: ATPase (adenosina trifosfatase), aldolase, enzima málica e glicerosfosfato desidrogenase. A ATPase hidrolisa o ATP (adenosina trifosfato) em ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico. Esta atividade enzimática é encontrada em dois diferentes tipos de proteína: ATPase miofibrilar e ATPase sarcoplasmática.

A atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares é utilizada como um bom índice para avaliar a estabilidade das proteínas musculares durante a refrigeração e congelamento e subsequente estocagem (ARAI, 1974). De acordo com estudos sobre a estabilidade protéica, as proteínas de pescado parecem ser mais instáveis do que as de coelho e aves (ARAI & TAKASHI, 1977). Esta instabilidade parece estar relacionada à temperatura do meio que o pescado habita (ARAI, 1974; SUZUKI, 1981; DAVIES *et al.*, 1994).

CONNEL (1960b) mostrou que ocorre diminuição da atividade ATPásica de proteínas miofibrilares de músculo de bacalhau, durante estocagem sob congelamento e que este decréscimo estava relacionado com a temperatura de estocagem, ou seja, quanto mais elevada a temperatura de armazenamento maiores os efeitos deletérios à atividade enzimática da actomiosina.

JIANG & LEE (1985) observaram a ocorrência de desnaturação protéica durante a estocagem de quatro espécies de peixes: *Scomber tapeinocephalus*, *Decapterus marudasi*, *Mugil cephalus* (L.) e *Ciprinus carpio* (L.), congeladas e estocadas a -20°C por 12 semanas e relataram que houve decréscimo na atividade Ca-ATPásica durante a estocagem. Os autores relataram que a actina na espécie *Ciprinus carpio* mostrou-se mais estável durante a estocagem, o que está de acordo com as afirmações de CONNEL (1960a); SIKORSKI *et al.* (1976) e SHENOUDA (1980), que consideram a actina como uma proteína geralmente estável durante a estocagem sob congelamento.

Segundo DONDERO *et al.* (1989), o decréscimo da atividade Ca-ATPásica durante o armazenamento de merluza (*Merluccius gayi gayi*) a -19°C por 7 semanas, atribui-se à dissociação da actina e miosina, com perda da capacidade de dissociação do ATP. Os filamentos de actomiosina tendem a agregar-se no estado congelado, o que altera a conformação do sítio ativo da enzima Ca-ATPase, situada na região S1 da molécula de miosina.

CASTRILLON *et al.* (1996) relataram que a perda da atividade enzimática parece estar relacionada às modificações da estrutura terciária das proteínas, causada pela cristalização da água. Porém, de acordo com estudos de vários autores a perda da atividade Ca-ATPase, ocorre devido à formação de pontes dissulfídicas decorrente da oxidação de grupos sulfidrilas (SH), no sítio ativo da miosina (HAMADA *et al.*, 1977; JIANG *et al.*, 1987a).

JIANG *et al.* (1987a) encontraram valores de atividade Ca-ATPásica decrescendo de 0,19 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (tempo zero) para 0,05 após 12 semanas de estocagem de pescado a -20°C . CHEN *et al.* (1989) obtiveram valores equivalentes aos do presente experimento, embora mais drásticos apresentando a atividade Ca-ATPásica diminuição de 0,13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (tempo zero) para 0,03, após 4 semanas de estocagem. Os autores sugerem que este decréscimo deve-se principalmente à oxidação das sulfidrilas, que diminuem durante a estocagem sob congelamento.

HAARD (1992) mostrou evidências da contribuição de ligações dissulfídicas na agregação protéica, concluindo que a adição de agentes redutores destas ligações, reduz a insolubilização das proteínas durante o congelamento.

DYER & DINGLE (1961) constataram em peixes magros (conteúdo de lipídeos menor que 1%) menor estabilidade e rápido decréscimo na extractabilidade da actomiosina, quando comparadas com espécies gordas (3-10% lipídeos), concluindo que a presença de níveis moderados de lipídeos, podem proteger as proteínas musculares ou aumentar a sua resistência à desnaturação, durante a estocagem sob congelamento. Este efeito protetor deve-se à fração de lipídeos neutros, tais como triglicerídeos, que parecem diminuir ou neutralizar o efeito prejudicial dos ácidos graxos livres.

Alguns pesquisadores têm mostrado que a atividade enzimática (ATPase) da miosina tende a diminuir com a evolução do congelamento e o desenvolvimento da oxidação de lipídeos (NAMBUDIRI & GOPAKUMAR, 1992; POLLONIO, 1994). A exposição das proteínas a lipídeos peroxidados ou aos seus produtos secundários, produz modificações protéicas incluindo perda de atividade enzimática, polimerização, cissão e formação de complexo lipoprotéico (FUNES *et al.*, 1982).

NAMBUDIRI & GOPAKUMAR (1992) observaram em estudo com quatro espécies de água doce, entre elas a tilápia (*Oreochromis mossambicus*), que o valor da atividade enzimática durante o congelamento nesta espécie decresceu de 0,13 $\mu\text{mol/min/mg}$ (peixe fresco) para 0,02 $\mu\text{mol/min/mg}$ (após 180 dias de estocagem). Relataram ainda correlação significativa ($r = -0,93$) entre a atividade ATPásica e a oxidação de lipídeos.

POLLONIO (1994) observou drástica redução nos valores de atividade ATPásica, de aproximadamente 0,076 para 0,016 $\mu\text{mol/min/mg}$ proteína, em proteínas miofibrilares extraídas de carne de frango mecanicamente desossada estocada a -20°C por 180 dias. O autor sugere que a desnaturação pode ter sido resultado do desenrolamento parcial da molécula, com exposição dos grupos hidrofóbicos, induzindo a agregação protéica durante a estocagem, fundamentada pelo fato que a solubilidade também decresceu durante a estocagem sob congelamento. Embora os níveis de TBA tenham aumentado durante a estocagem sob congelamento, o autor não faz referência à ação de lipídeos oxidados sobre a desnaturação das proteínas.

SMITH (1987) verificou que os valores de TBA não se correlacionaram bem ($r = 0,27$) com os índices de desnaturação protéica, permitindo ao autor concluir que a oxidação lipídica não é o fator mais importante na desnaturação das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de peru, durante o armazenamento sob congelamento a -20°C por 30 semanas, embora tenha observado que a adição de antioxidante preveniu a diminuição da atividade ATPásica ao longo da estocagem sob congelamento.

O acompanhamento da desnaturação das proteínas pode ser realizado através de técnicas eletroforéticas, como a eletroforese SDS-poliacrilamida (SVASTI & PANIJPAN, 1977).

A técnica de eletroforese é largamente utilizada na separação, identificação de proteínas e na determinação de seus pesos moleculares. Tem sido utilizada por vários autores para observação e acompanhamento de possíveis modificações nas proteínas durante o congelamento e estocagem (JIANG *et al.*, 1987a; JIANG *et al.*, 1987b; CARECHE & TEJADA, 1990a; POLLONIO, 1994), tratamento térmico (CHENG *et al.*, 1979a) e na identificação de diferentes espécies de pescado (DRAETTA *et al.*, 1986).

Dentre as proteínas que constituem a fração miofibrilar a miosina é mais susceptível à desnaturação, a actina mostra modificações leves e a tropomiosina é considerada a proteína mais estável (CONNEL, 1960a; SAMEJIMA *et al.*, 1982).

Em estudo com várias espécies de pescado CHENG *et al.* (1979b), usando SDS-PAGE, não observaram modificações nas proteínas actina e miosina após 12 meses a -29° C.

A separação eletroforética das proteínas miofibrilares de *Scomber tapeinocephalus* mantidas "in vitro" durante estocagem sob congelamento a -20° C por 12 semanas, mostrou desaparecimento da cadeia pesada da miosina e subsequente formação de compostos de menor peso molecular, diminuição das bandas de actina e tropomiosina ao final do período de estocagem (JIANG *et al.*, 1987a).

JIANG *et al.* (1987b) mencionaram decréscimo da cadeia pesada da miosina e da banda correspondente à actina, durante a estocagem sob congelamento a -20° C de pescado da espécie *Chanos chanos* após 18 semanas de estocagem, sugerindo a ocorrência de hidrólise nestas proteínas. LEBLANC & LEBLANC (1989) analisando o perfil eletroforético de proteínas miofibrilares, extraídas de bacalhau (*Gadus morhua*) após 20 dias de estocagem a -20° C, relataram também decréscimo da cadeia pesada da miosina.

SMITH (1987) não observou modificações nos padrões eletroforéticos das proteínas miofibrilares após estocagem sob congelamento de músculo de peru. Os resultados indicam que ligações cruzadas covalentes, cissão da cadeia polipeptídica e a atividade da protease endógena, não foram os fatores mais importantes nas modificações das propriedades bioquímicas e funcionais durante a estocagem, sendo estas provavelmente causadas pela abertura protéica e associação não covalente, a fim de produzir agregados de alto peso molecular.

CARECHE & TEJADA (1990a) em estudo eletroforético com proteínas miofibrilares de *Merluccius merluccius*, observaram que não houve diferenças apreciáveis nas proteínas durante a estocagem por 180 dias a -18°C . Os autores porém observaram que lipídeos oxidados adicionados às proteínas miofibrilares, permitindo o desenvolvimento de altos níveis de oxidação, provocaram o decréscimo da banda correspondente à cadeia pesada da miosina.

DIAS *et al.* (1994) não observaram alterações no perfil eletroforético das proteínas miofibrilares extraídas de duas espécies de pescado, mantidas estocadas a -18°C por 8 semanas.

De acordo com DAVIES *et al.* (1994) a miosina de peixes tropicais é menos susceptível à ligações cruzadas que a de pescado de águas frias, existindo portanto correlação entre a desnaturação da miosina pelo congelamento e a temperatura do habitat do pescado.

POLLONIO (1994) constatou em análise do perfil eletroforético de proteínas miofibrilares, extraídas de carne mecanicamente desossada, estocada a -20°C , o desaparecimento da banda correspondente a miosina (cadeia pesada), ao final do período de armazenamento.

2.7.2 Oxidação de lipídeos

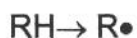
A oxidação de lipídeos constitui-se num dos principais causadores de deterioração da qualidade em músculos. Lipídeos oxidados ligam-se à proteínas, formando complexos lipoprotéicos insolúveis, levando à alteração de “flavor”, modificação de cor (escurecimento), destruição de nutrientes, modificação na textura (maior resistência) e formação de compostos tóxicos (XIONG, 1995).

A autooxidação de ácidos graxos insaturados envolve a formação de radicais livres e hidroperóxidos, e desenvolve-se através de três etapas: iniciação, propagação e terminação (KHAYAT & SCHWALL, 1983; CHAN, 1987; HSIEH & KINSELLA, 1989). A susceptibilidade ao processo de oxidação depende da capacidade dos ácidos graxos doarem um átomo de hidrogênio, com produção de um radical livre de lipídeo, o qual reage com oxigênio molecular para formar o radical peróxi. Desta forma os átomos de carbono adjacentes às duplas ligações tendem a doar um átomo de hidrogênio, levando à formação de radicais estabilizados por ressonância (KHAYAT & SCHWALL, 1983).

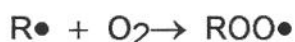
Etapas de iniciação, propagação e terminação no processo de oxidação de lipídeos:

a) Iniciação:

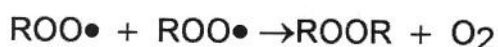
Formação de radicais livres ($R\bullet$)



b) Propagação:



c) Terminação:



Onde,

RH = ácido graxo insaturado

H = átomo de H adjacente à uma dupla ligação

ROOH=hidroperóxidos

A formação de hidroperóxidos como resultado da ação de oxigênio com os lipídeos, requer uma mudança radical no spin do elétron, uma vez que os hidroperóxidos e lipídeos estão no estado "singlet", enquanto o oxigênio está no estado "triplet". A conversão do estado "triplet" a "singlet" normalmente é feita por sensibilizadores presentes em plantas e tecido animal. Incluem compostos fotosensíveis como a clorofila e a mioglobina (KHAYAT & SCHWALL, 1983).

Os produtos primários da autooxidação são denominados de hidroperóxidos e estes não causam problemas de ranço, contudo, os produtos secundários de sua decomposição (aldeídos, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas) influenciam significativamente o "flavor" e o sabor (KHAYAT & SCHWALL, 1983; ERIKSSON, 1987).

Os fatores que influenciam a oxidação lipídica incluem a composição de ácidos graxos dos lipídios, a presença ou ausência de agentes inibidores e ativadores (heme, íons metálicos, valor de pH, enzimas oxidativas, tocoferol e carotenóides) e fatores externos como a temperatura de estocagem, tempo, luz, pressão de oxigênio, atividade de água e condições da embalagem utilizada (KHAYAT & SCHWALL, 1983; ERIKSSON, 1987).

Outros fatores afetam a peroxidação lipídica em sistemas alimentares tais como espécie, dieta, temperatura do meio ambiente, sexo, idade, composição e conteúdo de fosfolípidos (GRAY & PEARSON, 1987). Durante o processamento alguns fatores estão envolvidos neste processo, como a composição e estado de frescor dos componentes cárneos, cozimento ou aquecimento, trituração, desossa mecânica e a adição de ingredientes como o sal, nitrito e antioxidantes (KANNER, 1994).

O grau de insaturação dos ácidos graxos é o fator mais importante na estabilidade oxidativa dos lipídios. Geralmente a taxa de oxidação aumenta de acordo com o maior conteúdo de ligações insaturadas. Lipídios associados ao músculo escuro oxidam mais rapidamente que os encontrados na musculatura clara (KHAYAT & SCHWALL, 1983).

SIKORSKI (1978) observou que solutos concentrados, produzidos pelo congelamento da água, catalisam a oxidação lipídica em músculo que contém ácidos graxos insaturados. Uma vez formados, os lipídeos oxidados alteram as propriedades sensoriais e reagem com as proteínas a fim de modificar as propriedades funcionais da carne.

Os lipídeos de pescado são conhecidos por sua susceptibilidade à rancidez oxidativa, particularmente durante a estocagem sob congelamento. Estes geralmente contém uma alta proporção de ácidos graxos insaturados com 4, 5 ou 6 ligações duplas, sendo mais comumente encontrados em pescado os ácidos oléico, palmitoléico linoléico e linolênico (SHENOUDA, 1980).

A literatura cita que a oxidação lipídica ocorre quando o alimento é mantido sob baixas temperaturas, inclusive nas de congelamento, porém há vários relatos da importância da utilização de temperaturas em torno e abaixo de -30°C , a fim

de obter níveis menores de oxidação de lipídeos (KEAY *et al.* 1972; HARDY & SMITH, 1976; TOMÁS & ANON, 1990; BELTRAN & MORAL, 1991).

Segundo EUN *et al.* (1994), a utilização de temperaturas mais elevadas (-10° C) em relação à temperaturas menores (-20° C), provoca aumento das taxas de oxidação lipídica. A atividade da peroxidação a -10° C é maior devido a maior disponibilidade de solutos nesta faixa de temperatura. Entretanto, ERICKSON & THED (1994) estudaram duas espécies de tilápia sob a forma triturada mantidas sob congelamento a -18° C por 9 meses, e não observaram alterações quanto aos valores de TBA nos primeiros 3 meses de estocagem.

TICHIVANGANA & MORRISEY (1985) relataram efeito significativo entre a mioglobina, hemoglobina, íons inorgânicos e tempo de estocagem, agindo como prooxidantes em sistemas musculares, levando ao aumento dos valores de TBA em pescado. Os autores, porém concluíram que os pigmentos hemínicos exercem pouca influência na atividade catalítica, em sistemas não submetidos a aquecimento.

DENG *et al.* (1977) constataram que o início rápido da oxidação lipídica em *Mugil cephalus*, se deve ao pigmento heme presente na linha lateral dos filés. Este pigmento age como catalisador da oxidação de ácidos graxos insaturados.

O cloreto de sódio (NaCl) é um importante aditivo na indústria cárnea e tem sido incriminado por sua ação prooxidante, acelerando a oxidação lipídica. Assume-se que impurezas metálicas no sal estimulam a peroxidação ou mesmo o aumento da atividade das oxidases. Recentemente foi observado que o NaCl aumenta a atividade dos íons metálicos. Seu efeito parece em parte ser atribuído, à capacidade deste trocar íons de ligação das macromoléculas para reações oxidativas (KANNER, 1994).

RAHARJO *et al.* (1989) relatam que concentrações de 1,4% de NaCl em músculo reestruturado causa o aumento da oxidação lipídica. Referências ao efeito do cloreto de sódio como prooxidante em músculo foram também verificadas por KOETZ (1977) e KANNER *et al.* (1991).

KOETZ (1977) observou que amostras de polpa de corvina (*Micropogon furnieri*) e castanha (*Umbrina conosa*) adicionadas de 1% de cloreto de sódio apresentaram valores altos de TBA em relação às amostras sem sal.

O termo produtos reestruturados é usado para descrever produtos obtidos pela secção de músculos em pequenas porções, seguido de mistura com sal e fosfato, a fim de formar uma massa coesa induzida pelo calor, que envolve as partes através de interações proteína-proteína. Entretanto, o músculo triturado apresenta um sério problema no que se refere à oxidação lipídica, pois possui maior área superficial, e portanto mais exposta ao ar. Além disso, o próprio processo de trituração permite a incorporação de oxigênio ao produto, muitas vezes em um nível de 100% de oxigenação, acelerando intensamente a peroxidação de lipídeos (GRAY & PEARSON, 1987). ERICKSON & THED (1994) em estudo com espécies de tilápia sob a forma triturada, verificaram baixos valores de hidroperóxidos e número de TBA durante os três primeiros meses de estocagem sob congelamento, porém nos seis meses posteriores, aumentos expressivos no número de TBA foram observados.

O músculo de pescado é susceptível às reações oxidativas devido à alta concentração de catalisadores da oxidação (ferro e mioglobina) e lipídeos. Processos de trituração muscular intensificam as reações oxidativas pela mistura de catalisadores, lipídeos e oxigênio, levando a decréscimo da funcionalidade protéica (GRAY & PEARSON, 1987).

Numerosos estudos têm mostrado que lipídeos oxidados e peróxidos causam polimerização ou fragmentação protéica, insolubilização, destruição de aminoácidos, formação de radicais livres e complexos proteína-lipídeo (BUTTKUS, 1967; JARENBACK & LILJEMARK, 1975; SMITH, 1987; XIONG *et al.*, 1993, DECKER *et al.*, 1993). Estas modificações físico-químicas podem levar a alterações na funcionalidade, que podem ser descritas em termos de interação proteína-proteína (agregação e gelatinização), interação proteína-lipídeo (emulsificação) e interação proteína-água (viscosidade e solubilidade), resultando em modificações adversas na textura e palatabilidade (BRADDOCK & DUGAN, 1973; KANNER, 1994; XIONG & DECKER, 1995).

Ocorrência de decréscimo na solubilidade das proteínas miofibrilares concomitantemente ao aumento no número de TBA foi observado por alguns pesquisadores (AWAD *et al.*, 1969; TAKAMA, 1974; BORDERÍAS *et al.*, 1982; POLLONIO, 1994; REDDY *et al.*, 1992). Resultados semelhantes foram encontrados por XIONG *et al.* (1993) e KELLEHER *et al.* (1994) quanto à estabilidade da força de géis protéicos quando antioxidantes eram utilizados em músculo de pescado, durante a estocagem sob congelamento.

VARMA (1967) propôs dois mecanismos para explicar a relação entre lipídeos oxidados e proteínas:

- 1- O radical livre de peroxidação lipídica, sequestraria o hidrogênio de grupos como SH e causaria dois tipos de polimerização: polímeros solúveis em água em que o lipídeo não é incorporado, e polímeros insolúveis em água que são formados por ligações cruzadas das proteínas através de uma reação adicional envolvendo radicais peróxi.
- 2- O segundo mecanismo envolve os produtos da oxidação, como compostos carbonil, malonaldeído, propanal, hexanal, que reagem covalentemente com

grupos da proteína. Mais atenção tem sido dada a radicais livres como causadores de prejuízos às proteínas. Acredita-se que radicais livres são transferidos às proteínas, formando radicais protéicos livres, que poderiam dar início à várias reações, tais como ligações cruzadas com outras proteínas e lipídeos, formando agregados proteína-proteína e proteína-lipídeo.

Alguns relatos foram realizados a partir de experimentos realizados diretamente com a miosina isolada e a adição de ácidos graxos insaturados. KING *et al.* (1962) relataram que pequenas quantidades de ácidos linoléico e linolênico oxidados reduzem rapidamente a solubilidade da miosina de carpas. Observações de BRADDOCK & DUGAN (1973) através da reação de ácido linoléico oxidado com a miosina de salmão, indicaram que as reações que contribuem para a desnaturação, destruição e modificações na qualidade dos lipídeos e proteínas musculares, estão relacionadas com a interação do material oxidado (compostos carbonil) com as proteínas durante armazenamento sob congelamento.

Alterações indesejáveis das proteínas causadas por hidroperóxidos de ácido linoléico foram responsáveis pela destruição da estrutura da miofibrila, causando desnaturação e precipitação da miosina e decréscimo da solubilidade protéica (JARENBACK & LILJEMARK, 1975; TAKAMA, 1974).

Segundo REDDY & SRIKAR (1991) lipídeos oxidados interagem com aminoácidos como a cisteína-SH, grupo NH_2 da lisina, tirosina, metionina e arginina. Estas interações aumentam a hidrofobicidade da proteína, aumentando então a agregação protéica.

A proteção das proteínas contra alterações funcionais, conferida pelo uso de antioxidantes foi relatada por alguns autores (SMITH, 1987; XIONG *et al.*, 1993).

SMITH (1987) utilizou antioxidante em músculo de peru mecanicamente desossado e observou que este preveniu as perdas de solubilidade protéica e atividade Ca-ATPásica, evidenciando que as reações oxidativas estariam envolvidas na deterioração protéica.

XIONG *et al.* (1993) observaram que géis adicionados de antioxidante apresentaram maior rigidez do que os sem antioxidante, indicando que uma melhor resposta da capacidade de gelatinização das proteínas miofibrilares é dependente da inibição da oxidação de lipídeos.

2.7.3 Alterações da cor

O músculo esquelético de pescado é classificado como músculo claro e escuro e alguns pigmentos musculares como a mioglobina e hemoglobina, estão envolvidos na cor do músculo. A mioglobina é o principal pigmento responsável pela coloração marrom-avermelhada da carne de peixe e outros animais vertebrados e invertebrados, e contribui com mais de 80% das ferroporfirinas em pescado. A hemoglobina também presente no músculo escuro, porém em pequenas concentrações, pouco contribui para a cor da carne, exceto, nos casos em que haja ruptura de vasos sangüíneos com acúmulo de sangue nos tecidos musculares (OGAWA & MAIA, 1999).

A mioglobina e hemoglobina são pigmentos avermelhados envolvidos nos processos respiratórios. A mioglobina localiza-se dentro das células dos tecidos musculares, atuando como transportador temporário de oxigênio, enquanto a hemoglobina tem a função de transportar oxigênio e dióxido de carbono no sangue. Mioglobina e hemoglobina são cromoproteínas, constituídas pela *globina* (porção protéica) e pelo grupo *heme*, que determina a cor do músculo, uma vez que a cor é parcialmente dependente do estado de oxidação no interior do anel heme (JUDGE *et al.*, 1989b; OGAWA & MAIA, 1999).

Dentre os fatores que causam a descoloração dos pigmentos musculares, estão aqueles relacionados à modificação no estado do átomo de ferro (Fe^{+2} ou Fe^{+3}) do grupo heme da mioglobina e/ou modificação na molécula no sítio de ligação livre do grupo heme. A variação na cor depende da reversibilidade dos estados químicos da mioglobina, relacionados com a disponibilidade e ligação do oxigênio (CROSS *et al.*, 1986).

Após a execução de cortes no músculo, processo de trituração e exposição ao ar, os pigmentos reagem com o oxigênio e causam modificações na cor. Se o ambiente contém pouco oxigênio (embalagem que permite parcial permeabilidade ao O_2), a porção que contém o ferro do pigmento torna-se oxidada, passando do estado ferroso para o estado férrico, determinando o aparecimento de cor marrom. Este estado oxidado é chamado de metamioglobina. A formação desta coloração reduz a aceitabilidade de carnes e produtos cárneos por parte dos consumidores, que geralmente a associam como sendo decorrente de um longo período de estocagem (CROSS *et al.*, 1986; JUDGE *et al.*, 1989b). De acordo com OGAWA & MAIA (1999) a carne de pescado é duas a quatro vezes mais sensível à formação de metamioglobina do que a carne bovina.

NAKAYAMA & YAMAMOTO (1977) em estudo com diferentes espécies de pescado, mantidas estocadas sob congelamento (-20° C) por 6 meses, observaram tendência ao escurecimento, pela diminuição dos valores correspondentes à luminosidade (L). Entretanto, nenhuma das espécies mostrou alteração quanto ao parâmetro (a), referente à cor vermelha. Os autores relataram aumento do número de TBA, concomitantemente com a modificação da cor, o que pode indicar o envolvimento de lipídeos oxidados ou compostos secundários nesta alteração.

OGAWA & MAIA (1999) relataram durante a estocagem sob congelamento, em certos peixes, o desenvolvimento de coloração verde na carne hipodérmica e abdominal, denominada "green meat", que se deve à formação de sulfomioglobina e sulfohemoglobina. A fim de evitá-la, recomenda-se o processo de congelamento, imediatamente após a captura.

Relatos na literatura indicam que a oxidação de lipídeos causa modificações na coloração de produtos com o decorrer do armazenamento sob congelamento (KHAYAT & SCHWALL, 1983; HSIEH & KINSELLA, 1989; XIONG, 1995).

HSIEH & KINSELLA (1989) relatam que hidroperóxidos interagem com pigmentos e outras macromoléculas, causando a descoloração, ou seja, a modificação da cor original do músculo de pescado.

Em produtos congelados elaborados a partir de peixes gordos, pode aparecer durante a estocagem coloração amarela ou laranja- avermelhado (marrom) na parte abdominal e nas guelras. Esta ocorrência denomina-se "rusting" (escurecimento da gordura), podendo acometer também a porção muscular do pescado (OGAWA & MAIA, 1999).

Segundo OGAWA & MAIA (1999) a gordura de pescado não tem sua cor alterada somente pela oxidação, mas também pela reação com amônia, assumindo coloração marrom. Esta alteração de cor pode ocorrer com aminas, compostos heme, sais inorgânicos, compostos oxidados de metais básicos, sais inorgânicos etc. SHENOUDA (1980) define a ocorrência do "browning" na superfície de algumas espécies de pescado, como consequência da reação entre aminas (metabolismo bacteriano) e compostos carbonil (oxidação lipídica).

A descoloração da carne, comumente chamada de queima pelo frio, é ocasionada pela dessecação superficial que, além de interferir na cor, prejudica também a aparência comercial. A dessecação traz, em consequência, a concentração de sais na superfície determinando a oxidação do pigmento do músculo e transformando-o em metamioglobina de cor marrom. Este processo é acelerado pela flutuação da temperatura de estocagem, visto que esta favorece a sublimação do gelo no tecido. As superfícies expostas absorvem o oxigênio rapidamente, com concomitante oxidação de ácido graxos insaturados (OGAWA & MAIA, 1999).

A operação de separação mecânica em músculo de pescado geralmente implica em escurecimento, devido ao sangue ou linha escura da cavidade abdominal, ou à pele do pescado. JAUREGUI & BAKER (1980) verificaram coloração cinza no músculo cominuído, e durante o período de estocagem sob congelamento, variação da cor de amarelo a marrom, dependendo da espécie de pescado estudada.

A utilização de cloreto de sódio (NaCl), de acordo com HUFFMAN *et al.* (1981), melhora a condição da cor em hambúrguer bovino mantido sob congelamento, entretanto, seu efeito prooxidante em músculos de diferentes espécies animais, tem sido verificado por KOETZ (1977), RAHARJO *et al.* (1989) e KANNER *et al.* (1991).

2.7.4 Alterações de sabor/odor

A avaliação do sabor em alimentos é influenciada pela visão (cor, forma), paladar, aroma, textura etc., que são determinantes na aceitação e preferência por um alimento. Destaca-se a importância da relação entre sabor e odor, conhecida como “flavor” (OGAWA & MAIA, 1999).

A palatabilidade do pescado congelado por longos períodos é normalmente limitada pela deterioração do “flavor” decorrente principalmente da oxidação lipídica, sendo provavelmente influenciada por outras reações bioquímicas, tais como hidrólise lipídica, proteólise e catabolismo de nucleotídeos (HAARD, 1992).

A peroxidação lipídica gera grande quantidade de hidroperóxidos, cuja decomposição, por sua vez, gera compostos carbonil, hidrocarbonos, furanos e outros, que contribuem para a deterioração do sabor e odor dos alimentos, especialmente produtos à base de músculo. A etapa de propagação, no processo de oxidação lipídica, induz reações em cascatas que produzem grande taxa de mono e dímeros de hidroperóxidos, que são quebrados cataliticamente ou por ácido, e decomposição térmica, formando compostos secundários e deterioração do “flavor” (KANNER, 1994).

MILLER *et al.* (1980) em estudo com salsichas estocadas a -18° C por 18 semanas, relataram que somente poucos provadores puderam detectar “flavor” rançoso, ao final das 31 semanas de estocagem.

Segundo HUFFMAN *et al.* (1981), após a estocagem de hambúrguer bovino a -26° C por 60 dias, não foram observadas alterações nos atributos sensoriais (sabor e aroma), embora o valor de TBA tenha triplicado (1,27 $\mu\text{mol mal./kg}$ de amostra) em relação ao produto fresco (0,42 $\mu\text{mol mal./kg}$ de amostra). Entretanto,

RAHARJO *et al.* (1989) indicaram que valor de TBA de 1,6 mg malonaldeído/Kg de amostra (reestruturado de carne bovina), foi associado com odor rançoso.

MAIA *et al.* (1982) em estudo com “patties” feitos a partir de pescado de água doce curimatá (*Prochilodus scrofa*), observaram a ausência de diferença no “flavor” do produto armazenado sob congelamento por 92 dias a -20° C, cuja estabilidade se deve provavelmente ao baixo conteúdo de ácidos graxos desta espécie, e em parte ao alto teor de condimentos empregados.

Sabor rançoso foi perceptível em truta (*Salmo irideus*) triturada, somente após 120 dias de estocagem a -20° C, e 45 dias após (165° dia) tornou-se muito intenso (BORDERIAS *et al.*, 1982), o que entra em concordância com VARELTZIS *et al.* (1988) que não verificaram modificações no “flavor” nas espécies *Scomber japonicus collias* e *Mustellus mustellus* L., após 8 semanas de estocagem a -22° C.

2.7.5 Modificações na textura

Várias são as definições existentes na literatura para o termo *textura* (SZCZESNIAK, 1963; MULLER, 1969), porém por constituir um número de diferentes sensações físicas, BOURNE (1978) utiliza o termo *propriedades texturais*, que pressupõe um grupo de propriedades relacionadas, mais propriamente do que o termo *textura*.

Segundo BOURNE (1978) as propriedades texturais consistem de um grupo de características físicas, que originam-se de elementos estruturais do alimento, sendo percebidas pela sensação do toque, relacionadas à deformação, desintegração e fluxo do alimento sobre uma força, e medidas objetivamente em função da massa, tempo e distância.

SZCZESNIAK (1963) introduziu o perfil de textura como uma classificação das características texturais, sendo este aplicado a vários produtos alimentícios. O autor agrupou as características de textura em três grupos principais: mecânicas, geométricas e outras. As características mecânicas incluem a dureza, coesividade, elasticidade, adesividade e viscosidade; as características geométricas, relacionam-se ao tamanho e forma das partículas e àquelas referentes à forma e orientação; e as outras características, incluem as relacionadas à percepção do teor de umidade e de gordura dos alimentos.

As medidas objetivas de textura são importantes para estudar as modificações das propriedades reológicas dos tecidos durante a estocagem sob congelamento. Instrumentos têm sido desenvolvidos para simular sensações como mastigação, dureza, coesividade, elasticidade etc. As modificações texturais em tecidos durante o congelamento podem ser então quantitativamente monitoradas com maior exatidão (SHENOUDA, 1980).

O perfil da textura pode ser medido através de testes de compressão e/ou penetração, e o texturômetro TA-XT2, baseando-se em análises de curvas força/tempo e força/distância, permite a análise das características mecânicas do produto (BOURNE, 1978).

Segundo KINSELLA (1976), as proteínas miofibrilares são importantes no estabelecimento da aderência entre os componentes cárneos e também na estrutura e textura de carnes processadas. Agentes ligantes são empregados para melhorar a funcionalidade em produtos cárneos (ex. salsicha, hambúrguer etc.) quando matéria-prima de inferior qualidade é utilizada, estando geralmente a perda da aceitabilidade relacionada a modificações na textura, que será mais ou menos intensa, de acordo com a temperatura e tempo de estocagem empregados (SIKORSKI *et al.*, 1976; SHENOUDA, 1980).

O pescado pode tornar-se progressivamente mais rígido e fibroso durante a estocagem sob congelamento, originando atributos sensoriais descritos como esponjosidade, elasticidade, textura de borracha, perda de suculência e prejuízos à capacidade de retenção de água. Alguns tecnólogos reconhecem que a desnaturação e a agregação de proteínas em pescado, particularmente àquelas das frações miofibrilares, estão normalmente associadas com alterações na textura do pescado congelado (DYER, 1951; SHENOUDA, 1980; ACTON *et al.*, 1983; HAARD, 1992).

Durante a estocagem sob congelamento, as proteínas musculares sofrem desnaturação devido à causas variadas, entre elas o prejuízo causado pela formação e agregação de cristais, desidratação e aumento da concentração salina e modificações no pH. A desnaturação leva à ligações cruzadas das proteínas musculares, particularmente da actomiosina, e formação de uma malha tridimensional, que resulta em textura mais rígida (LEBLANC *et al.*, 1988). Estas modificações protéicas, em sistemas modelo, podem ser retardadas por lipídeos neutros e aceleradas por ácidos graxos livres, que reagem com as proteínas miofibrilares produzindo uma malha de ligações cruzadas, que aumenta a resistência das fibras à fragmentação (SIKORSKI *et al.*, 1976).

O grau da desnaturação é influenciado por tratamentos antes do congelamento, estado *post-mortem*, taxa de congelamento, temperatura de congelamento e de estocagem, período e flutuação da temperatura durante a estocagem, métodos de descongelamento e outros (SIKORSKI *et al.*, 1976; SHENOUDA, 1980).

Relatos de TEJADA (1994) indicam que o tecido conectivo não representa um fator muito importante na dureza em músculo de pescado, uma vez que o colágeno é muito instável e hidrolisado em temperaturas relativamente baixas, e no cozimento este parece ser convertido em gelatina.

Um fator importante na textura é o estado *post-mortem*. HAMM (1974) verificou que o processamento de carne em estado de *pre-rigor* resulta em produtos de excelente qualidade, decorrente da alta capacidade de retenção de água deste material, devido à presença do ATP. Entretanto, KRAMER & PETERS (1981) em estudo com filés de pescado da espécie *Sebastes flavidus*, observaram maiores valores de textura no estado de *pre-rigor* comparado ao estado de *rigor* e *post-rigor* mortis. Os autores deduziram que a maior dureza estava relacionada à contração das fibras musculares, durante o *rigor* do descongelamento.

Relatos na literatura indicam que o uso de cloreto de sódio (NaCl) melhora a textura em produtos reestruturados, pela diminuição das perdas pelo cozimento (COHEN *et al.*, 1977; HUFFMAN *et al.*, 1981).

Modificações na textura após o congelamento de pescado, foram observadas em estudos de vários pesquisadores (AWAD *et al.*, 1969; SIKORSKI *et al.*, 1976; MILLER *et al.*, 1980; REDDY & SRIKAR, 1991). Entretanto, pesquisas com peixes tropicais conduzidas por MAIA *et al.* (1982), POULTER *et al.* (1981) e VARELTZIS *et al.* (1988) não evidenciaram modificações na textura ao longo da estocagem sob congelamento.

AWAD *et al.* (1969) observaram aumento da textura, através de avaliação organoléptica de filés de pescado da espécie *Coregonus clupeiformis*, após 16 semanas de estocagem a -10° C. Inicialmente a textura foi caracterizada como macia, porém após 16 semanas sob congelamento, os provadores detectaram dureza muito acentuada nos filés. Os autores correlacionaram a diminuição da solubilidade com o aumento da dureza, sendo esta correlação especialmente observada entre a 3° e 16° semanas de estocagem.

OCKERMAN & ORGANISCIK (1979) verificaram leve modificação na textura de produtos reestruturados ("steaks"), mantidos sob congelamento por até 90 dias, enfatizando que a alteração ocorrida foi suave e lenta. Os autores constataram fraca correlação entre a dureza e a oxidação de lipídeos.

MILLER *et al.* (1980) em estudo com salsichas elaboradas de carne bovina, estocadas a -18° C por 18 semanas, observaram que as alterações observadas pelos provadores, através de teste sensorial triangular, se detiveram no parâmetro textura, concluindo que estas modificações foram possivelmente induzidas por lipídeos.

MAIA *et al.* (1982) em estudo com "patties" feitos a partir de pescado de água doce curimatá (*Prochilodus scrofa*), observaram que não houve diferença na textura do produto, cuja estabilidade segundo os autores, se deve ao baixo teor de ácidos graxos insaturados desta espécie. O produto elaborado manteve boa qualidade e aceitabilidade durante todo o experimento (92 dias a -20°C), sem a adição de preservativos. De acordo com POULTER *et al.* (1981), espécies tropicais de pescado parecem ser menos vulneráveis à deterioração da textura do que espécies de clima temperado.

Segundo BORDERIAS *et al.* (1982) pouca diferença foi encontrada na textura de músculo triturado de truta (*Salmo irideus*) avaliada por meios objetivos (Instron), mantida estocada por até 165 dias, e justificam este fato pela leve modificação ocorrida na solubilidade durante este período. A análise sensorial não mostrou modificações da textura no músculo inteiro, sendo observadas leves variações apenas no músculo triturado, após 75 dias de estocagem a -20° C.

VARELTZIS *et al.* (1988) verificaram que pescado das espécies *Scomber japonicus collias* e *Mustellus mustellus* L., não desenvolveram modificações na textura, após 8 semanas de estocagem a -22° C.

HSIEH & REGENSTEIN (1989) relataram que em pescado triturado mantido sob congelamento a -20°C não houve modificação significativa na textura, sugerindo que a deterioração na textura não ocorre de forma rápida nesta faixa de temperatura, porém, no início do armazenamento sob congelamento ocorreu um pequeno aumento na textura, concluindo os autores que isto se deve presumivelmente à formação de ligações cruzadas e ao fato do tecido (proteínas) tornar-se mais insolúvel e rijo. A coesividade teve comportamento similar à dureza, correlacionando-se fortemente com a dureza ($+0,95$) nas espécies de pescado estudadas.

REDDY & SRIKAR (1991) verificaram aumento na textura (dureza) em pescado triturado da espécie *Nemipterus japonicus*, durante estocagem sob congelamento a -18°C , concluindo que isto se devia principalmente a uma redução da solubilidade protéica como resultado de agregação. Ainda assim, o pescado foi considerado aceitável quanto ao parâmetro textura, após estocagem por 145 dias.

2.8 Propriedades funcionais

Funcionalidade protéica é uma expressão das propriedades físico-químicas das proteínas, modificadas por condições do meio ambiente. Estas propriedades são derivadas da composição e sequência de aminoácidos das proteínas, estruturas secundária, terciária e quaternária. Propriedades físico-químicas incluem carga de superfície, conteúdo de grupos sulfidril, hidrofobicidade, peso molecular, estabilidade conformacional e comportamento de associação/dissociação (KINSELLA, 1976; WILDING *et al.*, 1984).

Segundo MORRISEY *et al.* (1982), as proteínas miofibrilares estão diretamente comprometidas com as propriedades de gelatinização, solubilidade, atividade Ca-ATPásica, emulsificação, viscosidade e capacidade de formação de espuma.

Enquanto as propriedades funcionais tais como viscosidade, gelatinização, etc. são propriedades hidromecânicas das macromoléculas protéicas, as propriedades funcionais de solubilidade, formação de espuma, emulsificação e outras, são manifestações das propriedades de superfície ativa. As propriedades hidrodinâmicas são largamente influenciadas pela forma e tipo da macromolécula e são independentes da composição e distribuição de aminoácidos. Diferentemente, as propriedades de superfície ativa são influenciadas principalmente pela composição e distribuição dos aminoácidos do que pela forma e tipo da macromolécula (DAMODARAN, 1989).

As propriedades de superfície ativa (hidrofobicidade e hidrofiliidade) estão altamente relacionadas com a maioria das propriedades moleculares e funcionais das proteínas alimentares. A solubilidade de uma proteína, por exemplo, pode ser expressa como a manifestação do equilíbrio entre interações entre a proteína-solvente (hidrofílica) e proteína-proteína (hidrofóbica) (DAMODARAN, 1989).

KINSELLA (1976) e LANIER (1986) observaram que fatores extrínsecos como condições do meio ambiente e processamento influenciam a funcionalidade das proteínas miofibrilares por alteração de suas propriedades moleculares. Força iônica, presença de diferentes íons, pH, temperatura, teor de umidade, estado físico da fonte protéica, métodos de isolamento, precipitação, secagem/desidratação, modificação (química, enzimática etc.) e interação com outros ingredientes, todos afetam a funcionalidade das proteínas.

PARK *et al.* (1990) postularam que as modificações bioquímicas/biofísicas que ocorrem no músculo durante o desenvolvimento de *rigor mortis*, induzem modificações significativas nas propriedades funcionais das proteínas musculares. O desenvolvimento do *rigor mortis* varia com a espécie de pescado e é dependente da temperatura *post-mortem* e condições *ante-mortem* tais como estresse, método de captura, condições de processamento e estação do ano. O fenômeno de *rigor mortis* em pescado, ocorre mais rapidamente e tem duração mais curta do que em mamíferos (OGAWA & MAIA, 1999).

2.8.1 Solubilidade

A maioria das propriedades funcionais das proteínas relacionam-se com relações entre proteína-água, tais como a solubilidade. A avaliação do comportamento da solubilidade propicia um bom índice das aplicações e limitações das proteínas, fornecendo informações sobre a utilização de procedimentos de processamento e dos efeitos de tratamentos térmicos que podem afetar as aplicações protéicas (KINSELLA, 1976).

A solubilidade, segundo HULTIN *et al.* (1995), é geralmente definida como a quantidade de proteína que perdura numa solução de características definidas, depois de submetida à ação de força centrífuga específica por um determinado período de tempo. As características de solubilidade dependem da forma de solubilização da proteína e dos procedimentos operacionais para efetuar a separação das frações solúvel e insolúvel. Sofre influência de fatores como: composição e sequência de aminoácidos, taxa de aminoácidos polares e apolares, peso molecular e conformação, sendo afetada pelo pH, temperatura, sais (espécie e concentração), tratamento prévio sofrido pela proteína, métodos de extração e interação com outros componentes de alimento.

Outros fatores citados por KELLEHER & HULTIN (1991) afetam a solubilidade entre eles: o músculo (espécie, tipo de músculo, tipo de fibra, quantidade de tecido conectivo), a condição *post-mortem* (estado de *rigor* e *post-rigor*, temperatura), a condição da extração (técnica de ruptura de tecidos, tamanho da partícula, peso do tecido, solução de extração, volume, pH, força iônica, força centrífuga, temperatura).

Muitos termos têm sido utilizados para designar a solubilidade das proteínas para propósitos comerciais, tais como: "WSP- Water-Soluble Protein" (proteína solúvel em água), "WDP- Water-Dispersible Protein" (proteína dispersa em água), "PDI- Protein Dispersibility Index" (índice de dispersibilidade protéica), "NSI- Nitrogen Solubility Index" (índice de nitrogênio solúvel) e outros (KINSELLA, 1976).

WU & SMITH (1987) concluíram que a temperatura de 4° C empregada na extração protéica tem por finalidade minimizar a contribuição das proteases endógenas. KELLEHER & HULTIN (1991) mencionam que a prevenção da formação de espuma e manutenção da temperatura abaixo de 5° C são fatores importantes a fim de evitar a desnaturação, durante a solubilização das proteínas miofibrilares.

De acordo com CONNEL (1968), menor quantidade de proteínas é extraída quando o músculo se encontra em estado de *rigor mortis*, e isto se deve presumivelmente ao número de interações entre as moléculas de actina e miosina, que é maior no estado de contração muscular, resultando numa estrutura menos facilmente susceptível à ruptura pelo agente extrator.

Aumento da solubilidade das proteínas miofibrilares extraídas de tilápia, foi relatada por PARK *et al.* (1990), quando utilizado pescado em estado de *pre-rigor*

mortis, comparado com valores percentuais de proteína solúvel em pescado em estados de *rigor* e *post-rigor mortis*.

A solubilidade também sofre a influência da concentração protéica. Geralmente, para avaliação desta importante propriedade funcional são utilizadas concentrações protéicas que variam de 1-20mg proteína/mL. A utilização de concentrações maiores gera insolubilização, caracterizada pela sedimentação das proteínas quando submetidas à centrifugação (VOJDANI, 1996).

KINSELLA (1976) mencionou que a determinação do percentual de proteína solúvel é uma das primeiras análises a ser conduzida, quando se avalia o grau de desnaturação de uma proteína, e está correlacionada com a maioria das outras propriedades funcionais, especialmente com a gelatinização (ASGHAR *et al.*, 1985), emulsificação (GILLET *et al.*, 1977), retenção de água (RICHARDSON & JONES, 1987), força de ligação (KENNEY *et al.*, 1992) e propriedades térmicas (BARBUT & FINDLAY, 1991).

As proteínas musculares têm sido agrupadas em três categorias com base em suas solubilidades: 1) proteínas sarcoplasmáticas, *solúveis em água* ou soluções salinas diluídas, com baixa força iônica; 2) proteínas *solúveis em sal*, incluindo as proteínas miofibrilares, definidas como solúveis em soluções salinas de força iônica 0,45 a 0,6M; 3) proteínas do estroma, constituindo aquelas que mantêm-se *insolúveis* após as extrações mencionadas, sendo compostas pelas proteínas do tecido conectivo, podendo conter também proteínas miofibrilares não extraídas e algumas membranas protéicas (HULTIN *et al.*, 1995).

A solubilidade de uma proteína depende do pH da solução. Uma proteína em um sistema aquoso, no ponto isoelétrico (pI), possui carga líquida igual a zero e apresenta menor solubilidade. No pI as interações proteína-proteína aumentam

devido as forças eletrostáticas das moléculas estarem no mínimo, e menos água interage com a molécula protéica. Esta é uma condição favorável à agregação e precipitação das proteínas, que pode ser modificada pela utilização de sais (espécie e concentração) que alteram os efeitos eletrostáticos, de hidratação e estruturais da água, resultando em melhor solubilidade (efeito “salting-in”) (KINSELLA, 1976; MORRISEY *et al.*, 1982; HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

A fase caracterizada pelo aumento da solubilidade é conhecida como “salting-in”. Sais neutros na concentração de 0,1-1M geralmente aumentam a solubilidade protéica dependendo da proteína, pH e temperatura. Os íons salinos interagem com grupos da proteína opostamente carregados, a fim de formar uma camada dupla de grupos iônicos, com diminuição da interação eletrostática entre as moléculas protéicas, causando maior solvatação e deste modo propiciando maior solubilidade das proteínas (KINSELLA, 1976; KOLAKOWSKI *et al.*, 1977; HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

KOLAKOWSKI *et al.* (1977) observaram que concentrações de 1,0 a 2,5% de NaCl permitiam valores máximos de solubilidade da miosina extraída de arenque (*Clupea harengus membras* L.) e bacalhau (*Gadus gadus callaria* L.).

Em concentrações acima de 1M, os íons diminuem a solubilidade (“salting-out”) pela perda da superfície hidrofílica, causando a exposição das áreas hidrofóbicas da proteína. As interações hidrofóbicas aumentam, havendo competição então com a proteína pela água, desta forma causando a precipitação protéica (KINSELLA, 1976; HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

Em pH abaixo ou acima do pI, onde a proteína possui carga negativa ou positiva, maior quantidade de água interage com as cargas protéicas. As cargas líquidas e de repulsão contribuem para uma maior solubilidade. Valores de pH

extremamente ácidos ou básicos, podem levar à abertura das proteínas (desnaturação), e exposição de grupos hidrofóbicos. Esta abertura é decorrente do decréscimo das ligações eletrostáticas, gerando agregação e precipitação (HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

Segundo KINSELLA (1976), a desnaturação pode produzir alterações indesejáveis, uma vez que resulta em propriedades físico-químicas alteradas, particularmente, em diminuição/perda da solubilidade, extractabilidade e propriedades funcionais do material. Relatos da literatura têm mostrado o decréscimo do percentual de proteína solúvel, como consequência da estocagem sob congelamento (JIMÉNEZ-COLMENERO & BORDERIAS, 1983; CHEN *et al.*, 1989; REDDY *et al.*, 1992; DIAS *et al.*, 1994; PASTORIZA *et al.*, 1994).

JIMÉNEZ-COLMENERO & BORDERIAS (1983) estudaram peixes das espécies: *Micromesistius poutassou* (R.), e *Trachurus trachurus* (L.), triturados, estocados a -20°C por 8 meses e observaram decréscimo da estabilidade e solubilidade protéica, alteração que se correlaciona com o tempo de estocagem. Decréscimo de 50% em relação ao valor inicial da solubilidade protéica de *Nemipterus japonicus*, congelado e estocado a -18° C por 180 dias, foi também verificado por REDDY *et al.* (1992).

SCOTT *et al.* (1988) não evidenciaram decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares em *Theragra chalcogramma*, estocada a -29° C por 267 dias, e constataram que isto se deve à baixa temperatura de estocagem empregada.

DIAS *et al.* (1994) investigaram o efeito da estocagem sob congelamento sobre as propriedades físicas e químicas de *Aphanopus carbo* e *Lepidopus caudatus*, e relataram decréscimo de solubilidade após 8 semanas de estocagem a -18° C, decréscimo das proteínas sarcoplasmáticas e aumento das frações

álcali-solúvel e estromal, sendo estas duas últimas observações características de um processo de desnaturação protéica (SIKORSKI *et al.*, 1976; SHENOUDA, 1980).

A ocorrência da oxidação lipídica em músculos tem influência no comportamento funcional de suas proteínas. Os radicais livres modificam as estruturas moleculares protéicas, levando a alterações na sua funcionalidade. Decréscimo nos níveis de solubilidade tem sido observado quando as proteínas miofibrilares são expostas a lipídeos oxidados, durante a estocagem sob congelamento (KING *et al.*, 1962; AWAD *et al.*, 1969; TAKAMA, 1974; BORDERIAS *et al.*, 1982; CARECHE & TEJADA, 1990b; POLLONIO, 1994).

KING *et al.* (1962) constataram rápido decréscimo da solubilidade protéica, após a adição de baixas concentrações de ácidos graxos (linoléico e linolênico) oxidados à actomiosina extraída de bacalhau.

AWAD *et al.* (1969) observaram em estudo com pescado de água doce, da espécie *Coregonus Clupeiformis*, que a solubilidade das proteínas miofibrilares diminuiu após estocagem do pescado a -10° C por 16 semanas, sugerindo que produtos da oxidação lipídica podem ter contribuído à insolubilização protéica.

SIKORSKI *et al.* (1976) concluem que lipídeos oxidados em complexos lipoprotéicos, induzem à polimerização e à agregação das proteínas, tendo como consequência o decréscimo da solubilidade.

BORDERIAS *et al.* (1982) verificaram que a solubilidade protéica, em filés de pescado da espécie *Salmo irideus*, não apresentou variação significativa durante 165 dias de estocagem a -20° C. Os autores concluíram que o pequeno decréscimo da solubilidade, justificou-se pelo fato do número de TBA não ter

mostrado considerável aumento ao longo do período de armazenamento desta espécie de pescado.

CARECHE & TEJADA (1990b) analisaram o efeito da adição de lipídeos oxidados na funcionalidade protéica de *Lepidorhombus whiffiagonis* (W.) e *Sardina pilchardus* (R.) durante a estocagem à temperatura de -18° C por até 365 dias, e observaram a diminuição da solubilidade protéica ao longo do período de armazenamento.

Intensa redução da solubilidade simultaneamente com a elevação dos valores de TBA em carne de frango mecanicamente desossada, estocada por 180 dias a -20° C, foi verificada por POLLONIO (1994), indicando que lipídeos oxidados podem ter contribuído para a redução da solubilidade protéica. Valores de solubilidade e atividade Ca-ATPásica correlacionaram-se positivamente durante o período de armazenamento sob congelamento.

Estudos de PASTORIZA *et al.* (1994) com *Raja clavata* (L.), triturada, congelada e estocada à temperatura de -18°C mostraram decréscimo no que se refere a extração das proteínas miofibrilares. Redução mais expressiva foi observada após 1 ano de estocagem a -18° C. Os autores tentaram explicar o decréscimo na extração protéica através de observações feitas por REDDY & SRIKAR (1991), que acreditam que o decréscimo se deve à presença de agregados resultantes da formação progressiva de ligações intermoleculares, tais como: pontes de hidrogênio, ligações iônicas, interações hidrofóbicas e pontes dissulfídicas, formadas como consequência da estocagem do produto sob congelamento, porém, de acordo com SRIKAR *et al.* (1989) verificaram que a oxidação lipídica pode ser a causadora do decréscimo da extração das proteínas miofibrilares.

Decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares em sardinha (*Sardinella longiceps*) mantida a -20°C por 150 dias, foi atribuído à hidrofobicidade protéica, como consequência do aumento de ácidos graxos livres e índice de peróxidos, levando à agregação protéica (VERMA *et al.*, 1995).

2.8.2 Capacidade de Gelatinização

A capacidade de gelatinização constitui-se em importante propriedade funcional, definida por GLICKSMAN (1982) como uma associação ou ligação cruzada de cadeias de polímeros dispersas ao acaso em solução, para formar uma rede tridimensional contínua que imobiliza líquido nas estruturas intersticiais e resistem ao fluxo e pressão.

FERRY (1948) relatou que géis protéicos desnaturados podem ser formados somente quando é alcançado o balanço crítico entre forças atrativas e repulsivas. Segundo o autor, o processo de gelatinização é constituído por dois estágios: o primeiro envolvendo a *desnaturação* inicial da *proteína nativa* (aquecimento) em polipeptídeos abertos, que gradualmente num segundo estágio, *associam-se* a fim de formar a matriz do gel, se forças atrativas e condições termodinâmicas são adequadas. Por causa das altas temperaturas de desnaturação empregadas, o primeiro estágio do processo de gelatinização parece mais acelerado que o segundo, que ocorre de forma mais lenta, a fim de permitir que as proteínas desnaturadas se orientem e interajam em pontos específicos, para então formar a malha, rede tridimensional. Quando a agregação ocorre muito rapidamente há a obtenção de um coágulo caracterizado por alta opacidade, baixa elasticidade e considerável sinerese.

Os géis protéicos de acordo LEE & LANIER (1995) constituem uma malha tridimensional de proteínas miofibrilares, interligada por pontes de hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas e ligações covalentes. Alterações nas pontes de hidrogênio, ligações iônicas, interações dissulfídicas e hidrofóbicas ocorrem durante a transição para o estado desnaturado (ZIEGLER & ACTON, 1984).

A formação de gel com textura desejável é dependente não somente da composição de aminoácidos, peso molecular, hidrofobicidade, concentração, taxas de aquecimento e resfriamento, pH, e estado *post-mortem* do músculo, mas também da espécie animal, método de pesca, estação do ano, espécie de pescado e tipo de músculo envolvido (MORRISEY *et al.*, 1982; CHAN *et al.*, 1992).

Segundo SAMEJIMA *et al.* (1982) e SMITH (1988) as propriedades de gelatinização da miosina, em sistemas modelo, são melhoradas na presença de actina. Os autores relataram ainda que a tropomiosina e troponina não possuem influência na força de géis protéicos, confeccionados a partir de actomiosina de pescado.

As cadeias pesadas intactas da miosina são importantes na obtenção de géis protéicos de máxima força, uma vez que as cadeias leves dissociam-se e são solubilizadas durante o aquecimento. Subfragmentos da miosina produzem géis mais fracos do que as cadeias pesadas da miosina (SMITH, 1988).

Segundo SUZUKI (1981) e LANIER (1986), as proteínas sarcoplasmáticas interferem na propriedade de gelatinização, fazendo necessária a sua remoção quando se realiza a extração de proteínas para esta finalidade. Estas proteínas causam a interrupção das ligações cruzadas contínuas das proteínas miofibrilares e introduzem atividade proteolítica à mistura.

CHEN *et al.* (1997) relataram que em pescado de músculo escuro, é maior a dificuldade para a formação de géis viscoelásticos, uma vez que o decréscimo rápido do pH após a morte muitas vezes atinge o ponto isoelétrico, justificando-se então a etapa de lavagem com substâncias alcalinas.

De acordo com PARK *et al.* (1990) o estado do *rigor mortis* do pescado afeta a formação de géis de proteínas miofibrilares, sugerindo que a queda significativa do pH, promove a desnaturação protéica. Os autores atribuíram ao estado de *pre-rigor mortis* em tilápia, a maior extração protéica e obtenção de géis com melhor textura.

Melhor textura (dureza) em géis protéicos pode ser obtida, quando utilizado valor de pH na faixa de 6,0-6,5 (BEAS *et al.*, 1988; CARECHE *et al.*, 1991; LAN *et al.*, 1995; COFRADES *et al.*, 1997).

As condições de resfriamento requeridas para permitir a gelatinização, também afetam as características físicas dos géis. Após o resfriamento, os polipeptídeos enovelados, enrolados, associam-se para formar a malha. As ligações cruzadas envolvem muitas pontes de hidrogênio, atrações iônicas, pontes dissulfídicas e associações hidrofóbicas (FERRY, 1948).

Proteínas miofibrilares de animais de sangue frio, a exemplo do pescado, são menos estáveis quando submetidas a tratamento térmico (CONNEL, 1961), especialmente na presença de 0,5-0,6M de NaCl. Neste caso específico, para que se obtenham géis mais estáveis e resistentes são utilizadas duas faixas de temperatura, que consistem de um aquecimento inicial a 40° C por 30-60 minutos, seguido de outro geralmente, a 90° C por 30 minutos (LANIER, 1986; ROUSSEL & CHEFTEL, 1988).

A temperatura empregada na pré-incubação depende da espécie de pescado envolvida, ou seja, peixes com menor temperatura corporal requerem diminuição da taxa e temperatura empregadas durante o *setting* (RODGERS *et al.*, 1987).

O fenômeno conhecido como *setting* é definido como o estado em que as propriedades reológicas do pescado sob temperatura constante (40°C), mudam do estado sol para gel. Tem sido atribuído à interações hidrofóbicas, sulfidril-dissulfídica e à formação de ligações covalentes, catalisadas pela transglutaminase existente no músculo (OGAWA *et al.*, 1995). Observações de decréscimo das cadeias pesadas da miosina e concomitantemente produção de ligações cruzadas entre as mesmas, foram observadas com o decorrer do *setting* (NISHIMOTO *et al.*, 1987).

Segundo LIU *et al.* (1982) a exposição de surimi de *Atlantic croacker* a 35-40° C na presença de NaCl 0,5-0,6 M resultou na dissociação e solubilização de filamentos da miosina em moléculas individuais; parcial abertura da região de α -hélice das cadeias pesadas; formação de uma matriz ordenada do gel por agregação destas regiões abertas, através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. O aquecimento à temperaturas de 70-90°C envolve agregação das cabeças globulares através de interações hidrofóbicas e dissulfídicas (TAGUCHI *et al.*, 1987).

A utilização da pré incubação (0-40° C) resulta em géis protéicos macios, translúcidos e coesos e o subsequente aquecimento a 60-90° C, provoca aumento da opacidade e da força do gel e maior capacidade de retenção da água (LANIER *et al.*, 1982; LEE & LANIER, 1995).

Segundo TEJADA (1994), quando os géis protéicos são submetidos à temperaturas maiores do que 80° C, ocorre oxidação adicional de grupos sulfidrilas e ligações dissulfídicas são formadas. Devido à instabilidade das pontes de hidrogênio, as estruturas α -hélice se abrem, expondo um número maior de aminoácidos hidrofóbicos e mais ligações hidrofóbicas entre as moléculas são estabelecidas. Ao proceder o resfriamento dos géis, as pontes de hidrogênio novamente são estabelecidas e parte das α -hélice reestruturadas.

CHENG *et al.* (1979a) e XIONG & BREKKE (1989) verificaram que ocorre a degradação da miosina em algumas espécies, quando aquecidas em temperatura na faixa de 60-70° C, resultando em géis mais frágeis devido à ação de enzimas proteolíticas.

Vários relatos na literatura indicam decréscimo da dureza de géis protéicos em função da temperatura e tempo de estocagem (CHENG *et al.*, 1979b; SMITH, 1987; SCOTT *et al.*, 1988; SYCH *et al.*, 1991; MACDONALD *et al.*, 1992).

CHENG *et al.* (1979b) observaram que géis confeccionados a partir de diferentes espécies de pescado, estocadas por períodos longos (12 meses) a -29° C, tenderam a ser menos firmes e menos elásticos. SCOTT *et al.* (1988) concluíram que o congelamento de *Theragra chalcogramma* estocada a -29°C por 267 dias, resultou em géis menos resistentes, cuja força decrescia com o tempo de estocagem do peixe.

SMITH (1987) relatou em estudo com proteínas miofibrilares extraídas de músculo de peru, que a sinerese, firmeza e a coesividade dos géis protéicos diminuíram durante a estocagem sob congelamento e concluem que mesmo o uso de antioxidantes não preveniu modificações significativas destes parâmetros. As modificações na estrutura dos géis apresentou forte correlação com modificações da solubilidade e atividade ATPásica durante o congelamento.

MACDONALD *et al.* (1992) também verificaram em seu estudo com *Macruronus novaezelandiae* declínio da resistência do gel, quando estocado à mesma temperatura (-29° C) constatando ser este decorrente da queda do pH e aumento da concentração de formaldeído, que interage com as proteínas formando ligações cruzadas intra e intermoleculares levando à perda das propriedades funcionais. A queda do pH deve-se provavelmente à formação de ácidos graxos livres, hidrólise enzimática de ácidos neutros e fosfolipídeos.

Em desacordo com os autores supramencionados, SYCH *et al.* (1991) relataram aumento da dureza em géis protéicos obtidos de bacalhau (*Gadus morhua*), em função da temperatura de estocagem. A correlação significativa entre a dureza do gel e a umidade espremível sugere que o aumento está relacionado à perda da capacidade de retenção de água das proteínas miofibrilares.

A ocorrência da oxidação lipídica em músculos tem influência no comportamento funcional das proteínas miofibrilares. Alterações na capacidade de gelatinização decorrente da autooxidação durante o armazenamento sob congelamento, têm sido relatada na literatura, resultando em prejuízos à integridade da matriz do gel, com conseqüente perda da dureza dos géis protéicos (XIONG *et al.*, 1993; DECKER *et al.*, 1993; POLLONIO, 1994).

DECKER *et al.* (1993) e XIONG *et al.* (1993) observaram que géis adicionados de antioxidante tiveram maiores valores de força (dureza) do que os sem antioxidante, indicando que uma melhor resposta da capacidade de gelatinização das proteínas miofibrilares é dependente da inibição da oxidação de lipídeos.

Intensa redução da firmeza e coesão de géis protéicos obtidos de proteínas miofibrilares, extraídas de carne mecanicamente desossada estocada a -18° C, foi

observado por POLLONIO (1994). Segundo o autor, a desnaturação protéica e a interação com lipídeos oxidados resultaram na perda da dureza dos géis.

2.8.3 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água pelas proteínas miofibrilares, constitui-se em uma importante propriedade funcional, porque desta dependem os atributos de textura, suculência e maciez de seus produtos. Esta capacidade descreve a propriedade que uma matriz de macromoléculas possui de englobar grande quantidade de água, de tal modo que exsudatos não sejam formados (PARDI *et al.*, 1993).

A capacidade de retenção de água foi definida por HAMM (1960) como sendo a capacidade da carne reter sua própria água, ou a água adicionada durante a aplicação de forças externas, tais como: pressão, aquecimento, trituração, centrifugação e outras.

HAMM (1960) menciona que a capacidade de retenção de água tem grande importância na qualidade da carne e produtos cárneos. Quase todos os procedimentos de estocagem e processamento da carne são influenciados pela capacidade de retenção de água. Estes procedimentos incluem transporte, estocagem, enlatamento, cozimento, congelamento, descongelamento, salga e secagem.

Segundo JUDGE *et al.* (1989b) para o entendimento dos fundamentos químicos da capacidade de retenção da água, admite-se que a mesma apresenta-se sob três formas: água ligada, imobilizada e água livre.

A água ligada encontra-se unida a grupos hidrofílicos da proteína, permanecendo fortemente unida a ponto de resistir à ação de uma intensa força mecânica. A água imobilizada corresponde as outras moléculas aquosas localizadas em camadas cada vez mais débeis à medida que se distancia do grupo reativo da proteína. A água livre é aquela que se mantém unicamente por forças superficiais. Quase todas as modificações observadas na capacidade de retenção de água se devem à modificações experimentadas pela água livre.

A capacidade de retenção de água das proteínas miofibrilares é influenciada pelo estado de ionização e densidade de carga da proteína, os quais são modificados pela adição de sais e pH (ACTON *et al.*, 1983). Esta propriedade é altamente influenciada pela extração das proteínas, tratamento mecânico, temperatura, ambiente iônico e pH.

A capacidade de retenção de água altera-se após a morte do animal, diminuindo com o desencadeamento do *rigor mortis*. Este fenômeno produz a contração irreversível das fibras musculares, como consequência do decréscimo do pH, diminuição da concentração de ATP, e produção do complexo actomiosina. Esta diminuição se traduz em exsudação (PARDI *et al.*, 1993).

HAMM (1981) relata que a propriedade de capacidade de retenção de água é favorecida quando a carne se encontra em estado de *pre-rigor* e isto está diretamente relacionado ao nível mais alto de ATP, resultando em um estado mais relaxado, em mais hidratação e solubilidade das proteínas miofibrilares. Segundo o autor, a capacidade de retenção de água pode ser mantida por muitos meses, através do congelamento rápido de produtos reestruturados, obtidos a partir de músculo em *pre-rigor*.

Segundo HAMM (1960) a utilização de NaCl em tecido com pH maior que o ponto isoelétrico ($\sim 5,0-5,4$) $pH > pI$ resulta em maior capacidade de retenção da água, porém quando é estabelecida a relação $pH < pI$, ocorre diminuição na retenção da água pelo tecido muscular. O efeito é predominantemente devido aos íons Cl^- do NaCl que causam o enfraquecimento da interação entre grupos opostamente carregados em $pH > pI$.

A cominuição física do músculo leva a prejuízos no sarcolema (HAMM, 1975), endomísio (WILDING *et al.*, 1986) e integridade da fibra muscular. A cominuição muscular em alta força iônica (acima de 0,6M) causa a expansão das fibras musculares (WILDING *et al.*, 1986), despolimerização da miosina, solubilização e extração das proteínas miofibrilares (HAMM, 1975). As proteínas das fibras expandidas têm capacidade de retenção de água muito maior devido à exposição dos sítios das proteínas ao solvente, ao invés de estarem envolvidas em interações proteína-proteína (WISMER-PETERSEN, 1978). A miosina contém cerca de 38% de aminoácidos polares com grande conteúdo de resíduos de ácidos aspártico e glutâmico, que podem ligar 6-7 moléculas de água cada um (HARRINGTON, 1979). A adição de sal aumenta a capacidade de retenção da miosina pelo aumento da carga negativa efetiva e quebra de ligações iônicas, causando aumento molecular e compressão da água (ACTON *et al.*, 1983, WISMER-PETERSEN, 1978).

HERMANSSON & AKESSON (1975) relatam que concentrações de NaCl até 4% aumentam a ligação da água em sistemas musculares, afetando marcadamente as propriedades de retenção da água de carnes e produtos cárneos. Acima do ponto isoelétrico, íons Cl^- associados aumentam a carga negativa dos polipeptídeos, que aumenta a repulsão mútua entre eles, e deste modo facilitam a inibição da água pela malha protéica. Atribui-se também ao sal a capacidade de melhorar a textura de produtos cárneos cominuídos.

COHEN *et al.* (1977) relataram que a adição de NaCl em concentrações de 0,5-1,0% diminuía as perdas pelo cozimento, melhorando a textura de reestruturado de carne bovina. KOETZ (1977) constatou que amostras tratadas com 1% de NaCl tiveram menor perda de água durante a estocagem sob congelamento de polpa de castanha e corvina.

NAKAYAMA & YAMAMOTO (1977) em estudo com várias espécies de pescado verificaram após o cozimento que houve tendência a maior firmeza das amostras, porém este parâmetro aumentou levemente e de forma gradativa.

HUFFMAN *et al.* (1981) e GHADI & NINJOOR (1988) mostraram em seus estudos que a utilização de NaCl em produtos confeccionados a partir de músculo de pescado, melhoram a textura e minimizam as perdas durante o cozimento.

HSIEH & REGENSTEIN (1989) relataram que em pescado triturado mantido sob congelamento a -20°C não houve modificação significativa na textura, e na capacidade de retenção de água durante a estocagem, sugerindo que a deterioração na capacidade de retenção de água não ocorre de forma rígida nesta faixa de temperatura.

PÉREZ-VILARREAL & HOWGATE (1991) em estudo com merluza observaram leve aumento na dureza durante o período de estocagem de 40 semanas a -20°C e mostraram que não houve variação intensa nas perdas pelo cozimento, o que pode ser devido à ação do NaCl (retenção de umidade pelo sal). Entretanto, VERMA *et al.* (1995) em estudo com músculo de sardinha triturada estocada a -20°C por 150 dias, observaram perda da capacidade de retenção de água durante o cozimento, em torno de 30% do valor inicial

2.8.4 Umidade espremível

Uma das formas de se medir a capacidade de retenção de água de um material é através da avaliação da umidade espremível, definida por JAUREGUI *et al.* (1981) como a quantidade de líquido liberado de um sistema protéico, pela aplicação de força centrífuga, dependendo a quantidade de água livre, do tipo e intensidade da força aplicada.

CHENG *et al.* (1979b) e SYCH *et al.* (1991) relataram em seu estudo que a perda da capacidade de retenção de géis protéicos estava correlacionada com a dureza dos mesmos, uma vez que sua avaliação permite a medida da suculência de um produto.

HSIEH & REGENSTEIN (1989) relataram que em pescado triturado mantido sob congelamento a -20° C não houve modificação significativa na textura e umidade espremível durante a estocagem e concluem que isto se deve à faixa de temperatura empregada.

Relatos de HENINGAR *et al.* (1989) mostram que menores valores de umidade espremível foram obtidos quando os géis protéicos foram elaborados a partir de músculo de pescado em estado de *pre-rigor*, quando comparado ao estado de *post-rigor mortis*.

3 ESTUDO 1- OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DE MÚSCULO DE PACU (*Colossoma mitrei*)

1 INTRODUÇÃO

O músculo ou filé representa a principal parte comestível do pescado e consiste de músculos corporais, além de tecido conectivo, tecido adiposo e pequenos ossos intermusculares (OGAWA & MAIA, 1999).

A determinação da composição química dos pescados permite classificá-los nos grandes grupos de alimentos, de acordo com os teores de água, lipídeos, proteínas e minerais (SUZUKI, 1981; OGAWA & MAIA, 1999).

Segundo SUZUKI (1981) e SANCHEZ (1989) a composição química do pescado varia de acordo com a espécie, e dentro de uma mesma espécie. Tem-se observado que tais variações individuais estão relacionadas com fatores como a estação do ano em que foi realizada a captura, zona geográfica, temperatura da água, e com particularidades como: idade, sexo, zona do corpo, tipo de músculo, desenvolvimento gonadal, estado nutricional e tamanho do pescado.

O pescado, de acordo com STANSBY (1962), pode ser classificado 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%).

Os lipídeos do pescado variam com as condições ambientais (temperatura da água, profundidade, habitat, etc.), condições fisiológicas (idade, sexo, grau de maturação), alimentação (tipo e volume da dieta), razões pelas quais o conteúdo de lipídeos varia dentro de uma mesma espécie, quando o peixe é capturado em diferentes áreas e períodos de pesca (OGAWA & MAIA, 1999).

Os peixes são constituídos por duas classes de músculos: os *claros*, que são os mais abundantes, e os *escuros*, que comumente se encontram abaixo da pele e da linha lateral. Existe diferença na composição química destes dois tipos de músculo, possuindo a carne escura maior teor de lipídeos, proteínas sarcoplasmáticas e estromais, e menor conteúdo de proteínas miofibrilares, quando comparada à musculatura clara (STANSBY, 1962; OGAWA & MAIA, 1999).

O tipo de ácido graxo é o fator mais importante na estabilidade dos lipídios. Geralmente a taxa de oxidação aumenta, conforme o aumento no número de duplas ligações. Relatos de MACHADO (1989) e MAIA *et al.* (1995) indicaram que filés de pacu apresentam 33,55% de ácidos graxos saturados e 63,86% de ácidos insaturados.

Segundo OGAWA & MAIA (1999) o conteúdo de umidade dos peixes, em geral, está em torno de 60 a 85% variando inversamente com o teor de lipídeos. Este elevado teor de umidade constitui uma das causas que favorece a desnaturação e a deterioração do pescado.

ZAITSEV *et al.* (1969) apontaram como os principais constituintes minerais do filé de pescado, o fósforo, cálcio, potássio, sódio, magnésio e cloro. Observaram também, que o teor de minerais no tecido muscular de peixes é afetado pela composição e concentração de sais na água. Assim, o músculo de peixes marinhos possui maior concentração de sais, que a musculatura de peixes

de água doce. Além disso, este último contém menor quantidade de cloro e praticamente não contém iodo e bromo. MACHADO (1989) em estudo com pacu (*Colossoma mitrei*), verificou teor de ferro de 0,4 mg%, caracterizado como baixo, aproximando-se do encontrado em espécies marinhas de músculo predominantemente claro.

A composição do músculo de pescado de acordo com SUZUKI (1981), é aproximadamente 68-84% água, 15-24% proteína, 0,1-22% lipídeos, 1-3% carboidratos e 0,8-2% substâncias inorgânicas.

Sobre a composição química de peixes de água doce do Brasil, algumas referências foram encontradas. MAIA *et al.* (1983) obtiveram teores médios de 76,5% de umidade, 20,41% de proteína, 2,3% de lipídeos e 1,3% de cinzas para o curimatá (*Prochilodus scrofa*).

MORAES *et al.* (1984) estudaram a correlação entre a composição química e alguns parâmetros biológicos em saguiri (*Curimatus elegans*), bem como a sua variação mensal. Constataram relação inversa entre os teores de umidade (em média 78,04%) e de lipídeos (em média 3,03%), não havendo relação entre o teor de umidade e proteína bruta (17,66%). O teor médio de cinzas foi de 1,27%. Os autores enquadraram a espécie na categoria A estabelecida por STANSBY (1962).

Estudando aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia, ROCHA *et al.* (1982) determinaram a composição química de pacu, classificado como *Mylossoma spp*, não se tratando da espécie *Colossoma mitrei* originária do Pantanal, caracterizado como um peixe gordo com 8,0% de gordura, 71,5% de umidade, 18,3% de proteína e 2,2% de cinzas.

MACHADO (1989) estabeleceu a seguinte composição química após estudo com filés de pacu (*Colossoma mitrei*): água ($67,7 \pm 0,9\%$), proteína ($13,0 \pm 0,3\%$), lipídeos ($17,2 \pm 0,6\%$) e cinzas ($1,3 \pm 0,1\%$). O autor classificou o pacu, como um peixe com alto teor de gordura (maior do que 15%) e baixo conteúdo protéico (menor do que 15%). O alto conteúdo de gordura pode ser explicado pela inclusão no filé dos músculos ventrais, onde se concentra a gordura cavitária, ou pela retirada parcial da enorme quantidade de gordura que existe sob a pele do pacu. Variações em lipídeos em diferentes porções musculares foram também observadas por HENDERSON & TOCHER (1987).

As proteínas de pescado são mais instáveis do que as de mamíferos e são classificadas por ZAITSEV *et al.* (1969) em:

- Proteínas miofibrilares: representam aproximadamente 60-75% do total das proteínas. São solúveis em soluções de força iônica 0,5-0,6M NaCl ou KCl, e constituídas principalmente pela actina, miosina, troponina e tropomiosina.

- Proteínas sarcoplasmáticas: representam de 20-25% do total de proteínas. Solúveis em soluções de baixa força iônica $\leq 0,01M$ e pH neutro, e constituídas pelas enzimas do metabolismo muscular.

- Proteínas estromais: representam 2-10% do total de proteínas e apresentam-se insolúveis em soluções aquosas e em soluções salinas. São constituídas principalmente pelo colágeno.

DYER *et al.* (1950) desenvolveram métodos de extração da proteína, bem como o fracionamento em seus principais componentes, com o objetivo de detectar modificações ao longo da estocagem do pescado. A partir disso, vários autores procuraram avaliar a extractabilidade da proteína do músculo como um critério de avaliação tecnológica e acompanhamento de mudanças ao longo da

estocagem, sobretudo sob congelamento (MOORJANI *et al.*, 1962; AWAD *et al.*, 1969; KHALIL *et al.*, 1980; MACHADO, 1989; LAN *et al.*, 1995).

MOORJANI *et al.* (1962) relataram valores de proteínas sarcoplasmáticas que variaram de 22 a 35,7%, em quatro diferentes espécies de pescado. AWAD *et al.* (1969) obtiveram valores de 71,91% para a fração miofibrilar e 16,16% para a fração sarcoplasmática, extraíndo 93,0% de proteínas em pescado de água doce da espécie *Coregonus clupeiformis*.

KHALIL *et al.* (1980) observaram percentuais protéicos em *Tilapia nilotica*, de 66,7 e 24,8% para proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, respectivamente, valores estes similares aos obtidos por MACHADO (1989) em *Colossoma mitrei*, verificando teores de 64,3% para proteína miofibrilar, 25,0% para sarcoplasmática, 8,0% para proteína estromal e 2,7% para nitrogênio não-protéico.

LAN *et al.* (1995) encontraram valores de 64,0% para proteínas miofibrilares e 31,0% para proteínas sarcoplasmáticas extraídas de “catfish”.

A determinação das diferentes frações protéicas do pescado, constitui um dado importante para a 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, temperatura) seria de grande interesse (SHENOUDA, 1980).

Este estudo objetivou a caracterização química e a determinação das frações protéicas dos filés de pacu.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria- prima

Pescados da espécie *C. mitrei* foram obtidos do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura, CEPTA-IBAMA, Pirassununga, no período do verão (Janeiro), pesando cada peixe aproximadamente 2,0 Kg. Os peixes foram devidamente acondicionados em caixas térmicas, contendo gelo triturado na proporção de 2:1, onde sofreram processo de choque térmico, com subsequente morte rápida (em torno de 05 minutos). A seguir estes foram enviados a Campinas onde sofreram processo de filetagem, obtendo-se filés sem pele, em estado de *pre-rigor mortis*. Amostras desta matéria-prima fresca foram separadas para determinação de análises químicas e físicas, e o restante congeladas em congelador de placas a -30°C , embaladas em sacos de polietileno e estocadas em câmara fria a -20°C por até 6 meses.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Caracterização química

Foram realizadas as seguintes determinações:

- Umidade, proteína bruta e cinzas segundo os procedimentos da AOAC (1984).
- Lipídeos totais de acordo com a metodologia descrita por BLIGH & DYER (1959).
- Nitrogênio não- protéico por modificação do método descrito por BECKER *et al.* (1940).

Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

2.2.2 Determinação das frações protéicas

Foi realizada segundo o método de XIONG & BREKKE (1989) com algumas modificações.

Cinco filés foram coletados aleatoriamente e triturados em moedor elétrico. Amostra de 250 g (músculo triturado) foi homogeneizada em liquidificador por 90 segundos, com 4 volumes de solução- tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,1M NaCl, pH 7,0, extraída por 1 hora, sob resfriamento (banho de gelo), em agitador de velocidade variável (modelo Fisatom), e a seguir centrifugada a 6.000 rpm por 20 minutos, em centrífuga refrigerada (2-4° C). O sobrenadante foi separado e mantido sob refrigeração e o resíduo pesado e reextraído novamente com 4 volumes de solução- tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,1M NaCl, pH 7,0 por 1 hora, sob resfriamento. Nova centrifugação a 6.000 rpm por 20 minutos foi realizada. O sobrenadante foi adicionado ao anteriormente obtido, para a determinação do percentual das proteínas sarcoplasmáticas. Ao resíduo obtido foi adicionado 1/3 da solução- tampão fosfato de sódio 0,05M, 2,4M NaCl, pH 7,0, em relação ao peso do resíduo. Leve homogeneização foi realizada para dispersar o resíduo e a seguir adicionado 1-2 volumes de solução- tampão fosfato de sódio 0,05M, 0,6M NaCl, pH 7,0, e procedida a extração como anteriormente por 1 hora. Após a extração foi realizada centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos. O sedimento obtido foi utilizado para a determinação das proteínas estromais e o sobrenadante adicionado de 5 volumes de água destilada refrigerada, foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. O resíduo obtido foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm, sendo utilizado para a determinação das proteínas miofibrilares.

Todas as frações protéicas foram dosadas pelo método semi- micro Kjeldhal (AOAC, 1984), sempre em triplicata.

3 RESULTADOS

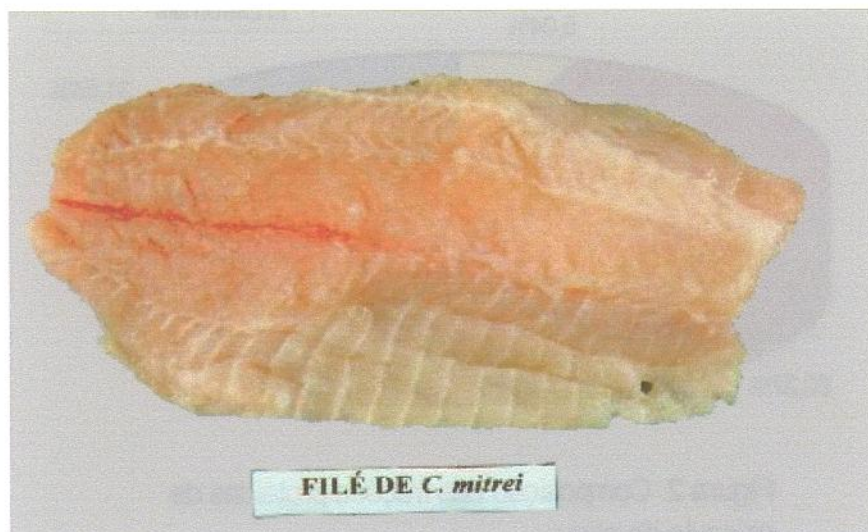


Figura 1. Filé de pacu (*C. mitrei*) fresco

Tabela 1. Composição química de músculo de pacu

Parâmetros	Valores médios (%)
Umidade	74,90±0,18
Proteína (Nt- NNP x 6,25)	18,46±0,08
Lipídeos	5,09±0,04
Cinzas	1,27±0,01
NNP	0,27±0,01

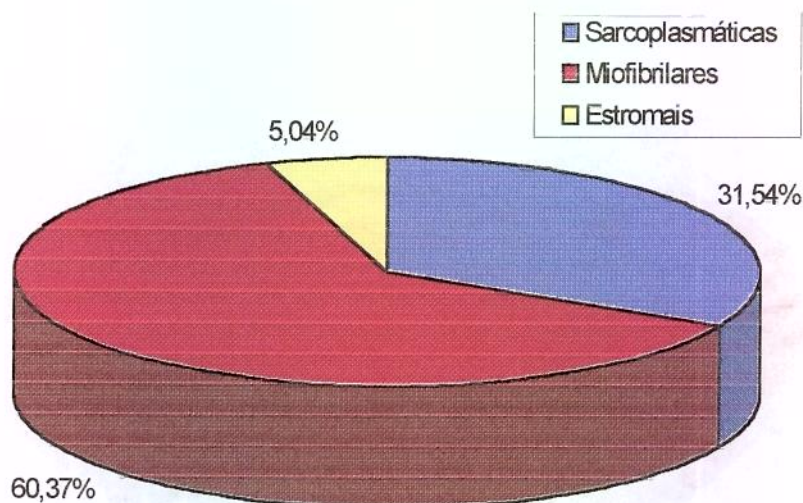


Figura 2. Composição das frações protéicas de músculo de pacu

4 DISCUSSÃO

Composição química

De acordo com SUZUKI (1981) a composição do músculo de pescado é aproximadamente 68-84% água, 15-24% proteína, 0,1-22% lipídeos, 1-3% carboidratos, substâncias inorgânicas 0,8-2%, e os resultados obtidos neste estudo, expostos na *Tabela 1*, estão dentro da faixa reportada pela literatura.

A determinação da composição química de pescado de água doce tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores (ROCHA *et al.*, 1982; MAIA *et al.*, 1983; MORAES *et al.*, 1984). Os resultados apresentados na *Tabela 1*, em concordância com os apresentados por MORAES *et al.* (1984), indicam relação inversa entre os teores de umidade e de lipídeos.

A composição do pacu não apresentou grande variação no teor de proteínas, umidade e cinzas, em relação aos percentuais observados para peixes de água doce nos experimentos conduzidos por ROCHA *et al.* (1982), MAIA *et al.* (1983) e MORAES *et al.* (1984), porém, o teor de lipídeos apresentou variação de acordo com a espécie estudada e mesmo entre a mesma espécie, como observado pelos resultados de MACHADO (1989).

Segundo STANSBY (1962) de acordo com o teor de lipídeos e proteínas é possível classificar o pescado em categorias distintas. Os resultados apresentados na *Tabela 1*, referentes aos teores de proteína total ($18,46 \pm 0,08\%$) e lipídeos totais ($5,09 \pm 0,04\%$), permitem classificar o pacu como um peixe com alto teor protéico e médio teor de gordura, pertencente portanto, à categoria B. Em desacordo com os resultados obtidos neste estudo, MACHADO (1989), em experimento com filés de pacu, classificou este pescado como um peixe gordo ($17,2 \pm 0,3\%$) com baixo teor protéico ($13,0 \pm 0,3\%$). O autor justifica o alto teor de lipídeos pela inclusão nos filés de músculos ventrais, onde se concentra a gordura cavitária e evidências indicam que isto pode também ter sido decorrente da retirada parcial da enorme camada de gordura que existe sob a pele do pacu. A *Figura 1* mostra que o filé obtido neste experimento estava livre de pele e tecido adiposo aparente.

Composição das frações protéicas

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 extractabilidade das proteínas musculares tem sido considerada um critério para avaliação de mudanças das propriedades do músculo de pescados congelados (SHENOUDA, 1980).

A *Figura 2* mostra as percentagens relativas às frações sarcoplasmáticas, estromais e miofibrilares das proteínas do pacu, que comparam-se aos teores citados por ZAITSEV *et al.* (1969).

Os valores obtidos para proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares por MOORJANI *et al.* (1962) e LAN *et al.* (1995) foram comparáveis com os apresentados neste estudo. Entretanto, AWAD *et al.* (1969) e KHALIL *et al.* (1980) obtiveram valores menores para proteínas sarcoplasmáticas.

MACHADO (1989) encontrou maior percentual para proteínas miofibrilares e menor para proteínas sarcoplasmáticas comparados aos obtidos neste experimento. As diferenças observadas nos experimentos, podem ser explicadas pelo fato que a composição aproximada do pescado varia de acordo com a espécie, e dentro de uma mesma espécie, e estão relacionadas com fatores como a estação do ano em que foi realizada a captura, zona geográfica, temperatura da água, e com particularidades como: idade, sexo, zona do corpo, tipo de músculo (claro ou escuro), desenvolvimento gonadal, estado nutricional e tamanho do pescado (SUZUKI, 1981; SANCHEZ, 1989). Além do que a padronização das condições de extração (tipo de sal, pH, força iônica, concentração, temperatura) seria de grande interesse para estabelecer uma real comparação entre espécies de pescado.

5 CONCLUSÕES

- Os teores de 18,46% para proteína e de 5,09% para lipídeos totais obtidos de músculo de *Colossoma mitrei*, permitem classificar este pescado como uma espécie com alto teor protéico e médio teor de gordura.

- Pela caracterização das frações protéicas pode-se concluir que o percentual de proteínas miofibrilares obtidas de músculo de pacu (60,37%), indica apresentar este pescado boa funcionalidade protéica, uma vez que a miosina e actina constituem as proteínas diretamente envolvidas nas propriedades de solubilidade, capacidade de gelatinização e emulsificação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C. 1984. **Official Methods of Analysis**, 14^a ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. D. C.
- AWAD, A.; POWRIE, W. D.; FENNEMA, A. O. 1969. Deterioration of fresh water whitefish muscle during frozen storage at -10°C. **J. Food Sci.** 34: 1-9.
- BECKER, H. C.; MILNER, R. T.; NAGEL, R. H. 1940. A method for the determination of non protein nitrogen in soybean meal. **Cereal Chem.** 17: 447-457.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917.
- DYER, W. J.; FRENCH, H. V.; SNOW, J. M. 1950. Proteins in fish muscle I. Extraction of protein fractions in fresh fish. **J. Fish. Res. Bd. Can.** 7: 585-593.
- HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progr. Lipid Res.** 26: 281-347.
- KHALIL, M. E.; MOUSTAFA, E. K.; OSMA, H. O. A. 1980. Composition of boliti (*Tilapia nilotica*) muscle protein. **Food Chem.** 5: 175-184.
- LAN, Y. L.; NOVAKOFSKI, J.; MCCUSKER, R. H.; BREWER, , M. S.; CARR, T. R.; MCKEITH, F. K. 1995. Thermal gelation of myofibrils from pork, beef, fish, chicken and turkey. **J. Food Sci.** 60 (6): 936-940.

- MACHADO, M. G. S. 1989. Composição em nutrientes e caracterização das proteínas do filé de pacu (*Colossoma mitrei*, Berg, 1895). **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; AMAYA-FARFAN, J. 1983. Proximate fatty acid and amino acid composition of the Brazilian fresh-water fish *Prochilodus scrofa*. **Food Chem.** 12: 275-276.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; HOTTA, L. K. 1995. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piaractus mesopotamicus*. **Int. J. Food Sci. Technol.** 30: 591-597.
- MOORJANI, M. N.; BALIGA, B. R.; VIJAYA RANGA, B.; LAHIRY, N. C. 1962. Post rigor in nitrogen distribution and texture of fish during storage in crushed ice. **Food Tech.** 20: 80-84.
- MORAES, M. N.; SANCHEZ, L.; CEREDA, M. P.; FERREIRA, A. E.; MARTINS, J. A. 1984. Variação química do saguiri *Curimatus elegans* Steindacher, em relação a alguns parâmetros biológicos. **Bol. Int. Pesca São Paulo** 11: 81-91.
- OGAWA, M.; MAIA, E. L. 1999. **Manual de Pesca- Ciência e Tecnologia do Pescado**. Vol. 1, 430p. Editora Varela, São Paulo.
- ROCHA, Y. R.; AGUIAR, J. P. L.; MACHADO, H. A.; SHRIMPTON, R. 1982. Aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia. **Acta Amazônica** 12: 787-794.
- SANCHEZ, L. 1989. **Pescado: Matéria-prima e Processamento**. 61p. Fundação Cargil, Campinas.

- SHENOUDA, S. Y. K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res.** 56: 275-307.
- STANSBY, M. E. 1962. Proximate composition of fish proteins and general composition. In **Fish in Nutrition**, E. Heen, R. Kreuzer (ed.), p.55-56. Fishing News Books, London.
- SUZUKI, T. 1981. Characteristics of fish and fish protein. Cap. 1. In **Fish and Krill Protein**, p.1-56. Applied Science Publishers Ltd., London.
- XIONG, Y. L.; BREKKE, C. J. 1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during frozen storage. **J. Food Sci.** 54 (5): 1141-1146.
- ZAITSSEV, V.; KIEVETTER, I.; LAGUNOV, L.; MAKAROVA, T.; MINDER, L.; PODSEVALV, V. 1969. Characteristics of fish as a raw material for industry. In **Fishing Curing and Processing**, p.52-59. Moscow.

4 ESTUDO 2- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (*Colossoma mitrei*) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO

1 INTRODUÇÃO

A desnaturação pode ser definida como um fenômeno complexo que envolve modificações nas estruturas secundária e terciária das proteínas, devido à quebra de ligações que contribuem à estabilidade da conformação nativa da proteína, sem ruptura das ligações entre átomos de carbono, comprometidos com os enlaces peptídicos, implicados na estrutura primária (FERRY, 1948; TANFORD, 1968; SIKORSKI *et al.*, 1976).

Segundo KINSELLA (1976), a desnaturação pode produzir alterações indesejáveis, uma vez que resulta em propriedades físico-químicas alteradas, particularmente, em diminuição/perda da solubilidade e demais propriedades funcionais do material.

Fatores como o nível de cristalização do gelo, decorrente do tipo de congelamento utilizado (lento ou rápido) e/ou de variações na câmara de estocagem, danificando as células e suas membranas, aumento da concentração de solutos na fase não-congelável, desidratação, atividade enzimática, e reação das proteínas com produtos da oxidação lipídica, podem causar a desnaturação das proteínas miofibrilares durante a estocagem do músculo sob congelamento (BURGESS *et al.*, 1967; LOVE, 1968; SIKORSKI *et al.*, 1976; SHENOUDA, 1980; SMITH, 1987).

De acordo com SHENOUDA (1980), a estabilidade da estrutura tridimensional das proteínas é altamente dependente das pontes de hidrogênio, muitas das quais são mediadas por moléculas de água. Então, a desidratação das moléculas protéicas pelo frio, que consiste da migração das moléculas de água, a fim de formar cristais de gelo, resulta numa ruptura do sistema de pontes de hidrogênio e acarreta a exposição das regiões de superfície (hidrofóbica ou hidrofílica). Conseqüentemente estas regiões tornam-se desprotegidas e vulneráveis. Interações hidrofóbicas-hidrofóbicas e hidrofílicas-hidrofílicas podem então acontecer, até mesmo na mesma molécula protéica, ou entre moléculas protéicas adjacentes, induzindo interações proteína-proteína, e posterior agregação.

A atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares é utilizada como um bom índice para avaliar a estabilidade das proteínas musculares durante a refrigeração e congelamento e subsequente estocagem (ARAI, 1974). De acordo com estudos sobre a estabilidade protéica, as proteínas de pescado parecem ser mais instáveis do que as de coelho e aves (ARAI & TAKASHI, 1977). Esta instabilidade parece estar relacionada à temperatura do meio que o pescado habita (ARAI, 1974; SUZUKI, 1981).

JIANG & LEE (1985) observaram a ocorrência de desnaturação protéica, indicada pelo decréscimo na atividade Ca-ATPásica durante a estocagem de quatro espécies de peixes congeladas e estocadas a -20°C por 12 semanas.

Segundo DONDERO *et al.* (1989) o decréscimo da solubilidade da actomiosina e da atividade Ca-ATPásica durante o congelamento de merluza a -19° C atribui-se à dissociação da actina e miosina, com perda da capacidade de dissociação do ATP. Os filamentos de actomiosina tendem a agregar-se no estado congelado, o que altera a conformação do sítio ativo da enzima Ca-ATPase, situada na região S1 da molécula da miosina.

CASTRILLON *et al.* (1996) relataram que a perda da atividade enzimática parece estar relacionada às modificações da estrutura terciária das proteínas, causada pela cristalização da água. Porém, de acordo com estudos de alguns autores a perda da atividade Ca-ATPase, ocorre devido à formação de pontes dissulfídicas decorrente da oxidação de grupos sulfidrilas (SH), no sítio ativo da miosina (HAMADA *et al.*, 1977; JIANG *et al.*, 1987a).

JIANG *et al.* (1987a) encontraram valores de atividade Ca-ATPásica decrescendo de 0,19 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (tempo zero) para 0,05 após 12 semanas de estocagem de pescado a -20°C . CHEN *et al.* (1989) obtiveram valores equivalentes aos do presente experimento, embora mais drásticos, apresentando a atividade Ca-ATPásica diminuição de 0,13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (tempo zero) para 0,03 após 4 semanas de estocagem. Os autores sugerem que este decréscimo deve-se principalmente à oxidação das sulfidrilas, que diminuem durante a estocagem sob congelamento.

DYER & DINGLE (1961) relataram em peixes magros (conteúdo de lipídeos menor que 1%) menor estabilidade e rápido decréscimo na extractabilidade da actomiosina quando comparadas com espécies gordas (3-10% lipídeos), concluindo que a presença de níveis moderados de lipídeos, podem proteger as proteínas musculares ou aumentar a sua resistência à desnaturação durante a estocagem sob congelamento. Este efeito protetor se deve à fração de lipídeos neutros, tais como triglicerídeos, que parecem diminuir ou neutralizar o efeito prejudicial dos ácidos graxos livres.

Alguns autores têm mostrado que a atividade enzimática (ATPase) da miosina tende a diminuir com a evolução do congelamento e o desenvolvimento da oxidação de lipídeos (NAMBUDIRI & GOPAKUMAR, 1992; POLLONIO, 1994). A exposição das proteínas a lipídeos peroxidados ou aos seus produtos secundários produz modificações protéicas, incluindo perda de atividade

enzimática, polimerização, cisão e formação de complexos lipoprotéicos (FUNES *et al.*, 1982).

NAMBUDIRI & GOPAKUMAR (1992) observaram em estudo com quatro espécies de água doce, entre elas a tilápia (*Oreochromis mossambicus*), que o valor da atividade enzimática (ATPase) durante o congelamento a -20° C decresceu de 0,13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (peixe fresco) para 0,02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (após 180 dias de estocagem). Relataram ainda correlação significativa ($r = -0,93$) entre a atividade ATPásica e a oxidação de lipídeos.

POLLONIO (1994) observou drástica redução nos valores de atividade Ca-ATPásica, de aproximadamente 0,076 para 0,016 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, em proteínas miofibrilares extraídas de carne de frango mecanicamente desossada, estocada a -20° C por 180 dias. O autor sugere que a desnaturação pode ter sido consequência do desenrolamento parcial da molécula, com exposição dos grupos hidrofóbicos, induzindo à agregação protéica durante a estocagem, fundamentada pelo fato que a solubilidade também decresceu durante a estocagem. A desnaturação protéica pode estar também associada aos níveis de oxidação de lipídeos da ordem de 6,58 mg de malonaldeído /Kg de amostra, observados ao fim do período de estocagem.

SMITH (1987) verificou que os valores de TBA não se correlacionaram bem com os índices de desnaturação protéica, permitindo ao autor concluir que a oxidação lipídica não foi o fator mais importante na desnaturação das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de peru, durante o armazenamento sob congelamento a -20° C por 30 semanas, embora tenha observado que a adição de antioxidante preveniu a diminuição da atividade ATPásica ao longo da estocagem sob congelamento.

O acompanhamento da desnaturação das proteínas pode ser realizado através de técnicas eletroforéticas, como a eletroforese SDS-poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). A técnica de eletroforese é largamente utilizada na separação, identificação de proteínas e na determinação de seus pesos moleculares. Tem sido utilizada por vários autores para observação e acompanhamento de possíveis modificações nas proteínas durante o congelamento e estocagem (JIANG *et al.*, 1987a, JIANG *et al.*, 1987b; CARECHE & TEJADA, 1990; POLLONIO, 1994).

Dentre as proteínas que constituem a fração miofibrilar, a miosina é a mais susceptível à desnaturação, a actina mostra modificações leves e a tropomiosina é considerada a proteína mais estável (CONNEL, 1960; SIKORSKI *et al.*, 1976; SAMEJIMA *et al.*, 1982). Entretanto, DAVIES *et al.* (1994) mencionaram que a miosina de peixes tropicais parece ser menos susceptível à ligações cruzadas, causadas pela desnaturação protéica, que as espécies de pescado de águas frias. Os autores deduzem portanto, que existe correlação entre o nível da desnaturação da miosina pelo frio e a temperatura do habitat do pescado.

Em estudo com várias espécies de pescado CHENG *et al.* (1979), usando SDS-PAGE, não observaram modificações nas proteínas actina e miosina após 12 meses a -29° C.

A separação eletroforética das proteínas miofibrilares de *Scomber tapeinocephalus* mantidas "in vitro", durante estocagem sob congelamento a -20°C por 12 semanas, mostrou o desaparecimento da cadeia pesada da miosina e a subsequente formação de compostos de menor peso molecular, além da diminuição das bandas de actina e tropomiosina ao final do período de estocagem (JIANG *et al.*, 1987a).

Leve decréscimo da cadeia pesada da miosina foi relatado por JIANG *et al.* (1987b) e LEBLANC & LEBLANC (1989), durante o armazenamento de pescado à temperatura de -20° C.

SMITH (1987) não observou modificações nos padrões eletroforéticos das proteínas miofibrilares após estocagem sob congelamento de músculo de peru. Resultados indicam que ligações cruzadas covalentes, cissão da cadeia polipeptídica e a atividade da protease endógena, não foram os fatores mais importantes nas modificações das propriedades bioquímicas e funcionais durante a estocagem, sendo estas provavelmente causadas pela abertura protéica e associação não covalente, a fim de produzir agregados de alto peso molecular.

CARECHE & TEJADA (1990) em estudo eletroforético com proteínas miofibrilares de *Merluccius merluccius*, observaram que não houve diferenças apreciáveis nas proteínas durante a estocagem por 180 dias a -18° C. Os autores porém, observaram que lipídeos oxidados adicionados, que permitiram altos níveis de oxidação, provocaram o decréscimo da banda correspondente à cadeia pesada da miosina.

DIAS *et al.* (1994) não observaram alterações no perfil eletroforético das proteínas miofibrilares extraídas de duas espécies de pescado, mantidas estocadas a -18° C por 8 semanas.

POLLONIO (1994) constatou em análise do perfil eletroforético de proteínas miofibrilares, extraídas de carne mecanicamente desossada, estocada a -20° C, o desaparecimento da banda correspondente à miosina (cadeia pesada), ao final do período de armazenamento.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da oxidação de lipídeos sobre a desnaturação das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado a -20° C por 180 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Os filés de pacu foram obtidos conforme procedimento especificado no estudo 1.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (número de TBA)

A análise do n° de TBA foi realizada de acordo com o método proposto por TARLADGIS *et al.* (1960), onde 10g da amostra (músculo moído) adicionada de 1 gota de antiespumante a base de silicone (Merck) e 1mL de solução de BHT (1mg/mL) com 50 mL de água destilada, foram homogeneizados em liquificador por exatamente 1 minuto. Esta mistura foi transferida quantitativamente para balão de fundo chato de 250 mL, com lavagem adicional de 46,5 mL de água destilada, sendo adicionado 2,5 mL de solução de HCl 4N para levar o pH para 1,5 e colocadas algumas contas de vidro para evitar turbulência e choques. O balão foi disposto na manta de aquecimento, em nível de aquecimento máximo, para recolher 50 mL de destilado. Foi coletado 5 mL do destilado em tubo com tampa rosqueada e a este adicionado 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,02M em ácido acético concentrado. Os tubos foram fechados, os conteúdos misturados e

imersos em banho de água fervente por 35 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados em água corrente por 10 minutos e a cor desenvolvida foi lida a 532 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU-70. A determinação foi realizada em triplicata e os valores obtidos, plotados em curva- padrão, sendo os resultados expressos em mg de malonaldeído/Kg de amostra.

2.2.2 Extração das proteínas miofibrilares

Foi realizada segundo o método de XIONG & BREKKE (1989) com algumas modificações, conforme descrito no estudo 1.

A fração miofibrilar foi dosada pelo método semi-micro Kjeldhal (AOAC, 1984), utilizada dentro de um prazo máximo de 24-48 horas, e mantida sob resfriamento (2- 4° C).

2.2.3 Determinação da atividade Ca-ATPásica

A atividade de ATPase das proteínas miofibrilares foi determinada de acordo com ARAI (1974).

Foi preparada uma solução de proteína, com a concentração exata de 0,25 mg/mL, em tampão tris-acetato 20 mM, 1 mM de CaCl_2 , pH 7,0 e 20 mM KCl. Em seguida, esta foi homogeneizada lentamente, sob resfriamento, em agitador magnético por 30 minutos. A solução foi retirada do banho de gelo até a temperatura atingir 25° C. O ATP foi adicionado para a concentração de 1 mM, homogeneizando lenta e continuamente por 60 segundos. Alíquotas de 2 mL desta solução foram coletadas em intervalo de tempo de 60 segundos, transferindo para tubo de centrifuga previamente disposto em banho de gelo,

contendo 3 mL de ácido tricloroacético a 15%. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, para a remoção da proteína desnaturada e retirados 2 mL da camada sobrenadante, para determinação do fosfato inorgânico. O sobrenadante (2 mL) foi colocado em tubos com tampa rosqueada, contendo 2 mL do reagente molibdato e 5 mL de solução álcool isobutílico-benzeno na proporção 1:1. Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador de tubos em posição vertical, por exatamente 1 minuto e mantidos em repouso até a separação das fases. Foram pipetados 2 mL do sobrenadante em tubo com tampa rosqueada, contendo 2 mL de solução de H_2SO_4 alcoólica. Os tubos foram agitados rapidamente no agitador vertical e adicionados de 0,5 mL de SnCl_2 (solução diluída) e o seu conteúdo misturado gentilmente. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, e a cor desenvolvida foi lida a 660 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU-70. A determinação foi realizada em triplicata e os valores obtidos, plotados em curva-padrão, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol Pi/ min/mg}$ proteína.

2.2.4 Eletroforese

Foi conduzida de acordo com a metodologia proposta por LAEMMLI (1970), em sistema Mini-Protean II da BIORAD. A concentração protéica utilizada foi de 10 $\mu\text{g/mL}$. As amostras (proteínas miofibrilares) foram misturadas a 2 mL da solução tampão, aquecidas a 95° C por 4 minutos e armazenadas em freezer até o momento da análise. Utilizou-se "stacking gel" a 4% e "separation gel" a 10%, sendo aplicados 5 μL da amostra. As condições de desenvolvimento, coloração e descoloração dos géis obedeceram a metodologia clássica.

2.2.5 Análise estatística

Foi realizada através de análise de variância e teste de Tukey usando o programa SAS (Statistical Analysis System).

3 RESULTADOS

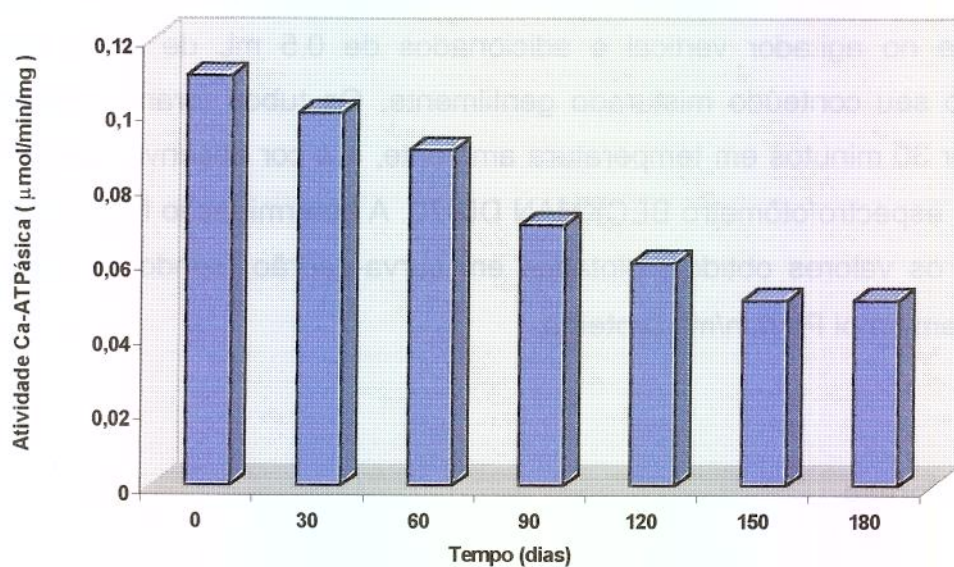


Figura 1. Avaliação da atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento (- 20° C)

Tabela 1. Avaliação da desnaturação (atividade Ca-ATPásica) das proteínas miofibrilares durante a estocagem sob congelamento de músculo de pacu

Tempo (dias)	Atividade Ca-ATPásica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína)
0	0,11 $\pm$ 0,01 a
30	0,10 $\pm$ 0,00 b
60	0,09 $\pm$ 0,00 c
90	0,07 $\pm$ 0,00 d
120	0,06 $\pm$ 0,00 e
150	0,05 $\pm$ 0,00 f
180	0,05 $\pm$ 0,00 f

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

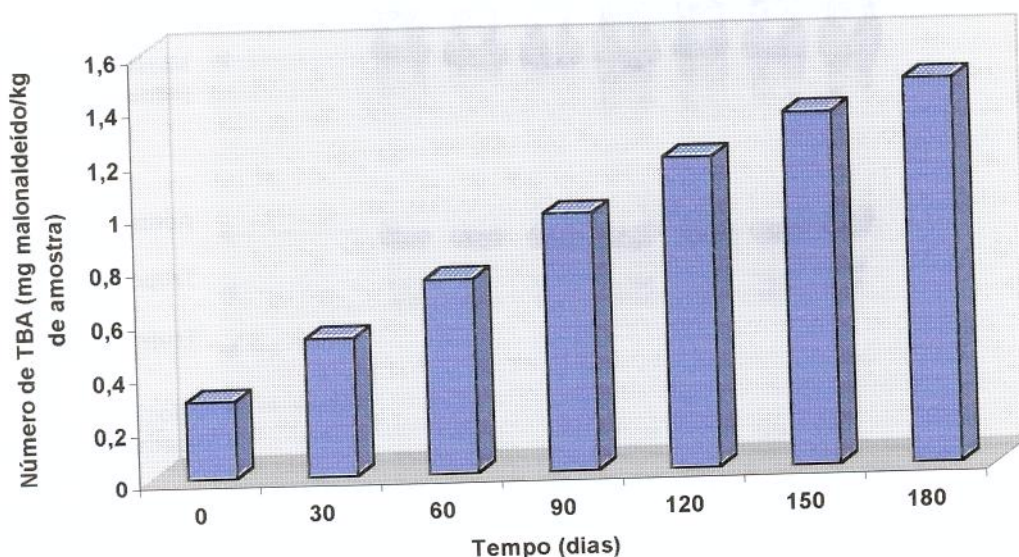


Figura 2. Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento (- 20° C)

Tabela 2. Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento

Tempo (dias)	TBA (mg malonaldeído/kg de amostra)
0	0,29±0,01a
30	0,52±0,02 b
60	0,73±0,04 c
90	0,97±0,02 d
12	1,17±0,09 e
150	1,33±0,06 f
180	1,45±0,09 f

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

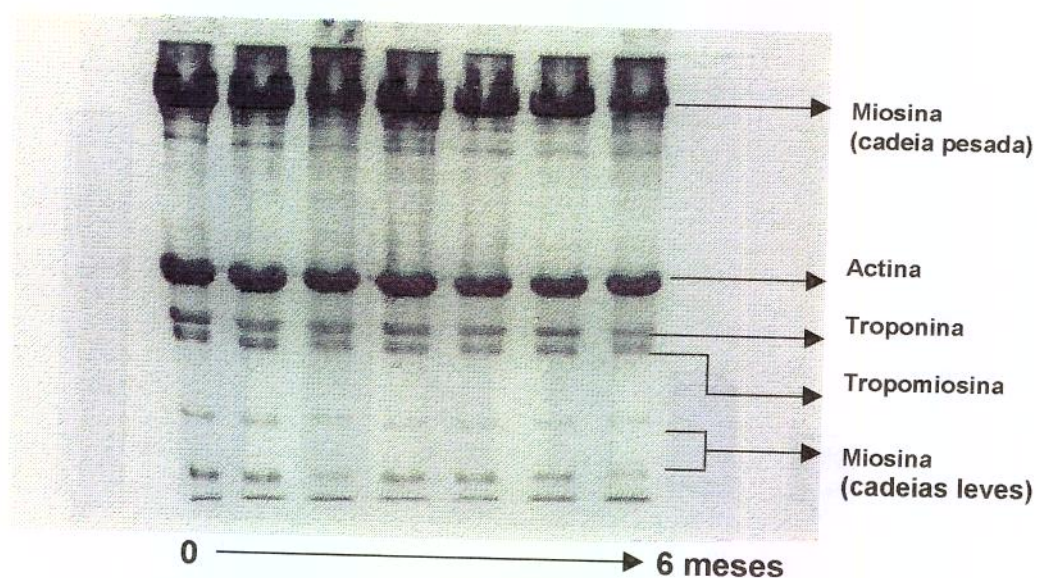


Figura 3. Perfil eletroforético das proteínas miofibrilares de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

4 DISCUSSÃO

A *Figura 1* mostra o decréscimo da atividade enzimática da miosina durante a estocagem sob congelamento de músculo de pacu por 180 dias. Pelos dados apresentados na *Tabela 1* pode ser verificado decréscimo de aproximadamente 55,0% da atividade Ca-ATPásica, indicando processo de desnaturação protéica. Os valores da atividade enzimática diminuíram significativamente ($P < 0,05$) durante o período de estocagem, podendo isto ser explicado pela abertura parcial da molécula protéica, permitindo a exposição de grupos hidrofóbicos, induzindo interações proteína-proteína e conseqüente agregação protéica, conforme mencionado por SHENOUDA (1980). A redução da atividade Ca-ATPásica de 55,0% neste estudo parece pequena, se comparada às obtidas por JIANG *et al.* (1987a, 1987b) e POLLONIO (1994), cujos percentuais situaram-se respectivamente, em aproximadamente 74,0%, 95,0% e 78,0% durante o armazenamento sob congelamento. O nível da desnaturação observada no presente estudo, pode ser explicado por uma possível proteção conferida pelos lipídeos neutros (DYER & DINGLE, 1961), ou ainda pelo fato de tratar-se de uma espécie tropical na qual a miosina, segundo DAVIES *et al.* (1994), parece ser mais estável à desnaturação protéica.

Autores como NAMBUDIRI & GOPAKUMAR (1992) e POLLONIO (1994) mostraram que a atividade Ca-ATPásica da miosina tende a diminuir com a evolução do congelamento e da oxidação de lipídeos. Pode ser observado na *Figura 2* e *Tabela 2* o aumento significativo ($P < 0,05$) dos valores de TBA durante a estocagem sob congelamento, concomitantemente com o decréscimo dos valores da atividade Ca-ATPásica (*Tabela 1*).

Contrariamente à pesquisa realizada por SMITH (1987), pode ser observada neste estudo forte correlação entre a desnaturação e a oxidação de lipídeos ($r = -0,97$), indicando que lipídeos peroxidados ou seus produtos

secundários, podem ter produzido modificações nas proteínas, especialmente no sítio ativo da enzima Ca-ATPase, durante o armazenamento de filés de pacu sob congelamento. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por NAMBUDIRI & GOPAKUMAR (1992), que também evidenciaram alta correlação entre oxidação lipídica e desnaturação protéica.

Pela determinação do perfil eletroforético das proteínas miofibrilares do presente estudo, conforme mostrado na *Figura 3*, verificou-se ausência de alterações nas bandas correspondentes a actina, troponina e tropomiosina após 180 dias de estocagem sob congelamento, o que está de acordo com observações de SMITH (1987) e DIAS *et al.* (1994). Entretanto, decréscimo significativo das bandas referentes às cadeias leves da miosina e leve diminuição da cadeia pesada, podem ser observados na *Figura 3*, ao longo do período de armazenamento, confirmando relatos de JIANG *et al.* (1987b), LEBLANC & LEBLANC (1989) e CARECHE & TEJADA (1990). Pelos resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que os níveis da desnaturação protéica ocorrida e da oxidação lipídica não foram capazes de provocar modificações expressivas nas proteínas miofibrilares actina, troponina e tropomiosina, porém, a miosina, a mais importante proteína sob o ponto de vista da funcionalidade, apresentou decréscimo ao longo do armazenamento sob congelamento, conforme observado no eletroforetograma.

5 CONCLUSÕES

- A atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares apresentou correlação significativa com a oxidação de lipídeos, o que sugere o comprometimento de lipídeos oxidados no processo de desnaturação protéica.

- As alterações promovidas pelo congelamento e pela oxidação lipídica não foram tão drásticas a ponto de comprometer as frações protéicas correspondentes às proteínas actina , troponina, tropomiosina.

- As bandas da miosina (cadeias leves) mostraram decréscimo significativo ao longo do período de armazenamento sob congelamento de músculo de pacu e leve decréscimo foi observado na banda correspondente à cadeia pesada da miosina, indicando desnaturação da mais importante proteína miofibrilar sob o aspecto da funcionalidade protéica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C. 1984. **Official Methods of Analysis**, 14^a ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. DC.
- ARAI, K. 1974. Evaluation of fish quality from the muscle protein studies. In **Quality of Fish**, Sakana no Hinshitsu, p. 55-80, Tokyo.
- ARAI, K.; TAKASHI, R. 1977. Studies on molecular proteins of fish- Effect of freezing on denaturation of actomyosin ATPase from carp muscle. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 43: 533-541.
- BURGUESS, G. H. O.; CUTTING, C. L.; LOVERN, J. A.; WATERMAN, J. J. 1967. Congelación y almacenamiento frigorífico. Cap. 7. In **Fish Handling and Processing**, p.142-200. Chemical Publishing Company, New York.
- CARECHE, M.; TEJADA, M. 1990. The effect of neutral and oxidized lipids on functionality in hake (*Merluccius merluccius* L.): a dimethylamine and formaldehyde-forming species during frozen storage. **Food Chem.** 36: 113-128.
- CASTRILLÓN, A. M.; ALVAREZ-PONTES, E.; ARIAS, M. T. G. 1996. Influence of frozen storage and defrosting on the chemical and nutritional quality of sardine (*Clupea pilchardus*). **J. Sci. Food Agric.** 70: 29-34.
- CHEN, C. S.; HWANG, D. C.; JIANG, S. T. 1989. Effect of storage temperatures on the formation of disulfides and denaturation of milkfish actomyosin (*Chanos chanos*). **J. Agric. Food Chem.** 37 (5): 1228-1231.

- CHENG, C. S.; HAMANN, D. D.; WEBB, N. B.; SIDWELL, V. 1979. Effects of species and storage time on minced fish gel texture. **J. Food Sci.** 44: 1087-1092.
- CONNEL, J. J. 1960. Changes in the actin of cod flesh during storage at -14°C. **J. Sci. Food Agric.** 11: 515.
- DAVIES, J. R.; LEDWARD, D. A.; BARDSLEY, R. G.; POULTER, R. G. 1994. Species dependence of fish myosin stability to heat and frozen storage. **Int. J. Food Sci. Technol.** 29: 287-301.
- DIAS, J.; NUNES, M. L.; MENDES, R. 1994. Effect of frozen storage on the chemical and physical properties of black and silver scabbarfish. **J. Food Sci.** 66: 327-335.
- DONDERO, M.; SANTIBÁÑEZ, M. A.; TARKY, W.; CUROTTO, E.; CANTO, M. 1989. Desnaturalización proteica en merluza (*Merluccius gayi gayi*) almacenada congelada. **Rev. Agroquim. Technol. Alim.** 29 (2): 230-238.
- DYER, W. J.; DINGLE, J. R. 1961. Fish proteins with special reference to freezing. In **Fish as Food**, p.275, G. Borgstrom (ed.), Academic Press, New York.
- FERRY, J. D. 1948. Protein gels. **Adv. Protein Chem.** 4: 1-28.
- FUNES, J. A.; WEISS, U.; KAREL, M. 1982. Effects of reactions conditions and reactant concentrations on polymerization of lysozyme reacted with peroxidizing lipids. **J. Agric. Food Chem.** 30 (6): 1204-1206.
- HAMADA, I.; NAKAYAMA, T.; NIWA, E. 1977. Oxidative denaturation of actomyosin. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 43: 1105-1109.

- JIANG, S. T.; LEE, T. C. 1985. Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage. **J. Agric. Food Chem.** 33 (5): 839-843.
- JIANG, S. T.; TSAO, C. Y.; LEE, T. C. 1987a. Effect of free amino acids on the denaturation of mackerel myofibrillar proteins in vitro during frozen storage at -20° C. **J. Agric. Food Chem.** 35 (1): 28-33.
- JIANG, S. T.; HWANG, B. S.; TSAO, C. Y. 1987b. Protein denaturation and changes in nucleotides of fish muscle during frozen storage. **J. Agric. Food Chem.** 35 (1): 22-27.
- KINSELLA, J. E. 1976. Functional properties of proteins. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 4: 219-280.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- LEBLANC, E. L.; LEBLANC, R. J. 1989. Separation of cod fillets proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. **J. Food Sci.** 54 (4): 827-834.
- LOVE, R. M. 1968. Ice formation in frozen muscle. In **Low Temperature Biology of Foodstuffs**, J. Hawthorn and J. Rolf, (ed.). Pergamon, Oxford.
- NAMBUDIRI, D. D.; GOPAKUMAR, K. 1992. ATPase and lactate dehydrogenase activities in frozen stored fish muscle as indices of cold storage deterioration. **Food Sci.** 57 (1): 72-76.

- POLLONIO, M. A. R. 1994. Estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de carne mecanicamente desossada. **Tese de Doutorado**, Unicamp, Campinas, SP.
- SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M.; YASUI, T. 1982. Heat induced gelling properties of actomyosin: effect of tropomyosin and troponin. **Agric. Biol. Chem.** 46 (2): 535-540.
- SAS. 1985. **Statistical Analysis System User's Guide: Statistics**. SAS Institute, Inc., Cary NC, SAS Institute Inc.
- SHENOUDA, S. Y. K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res.** 56: 275-307.
- SIKORSKI, Z. E.; OLLEY, J.; KOSTUCH, S. 1976. Protein changes in frozen fish. **CRC- Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 6 (1): 97-129.
- SMITH, D. M. 1987. Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. **J. Food Sci.** 52 (1): 22-27.
- SUZUKI, T. 1981. Characteristics of fish and fish protein. Cap. 1. In **Fish and Krill Protein**, p.1-56. Applied Science Publishers Ltd., London.
- TANFORD, C. 1968. Protein denaturation: the transition from native to denaturated state. **Adv. Protein Chem.** 23: 219-238.
- TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNNATHAN, M. T. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 37 (1): 44-48.

XIONG, Y. L.; BREKKE, C. J.1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrills during frozen storage. **J. Food Sci.** 54 (5): 1141-1146.

5 ESTUDO 3- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (*Colossoma mitrei*) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO

1 INTRODUÇÃO

A maioria das propriedades funcionais das proteínas estão relacionadas com as interações proteína-água, entre elas podemos citar a solubilidade. A avaliação do comportamento da solubilidade propicia um bom índice das aplicações e limitações das proteínas, fornecendo informações sobre a utilização de procedimentos de processamento e dos efeitos de tratamentos térmicos que podem afetar as aplicações protéicas (KINSELLA, 1976).

A solubilidade protéica, segundo HULTIN *et al.* (1995), é geralmente definida como a quantidade de proteína que permanece numa solução de características definidas, depois de submetida à ação de força centrífuga específica, por um determinado período de tempo. As características de solubilidade dependem da forma de solubilização da proteína e dos procedimentos operacionais para efetuar a separação das frações solúvel e insolúvel. Sofre influência de fatores como: composição e sequência de aminoácidos, taxa de aminoácidos polares e apolares, peso molecular e conformação, sendo afetada pelo pH, temperatura, sais (espécie e concentração), tratamento prévio sofrido pela proteína, métodos de extração e interação com outros componentes de alimento.

Outros fatores citados por KELLEHER & HULTIN (1991) afetam a solubilidade entre eles: o músculo (espécie, tipo de músculo, tipo de fibra, quantidade de tecido conectivo), a condição *post-mortem* (estado de *rigor* e *post-*

rigor mortis, temperatura), a condição da extração (técnica de ruptura de tecidos, tamanho da partícula, peso do tecido, solução de extração, volume, pH, força iônica, força centrífuga, temperatura).

WU & SMITH (1987) e KELLEHER & HULTIN (1991) concluíram que a utilização de temperaturas entre 4-5° C empregadas na extração das proteínas miofibrilares, tem por finalidade minimizar a contribuição das proteases endógenas e evitar a desnaturação protéica.

A solubilidade também sofre a influência da concentração protéica. Geralmente para avaliação desta importante propriedade funcional são utilizadas concentrações protéicas que variam de 1-20mg proteína/mL. A utilização de concentrações maiores resulta em diminuição da solubilidade, pela menor disponibilidade de solvente para interagir com as proteínas e caracteriza-se pela sedimentação destas, quando submetidas à centrifugação (VOJDANI, 1996).

KINSELLA (1976) mencionou que a determinação do percentual de proteína solúvel é uma das primeiras análises a serem conduzidas, quando se avalia o grau de desnaturação de uma proteína, e está de algum modo, correlacionada as outras propriedades funcionais.

As proteínas musculares têm sido agrupadas em três categorias com base em suas solubilidades. As proteínas sarcoplasmáticas, são *solúveis em água* ou soluções salinas diluídas, com baixa força iônica. As proteínas *solúveis em sal*, incluem as proteínas miofibrilares, definidas como solúveis em soluções salinas de força iônica 0,45 a 0,6M. As proteínas do estroma constituem-se naquelas que mantêm-se *insolúveis* após as extrações mencionadas, sendo compostas pelas proteínas do tecido conectivo, podendo conter também proteínas miofibrilares não extraídas e algumas membranas protéicas (HULTIN *et al.*, 1995).

A solubilidade de uma proteína depende do pH da solução. Uma proteína em um sistema aquoso, no ponto isoelétrico (pI), possui carga líquida igual a zero, apresentando menor solubilidade. No pI as interações proteína-proteína aumentam devido às forças eletrostáticas das moléculas estarem no mínimo, e menos água interage com a molécula protéica. Esta é uma condição favorável à agregação e precipitação das proteínas, que pode ser modificada pela utilização de sais (espécie e concentração) que alteram os efeitos eletrostáticos, de hidratação e estruturais da água, resultando em melhor solubilidade (efeito “salting-in”) (KINSELLA, 1976; MORRISEY *et al.*, 1982; HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

A solubilidade atinge o valor máximo geralmente em concentração de sais neutros de 0,1-1M, porém, ao se aumentar a concentração a solubilidade decresce marcadamente, devido à competição entre a proteína e íons salinos pela ligação da água. A fase caracterizada pelo aumento da solubilidade é conhecida como “salting-in”. Sais neutros na concentração de 0,1-1M geralmente aumentam a solubilidade protéica dependendo da proteína, pH e temperatura. Os íons salinos interagem com grupos da proteína opostamente carregados, a fim de formar uma camada dupla de grupos iônicos, com diminuição da interação eletrostática entre as moléculas protéicas, causando maior solvatação e deste modo propiciando maior solubilidade das proteínas (KINSELLA, 1976; KOLAKOWSKI *et al.*, 1977; HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

Em concentrações acima de 1M, os íons diminuem a solubilidade (“salting-out”) pela perda da superfície hidrofílica, causando a exposição das áreas hidrofóbicas da proteína. As interações hidrofóbicas aumentam, havendo competição então com a proteína pela água, desta forma causando a precipitação protéica (KINSELLA, 1976; HULTIN *et al.*, 1995; VOJDANI, 1996).

Parâmetros bioquímicos com modificações (decréscimo) na atividade ATPásica de músculo de pescado, são sensíveis indicadores para o monitoramento da desnaturação protéica, como consequência de mudanças na conformação, que podem ocorrer durante a estocagem sob congelamento (SHENOUDA, 1980).

Segundo KINSELLA (1976), a desnaturação pode produzir alterações indesejáveis, uma vez que resulta em propriedades físico-químicas alteradas, particularmente, em diminuição/perda da solubilidade, extractabilidade e propriedades funcionais do material. Relatos na literatura têm mostrado o decréscimo do percentual de proteína solúvel, como consequência da estocagem sob congelamento (JIMÉNEZ-COLMENERO & BORDERIAS, 1983; REDDY *et al.*, 1992; DIAS *et al.*; 1994; PASTORIZA *et al.*, 1994).

JIMÉNEZ-COLMENERO & BORDERIAS (1983) estudaram peixes das espécies: *Micromesistius poutassou* (R.), e *Trachurus trachurus* (L.), triturados, estocados a -20°C por 8 meses e observaram decréscimo da estabilidade e solubilidade protéica, alteração que se correlaciona com o tempo de estocagem. Decréscimo de 50% em relação ao valor inicial da solubilidade protéica de *Nemipterus japonicus*, congelado e estocado a -18° C por 180 dias, também foi verificado por REDDY *et al.* (1992).

DIAS *et al.* (1994) investigaram o efeito da estocagem sob congelamento sobre as propriedades físicas e químicas de *Aphanopus carbo* e *Lepidopus caudatus*, e relataram redução da solubilidade das proteínas miofibrilares após 8 semanas de estocagem a -18°C e aumento das frações álcali-solúvel e estromal, sendo estas duas últimas observações características de um processo de desnaturação protéica (SIKORSKI *et al.*, 1976; SHENOUDA, 1980).

SCOTT *et al.* (1988) não evidenciaram decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares em *Theragra chalcogramma*, estocada a -29° C por 267 dias, e constataram que isto se deve à baixa temperatura de estocagem empregada.

A ocorrência da oxidação lipídica em músculos tem influência no comportamento funcional de suas proteínas, uma vez que radicais livres modificam as estruturas moleculares protéicas, levando a alterações na sua funcionalidade. O decréscimo nos níveis de solubilidade tem sido observado quando as proteínas miofibrilares são expostas a lipídeos oxidados, durante a estocagem sob congelamento (KING *et al.* , 1962; AWAD *et al.*, 1969; TAKAMA, 1974; BORDERIAS *et al.*, 1982; CARECHE & TEJADA, 1990; POLLONIO, 1994).

KING *et al.* (1962) constataram rápido decréscimo da solubilidade protéica, após a adição de baixas concentrações de ácidos graxos (linoléico e linolênico) oxidados à actomiosina extraída de bacalhau.

AWAD *et al.* (1969) observaram em estudo com pescado de água doce, da espécie *Coregonus Clupeiformis*, que a solubilidade das proteínas miofibrilares diminuiu após estocagem do pescado a -10° C por 16 semanas, sugerindo que produtos da oxidação lipídica podem ter contribuído à insolubilização protéica.

SIKORSKI *et al.* (1976) concluem que lipídeos oxidados em complexos lipoprotéicos, induzem a polimerização e a agregação das proteínas, tendo como consequência o decréscimo da solubilidade.

BORDERIAS *et al.* (1982) verificaram que a solubilidade protéica, em filés de pescado da espécie *Salmo irideus*, não apresentou variação significativa durante 165 dias de estocagem a -20° C. Os autores concluíram que o pequeno decréscimo da solubilidade, justificou-se pelo fato do número de TBA não ter

mostrado considerável aumento ao longo do período de armazenamento desta espécie de pescado.

CARECHE & TEJADA (1990) analisaram o efeito da adição de lipídeos oxidados na funcionalidade protéica de *Lepidorhombus whiffiagonis* (W.) e *Sardina pilchardus* (R.) durante a estocagem à temperatura de -18°C por até 365 dias, e observaram a diminuição da solubilidade protéica ao longo do período de armazenamento.

Intensa redução da solubilidade simultaneamente com a elevação dos valores de TBA em carne de frango mecanicamente desossada, estocada por 180 dias a -20° C, foi verificada por POLLONIO (1994), indicando que lipídeos oxidados podem ter contribuído para a redução da solubilidade protéica. O autor relatou ainda que valores de solubilidade e atividade Ca-ATPásica correlacionaram-se positivamente durante o período de estocagem.

O estudo de PASTORIZA *et al.* (1994) com *Raja clavata* (L.), triturada, congelada e estocada à temperatura de -18°C mostrou decréscimo no que se refere à extração das proteínas miofibrilares. Redução mais expressiva da solubilidade foi observada após 1 ano de estocagem a -18°C. Os autores tentaram explicar o decréscimo na extração protéica através de observações feitas por REDDY & SRIKAR (1991), que acreditam que o decréscimo se deve à presença de agregados resultantes da formação progressiva de ligações intermoleculares, tais como: pontes de hidrogênio, ligações iônicas, interações hidrofóbicas e pontes dissulfídicas, formadas como consequência do congelamento e da estocagem do produto congelado, porém, de acordo com SRIKAR *et al.* (1989), verificaram que a oxidação lipídica pode ser responsável pelo decréscimo da extração das proteínas miofibrilares.

Decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares em sardinha (*Sardinella longiceps*) mantida a -20° C por 150 dias, foi atribuído à hidrofobicidade protéica, como consequência do aumento de ácidos graxos livres e índice de peróxidos, levando à agregação protéica (VERMA *et al.*, 1995).

Este estudo teve como objetivo verificar a influência da oxidação de lipídeos na solubilidade das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado a -20° C por 180 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Os filés de pacu foram obtidos conforme procedimento especificado no estudo 1.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (número de TBA)

A análise do n° de TBA foi realizada de acordo com o método proposto por TARLADGIS *et al.* (1960), conforme descrito no estudo 2.

2.2.2 Extração das proteínas miofibrilares

Foi realizada segundo o método de XIONG & BREKKE (1989) modificado, como descrito anteriormente no estudo 1.

A fração miofibrilar foi dosada pelo método semi- micro Kjeldhal (AOAC, 1984), utilizada dentro de um prazo máximo de 24-48 horas, e mantida sob resfriamento (2-4° C).

2.2.3 Determinação da solubilidade protéica

Foi empregado o método de XIONG & BREKKE (1989), com algumas modificações.

Foi preparada uma dispersão de proteínas miofibrilares contendo 5 mg/ mL de proteína em solução- tampão fosfato 0,05M, 0,6M NaCl, pH 6,0. Esta foi mantida sob agitação (agitador magnético) em banho de gelo por 30 minutos, evitando a formação de espuma. Foi coletada alíquota de 10 mL desta dispersão protéica em tubos de centrífuga (em triplicata), em seguida a dispersão foi centrifugada a 5.000 rpm durante 15 minutos em centrífuga refrigerada (2-4°C). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro, seu volume medido e a concentração de nitrogênio total no filtrado foi determinada pelo método de Kjeldahl. A percentagem de solubilidade foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Solubilidade} = \frac{\text{Concentração de proteína no sobrenadante}}{\text{Concentração de proteína nos 10 mL originais}} \times 100$$

2.2.4 Determinação da atividade de Ca-ATPásica

A atividade de ATPase das proteínas miofibrilares foi determinada de acordo com ARAI (1974), conforme descrito no estudo 2.

2.2.5 Análise estatística

Foi realizada através de análise de variância e teste de Tukey usando o programa SAS (Statistical Analysis System).

3 RESULTADOS

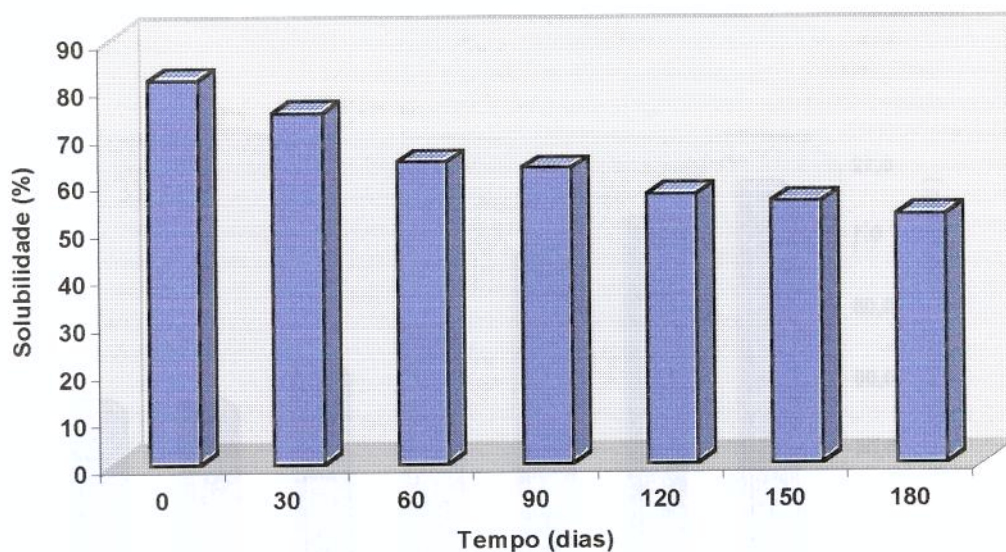


Figura 1. Avaliação da solubilidade das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 1. Avaliação da solubilidade das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento

Tempo (dias)	Solubilidade (%)
0	81,38±2,12 a
30	74,53±2,61 b
60	64,07±2,48 c
90	62,67±2,50 cd
120	56,98±2,18 de
150	55,41±2,47 e
180	52,59±3,61 e

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

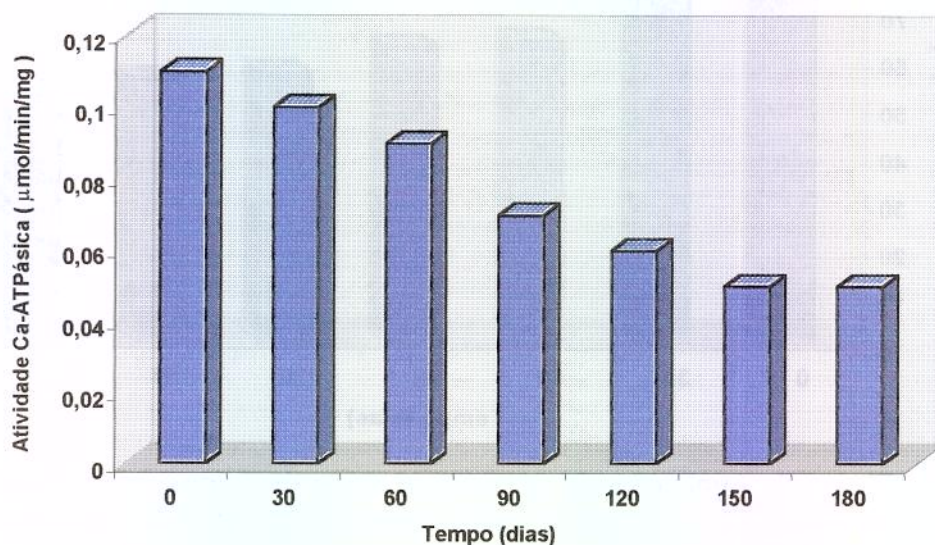


Figura 2. Avaliação da atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento (- 20° C)

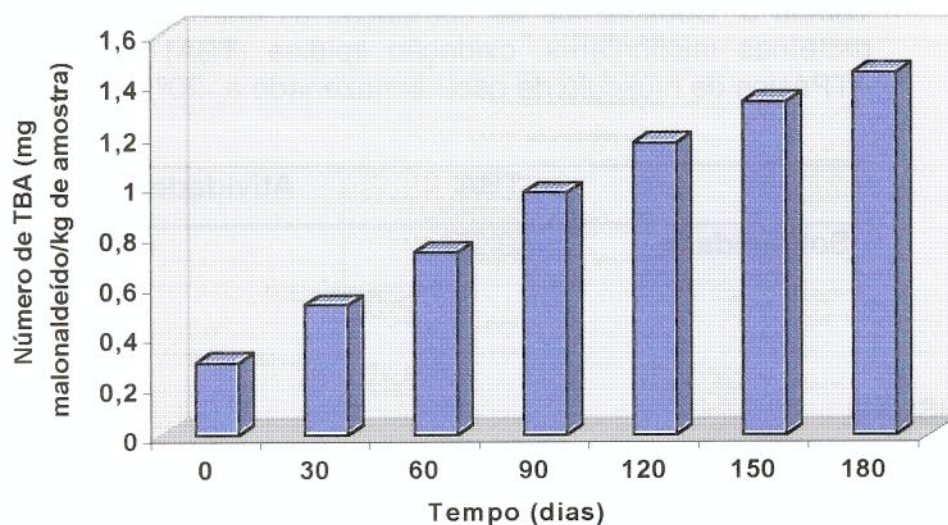


Figura 3. Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 2. Avaliação da oxidação de lipídeos em músculo de pacu armazenado sob congelamento

Tempo (dias)	TBA (mg malonaldeído/kg de amostra)
0	0,29±0,01 a
30	0,52±0,02 b
60	0,73±0,04 c
90	0,97±0,02 d
120	1,17±0,09 e
150	1,33±0,06 f
180	1,45±0,09 f

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 3. Coeficientes de correlação (r) entre a solubilidade das proteínas miofibrilares, oxidação lipídica (TBA) e atividade Ca-ATPásica de músculo de pacu armazenado a -20° C por 180 dias

	TBA	Atividade Ca-ATPásica
Solubilidade	-0,97	+0,93

4 DISCUSSÃO

Tem sido relatado na literatura que o armazenamento sob congelamento pode levar ao decréscimo/perda da solubilidade das proteínas musculares, pela desnaturação das proteínas (KINSELLA, 1976; JIMENEZ-COLMENERO & BORDERIAS, 1983; DIAS *et al.*, 1994). A *Figura 1* mostra o decréscimo da solubilidade das proteínas miofibrilares, ao longo do período de estocagem. Os dados expostos na *Tabela 1* indicam decréscimo dos valores da solubilidade protéica de aproximadamente 35,0% em relação ao valor inicial. Variação significativa ($P < 0,05$) foi observada até o 120º dia sob congelamento. Concomitantemente ao decréscimo da solubilidade verificou-se a redução dos valores da atividade ATPásica das proteínas musculares, conforme mostrado na *Figura 2* estabelecendo-se alta correlação positiva (*Tabela 3*) entre eles, indicando que a desnaturação protéica contribuiu para o decréscimo da solubilidade. Entretanto, a desnaturação protéica apresentou correlação significativa (*Tabela 3*) com a oxidação de lipídeos, o que indica o envolvimento de lipídeos oxidados no processo de desnaturação protéica.

Pelos resultados apresentados (*Figura 3* e *Tabela 2*) verificou-se aumento dos valores de TBA, durante a estocagem sob congelamento. A redução da solubilidade foi simultânea à elevação dos valores de TBA, correlacionando-se fortemente ao longo do período de estocagem sob congelamento (*Tabela 3*). Pelo presente estudo permite-se então concluir que o decréscimo da solubilidade se

deve à ação de lipídeos oxidados sobre as proteínas, através da formação de complexos insolúveis, o que está de acordo com os resultados apresentados por KING *et al.* (1962); AWAD *et al.* (1969); SRIKAR *et al.* (1989); CARECHE & TEJADA (1990); POLLONIO (1994); VERMA *et al.* (1995).

5 CONCLUSÕES

- O processo da oxidação de lipídeos produz efeito prejudicial sobre as proteínas miofibrilares, estabelecendo forte correlação com a desnaturação das proteínas, resultando em diminuição da solubilidade protéica ao longo da estocagem sob congelamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C. 1984. **Official Methods of Analysis**, 14^a ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. DC.
- ARAI, K. 1974. Evaluation of fish quality from the muscle protein studies. In **Quality of Fish**, Sakana no Hinshitsu, p. 55-80, Tokyo.
- AWAD, A.; POWRIE, W. D.; FENNEMA, A. O. 1969. Deterioration of fresh water whitefish muscle during frozen storage at -10°C. **J. Food Sci.** 34: 1-9.
- BORDERIAS, A. J.; MORAL, A.; TEJADA, M. 1982. Stability of whole, filleted, and minced trout (*Salmo irideus*, Gibb) during frozen storage. **J. Food Biochem.** 6: 187-195.
- CARECHE, M.; TEJADA, M. 1990. Effect of neutral and oxidized lipids on protein functionality in megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis* W.) and sardine. (*Sardina pilchardus* R.) during frozen storage. **Food Chem.** 37 (4): 275-287.
- DIAS, J.; NUNES, M. L.; MENDES, R. 1994. Effect of frozen storage on the chemical and physical properties of black and silver scabbarfish. **J. Food Sci.** 66: 327-335.
- HULTIN, H. O.; FENG, Y.; STANLEY, D. W. 1995. A re-examination of muscle protein solubility. **J. Muscle Foods** 6: 91-107.
- JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; BORDERIAS, A., J. 1983. A study of the effects of frozen storage on certain functional properties of meat and fish and protein. **J. Food Technol.** 18: 731-737.

- KING, F. J.; ANDERSON, M. L.; STEINBERG, M. A. 1962. Reaction of cod actomyosin with linoleic and linolenic acids. **J. Food Sci.** 27: 363-366.
- KINSELLA, J. E. 1976. Functional properties of proteins. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 4: 219-280.
- KELLEHER, S. D.; HULTIN, H. O. 1991. Lithium chloride as a preferred extractant of fish muscle proteins. **J. Food Sci.** 56: 315-317.
- KOLAKOWSKI, E.; SZYBOWICZ, Z.; RACZEK, K. 1977. Extractability of muscle protein as a criterion for technological evaluation of sea fish. Part I- Changes of protein fraction of baltic herring and baltic cod during storage in ice. **Die Nahrung** 21 (6): 485-499.
- MORRISEY, P. A.; MULVIHILL, D. M.; O'NEILL, E. M. 1982. Functional properties of muscle proteins. Cap.1. In **Developments in Food Proteins-5**, B. J. F. Hudson, p.196. Elsevier Applied Science, London.
- PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; HERRERA, J. J. 1994. Effects of mincing and frozen storage on functional properties of ray muscle (*Raja clavata*). **J. Sci. Agric.** 66: 35-44.
- POLLONIO, M. A. R. 1994. Estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de carne mecanicamente desossada. **Tese de Doutorado**, Unicamp, Campinas, SP.
- REDDY, G. V. S.; SRIKAR, L. N. 1991. Preprocessing ice storage effects on functional properties of fish mince protein. **J. Food Sci.** 56 (4): 965-968.

- REDDY, G. V. S.; SRIKAR, L. N.; SUDHAKARA, N.S. 1992. Deterioration changes in pink perch mince during frozen storage. **Int. J. Food Sci. Tech.** 27 (3): 271-276.
- SAS. 1985. **Statistical Analysis System User's Guide: Statistics**. SAS Institute, Inc., Cary NC, SAS Institute Inc.
- SCOTT, D. N.; PORTER, R. W.; KUDO, G.; MILLER, R.; KOURY, B. 1988. Effect of freezing and frozen storage of alaska pollock on the chemical properties of surimi. **J. Food Sci.** 53 (2): 353-358.
- SHENOUDA, S. Y. K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res.** 56: 275-307.
- SIKORSKI, Z. E.; OLLEY, J.; KOSTUCH, S. 1976. Protein changes in frozen fish. **CRC- Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 6 (1): 97-129.
- SRIKAR, L. N.; SESHADARI, H. S.; H. S.; FAZAL, A. A. 1989. Changes in lipids and proteins of marine catfish (*Trachysurus dussumieri*) during frozen storage. **Int. J. Food Sci. Technol.** 24: 653-658.
- TAKAMA, K. 1974. Insolubilization of rainbow trout actomyosin during storage at -20° C. Mechanism of propanal or caproic acid reaction with actomyosin to induce insolubilization. **Bull. Jap. Soc. Sci.** 40: 389-393.
- TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNNATHAN, M. T. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 37 (1): 44-48.

- VERMA, J. K.; SRIKAR, L. N.; SUDHAKARA, N. S.; SARMA, J. 1995. Effects of frozen storage on lipid freshness parameters and some functional properties of oil sardine (*Sardinella longiceps*) mince. **Food Res. Int.** 28 (1): 87-90.
- VOJDANI, F. 1996. Ch.2. In **Methods of Testing Protein Functionality**, G. M. Hall (ed.), p.11. Blackie Academic Professional.
- WU, F. Y.; SMITH, S. B. 1987. Ionic strength and myofibrillar protein solubilization. **J. An. Sci.** 65: 597-608.
- XIONG, Y. L.; BREKKE, C. J. 1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during frozen storage. **J. Food Sci.** 54 (5): 1141-1146.

6 ESTUDO 4- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA SOBRE A DUREZA E UMIDADE ESPREMÍVEL DE GÉIS OBTIDOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES EXTRAÍDAS DE MÚSCULO DE PACU (*Colossoma mitrei*) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de gelatinização constitui-se em importante propriedade funcional, definida por GLICKSMAN (1982) como uma associação ou ligação cruzada de cadeias de polímeros, dispersas ao acaso em solução, para formar uma rede tridimensional contínua, que imobiliza líquido nas estruturas intersticiais e resistem ao fluxo e pressão.

FERRY (1948) relatou que géis protéicos desnaturados podem ser formados somente quando é alcançado o balanço crítico entre forças atrativas e repulsivas. Segundo o autor, o processo de gelatinização é constituído por dois estágios: o primeiro envolvendo a *desnaturação* inicial da *proteína nativa* (aquecimento) em polipeptídeos abertos, que gradualmente num segundo estágio, *associam-se* a fim de formar a matriz do gel, se forças atrativas e condições termodinâmicas são adequadas. Devido às altas temperaturas de desnaturação empregadas, o primeiro estágio do processo de gelatinização parece mais acelerado que o segundo, que ocorre de forma mais lenta, a fim de permitir que as proteínas desnaturadas se orientem e interajam em pontos específicos, para então formar a malha, rede tridimensional. Quando a agregação ocorre muito rapidamente, há a obtenção de um coágulo caracterizado por alta opacidade, baixa elasticidade e considerável sinerese.

De acordo com LEE & LANIER (1995) géis protéicos consistem de uma malha tridimensional de proteínas miofibrilares, interligada por pontes de

hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas e ligações covalentes. Alterações nas pontes de hidrogênio, ligações iônicas, interações dissulfídicas e hidrofóbicas ocorrem durante a transição para o estado desnaturado (ZIEGLER & ACTON, 1984).

A formação de gel com textura desejável é dependente não somente da composição de aminoácidos, peso molecular, hidrofobicidade, concentração, taxas de aquecimento e resfriamento, pH, e estado *post-mortem* do músculo, mas também do método de pesca, estação do ano, espécie de pescado e tipo de músculo envolvido (MORRISEY *et al.*, 1982; CHAN *et al.*, 1992).

A menor concentração de proteína necessária para a formação de um gel pode ser usada como medida da capacidade gelatinizante das proteínas miofibrilares, tendo no pH, força iônica e condições de aquecimento usados na obtenção do gel, os fatores que mais influenciam as características de textura do mesmo (GRABOWSKA & SIKORSKI, 1976; LANIER, 1986).

Segundo SAMEJIMA *et al.* (1982) e SMITH (1988) as propriedades de gelatinização da miosina, em sistemas modelo, são melhoradas na presença de actina entretanto, a tropomiosina e troponina não possuem influência na força de géis protéicos.

Cadeias pesadas intactas da miosina são importantes na obtenção de géis protéicos de máxima força, uma vez que as cadeias leves dissociam-se e são solubilizadas durante o aquecimento. Subfragmentos da miosina produzem géis mais fracos do que as cadeias pesadas da miosina (SMITH, 1988).

Segundo SUZUKI (1981) e LANIER (1986) as proteínas sarcoplasmáticas interferem na propriedade de gelatinização, fazendo necessária a sua remoção quando se realiza a extração de proteínas para esta finalidade. Estas proteínas

causam a interrupção das ligações cruzadas contínuas das proteínas miofibrilares e introduzem atividade proteolítica à mistura.

De acordo com PARK *et al.* (1990) o estado *post-mortem* em pescado, especialmente o *rigor mortis*, afeta desfavoravelmente a formação de géis de proteínas miofibrilares, sugerindo que a queda significativa do pH, promove a desnaturação protéica. Os autores atribuíram ao estado de *pre-rigor mortis* em tilápia, a maior extração protéica e obtenção de géis com melhor textura.

Relatos da literatura indicam que valores de pH na faixa de 6,0-6,5 propiciam melhor textura de géis protéicos obtidos a partir de peixes (BEAS *et al.*, 1988; CARECHE *et al.*, 1991; LAN *et al.*, 1995; COFRADES *et al.*, 1997).

As condições de resfriamento requeridas para permitir a gelatinização, também afetam as características físicas dos géis. Após o resfriamento, os polipeptídeos enovelados, enrolados, associam-se para formar a malha. As ligações cruzadas formadas envolvem muitas pontes de hidrogênio, atrações iônicas, pontes dissulfídicas e associações hidrofóbicas (FERRY, 1948).

As proteínas miofibrilares de animais de sangue frio, a exemplo do pescado, são menos estáveis quando submetidas a tratamento térmico (CONNEL, 1961), especialmente na presença de 0,5-0,6M de NaCl. Neste caso específico, para que se obtenham géis mais estáveis e resistentes são utilizadas duas faixas de temperatura, que consistem de um aquecimento inicial (*setting*) a 40° C por 30-60 minutos, seguido de outro geralmente, a 90° C por 30 minutos (LANIER, 1986; ROUSSEL & CHEFTEL, 1988).

A temperatura empregada na pré-incubação depende da espécie de pescado envolvida, ou seja, peixes com menor temperatura corporal requerem

diminuição da taxa e temperatura empregadas durante o *setting* (RODGERS *et al.*, 1987).

O fenômeno conhecido como *setting* é definido como o estado em que as propriedades reológicas do pescado sob temperatura constante (40°C), mudam do estado sol para gel. A utilização da pré incubação (0-40° C) resulta em géis protéicos macios, translúcidos e coesos e o subsequente aquecimento a 60-90° C, provoca aumento da opacidade e da força do gel e maior capacidade de retenção da água (LEE & LANIER, 1995).

CHENG *et al.* (1979a) e XIONG & BREKKE (1989) verificaram que ocorre a degradação da miosina em algumas espécies de pescado, quando aquecidas em temperatura na faixa de 60-70° C, resultando em géis mais frágeis devido à ação de enzimas proteolíticas, oriundas da contaminação por conteúdo intestinal ou resíduos de órgãos, durante a etapa de evisceração do pescado.

Vários relatos na literatura indicam decréscimo da dureza de géis protéicos em função da temperatura e tempo de estocagem (CHENG *et al.*, 1979b; SMITH, 1987; SCOTT *et al.*, 1988; SYCH *et al.*, 1991; MACDONALD *et al.*, 1992).

SMITH (1987) relatou em estudo com proteínas miofibrilares extraídas de músculo de peru, que a dureza e a coesividade dos géis protéicos diminuiram durante a estocagem sob congelamento, constatando que mesmo o uso de antioxidantes não preveniu modificações significativas deste parâmetro. As modificações na estrutura dos géis apresentou forte correlação com alterações da solubilidade e atividade ATPásica durante o congelamento, sugerindo processo de desnaturação comprometendo a integridade da matriz dos géis, o que está de acordo com observações de KINSELLA (1976) de que a desnaturação geralmente tem caráter indesejável , uma vez que resulta em propriedades físico-químicas

alteradas, particularmente, em diminuição/perda da solubilidade e demais propriedades funcionais do material.

SCOTT *et al.* (1988) observaram que géis confeccionados a partir de proteínas miofibrilares de diferentes espécies de pescado, estocados por períodos longos a -29° C, tenderam a ser menos resistentes e menos elásticos, cuja força decrescia com o tempo de estocagem.

MACDONALD *et al.* (1992) também verificaram em seu estudo com *Macruronus novaezelandiae* declínio da resistência do gel, quando estocado à mesma temperatura (-29° C) constatando ser este decorrente da queda do pH e aumento da concentração de formaldeído, que interage com as proteínas formando ligações cruzadas intra e intermoleculares levando à perda das propriedades funcionais. A queda do pH de acordo com os autores deve-se provavelmente à formação de ácidos graxos livres, hidrólise enzimática de ácidos neutros e fosfolipídeos.

Em desacordo com os autores supramencionados, CHENG *et al.* (1979b) e SYCH *et al.* (1991) relataram aumento da dureza em géis protéicos obtidos de bacalhau (*Gadus morhua*), em função da temperatura de estocagem e verificaram alto nível de correlação positiva entre a dureza do gel e a umidade espremível, sugerindo que o aumento da dureza está relacionado à perda da capacidade de retenção de água das proteínas miofibrilares.

Uma das formas de se medir a capacidade de retenção de água de um material é através da avaliação da umidade espremível, definida por JAUREGUI *et al.* (1981) como a quantidade de líquido liberado de um sistema protéico, pela aplicação de força centrífuga, dependendo a quantidade de água livre do tipo e intensidade da força aplicada.

Relatos de HENINGAR *et al.* (1989) mostram que menores valores de umidade espremível foram obtidos quando os géis protéicos foram elaborados a partir de músculo de pescado em estado de *pre-rigor*, quando comparado ao estado de *post-rigor mortis*.

A ocorrência da oxidação lipídica em músculos tem influência no comportamento funcional das proteínas miofibrilares. Alterações na capacidade de gelatinização decorrente da autooxidação, durante o armazenamento sob congelamento de pescado, têm sido relatadas na literatura, resultando em prejuízos à integridade da matriz do gel, com conseqüente comprometimento da capacidade de gelatinização das proteínas miofibrilares (DECKER *et al.*, 1993; XIONG *et al.*, 1993, POLLONIO, 1994).

DECKER *et al.* (1993) e XIONG *et al.* (1993) observaram que géis adicionados de antioxidante tiveram maiores valores de força (dureza) do que os sem antioxidante, indicando que uma melhor resposta da capacidade de gelatinização das proteínas miofibrilares é dependente da inibição da oxidação de lipídeos.

Intensa redução da firmeza e coesão de géis protéicos obtidos de proteínas miofibrilares, extraídas de carne mecanicamente desossada estocada a -18° C, foi observado por POLLONIO (1994). Segundo o autor, a desnaturação protéica e a interação com lipídeos oxidados resultaram na perda da dureza e estabilidade dos géis.

Este trabalho objetivou o estabelecimento da influência da oxidação lipídica na força de géis formados e umidade espremível, ao longo da estocagem sob congelamento de músculo de pacu a -20° C por 180 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Os filés de pacu foram obtidos conforme procedimento especificado no estudo 1.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice de TBA)

A análise do n° de TBA foi realizada de acordo com o método proposto por TARLADGIS *et al.* (1960), conforme descrito no estudo 2.

2.2.2 Extração das proteínas miofibrilares

Foi realizada segundo o método de XIONG & BREKKE (1989) modificado, como descrito anteriormente no estudo 1.

A fração miofibrilar foi dosada pelo método semi-micro Kjeldhal (AOAC, 1984), utilizada dentro de um prazo máximo de 24-48 horas, e mantida sob resfriamento (2-4° C).

2.2.3 Formação de géis protéicos

Os géis foram preparados de acordo com XIONG & BREKKE (1989), com algumas modificações.

Foi preparada uma dispersão de proteínas miofibrilares contendo 50 mg proteína/mL em solução- tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0 contendo 0,6 M de NaCl, para a dissolução da proteína miofibrilar. A dispersão foi submetida à agitação durante 3 minutos, em banho de gelo. O conteúdo foi colocado em béqueres (triplicata), fechados com filme plástico. Os frascos foram colocados em banho-maria a 40°C por 40 minutos, a seguir em outro banho a 90°C por 30 minutos e então resfriados bruscamente em banho com gelo durante 20 minutos. Os géis foram mantidos em refrigerador doméstico ($\pm 4^\circ \text{C}$) por 18 horas.

Os géis foram retirados do refrigerador e mantidos durante 1 hora em temperatura ambiente. Os géis foram mantidos nos frascos e a dureza analisada em texturômetro TA-XT2, que teve força de compressão programada para 50%.

2.2.4 Determinação da umidade espremível

Foi realizada segundo a metodologia proposta por JAUREGUI *et al.* (1981). Os géis foram retirados do refrigerador e mantidos em temperatura ambiente por 1 hora. Foi pesado 1,0 g do gel protéico em papel de filtro watman número 2, e o conjunto colocado em tubos de centrifuga. A seguir procedeu-se a centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos (centrífuga a 2-4°C). Após a centrifugação o gel foi retirado e o percentual de umidade espremível estabelecido pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade espremível} = \frac{\text{Peso papel úmido} - \text{peso do papel seco}}{\text{Peso da amostra(g)}} \times 100$$

2.2.5 Análise estatística

Foi realizada através de análise de variância e teste de Tukey usando o programa SAS (Statistical Analysis System).

3 RESULTADOS

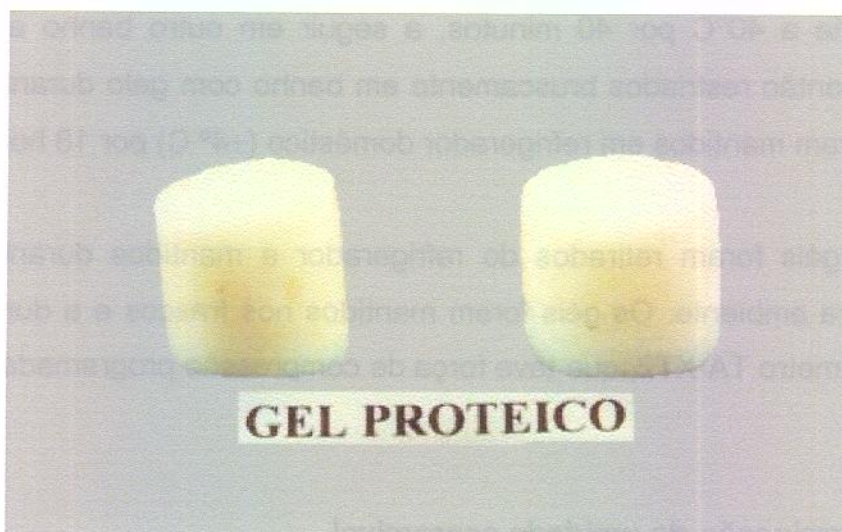


Figura 1. Gel protéico a 5%

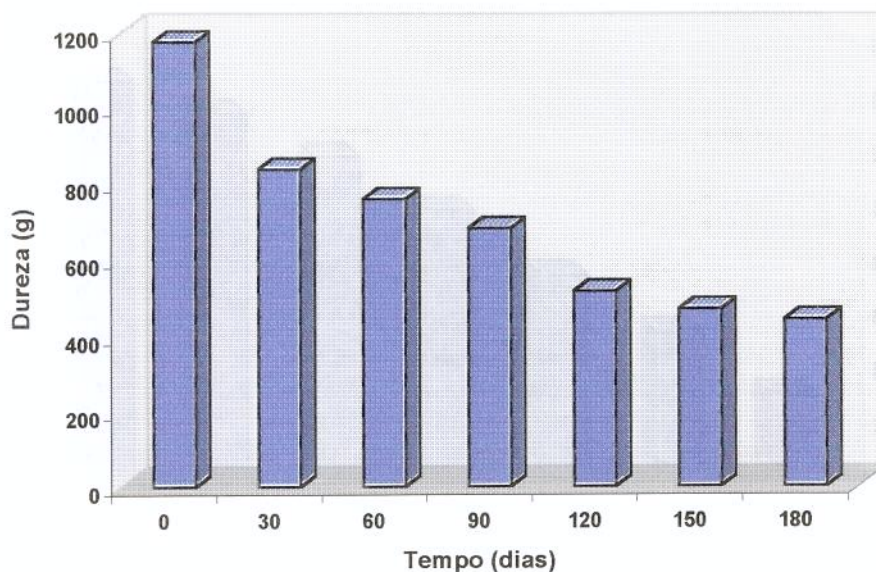


Figura 2. Avaliação da dureza de géis obtidos de proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu mantido sob congelamento (-20°C)

Tabela 1. Avaliação da dureza de géis de proteínas miofibrilares extraídas de músculo de pacu armazenado sob congelamento

Tempo (dias)	Dureza (g)
0	1173,74±74,10 a
30	837,26±67,74 b
60	758,25±61,89 b
90	681,14±51,66 b
120	517,21±123,12 c
150	471,06±44,54 c
180	442,21±44,91 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

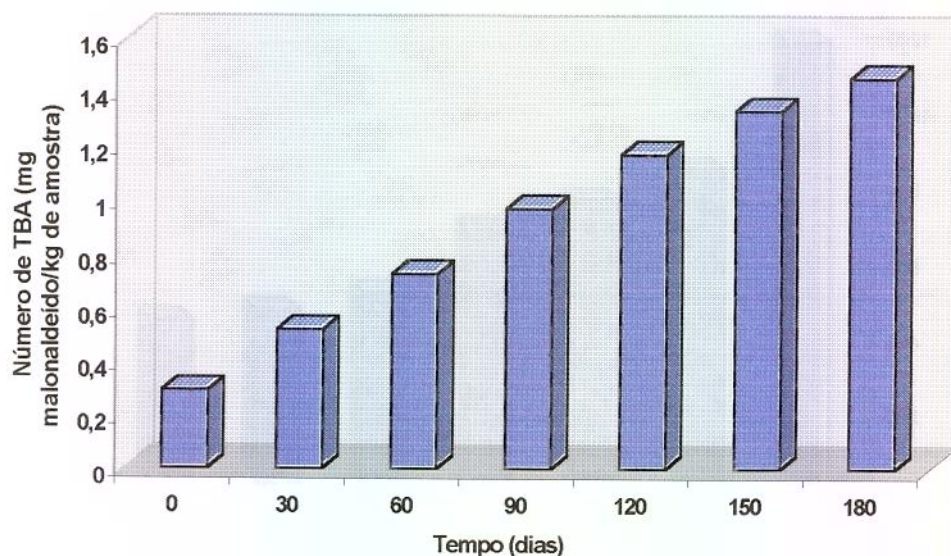


Figura 3. Avaliação da oxidação lipídica em músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 2. Avaliação da oxidação de lipídeos em músculo de pacu armazenado sob congelamento

Tempo (dias)	TBA (mg malonaldeído/kg de amostra)
0	0,29±0,01 a
30	0,52±0,02 b
60	0,73±0,04 c
90	0,97±0,02 d
120	1,17±0,09 e
150	1,33±0,06 f
180	1,45±0,09 f

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 3. Coeficientes de correlação (r) entre a dureza de géis protéicos, oxidação lipídica e propriedades funcionais em músculo de pacu armazenado a -20° C por 180 dias

	Solubilidade	Atividade Ca-ATPásica	Umidade espremível	TBA
Dureza	+0,96	+0,92	-0,95	-0,93

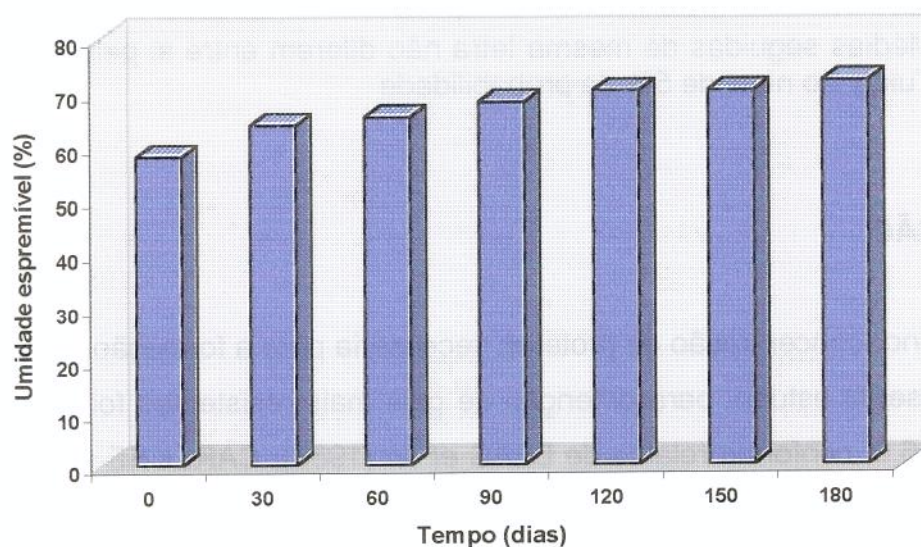


Figura 4. Avaliação da umidade espremível de géis obtidos de proteínas miofibrilares de músculo de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 4 Avaliação da umidade espremível de géis obtidos de proteínas miofibrilares de músculo de pacu armazenado a -20°C

Tempo (dias)	Umidade espremível (%)
0	57,81 $\pm$ 0,90 a
30	63,64 $\pm$ 1,79 b
60	65,17 $\pm$ 2,72 bc
90	67,93 $\pm$ 1,10 bcd
120	70,01 $\pm$ 1,92 cd
150	70,10 $\pm$ 1,92 cd
180	71,98 $\pm$ 1,85 d

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

4 DISCUSSÃO

A menor concentração de proteína necessária para a formação do gel foi de 3%. No presente estudo, para obtenção de géis mais resistentes foi utilizado pH na faixa de 6,0, conforme relatos de BEAS *et al.* (1988), CARECHE *et al.* (1991), LAN *et al.* (1995) e COFRADES *et al.* (1997).

A Figura 1 mostra o gel protéico na concentração de 5%, elaborado a partir de duas faixas de temperatura (40°C e 90°C). Foi observado que a utilização da temperatura de 40°C que caracteriza o *setting*, constitui-se em uma importante etapa na formação do gel, uma vez que possibilita a formação de uma malha protéica mais ordenada e forte (LEE & LANIER, 1995). A utilização de temperatura de 70°C conforme empregada no estudo de XIONG & BREKKE (1989), possibilitou a formação de géis mais frágeis, o que pode ser explicado pela provável ação de proteases alcalinas sobre as proteínas miofibrilares.

Os dados expostos na *Figura 2* e *Tabela 1* indicam decréscimo na força dos géis protéicos ao longo do armazenamento sob congelamento de acordo com relatos de CHENG *et al.* (1979b), SMITH (1987), SCOTT *et al.* (1988), decorrente da desnaturação das proteínas miofibrilares, comprometendo a integridade da rede protéica, resultando em géis mais frágeis.

Conforme mostrado na *Figura 3* e *Tabela 2* os níveis de TBA aumentaram significativamente ($P < 0,05$), indicando a ocorrência de processo de autooxidação de lipídeos, durante a estocagem sob congelamento. Estes resultados mostraram correlação com a diminuição da força dos géis (*Tabela 3*), indicando que lipídeos oxidados através da formação de complexos lipoprotéicos, podem ter contribuído para a redução da dureza dos géis, conforme mencionado por XIONG *et al.* (1993) e POLLONIO (1994).

A modificação na estrutura dos géis ao longo do processo de congelamento apresentou forte correlação com modificações da solubilidade, atividade ATPásica e umidade espremível, conforme verificado na *Tabela 3*, confirmando resultados obtidos por KINSELLA (1976) e SMITH (1987).

Pelo decréscimo observado nos valores da umidade espremível (*Figura 4* e *Tabela 4*), permite-se deduzir que estes não apresentaram intensa variação entre si ao longo de todo o período de estocagem, que de acordo com HENINGAR *et al.* (1989), pode ser explicada pela obtenção dos géis protéicos a partir de músculo de pacu em estado de *pre-rigor mortis*, o que propicia melhor propriedade de capacidade de retenção de água pelas proteínas miofibrilares. Pelos dados obtidos foi possível estabelecer correlação negativa entre a umidade espremível e a textura dos géis (*Tabela 3*), em desacordo com observações de CHENG *et al.* (1979b) e SYCH *et al.* (1991).

5 CONCLUSÕES

- Foi requerida a concentração mínima de 3% de proteína para a formação dos géis protéicos.
- A utilização da temperatura de pré-incubação a 40° C propicia a formação de géis mais firmes.
- A alta correlação verificada entre o decréscimo da dureza de géis protéicos e o aumento da oxidação de lipídeos durante a estocagem sob congelamento de músculo de pacu, indica que lipídeos oxidados podem ter contribuído à desnaturação das proteínas miofibrilares.
- As proteínas miofibrilares extraídas de músculo em estado de *pre-rigor mortis* permitem a formação de géis com menores percentuais de umidade espremível, ao longo da estocagem sob congelamento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C. 1984. **Official Methods of Analysis**, 14^a ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. DC.
- BEAS, V. E.; CRUPKIN, M.; TRUCCO, R. E. 1988. Gelling properties of actomyosin from pre and pro-spawning hake (*Merluccius hubsi*). **J. Food Sci.** 53: 1322-1326.
- CARECHE, M.; CURRAL, J.; MACKIE, I. M. 1991. A study of the effects of different factors on the heat-induced gelation of cod actomyosin using response surface methodology. **Food Chem.** 42 (1): 39-55.
- CHAN, J. K.; GILL, T. A.; PAULSON, A. T. 1992. Cross-linking of myosin heavy chain from cod, herring and silver hake during thermal setting. **J. Food Sci.** 57 (4): 960-912.
- CHENG, C. S.; HAMANN, D. D.; WEBB, N. B. 1979a. Effect of thermal processing on minced fish gel texture. **J. Food Sci.** 44: 1080-1086.
- CHENG, C. S.; HAMANN, D. D.; WEBB, N. B.; SIDWELL, V. 1979b. Effect of species and storage time on minced fish gel texture. **J. Food Sci.** 44: 1087-1092.
- COFRADES, S.; CARECHE, M.; CARBALLO, J.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. 1997. Thermal gelation of chicken, pork and hake (*Merluccius merluccius*, L.) actomyosin. **Meat Sci.** 47 (1/2): 157-166.
- CONNEL, J. J. 1961. The relative stabilities of the skeletal muscle myosin of some animals. **J. Biochem.** 8: 503-509.

- DECKER, E. A.; XIONG, Y. L.; CALVERT, J. T.; CRUM, A. D.; BLANCHARD, S. P. 1993. Chemical, physical and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. **J. Agric. Food Chem.** 41 (2): 186-189.
- FERRY, J. D. 1948. Protein gels. **Adv. Protein Chem.** 4: 1-28.
- GLICKSMAN, M. 1982. Functional properties of hydrocolloids. Vol.1. In **Food Hydrocolloids**, M. Glicksman, p.47, CRC Press, Florida.
- GRABOWSKA, J.; SIKORSKI, Z. E. 1976. The gel-forming capacity of fish myofibrillar proteins. **Lebensm. Wiss. Technol.** 9 (1): 33-35.
- HENINGAR, C. J.; BUCK, E. M.; HULTIN, H. O.; PELEG, M.; VARELTZIS, K. 1989. Mechanical properties of fish and beef gels prepared with and without washing and sodium chloride. **J. Food Quality.** 12: 155-166.
- JAUREGUI, C. A.; REGENTEIN, J. M.; BAKER, R. C. 1981. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture- a water-binding property of muscle foods. **J. Food Sci.** 46 (4): 1271-1273.
- KINSELLA, J. E. 1976. Functional properties of proteins. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 4: 219-280.
- LAN, Y. L.; NOVAKOFSKI, J.; MCCUSKER, R. H.; BREWER, M. S.; CARR, T. R.; MCKEITH, F. K. 1995. Thermal gelation of myofibrils from pork, beef, fish, chicken and turkey. **J. Food Sci.** 60 (6): 936-940.
- LANIER, T. C. 1986. Functional properties of surimi. **Food Tech.** 40: 107-113, 124.

- LEE, H. G.; LANIER, T. C. 1995. The role of covalent cross-linking in the texturizing of muscle protein sols. **J. Muscle Food** 6: 125-138.
- MACDONALD, G. A.; LELIEVRE, J.; WILSON, N. D. C. 1992. Effect of frozen storage on the gel-forming properties of hoki (*Macruronus novaezelandiae*). **J. Food Sci.** 57 (1): 69-71.
- MORRISEY, P. A.; MULHIVIL, D. M.; O'NEILL, E. M. 1982. Functional properties of muscle proteins. Cap.1. In **Developments in Food Proteins-5**, B. J. F. Hudson, p.196. Elsevier Applied Science, London.
- PARK, J. W.; KORHONEN, R. W.; LANIER, T. C. 1990. Effect of "rigor mortis" on gel forming properties of surimi and unwashed minced prepared from tilapia. **J. Food Sci.** 55 (2): 353-355.
- POLLONIO, M. A. R. 1994. Estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de carne mecanicamente desossada. **Tese de Doutorado**, Unicamp, Campinas, SP.
- RODGERS, M. E.; KARR, T.; BIODERMAN, K.; UENO, W.; HARINGTON, W. F. 1987. Thermal stability of myosin rod from various species. **Biochemistry**. 26: 270.
- ROUSSEL, H.; CHEFTEL, J. C. 1988. Characteristics of surimi and kamaboko from sardines. **Int. J. Food Sci. Tech.** 23: 607-623.
- SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M.; YASUI, T. 1982. Heat induced gelling properties of actomyosin: effect of tropomyosin and troponin. **Agric. Biol. Chem.** 46 (2): 535-540.

- SAS. 1985. **Statistical Analysis System User's Guide: Statistics**. SAS Institute, Inc., Cary NC, SAS Institute Inc.
- SCOTT, D. N.; PORTER, R. W.; KUDO, G.; MILLER, R.; KOURY, B. 1988. Effect of freezing and frozen storage of alaska pollock on the chemical properties of surimi. **J. Food Sci.** 53 (2): 353-358.
- SMITH, D. M. 1987. Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. **J. Food Sci.** 52 (1): 22-27.
- SMITH, D. M. 1988. Meat proteins: functional properties in comminuted meat products. **Food Tech.** 42 (4): 116-121.
- SUZUKI, T. 1981. Characteristics of fish and fish protein. Cap. 1. In **Fish and Krill Protein**,. p.1-56. Applied Science Publishers Ltd., London.
- SYCH, J.; LACROIX, C.; ADAMBOUNOU, L. T.; CASTAIGNE, F. 1991. The effect of low- or non- sweet additives on the stability of protein functional properties of frozen cod surimi. **Int. J. Food Sci. Technol.** 26 (2): 185-197.
- TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNNATHAN, M. T. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 37 (1): 44-48.
- XIONG, Y. L.; BREKKE, C. J. 1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrills during frozen storage. **J. Food Sci.** 54 (5): 1141-1146.

- XIONG, Y. L.; DECKER, E. A.; ROBE, G. H.; MOODY, W. G. 1993. Gelation of crude myofibrillar protein isolated from beef heart under antioxidative conditions. **J. Food Sci.** 58 (6): 1241-1244.
- ZIEGLER, Y. L; ACTON, J. C. 1984. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. **Food Technol.** 5: 77-82.

7 ESTUDO 5- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS E SENSORIAIS DE HAMBÚRGUER DE PACU (*Colossoma mitrei*) ARMAZENADO SOB CONGELAMENTO

1 INTRODUÇÃO

O congelamento é um dos melhores métodos de preservação empregados em produtos de origem animal, sendo utilizado para aumentar o tempo de vida útil destes. Entretanto, mesmo após estocagem em temperaturas em torno de -20°C, ocorrem modificações indesejáveis, ficando a vida de prateleira limitada por alterações nas frações lipídica e protéica, denominadas, respectivamente de oxidação lipídica e desnaturação protéica, ambas levando à alterações nas propriedades funcionais das proteínas miofibrilares, especialmente da miosina e actina (SIKORSKI *et al.*, 1976).

O pescado, de acordo com STANSBY (1962), baseado no teor de gordura e proteínas, pode ser classificado segundo categorias distintas (A, B, C, D, E), sendo enquadrado na categoria A o pescado que apresenta baixo teor de gordura (menor do que 5%) e alto teor protéico (entre 15 a 20%).

Os lipídeos de pescado são conhecidos por sua susceptibilidade à rancidez oxidativa, particularmente durante a estocagem sob congelamento, devido à alta proporção de ácidos graxos insaturados, contendo geralmente 4, 5 ou 6 ligações duplas (SHENOUDA, 1980).

Relatos de MACHADO (1989) e MAIA *et al.* (1995) indicam que filés de pacu apresentam 33,55% de ácidos graxos saturados e 63,86% de ácidos insaturados.

As reações de oxidação são afetadas pelo oxigênio, calor, metais, pigmentos e grau de insaturação de ácidos graxos (KHAYAT & SCHWALL, 1983; ERIKSSON, 1987). Entretanto, durante o processamento outros fatores estão envolvidos neste processo, como a composição e estado de frescor dos componentes cárneos, cozimento ou aquecimento, trituração, desossa mecânica e a adição de compostos endógenos como sal, levando ao decréscimo da funcionalidade protéica (GRAY & PEARSON, 1987; KANNER, 1994).

DENG *et al.* (1977) constataram que o início rápido da oxidação lipídica em *Mugil cephalus*, deve-se ao pigmento heme presente na linha lateral dos filés, que age como catalisador da oxidação de ácidos graxos insaturados.

A oxidação de lipídeos constitui-se num dos principais causadores de deterioração da qualidade em músculos. Lipídeos oxidados ligam-se à proteínas, formando complexos lipoprotéicos insolúveis, levando à alteração de “flavor”, modificação de cor (escurecimento), destruição de nutrientes, modificação na textura (maior resistência) e formação de compostos tóxicos, além de influenciar negativamente a funcionalidade das proteínas (HSIEH & KINSELLA, 1989; XIONG, 1995).

As medidas objetivas de textura são importantes para estudar as modificações das propriedades reológicas dos tecidos durante a estocagem sob congelamento. Instrumentos têm sido designados para simular sensações como mastigação, dureza, coesividade, elasticidade, gomosidade, etc. As modificações texturais em tecidos durante o congelamento podem ser então quantitativamente monitoradas com maior exatidão (SHENOUDA, 1980).

O perfil da textura pode ser medido através de testes de compressão e/ou penetração, e o texturômetro TA-XT2, baseando-se em análises de curvas

força/tempo e força/distância, permite a análise dos parâmetros mecânicos do produto (BOURNE, 1978).

O pescado pode tornar-se progressivamente mais rígido e fibroso durante a estocagem sob congelamento, originando atributos sensoriais descritos como esponjosidade, elasticidade, textura de borracha, perda de suculência e prejuízos à capacidade de retenção de água. Alguns tecnólogos reconhecem que a desnaturação e a agregação de proteínas em pescado, particularmente aquelas das frações miofibrilares, estão normalmente associadas com alterações na textura do pescado congelado (DYER, 1951; SHENOUDA, 1980; ACTON *et al.*, 1983; HAARD, 1992).

Durante a estocagem sob congelamento, as proteínas musculares sofrem desnaturação devido a causas variadas, entre elas o prejuízo causada pela formação e agregação de cristais, desidratação, aumento da concentração salina e modificações no pH. A desnaturação leva a ligações cruzadas nas proteínas musculares, particularmente da actomiosina, e formação de uma malha tridimensional, que resulta em textura mais rígida (LEBLANC *et al.*, 1988). Estas modificações protéicas, em sistemas modelo, podem ser retardadas por lipídeos neutros e aceleradas por ácidos graxos livres, que reagem com as proteínas miofibrilares produzindo uma malha de ligações cruzadas, que aumenta a resistência das fibras musculares à fragmentação (SIKORSKI *et al.*, 1976).

A capacidade de retenção de água pelas proteínas miofibrilares, constitui-se em uma importante propriedade funcional, porque desta dependem os atributos de textura, suculência e maciez de seus produtos, sendo definida por HAMM (1960) como sendo a capacidade da carne reter sua própria água, ou a água adicionada durante a aplicação de forças externas, tais como: pressão, aquecimento, trituração, centrifugação e outras. É altamente influenciada pela

extração das proteínas, tratamento mecânico, temperatura, ambiente iônico e pH (ACTON *et al.*, 1983).

Um fator importante na textura é o estado *post-mortem*. HAMM (1981) verificou que o processamento de carne em estado de *pre-rigor* resulta em produtos de excelente qualidade, decorrente da alta capacidade de retenção de água deste material, devido à presença do ATP. Segundo o autor, a capacidade de retenção da água pode ser mantida por muitos meses, através do congelamento rápido de produtos reestruturados, obtidos a partir de músculo em *pre-rigor*. Entretanto, KRAMER & PETERS (1981) em estudo com filés de pescado da espécie *Sebastes flavidus*, observaram maiores valores de dureza quando utilizado peixe no estado de *pre-rigor*, comparado ao estado de *rigor* e *post-rigor mortis*. Os autores deduziram que a maior dureza estava relacionada à contração das fibras musculares, durante o *rigor* do descongelamento.

A deterioração da cor em produtos à base de pescado constitui-se em modificação indesejável, uma vez que geralmente representa o primeiro parâmetro através do qual o consumidor julga a qualidade da carne. Segundo KHAYAT & SCHWALL (1983) e ERIKSSON (1987) a alteração da cor pode ocorrer em pescado armazenado à temperatura de congelamento, devido ao seu alto teor de ácido graxos insaturados, produzindo hidroperóxidos e produtos secundários, que reagem com as proteínas, pigmentos, enzimas e vitaminas, levando à descoloração muscular, caracterizada pelo escurecimento da cor original.

A descoloração da carne, comumente chamada de queima pelo frio, é ocasionada pela dessecação superficial que, além de interferir na cor, prejudica também a aparência comercial. A dessecação traz, em consequência, a concentração de sais na superfície determinando a oxidação do pigmento do músculo e transformando-o em metamioglobina de cor marrom. Este processo é acelerado pela flutuação da temperatura de estocagem, visto que esta favorece a

sublimação do gelo no tecido. As superfícies expostas absorvem o oxigênio rapidamente, com concomitante oxidação de ácidos graxos insaturados (OGAWA & MAIA, 1999).

JAUREGUI & BAKER (1980) verificaram modificação da cor em músculo cominuído durante o período de estocagem sob congelamento e deduziram ser isto resultado da incorporação de pigmentos da pele ao músculo durante o processo de trituração.

SHENOUDA (1980) define a ocorrência do "browning" na superfície de algumas espécies de pescado, como consequência da reação entre aminas (metabolismo bacteriano) e compostos carbonil (oxidação lipídica).

HSIEH & KINSELLA (1989) relatam que hidroperóxidos interagem com pigmentos e outras macromoléculas, causando a descoloração, ou seja, a modificação da cor original do músculo de pescado.

COHEN *et al.* (1977), HUFFMAN *et al.* (1981) e GHADI & NINJOOR (1988) postularam que o uso de cloreto de sódio (NaCl) melhora a textura de produtos reestruturados pela diminuição das perdas pelo cozimento, além de influir positivamente na coloração dos mesmos. Entretanto, relatos de KOETZ (1977), RAHARJO *et al.* (1989) e KANNER *et al.* (1991) mostraram o efeito do NaCl como prooxidante, acelerando os níveis da oxidação lipídica em produtos reestruturados armazenados sob congelamento.

Relatos na literatura têm mostrado que embora os níveis da oxidação lipídica tenham aumentado durante o congelamento, o "flavor" rançoso não é facilmente perceptível com o decorrer da estocagem (MILLER *et al.*, 1980; HUFFMAN *et al.*, 1981; MAIA *et al.*, 1982; BORDERIAS *et al.*, 1982; VARELTZIS *et al.*, 1988).

Modificações na textura após o congelamento de pescado, podem ser observadas em estudos de vários pesquisadores (AWAD *et al.*, 1969; SIKORSKI *et al.*, 1976; NAKAYAMA & YAMAMOTO, 1977; MILLER *et al.*, 1980; REDDY & SRIKAR, 1991). Entretanto, pesquisas com peixes tropicais conduzidas por MAIA *et al.* (1982) e VARELTZIS *et al.* (1988) não evidenciaram modificações na textura ao longo da estocagem sob congelamento.

De acordo com POULTER *et al.* (1981) espécies tropicais de pescado parecem ser menos vulneráveis à deterioração da textura do que espécies de clima temperado. Os autores observaram que a miosina de peixes de águas frias é mais susceptível à formação de ligações cruzadas que a de pescado de espécies tropicais.

AWAD *et al.* (1969) observaram aumento da textura, através de avaliação organoléptica de filés de pescado da espécie *Coregonus clupeiformis*, após 16 semanas de estocagem a -10° C. Inicialmente a textura foi caracterizada como macia, porém após 16 semanas sob congelamento, os provadores detectaram dureza muito acentuada nos filés. Os autores correlacionaram a diminuição da solubilidade com o aumento da dureza, sendo esta correlação especialmente observada entre a 3ª e 16ª semanas de estocagem.

NAKAYAMA & YAMAMOTO (1977) em estudo com diferentes espécies de pescado, mantidas estocadas sob congelamento (-20° C) por 6 meses, observaram tendência ao escurecimento, pela diminuição dos valores correspondentes à luminosidade (L). Entretanto, nenhuma das espécies mostrou alteração quanto ao parâmetro (a), referente à cor vermelha. Os autores relataram aumento do número de TBA, concomitantemente com a modificação da cor, o que pode indicar o envolvimento de lipídeos oxidados ou compostos secundários nesta alteração. Foi observada também tendência a maior firmeza das amostras do

pescado após o cozimento, porém este parâmetro aumentou levemente e de forma gradativa.

OCKERMAN & ORGANISCIK (1979) observaram leve modificação na textura de produtos reestruturados ("steaks"), mantidos sob congelamento por até 90 dias, enfatizando que a modificação ocorrida foi suave e lenta. Os autores constataram fraca correlação entre a dureza e a oxidação de lipídeos.

MILLER *et al.* (1980) avaliaram a textura em salsichas elaboradas com carne bovina, estocadas a -18° C, através de análise sensorial (teste triangular) e verificaram diferença significativa entre as amostras frescas e congeladas durante o período de estocagem. O número de respostas corretas aumentou com o decorrer do tempo de congelamento iniciando o primeiro mês com 50% de respostas corretas, atingindo após 25 semanas de estocagem 90% de respostas corretas. Os provadores observaram ao fim do período de estocagem, aumento da textura, concluindo que estas modificações foram possivelmente induzidas por lipídeos, uma vez que os níveis de oxidação aumentaram significativamente ao longo do armazenamento.

MAIA *et al.* (1982) em estudo com "patties" feitos a partir de curimatá (*Prochilodus scrofa*), observaram a ausência de diferença na textura do produto, cuja estabilidade se deve provavelmente ao baixo conteúdo de ácidos graxos insaturados desta espécie. O produto elaborado manteve boa qualidade e aceitabilidade durante todo o experimento (92 dias a -20°C), sem a adição de preservativos, o que está de acordo com dados obtidos por KOETZ (1977), em estudo com hambúrguer de uma mistura de corvina (*Micropogon furnieri*) e castanha (*Umbrina conosai*) que apresentou boa aceitabilidade durante 85 dias de estocagem a -30°C.

BORDERIAS *et al.* (1982) constataram pouca diferença na textura em truta (*Salmo irideus*) triturada, estocada por 165 dias a -20° C, e os autores justificam este fato pela leve modificação ocorrida na solubilidade durante este período. A análise sensorial não mostrou modificações da textura no músculo inteiro, sendo observadas leves variações apenas no músculo triturado, após 75 dias de estocagem a -20° C.

HSIEH & REGENSTEIN (1989) relataram que em pescado triturado mantido sob congelamento a -20°C não houve modificação significativa na textura, sugerindo que a deterioração na textura não ocorre de forma rápida nesta faixa de temperatura, porém, no início do congelamento ocorreu um pequeno aumento na textura, concluindo os autores que isto se deve presumivelmente à formação de ligações cruzadas e ao fato do tecido (proteínas) tornar-se mais insolúvel e rijo. A coesividade teve comportamento similar à dureza, correlacionando-se fortemente com a dureza (+0,95) nas espécies de pescado estudadas.

REDDY & SRIKAR (1991) constataram aumento na textura (dureza) em pescado triturado da espécie *Nemipterus japonicus*, durante estocagem sob congelamento a -18° C, concluindo que isto se devia principalmente a uma redução da solubilidade, como consequência de agregação protéica. Ainda assim, o pescado foi considerado aceitável quanto ao parâmetro textura, após estocagem por 145 dias.

PÉREZ-VILARREAL & HOWGATE (1991) em estudo com merluza observaram leve aumento na dureza durante o período de estocagem de 40 semanas a -20°C e mostraram que não houve variação intensa nas perdas pelo cozimento, o que pode ser devido à ação do NaCl (retenção da umidade pelo sal). Entretanto, VERMA *et al.* (1995) em estudo com músculo de sardinha triturada estocada a -20°C por 150 dias, observaram perdas da capacidade de retenção de água durante o cozimento, em torno de 30% do valor inicial

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer a correlação entre o desenvolvimento da oxidação lipídica durante o congelamento de hambúrgueres de pacu a -20° C por 150 dias e possíveis alterações da cor e da textura dos produtos ao longo do armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria Prima

Os hambúrgueres foram elaborados a partir de filés de pacu (obtidos de peixes capturados no período de inverno (Junho), conforme procedimento especificado no estudo 1), mantidos à temperatura de 0-2° C, elaborados a partir da seguinte formulação: músculo 88,4%; gelo 10,0%; glutamato monossódico (Ajinomoto) 0,10%; sal 1,5%. Amostras do produto foram separadas para determinação de análises físico-químicas, e o restante congeladas em congelador de placas a -30°C e estocadas em câmara fria a -20°C por até 5 meses.

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Caracterização química

Foram realizadas as seguintes determinações:

- Umidade, proteína bruta e cinzas segundo os procedimentos da AOAC (1984).
- Lipídeos totais de acordo com a metodologia descrita por BLIGH & DYER (1959).
- Nitrogênio não-protéico por modificação do método descrito por BECKER *et al.* (1940).

Todas as análises foram conduzidas em triplicata

2.2.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (índice de TBA)

A análise do n° de TBA foi realizada de acordo com o método proposto por TARLADGIS *et al.* (1960), conforme descrito no estudo 2.

2.2.3 Avaliação da cor

A cor foi avaliada pelo colorímetro Minolta modelo CR 200b, previamente calibrado, obtendo-se os parâmetros de L (luminosidade), a (intensidade do vermelho) e b (intensidade do amarelo). As análises foram conduzidas em triplicata, sendo utilizadas três amostras por leitura.

2.2.4 Avaliação do perfil de textura

A textura foi realizada no hambúrguer após processo de fritura em chapa elétrica a 200°C por 7 minutos. Foram utilizadas três amostras por leitura e as determinações realizadas em triplicata.

O perfil de textura foi analisado em texturômetro TA-XT2 (devidamente calibrado), com probe cilíndrico de acrílico com diâmetro de 20 mm, com o produto à temperatura ambiente. O texturômetro teve força de compressão programada para 50%.

2.2.5 Avaliação da perda de peso no cozimento (%)

Hambúrgueres fritos à temperatura de 200° C por 7 minutos em chapa elétrica, foram dispostos em recipientes com tampa. Após atingirem a temperatura ambiente foram novamente pesados. O cálculo do percentual da perda de peso no cozimento foi estabelecido pela diferença do peso antes e depois do tratamento térmico. A determinação foi realizada em triplicata.

2.2.6 Avaliação sensorial

Foi utilizado o teste triangular segundo as determinações de LARMOND (1987).

Os hambúrgueres foram submetidos a processo de fritura em chapa elétrica a 200°C por 7 minutos. A seguir cada hambúrguer foi fracionado em 04 porções e após a fritura de todo o lote estes foram encaminhados ao laboratório. Foram utilizados no total 21 provadores durante o experimento. Cada provador recebeu segundo o determinado pelo teste triangular, 03 amostras ($\pm 20g$) devidamente codificadas, sendo duas iguais e uma diferente (amostras de hambúrguer fresco e congelado), à temperatura de aproximadamente 60°C, que foram acompanhadas por água, torradas e fichas de avaliação sensorial. Os resultados indicam se há ou não diferença entre duas amostras.

2.2.7 Análise estatística

Foi realizada através de análise de variância e teste de Tukey usando o programa SAS (Statistical Analysis System). A análise estatística do teste triangular foi realizada de acordo com a tabela elaborada por ROESSLER *et al.* (1948).

3 RESULTADOS



Figura 1. Hambúrguer de pacu fresco

Tabela 1. Composição química de hambúrguer de pacu

Parâmetros	Valores médios (%)
Umidade	79,55±0,15
Proteína (Nt-NNP x 6,25)	15,24±0,14
Lipídeos	3,33±0,01
Cinzas	1,63±0,02
NNP	0,27±0,01

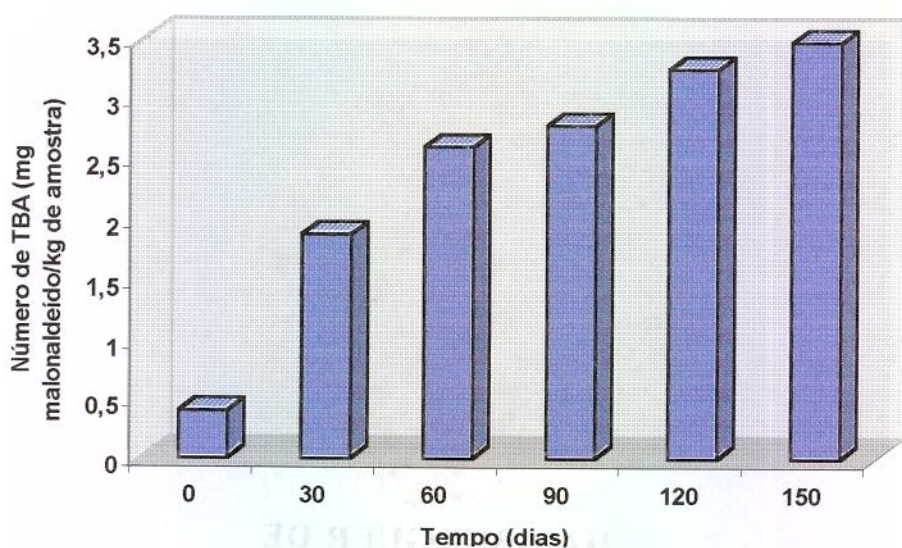


Figura 2. Avaliação da oxidação lipídica em hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 2. Avaliação da oxidação de lipídeos em hambúrguer de pacu armazenado a -20°C

Tempo (dias)	TBA (mg malonaldeído/kg de amostra)
0	0,40±0,01 a
30	1,88±0,04 b
60	2,64±0,01 c
90	2,78±0,22 c
120	3,25±0,09 d
150	3,48±0,03 d

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

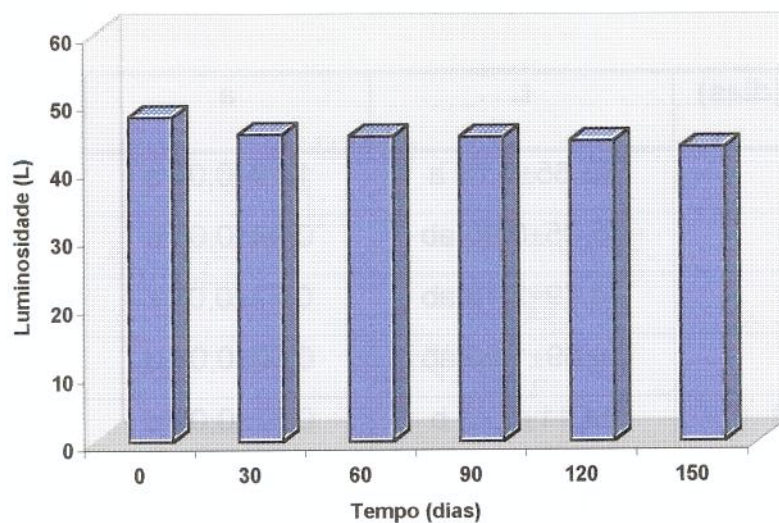


Figura 3. Avaliação da luminosidade (L) em hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

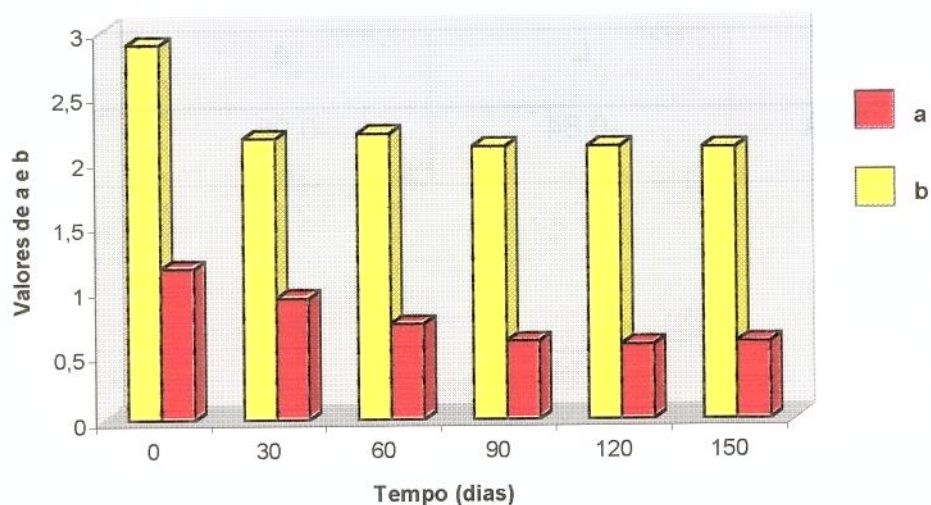


Figura 4 .Avaliação da cor (a e b) em hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 3. Avaliação da cor (L,a,b) em hambúrguer de pacu estocado a -20° C

Tempo (dias)	L	a	b
0	46,65±0,75 a	1,16±0,02 a	2,89±0,20 a
30	45,05±0,90 ab	0,93±0,06 b	2,16±0,16 b
60	44,79±2,13 ab	0,73±0,05 c	2,20±0,15 b
90	44,69±1,50 ab	0,60±0,03 d	2,10±0,20 b
120	44,11±0,47 b	0,57±0,03 d	2,09±0,10 b
150	43,23±0,78 b	0,59±0,03 d	2,00±0,14 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 4. Coeficientes de correlação (r) entre a oxidação de lipídeos e os parâmetros de cor (L, a, b) em hambúrguer de pacu mantido a -20° C por 150 dias

	L	a	b
TBA	-0,84	-0,96	-0,87

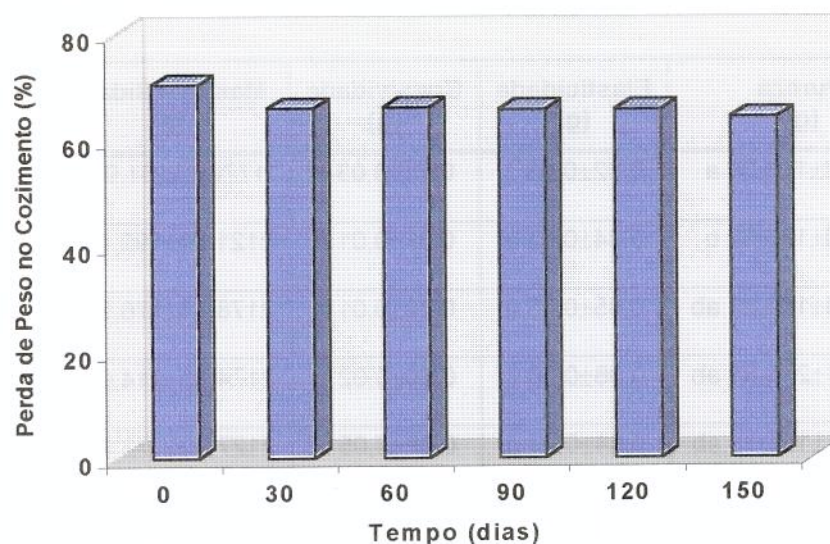


Figura 5. Avaliação da perda de peso no cozimento de hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento (-20° C)

Tabela 5. Avaliação da perda de peso no cozimento de hambúrguer de pacu estocado a -20° C

Tempo (dias)	Perda de peso no cozimento (%)
0	70,50±1,12 a
30	65,95±0,74 b
60	66,15±1,72 b
90	65,76±1,32 b
120	65,79±2,31 b
150	64,43±0,99 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 6. Avaliação do perfil de textura de hambúrguer armazenado sob congelamento (-20° C)

Dias	Dureza (g)	Elasticidade (g)	Coesividade (g)	Mastigabilidade (g)	Gomosidade (g)
0	3071,12±128,34 a	0,82±0,03 a	0,71±0,03 a	1778,83±61,95 a	2071,00±37,27 a
30	3700,60±183,52 b	0,84±0,03 a	0,68±0,01 a	2121,20±199,47 a	2526,01±167,00 b
60	3641,58±149,83 ab	0,85±0,03 a	0,69±0,01 a	2178,14±176,99 a	2626,03±96,10 b
90	3615,31±275,81 ab	0,86±0,06 a	0,69±0,02 a	2174,85±214,60 a	2505,57±212,90 ab
120	3601,81±123,12 ab	0,84±0,04 a	0,69±0,05 a	2127,02±172,92 a	2494,13±237,96 ab
150	3580,08±323,25 ab	0,83±0,01 a	0,68±0,01 a	2089,29±115,06 a	2435,66±140,21 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 7. Coeficientes de correlação (r) entre a dureza, perda de peso no cozimento e a coesividade em hambúrguer de pacu armazenado a -20° C por 150 dias

	Perda de peso no cozimento	Coesividade
Dureza	+0,83	+0,89

Tabela 8. Coeficientes de correlação entre a oxidação de lipídeos e o perfil de textura de hambúrguer de pacu armazenado a -20° C

	Dureza	Gomosidade	Mastigabilidade	Elasticidade	Coesividade
TBA	+0,56	+0,61	+0,25	+0,17	-0,40

Tabela 9. Avaliação sensorial triangular de hambúrguer de pacu armazenado sob congelamento

Congelamento (dias)	Respostas corretas (%)	Resultado do teste triangular
30	43	Não existe diferença significativa
60	67	Existe diferença ao nível de 1%
90	71	Existe diferença ao nível de 0,1%
120	71	Existe diferença ao nível de 0,1%
150	81	Existe diferença ao nível de 0,1%

4 DISCUSSÃO

Composição química/ Oxidação de lipídeos

O hambúrguer elaborado a partir de pescado fresco pode ser observado na *Figura 1* e os dados referentes a sua caracterização química apresentados na *Tabela 1*, podendo ser constatada a relação inversa entre o teor de umidade e lipídeos.

Embora os hambúrgueres apresentem baixo teor de lipídeos (3,33%) segundo a classificação proposta por STANSBY (1962), os níveis de oxidação (*Tabela 2* e *Figura 2*), avaliados pelo teste de TBA, aumentaram significativamente durante a estocagem sob congelamento. Isto pode ser explicado inicialmente, pelo alto teor de ácidos graxos insaturados desta espécie de pescado, segundo relatos

de MACHADO (1989) e MAIA *et al.* (1995). Entretanto, como se trabalhou com produto reestruturado, o próprio processo de trituração muscular, permitindo a incorporação do oxigênio atmosférico, associada à presença de pigmentos heme, oriundos da linha lateral dos filés, podem ter favorecido o desencadeamento da autooxidação, de acordo com DENG *et al.* (1977) e KHAYAT & SCHWALL (1983). Além do que, o cloreto de sódio (NaCl) devido ao seu efeito prooxidante, pode também contribuído para o desencadeamento das reações oxidativas, de acordo com relatos de KOETZ (1977), RAHARJO *et al.* (1989) e KANNER *et al.* (1991).

Cor

Pela *Figura 3* é possível verificar leve decréscimo do parâmetro L (luminosidade) em hambúrguer de pacu ao longo do armazenamento sob congelamento, indicando escurecimento da cor original do produto. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas na *Tabela 3*, basicamente entre o produto fresco e o congelado por 120 e 150 dias.

A cor amarela, avaliada pelo parâmetro b, decresceu ao longo período de estocagem, conforme observado na *Figura 4* e *Tabela 3*, apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o produto fresco e os mantidos sob congelamento. Contrariamente ao postulado por NAKAYAMA & YAMAMOTO (1977), a cor vermelha (a) foi reduzida de forma significativa ($P < 0,05$) durante os primeiros 90 dias de estocagem conforme verificado na *Figura 4* e *Tabela 3*

A alteração dos parâmetros L,a,b do produto reestruturado pode ser atribuída à dessecação pelo frio trazendo como consequência a oxidação do pigmento do músculo, transformando-o em metamioglobina e principalmente à ação de lipídeos oxidados, o que pode ser confirmado pelos altos níveis de correlação expostos na *Tabela 4*.

Embora HUFFMAN *et al.* (1981), tenham relatado que a adição de cloreto de sódio a produtos reestruturados melhora as características da cor, é possível verificar neste estudo que a utilização do NaCl na concentração de 1,5% não favoreceu a manutenção da cor, mas sim agiu provavelmente como catalisador da oxidação de lipídeos, conforme mencionado por KOETZ (1977), RAHARJO *et al.* (1989) e KANNER *et al.* (1991).

Perda de peso no cozimento (%)

Entre as propriedades físicas de produtos reestruturados, dados da perda de peso no cozimento tornam-se importantes tanto pelo aspecto econômico, como pelas características sensoriais do produto.

Diminuição significativa na perda de peso no cozimento pode ser observada (*Figura 5 e Tabela 5*) entre o produto fresco e os mantidos sob congelamento por até 150 dias, porém não houve variação significativa ($P < 0,05$) entre os diferentes tempos de congelamento, o que pode ser explicado pela ação do NaCl e da utilização de músculo em estado de *pre-rigor mortis* aumentando a capacidade de retenção de água do produto, e provavelmente por um leve processo de desnaturação ocorrida durante o armazenamento do produto sob congelamento.

O percentual da perda de peso no cozimento apresentou alta correlação com a dureza dos hambúrgueres conforme mostrado na *Tabela 7*.

Perfil de textura

Pelos dados fornecidos pela *Tabela 6* não foi observada modificação significativa na dureza ao longo da estocagem sob congelamento de hambúrguer

de pacu, exceto entre o produto fresco e o congelado por 30 dias que apresentou aumento significativo da dureza, presumivelmente devido à formação de ligações cruzadas entre as proteínas, tornando o tecido mais rígido e ao decréscimo da capacidade de retenção de água, comprovada pela maior perda pelo cozimento ocorrida aos 30 dias de estocagem (*Tabela 5*), resultados estes semelhantes aos de HSIEH & REGENSTEIN (1989), que ainda observou correlação entre a coesividade e a dureza de produtos reestruturados, o que confirma os resultados obtidos neste estudo onde também foi estabelecida alta correlação positiva entre estes dois parâmetros (*Tabela 7*).

Os resultados fornecidos permitem concluir que o aumento na textura (dureza) do hambúrguer pode ser considerado como leve, tendo em vista o aumento de aproximadamente 17% ao longo dos 150 dias sob congelamento. Esta leve modificação na dureza pode ser explicada também por POULTER *et al.* (1981), que mencionam que espécies tropicais parecem ser menos vulneráveis à deterioração da textura do que espécies de clima temperado.

A elasticidade, coesividade e mastigabilidade não sofreram a influência do congelamento, conforme observado na *Tabela 8*. Somente a gomosidade sofreu maior influência do congelamento, principalmente entre o produto fresco e o congelado por 30 dias.

Embora tenha se verificado um rápido aumento dos níveis de TBA no presente experimento, é possível constatar pelos dados apresentados na *Tabela 8* que a oxidação de lipídeos não é o fator mais importante no aumento da dureza conferida ao produto ao longo da estocagem, sendo a desnaturação, levando à agregação das proteínas miofibrilares, a principal responsável por esta alteração, conforme citado por alguns autores, entre eles OCKERMAN & ORGANISCIK (1979), BORDERIAS *et al.* (1982), HSIEH & REGENSTEIN (1989), REDDY &

SRIKAR (1991). A oxidação lipídica também não produziu modificações significativas na coesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade.

Análise sensorial (teste triangular)

O teste triangular objetivou estabelecer se havia ou não diferença entre o produto fresco e o produto congelado durante a estocagem sob congelamento. O modelo da ficha e da tabela para análise estatística utilizadas no presente teste encontram-se no Anexo 1.

Pelos resultados expostos na *Tabela 9*, verifica-se diferença significativa ao nível de 1%, a partir do 2º mês de estocagem, tornando-se mais intensa a partir do 3º mês. O número de respostas corretas aumentou com o decorrer do congelamento, iniciando o primeiro mês com aproximadamente 43% de respostas corretas, atingindo ao fim do 5º mês 81% de acertos no teste, resultados estes similares aos obtidos por MILLER *et al.* (1980).

Embora o objetivo do teste triangular seja apenas verificar a existência ou não de diferenças entre amostras, os provadores fizeram referências quanto à preferência, grau de diferença e textura do produto, que acreditamos ser interessante reportar neste estudo. Cerca de 60-65% dos provadores preferiram a amostra fresca à congelada, relatando textura ligeiramente mais macia na amostra fresca, caracterizando o grau de diferença encontrado variando de leve a moderado. Poucos provadores entretanto, fizeram comentários coerentes sobre as modificações no sabor do produto durante o armazenamento sob congelamento, o que está de acordo com observações de MAIA *et al.* (1982) e VARELTZIS *et al.* (1988).

5 CONCLUSÕES

- O rápido desenvolvimento da oxidação de lipídeos no hambúrguer, deve-se à insaturação dos ácidos graxos desta espécie, que confere maior susceptibilidade à oxidação lipídica, aos pigmentos heme e provavelmente à ação prooxidante do cloreto de sódio.
- O armazenamento sob congelamento de hambúrguer de pacu por 150 dias, provocou alterações nos parâmetros de luminosidade (L), cor amarela (b) e cor vermelha (a) do produto, apresentando altas correlações com a oxidação de lipídeos.
- A oxidação de lipídeos não contribuiu de forma significativa à modificação do perfil de textura de hambúrgueres de pacu armazenados sob congelamento por 150 dias.
- O percentual da perda de peso no cozimento e a dureza de hambúrgueres correlacionaram-se positivamente durante o armazenamento sob congelamento do produto.
- A matéria prima, filé de pacu, devido as suas propriedades funcionais e sensoriais pode ser empregada na elaboração de produtos reestruturados de boa qualidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C. 1984. **Official Methods of Analysis**, 14^a ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. DC.
- ACTON, J. C. ; ZIEGLER, G. R.; BURGE, D. L. 1983. Functionality of muscle constituents in the comminuted meat products. **CRC Crit. Rev Food Sci. Nutr.** 18 (2): 99-121.
- AWAD, A.; POWRIE, W. D.; FENNEMA, A. O. 1969. Deterioration of fresh water whitefish muscle during frozen storage at -10° C. **J. Food Sci.** 34: 1-9.
- BECKER, H. C.; MILNER, R. T.; NAGEL, R. H. 1940. A method for the determination of non protein nitrogen in soybean meal. **Cereal Chem.** 17: 447-457.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917.
- BORDERIAS, A. J.; MORAL, A.; TEJADA, M. 1982. Stability of whole, filleted, and minced trout (*Salmo irideus*, gibb) during frozen storage. **J. Food Biochem.** 6: 187-195.
- BOURNE, M. C. 1978. Standardization of texture measuring instruments. **Food Technol.** 32 (2): 62-72.
- COHEN, J. S.; SHULTS, G. W.; MASON, V. C.; WIERBICK, E. 1977. Variables affecting the acceptability of radappertized ground beef products. **J. Food Sci.** 42 (2): 338-343.

- DENG, J. C. ; MATTHEWS, R. F.; WATSON, C. M. 1977. Effect of chemical and physical treatments on rancidity development of frozen mullet (*Mugil cephalus*) fillets. **J. Food Sci.** 42 (2): 344-347.
- DYER, W. J. 1951. Protein denaturation in frozen and stored fish. **Food Res.** 16: 522.
- ERIKSSON, C. E. 1987. Oxidation of lipids in food systems. Cap. 6. In **Autoxidation of Unsaturated Lipids**. Chan, H. W. S., p. 207-215, Academic Press, London.
- GHADI, S. V.; NINJOOR, V. 1988. The binding strength of fish muscle rolls. **J. Food Sci. Technol.** 25 (1): 28-30.
- GRAY, J. I.; PEARSON, A. M. 1987. Rancidity and warmed-over flavor. Vol.3. Cap.6. In **Advances in Meat Research- Restructured Meat and Poultry Products**, A. M. Pearson; T. R. AVI Book, New York.
- HAARD, N. F. 1992. Biochemical reactions in fish muscle during frozen storage. Ch.20. In **Seafood Science Technology**, E. G. Bligh, p.176, Fishing News Books, Canada.
- HAMM, R. 1960. Biochemistry of meat hydration. **Adv. Food Res.** 10: 355.
- HAMM, R. 1981. Post-mortem muscle affecting the quality of comminuted meat products. Chap. 4. In **Developments in Meat Science**, R. Lawrie (ed.), p. 93, Applied Science Publishers, London.

- HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. 1989. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutr. Res.** 33: 233-341.
- HSIEH, Y. L.; REGENSTEIN, J. M. 1989. Texture changes of frozen stored cod and ocean perch minces. **J. Food Sci.** 54 (4): 824-834.
- HUFFMAN, D. L.; CROSS, H. R.; CAMPBELL, K. J.; CORDRAY, J. C. 1981. Effect of salt and tripolyphosphate on acceptability of flaked and formed hamburger patties. **J. Food Sci.** 46: 34.
- JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. C. 1980. Discoloration problems in mechanically deboned fish. **J. Food Sci.** 45 (4): 1068-1069.
- KANNER, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products. **Meat Sci.** 36 (1): 169-189.
- KANNER, J.; HAREL, S.; JAFFER, R. 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. **J. Agric. Food Chem.** 39 (6): 1017-1021.
- KHAYAT, A.; SCHWALL, D. 1983. Lipid oxidation in seafood. **Food Tech.** 37 (7): 130-140.
- KOETZ, P. R. 1977. Elaboração de hambúrgueres mistos de polpa de pescado, carne e proteína de soja texturizada. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- KRAMER, D. E. ; PETERS, M. D. 1981. Effect of pH and prefreezing treatment on the texture of yellowtail rockfish as measured by the Ottawa texture measuring system. **J. Food Tech.** 16 (5): 493-504.

- LARMOND, E. 1987. **Laboratory Methods for Sensory Evaluation of Food**. 72 p
Canadian Government Publishing Centre, Ottawa, Canada.
- LEBLANC, E. L.; LEBLANC, R. J.; BLUM, I. E. 1988. Prediction of quality in frozen cod fillets. **J. Food Sci.** 53 (2): 328-340.
- MACHADO, M. G. S. 1989. Composição em nutrientes e caracterização das proteínas do filé de pacu (*Colossoma mitrei*, Berg, 1895). **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; MORAES, M. A. C. 1982. Formulation, acceptability and stability of fish patties made with freshwater fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner). **Cienc. Tecnol. Aliment.** 2 (1): 33-46.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; HOTTA, L. K. 1995. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piaractus mesopotamicus*. **Int. J. Food Sci. Technol.** 30: 591-597.
- MILLER, A. J.; ACKERMAN, S. A.; PALUMBO, S. A. 1980. Effects of frozen storage on functionality of meat for processing. **J. Food Sci.** 45: 1466-1471.
- NAKAYAMA, T.; YAMAMOTO, M. 1977. Physical, chemical and sensory evaluations of frozen-stored deboned minced fish flesh. **J. Food Sci.** 42 (4): 900-905.
- OCKERMAN, H. W.; ORGANISCIK, C. S. 1979. Quality of restructured beef steaks after refrigerated and frozen storage. **J. Food Prot.** 42 (2): 126-130.
- OGAWA, M.; MAIA, E. L. 1999. **Manual de Pesca- Ciência e Tecnologia do Pescado**. Vol. 1, 430p. Editora Varela, São Paulo.

- PÉREZ-VILLAREAL, B.; HOWGATE, P. 1991. Deterioration of European hake (*Merluccius merluccius*) during frozen storage. **J. Sci. Food Agric.** 55: 455-469.
- POULTER, R. G.; CURRAN, C. A.; DISNEY, J. G. 1981. Chill storage of tropical and temperate water fish- differences and similarities. **Sci. Technol. Refrigeration.** 22 (2): 123.
- RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; MAGA, J. A.; SCHMIDT, G. R. 1989. Influence of meat restructuring systems on lipid oxidation in beef. **Lebensm. Wiss und Technol.** 22 (4): 199.
- REDDY, G. V. S.; SRIKAR, L. N. 1991. Preprocessing ice storage effects on functional properties of fish mince protein. **J. Food Sci.** 56 (4): 965-968.
- ROSSLER, E. B.; WARREN, J.; GUYMON, J. F. 1948. **Significance in Triangular Taste Tests.** 13: 503-505.
- SAS. 1985. **Statistical Analysis System User's Guide: Statistics.** SAS Institute, Inc., Cary NC, SAS Institute Inc.
- SHENOUDA, S. Y. K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res.** 56: 275-307.
- SIKORSKI, Z. E.; OLLEY, J.; KOSTUCH, S. 1976. Protein changes in frozen fish. **CRC- Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 6 (1): 97-129.
- STANSBY, M. E. 1962. Proximate composition of fish- proteins and general composition. In **Fish in Nutrition**, E. Heen, R. Kreuzer (ed.), p.55-56. Fishing News Books, London.

- TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNNATHAN, M. T. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 37 (1): 44-48.
- VARELTZIS, K.; ZETOU, F.; TSIARAS, I. 1988. Textural deterioration of chub mackerel (*Scomber japonicus collias*) and smooth hound (*Mustelus mustelus* L.) in frozen storage in relation to chemical properties. **Lebensmittel-wissenschaft und Technologie** 21 (4): 206.
- VERMA, J. K.; SRIKAR, L. N.; SUDHAKARA, N. S.; SARMA, J. 1995. Effects of frozen storage on lipid freshness parameters and some functional properties of oil sardine (*Sardinella longiceps*) mince. **Food Res. Int.** 28 (1): 87-90.
- XIONG, Y. L. 1995. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. **J. Muscle Foods** 6 (2): 139-160.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- Os teores de 18,46% para proteína e de 5,09% para lipídeos totais obtidos de músculo de *Colossoma mitrei*, permitem classificar este pescado como uma espécie com alto teor protéico e médio teor de gordura.

- Pela caracterização das frações protéicas pode-se concluir que o percentual de proteínas miofibrilares obtidas de músculo de pacu (60,37%), indica apresentar este pescado boa funcionalidade protéica, uma vez que a miosina e actina constituem as proteínas diretamente envolvidas nas propriedades de solubilidade, capacidade de gelatinização e emulsificação.

- A atividade Ca-ATPásica das proteínas miofibrilares apresentou correlação significativa com a oxidação de lipídeos, o que sugere o comprometimento de lipídeos oxidados no processo de desnaturação protéica.

- As alterações promovidas pelo congelamento e pela oxidação lipídica não foram tão drásticas a ponto de comprometer as frações protéicas correspondentes às proteínas actina, troponina, tropomiosina.

- As bandas da miosina (cadeias leves) mostraram decréscimo significativo ao longo do período de armazenamento sob congelamento de músculo de pacu e leve decréscimo foi observado na banda correspondente à cadeia pesada da miosina, indicando desnaturação da mais importante proteína miofibrilar sob o aspecto da funcionalidade protéica.

- O processo da oxidação de lipídeos produz efeito prejudicial sobre as proteínas miofibrilares, estabelecendo forte correlação com a desnaturação das proteínas, resultando em diminuição da solubilidade protéica ao longo da estocagem sob congelamento.

- Foi requerida a concentração mínima de 3% de proteína para a formação dos géis protéicos.
- A utilização da temperatura de pré- incubação a 40° C propicia a formação de géis mais firmes.
- A alta correlação verificada entre o decréscimo da dureza de géis protéicos e o aumento da oxidação de lipídeos durante a estocagem sob congelamento de músculo de pacu., indica que lipídeos oxidados podem ter contribuído à desnaturação das proteínas miofibrilares.
- As proteínas miofibrilares extraídas de músculo em estado de *pre-rigor mortis* permitem a formação de géis com menores percentuais de umidade espremível, ao longo da estocagem sob congelamento.
- O rápido desenvolvimento da oxidação de lipídeos no hambúrguer, deve-se à insaturação dos ácidos graxos desta espécie, que confere maior susceptibilidade à oxidação lipídica, aos pigmentos heme e provavelmente à ação prooxidante do cloreto de sódio.
- O armazenamento sob congelamento de hambúrguer de pacu por 150 dias, provocou alterações nos parâmetros de luminosidade (L), cor amarela (b) e cor vermelha (a) do produto, apresentando altas correlações com a oxidação de lipídeos.
- A oxidação de lipídeos não contribuiu de forma significativa à modificação do perfil de textura de hambúrgueres de pacu armazenados sob congelamento por 150 dias.

- O percentual de perda de água no cozimento e a dureza de hambúrgueres correlacionaram-se positivamente durante o armazenamento sob congelamento do produto.

- A matéria prima, filé de pacu, devido as suas propriedades funcionais e sensoriais pode ser empregada na elaboração de produtos reestruturados de boa qualidade.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C. 1984. **Official Methods of Analysis**, 14^a ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington. DC.
- ACTON, J. C. ; ZIEGLER, G. R.; BURGE, D. L. 1983. Functionality of muscle constituents in comminuted meat products. **CRC Crit. Rev Food Sci. Nutr.** 18 (2): 99-121.
- ARAI, K. 1974. Evaluation of fish quality from the muscle protein studies. In **Quality of Fish**, Sakana no Hinshitsu, p. 55-80, Tokyo.
- ARAI, K.; TAKASHI, R. 1977. Studies on molecular proteins of fish- Effect of freezing on denaturation of actomyosin ATPase from carp muscle. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish** 43: 533-541.
- ASHGAR, A.; SAMEJIMA, K.; YASUI, T. 1985. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 22 (1): 27-107.
- AWAD, A.; POWRIE, W. D.; FENNEMA, A. O. 1969. Deterioration of fresh water whitefish muscle during frozen storage at -10° C. **J. Food Sci.** 34: 1-9.
- BARBOSA, J. M. 1986. Espécies do gênero *Colossoma* (Pisces, *Characidae*) importantes para a 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 aquicultura, Pirassununga, São Paulo, p.8.

- BARBUT, S.; FINDLAY, C. J. 1991. Influence of sodium, potassium and magnesium chloride on thermal properties of beef muscle. **J. Food Sci.** 56: 180-182.
- BEAS, V. E.; CRUPKIN, M.; TRUCCO, R. E. 1988. Gelling properties of actomyosin from pre and pro-spawning hake (*Merluccius hubbsi*). **J. Food Sci.** 53: 1322-1326.
- BECHTEL, P. J. 1986. Skeletal Muscle Structure. Cap. 1. In **Muscle as Food**, p.5. Academic Press, London.
- BECKER, H. C.; MILNER, R. T.; NAGEL, R. H. 1940. A method for the determination of non protein nitrogen in soybean meal. **Cereal Chem.** 17: 447-457.
- BELTRAN, A.; MORAL, A. 1991. Changes in fatty acid composition of fresh and frozen sardine (*Sardina pilchardus*, W.) during smoking. **Food Chem.** 42: 99-109.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917.
- BORDERIAS, A. J.; MORAL, A.; TEJADA, M. 1982. Stability of whole, filleted, and minced trout (*Salmo irideus*, Gibb) during frozen storage. **J. Food Biochem.** 6: 187-195.
- BOURNE, M. C. 1978. Standardization of texture measuring instruments. **Food Technol.** 32 (2): 62-72.

- BRADDOCK, R. J.; DUGAN, L. R. 1973. Reaction of autoxidizing linoleate with coho salmon myosin. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 30: 343.
- BURGUESS, G. H. O.; CUTTING, C. L.; LOVERN, J. A.; WATERMAN, J. J. 1967. Congelación y almacenamiento frigorífico. Cap. 7 In **Fish Handling and Processing**, p.142-200. Chemical Publishing Company, New York.
- BUTTKUS, H. 1967. The reaction of myosin with malonaldehyde. **J. Food Sci.** 32: 432-434.
- CARECHE, M.; CURRAL, J.; MACKIE, I. M. 1991. A study of the effects of different factors on the heat-induced gelation of cod actomyosin using response methodology. **Food Chem.** 42 (1): 39-55.
- CARECHE, M.; TEJADA, M. 1990a. The effect of neutral and oxidized lipids on functionality in hake (*Merluccius merluccius* L.): a dimethylamine and formaldehyde-forming species during frozen storage. **Food Chem.** 36: 113-128.
- CARECHE, M.; TEJADA, M. 1990b. Effect of neutral and oxidized lipids on protein functionality in megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis* W.) and sardine. (*Sardina pilchardus* R.) during frozen storage. **Food Chem.** 37 (4): 275-287.
- CASTRILLÓN, A. M.; ALVAREZ-PONTES, E.; ARIAS, M. T. G. 1996. Influence of frozen storage and defrosting on the chemical and nutritional quality of sardine (*Clupea pilchardus*). **J. Sci. Food Agric.** 70: 29-34.
- CHAN, H. W. S. 1987. The mechanism of autoxidation. Cap.1. In **Autoxidation of Unsaturated Lipids**, p.1-15. Academic Press, London.

- CHAN, J. K.; GILL, T. A.; PAULSON, A. T. 1992. Cross-linking of myosin heavy chain from cod, herring and silver hake during thermal setting. **J. Food Sci.** 57 (4): 960-912.
- CHEN, C. S.; HWANG, D. C.; JIANG, S. T. 1989. Effect of storage temperatures on the formation of disulfides and denaturation of milkfish actomyosin (*Chanos chanos*). **J. Agric. Food Chem.** 37 (5): 1228-1231.
- CHEN, H. W.; CHIU, E. M. ; HUANG, J. R. 1997. Color and gel-forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. **J. Food Sci.** 62 (5): 985-991.
- CHENG, C. S.; HAMANN, D. D.; WEBB, N. B. 1979a. Effect of thermal processing on minced fish gel texture. **J. Food Sci.** 44: 1080-1086.
- CHENG, C. S.; HAMANN, D. D.; WEBB, N. B.; SIDWELL, V. 1979b. Effect of species and storage time on minced fish gel texture. **J. Food Sci.** 44: 1087-1092.
- COFRADES, S.; CARECHE, M.; CARBALLO, J.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. 1997. Thermal gelation of chicken, pork and hake (*Merluccius merluccius*, L.) actomyosin. **Meat Sci.** 47 (1/2): 157-166.
- COHEN, J. S.; SHULTS, G. W.; MASON, V. C.; WIERBICK, E. 1977. Variables affecting the acceptability of radappertized ground beef products. **J. Food Sci.** 42 (2): 338-343.
- CONNEL, J. J. 1960a. Changes in the actin of cod flesh during storage at -14°C. **J. Sci. Food Agric.** 11: 515.

- CONNEL, J. J. 1960b. Changes in the ATP-ase activity and sulfhydryl groups of cod flesh during frozen storage. **J. Sci. Food Agric.** 11: 245.
- CONNEL, J. J. 1961. The relative stabilities of the skeletal muscle myosin of some animals. **J. Biochem.** 8: 503-509.
- CONNEL, J. J. 1968. The effect of freezing and frozen storage on the proteins of fish muscle. In **Recent Advances in Food Science- Low Temperature Biology of Foodstuffs**, vol. 4, J. Hawthorn; E. J. Rolfe (ed.), p.233-255. Pergamon Press.
- CROSS, H. R.; DURLAND, P. R.; SEIDMAN, S. C. 1986. Sensory qualities of meat. Ch.7. In **Muscle as Food**, B. J. Bechtel, p.279-288. Academic Press, London.
- DAMODARAN, S. 1989. Molecular and functional properties of food proteins. In **Food Proteins**, J. E. Kinsella, p. 30-40, The American Oil Chemists' Society.
- DAVIES, J. R.; LEDWARD, D. A.; BARDSLEY, R. G.; POULTER, R. G. 1994. Species dependence of fish myosin stability to heat and frozen storage. **Int. J. Food Sci. Technol.** 29: 287-301.
- DECKER, E. A.; XIONG, Y. L.; CALVERT, J. T.; CRUM, A. D.; BLANCHARD, S. P. 1993. Chemical, physical and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. **J. Agric. Food Chem.** 41 (2): 186-189.
- DENG, J. C. ; MATTHEWS, R. F.; WATSON, C. M. 1977. Effect of chemical and physical treatments on rancidity development of frozen mullet (*Mugil cephalus*) fillets. **J. Food Sci.** 42 (2): 344-347.

- DIAS, J.; NUNES, M. L.; MENDES, R. 1994. Effect of frozen storage on the chemical and physical properties of black and silver scabbarfish. **J. Food Sci.** 66: 327-335.
- DONDERO, M.; SANTIBÁÑEZ, M. A.; TARKY, W.; CUROTTO, E.; CANTO, M. 1989. Desnaturalización proteica en merluza (*Merluccius gayi gayi*) almacenada congelada. **Rev. Agroquim. Tecnol. Alim.** 29 (2): 230-238.
- DRAETTA, I. S.; IADEROZA, M.; BALDINI, V. L. S.; FILHO, L. M. 1986. Padrões Eletroforéticos na Identificação de espécies de Peixes. **Col. Ital.** 15: 171-184.
- DYER, W. J. 1951. Protein denaturation in frozen and stored fish. **Food Res.** 16: 522.
- DYER, W. J.; DINGLE, J. R. 1961. Fish proteins with special reference to freezing. In **Fish as Food**, G. Borgstrom (ed.), Academic Press, New York.
- DYER, W. J.; FRENCH, H. V.; SNOW, J. M. 1950. Proteins in fish muscle I. Extraction of protein fractions in fresh fish. **J. Fish. Res. Bd. Can.** 7: 585-593.
- ERICKSON, M. C.; THED, S. T. 1994. Comparison of chemical measurements to differentiate oxidative stability of frozen minced tilapia fish muscle. **Int. J. Food Sci. Tech.** 29: 585-591.
- ERIKSSON, C. E. 1987. Oxidation of lipids in food systems. Cap. 6. In **Autoxidation of Unsaturated Lipids**. Chan, H. W. S., p. 207-215, Academic Press, London.

- EUN, J. B.; BOYLE, J. A.; HEARNSBERGER, J. O. 1994. Lipid peroxidation and chemical changes in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle microsomes during frozen storage. **J. Food Sci.** 59 (2): 251-255.
- FERRY, J. D. 1948. Protein gels. **Adv. Protein Chem.** 4: 1-28.
- FUNES, J. A.; WEISS, U.; KAREL, M. 1982. Effects of reactions conditions and reactant concentrations on polymerization of lysozyme reacted with peroxidizing lipids. **J. Agric. Food Chem.** 30 (6): 1204-1206.
- GÉRY, J. 1986. Notes de characologie néotropical 1. Progrés dans la systématique des genres *Colossoma* et *Piaractus*. **Revue Fr. Aquariol.** 12: 96-102.
- GHADI, S. V.; NINJOOR, V. 1988. The binding strength of fish muscle rolls. **J. Food Sci. Technol.** 25 (1): 28-30.
- GILLET, T. A.; MEIBURG, D. E.; BROWN, C. L.; SIMON, S. 1977. Parameters affecting meat protein extraction and interpretation of model system data for meat emulsion formation. **J. Food Sci.** 42: 1606-1610.
- GLICKSMAN, M. 1982. Functional properties of hydrocolloids. Vol.1. In **Food Hydrocolloids**, M. Glicksman, p.47, CRC Press, Flórida.
- GOMES, J. C.; BIANCHINI, M. A. S.; PEREIRA, C. A. S.; COELHO, D. T.; COSTA, P. M. A. 1994. Processamento e caracterização do surimi de peixe de água doce. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 14 (2): 226-237.

- GRAY, J. I.; PEARSON, A. M. 1987. Rancidity and warmed-over "flavor". Vol.3. Cap.6. In **Advances in Meat Research- Restructured Meat and Poultry Products**, A. M. Pearson; T. R. AVI Book, New York.
- HAARD, N. F. 1992. Biochemical reactions in fish muscle during frozen storage. Ch.20. In **Seafood Science Technology**, E. G. Bligh, p.176, Fishing News Books, Canada.
- HAMADA, I.; NAKAYAMA, T.; NIWA, E. 1977. Oxidative denaturation of actomyosin. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 43: 1105-1109.
- HAMM, R. 1960. Biochemistry of meat hydration. **Adv. Food Res.** 10: 355.
- HAMM, R. 1974. Water-holding capacity of meat. **Proceedings of the Twenty First Easter Meat Science**. Cole, D. J. A , Lawrie, R. A. (ed.).
- HAMM, R. 1975. On the rheology of minced meat. **J. Texture Studies** 6: 281.
- HAMM, R. 1981. Post-mortem muscle affecting the quality of comminuted meat products. Chap. 4. In **Developments in Meat Science**, R. Lawrie (ed.), p. 93, Applied Science Publishers, London.
- HARDY, R.; SMITH, J. G. M. 1976. The storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity. **J. Sci. Food Agric.** 27: 595-599.
- HARRINGTON, W. F. 1979. Contractile proteins of the myofibril. In **The Proteins**, H. Neurath and R. L. Hill, v.4, p. 245. Academic Press, New York.
- HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progr. Lipid Res.** 26: 281-347.

- HENINGAR, C. J.; BUCK, E. M.; HULTIN, H. O.; PELEG, M.; VARELTZIS, K. 1989. Mechanical properties of fish and beef gels prepared with and without washing and sodium chloride. **J. Food Quality**. 12: 155-166.
- HERMANSSON, A. M.; AKESSON, C. 1975. Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems: effects of various parameters. **J. Food Sci.** 40: 595.
- HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. 1989. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutr. Res.** 33: 233-341.
- HSIEH, Y. L.; REGENSTEIN, J. M. 1989. Texture changes of frozen stored cod and ocean perch minces. **J. Food Sci.** 54 (4): 824-834.
- HUFFMAN, D. L.; CROSS, H. R.; CAMPBELL, K. J.; CORDRAY, J. C. 1981. Effect of salt and tripolyphosphate on acceptability of flaked and formed hamburger patties. **J. Food Sci.** 46: 34.
- HULTIN, H. O.; FENG, Y.; STANLEY, D. W. 1995. A re-examination of muscle protein solubility. **J. Muscle Foods** 6: 91-107.
- JARENBACK, L.; LILJEMARK, A. 1975. Ultrastructural changes during frozen storage of cod III-effects of linoleic acid and linolinoleic hydroperoxides on myofibrillar proteins. **J. Food Tech.** 10 (3): 437-441.
- JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. C. 1980. Discoloration problems in mechanically deboned fish. **J. Food Sci.** 45 (4): 1068-1069.

- JAUREGUI, C. A.; REGENTEIN, J. M.; BAKER, R. C. 1981. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture- a water-binding property of muscle foods. **J. Food Sci.** 46 (4): 1271-1273.
- JIANG, S. T.; LEE, T. C. 1985. Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage. **J. Agric. Food Chem.** 33 (5): 839-843.
- JIANG, S. T.; TSAO, C. Y.; LEE, T. C. 1987a. Effect of free amino acids on the denaturation of mackerel myofibrillar proteins in vitro during frozen storage at -20° C. **J. Agric. Food Chem.** 35 (1): 28-33.
- JIANG, S. T.; HWANG, B. S.; TSAO, C. Y. 1987b. Protein denaturation and changes in nucleotides of fish muscle during frozen storage. **J. Agric. Food Chem.** 35 (1): 22-27.
- JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; BORDERIAS, A., J. 1983. A study of the effects of frozen storage on certain functional properties of meat and fish and protein. **J. Food Technol.** 18: 731-737.
- JUDGE, M.; ABERLE, E.; HEDRICK, H.; MERKEL, R. 1989a. Muscle and associated tissues. Cap.2. In **Principles of Meat Science**, M. Judge; E. Aberle; J. Forrest; H. Hedrick; R. Merkel (ed.), p.11-56. Hunt Publishing Company, USA.
- JUDGE, M.; ABERLE, E.; HEDRICK, H.; MERKEL, R. 1989b. Properties of fresh meat tissues. Cap.6. In **Principles of Meat Science**, M. Judge; E. Aberle; J. Forrest; H. Hedrick; R. Merkel (ed.), p.125-133. Hunt Publishing Company, USA.
- KANNER, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products. **Meat Sci.** 36 (1): 169-189.

- KANNER, J.; HAREL, S.; JAFFER, R. 1991. Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. **J. Agric. Food Chem.** 39 (6): 1017-1021.
- KEAY, J. N.; RATTAGOOOL, P.; HARDY, R. 1972. Chub mackerel of Thailand (*Rastrelliger neglectus*, Van Kampen): A short study of its chemical composition, cold storage and canning properties. **J. Sci. Food Agric.** 23: 1359-1369.
- KELLEHER, S. D.; HULTIN, H. O. 1991. Lithium chloride as a preferred extractant of fish muscle proteins. **J. Food Sci.** 56: 315-317.
- KELLEHER, S. D.; HULTIN, H. O.; WILHELM, K. A. 1994. Stability of mackerel surimi prepared under lipid-stabilizing processing conditions. **J. Food Sci.** 59 (2): 269-271.
- KENNEY, P. B.; KASTNER, C. L.; KROPF, D. H. 1992. Muscle washing and raw material source affect quality and physiochemical properties of low-salt, low-fat, restructured beef. **J. Food Sci.** 57: 545-550.
- KHALIL, M. E.; MOUSTAFA, E. K.; OSMA, H. O. A. 1980. Composition of boliti (*Tilapia nilotica*) muscle protein. **Food Chem.** 5: 175-184.
- KHAYAT, A.; SCHWALL, D. 1983. Lipid oxidation in seafood. **Food Tech.** 37 (7): 130-140.
- KING, F. J.; ANDERSON, M. L.; STEINBERG, M. A. 1962. Reaction of cod actomyosin with linoleic and linolenic acids. **J. Food Sci.** 27: 363-366.
- KINSELLA, J. E. 1976. Functional properties of proteins. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 4: 219-280.

- KINSELLA, J. E. 1982. Protein structure and functional properties: emulsification and "flavor" binding effects. In **Food Protein Deterioration- Mechanisms and Functionality**, J. P. Cherry (ed.), p.301. ACS Symposium Series 206, Am. Chem. Soc., Washington, D. C.
- KOETZ, P. R. 1977. Elaboração de hambúrgueres mistos de polpa de pescado, carne e proteína de soja texturizada. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- KOLAKOWSKI, E.; SZYBOWICZ, Z.; RACZEK, K. 1977. Extractability of muscle protein as a criterion for technological evaluation of sea fish. part I- changes of protein fraction of baltic herring and baltic cod during storage in ice. **Die Nahrung**. 21 (6): 485-499.
- KRAMER, D. E. ; PETERS, M. D. 1981. Effect of pH and prefreezing treatment on the texture of yellowtail rockfish as measured by the ottawa texture measuring system. **J. Food Tech.** 16 (5): 493-504.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- LAN, Y. L.; NOVAKOFSKI, J.; MCCUSKER, R. H.; BREWER, , M. S.; CARR, T. R.; MCKEITH, F. K. 1995. Thermal gelation of myofibrils from pork, beef, fish, chicken and turkey. **J. Food Sci.** 60 (6): 936-940.
- LANIER, T. C. 1986. Functional properties of surimi. **Food Tech.** 40: 107-113, 124.
- LANIER, T. C.; LIN, T. S.; LIU, Y. M.; HAMANN, D. D. 1982. Heat gelation properties of actomyosin and surimi prepared from atlantic croacker. **J. Food Sci.** 47: 1921-1925.

- LARMOND, E. 1987. **Laboratory Methods for Sensory Evaluation of Food**. 72 p
Canadian Government Publishing Centre, Ottawa, Canada.
- LEBLANC, E. L.; LEBLANC, R. J. 1989. Separation of cod fillets proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. **J. Food Sci.** 54 (4): 827-834.
- LEBLANC, E. L.; LEBLANC, R. J.; BLUM, I. E. 1988. Prediction of quality in frozen cod fillets. **J. Food Sci.** 53 (2): 328-340.
- LEE, H. G.; LANIER, T. C. 1995. The role of covalent cross-linking in the texturizing of muscle protein sols. **J. Muscle Food** 6: 125-138.
- LIU, Y. M.; LIN, T. S.; LANIER, T. C. 1982. Thermal denaturation and aggregation of actomyosin from atlantic croacker. **J. Food Sci.** 47: 1916-1920.
- LOVE, R. M. 1968. Ice formation in frozen muscle. In **Low Temperature Biology of Foodstuffs**, J. Hawthorn and J. Rolf, eds.) Pergamon, Oxford.
- MACDONALD, G. A.; LELIEVRE, J.; WILSON, N. D. C. 1992. Effect of frozen storage on the gel-forming properties of hoki (*Macruronus novaezelandiae*). **J. Food Sci.** 57 (1): 69-71.
- MACHADO, M. G. S. 1989. Composição em nutrientes e caracterização das proteínas do filé de pacu (*Colossoma mitrei*, Berg, 1895). **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; AMAYA-FARFAN, J. 1983. Proximate fatty acid and amino acid composition of the Brazilian fresh-water fish *Prochilodus scrofa*. **Food Chem.** 12: 275-276.

- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; HOTTA, L. K. 1995. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piaractus mesopotamicus*. **Int. J. Food Sci. Technol.** 30: 591-597.
- MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; MORAES, M. A. C. 1982. Formulation, acceptability and stability of fish patties made with freshwater fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner). **Cienc. Tecnol. Aliment.** 2 (1): 33-46.
- MILLER, A. J.; ACKERMAN, S. A.; PALUMBO, S. A. 1980. Effects of frozen storage on functionality of meat for processing. **J. Food Sci.** 45: 1466-1471.
- MORAES, M. N.; SANCHEZ, L.; CEREDA, M. P.; FERREIRA, A. E.; MARTINS, J. A. 1984. Variação química do saguiri *Curimatus elegans* Steindacher, em relação a alguns parâmetros biológicos. **Bol. Inst. Pesca- São Paulo.** 11: 81-91.
- MORRISSEY, P. A.; MULHIVIL, D. M.; O'NEILL, E. M. 1982. Functional properties of muscle proteins. Cap.1. In **Developments in Food Proteins-5**, B. J. F. Hudson, p.196. Elsevier Applied Science, London.
- MOORJANI, M. N.; BALIGA, B. R.; VIJAYA RANGA, B.; LAHIRY, N. C. 1962. Post rigor in nitrogen distribution and texture of fish during frozen storage in crushed ice. **Food Tech.** 20: 80-84.
- MULLER, H. G. 1969. Mechanical properties, rheology and haptesthesia of food. **J. Texture Stud.** 1: 38-42.
- NAKAYAMA, T.; YAMAMOTO, M. 1977. Physical, chemical and sensory evaluations of frozen-stored deboned minced fish flesh. **J. Food Sci.** 42 (4): 900-905.

- NAMBUDIRI, D. D.; GOPAKUMAR, K. 1992. ATPase and lactate dehydrogenase activities in frozen stored fish muscle as indices of cold storage deterioration. **J. Food Sci.** 57 (1): 72-76.
- NEVES, F. L. C. 1985. Alguns aspectos de importância na estocagem e distribuição de alimentos frigorificados. **Alimentos e Tecnologia** 1 (2): 4-9.
- NISHIMOTO, S.; HASHIMOTO, A.; SEKI, N.; KIMURA, I.; TOYODA, K.; FUJITA, T.; ARAI, K. 1987. Influencing factors on changes in myosin heavy chain and jelly strength of salted meat paste from Alaska pollock during setting. **Nippon Suisan Gakkaishi** 53: 2011-2020.
- OCKERMAN, H. W.; ORGANISCIAK, C. S. 1979. Quality of restructured beef steaks after refrigerated and frozen storage. **J. Food Prot.** 42 (2): 126-130.
- OGAWA, M.; MAIA, E. L. 1999. **Manual de Pesca- Ciência e Tecnologia do Pescado**. Vol. 1, 430p. Editora Varela, São Paulo.
- OGAWA, M.; KANAMARU, J.; MIYASHITA, H.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. 1995. Alpha-helical structure of fish actomyosin: changes during setting. **J. Food Sci.** 60 (2): 297-299.
- OKADA, M.; MIYAUCHI, D.; KUDO, G. 1973. Kamaboko- the giant along Japanese processed fishery products. **Mar. Fish. Rev.** 35 (12): 1-6.
- PARDI, M. C.; SANTOS, F. L.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. 1993. Fundamentos da ciência da carne. Parte II. In **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne- volume I**, p.89-97. EDUFF, Goiânia.

- PARK, J. W.; KORHONEN, R. W.; LANIER, T. C. 1990. Effect of *rigor mortis* on gel forming properties of surimi and unwashed minced prepared from tilapia. **J. Food Sci.** 55 (2): 353-355.
- PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; HERRERA, J. J. 1994. Effects of mincing and frozen storage on functional properties of ray muscle (*Raja clavata*). **J. Sci. Agric.** 66: 35-44.
- PÉREZ-VILLAREAL, B.; HOWGATE, P. 1991. Deterioration of European hake (*Merluccius merluccius*) during frozen storage. **J. Sci. Food Agric.** 55: 455-469.
- POLLONIO, M. A. R. 1994. Estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de carne mecanicamente desossada. **Tese de Doutorado**, Unicamp, Campinas, SP.
- POULTER, R. G.; CURRAN, C. A.; DISNEY, J. G. 1981. Chill storage of tropical and temperate water fish- differences and similarities. **Sci. Technol. Refrigeration.** 22 (2): 123.
- RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; MAGA, J. A.; SCHMIDT, G. R. 1989. Influence of meat restructuring systems on lipid oxidation in beef. **Lebensm. Wiss und Technol.** 22 (4): 199.
- REDDY, G. V. S.; SRIKAR, L. N. 1991. Preprocessing ice storage effects on functional properties of fish mince protein. **J. Food Sci.** 56 (4): 965-968.
- REDDY, G. V. S.; SRIKAR, L. N.; SUDHAKARA, N.S. 1992. Deterioration changes in pink perch mince during frozen storage. **Int. J. Food Sci. Tech.** 27 (3):271-276.

- RICHARDSON, R. I., JONES, J. M. 1987. The effects of salt concentration and pH upon water-binding, water-holding and protein extractability of turkey meat. **Int. J. Food Sci.** 22: 683-692.
- ROCHA, Y. R.; AGUIAR, J. P. L.; MACHADO, H. A.; SHRIMPTON, R. 1982. Aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia. **Acta Amazônica** 12: 787-794.
- RODGERS, M. E.; KARR, T.; BIODERMAN, K.; UENO, W.; HARINGTON, W. F. 1987. Thermal stability of myosin rod from various species. **Biochem.** 26: 270.
- ROSSLER, E. B.; WARREN, J.; GUYMON, J. F. 1948. **Significance in Triangular Taste Tests.** 13: 503-505.
- ROUSSEL, H.; CHEFTEL, J. C. 1988. Characteristics of surimi and kamaboko from sardines. **Int. J. Food Sci. Tech.** 23: 607-623.
- SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M.; YASUI, T. 1982. Heat induced gelling properties of actomyosin: effect of tropomyosin and troponin. **Agric. Biol. Chem.** 46 (2): 535-540.
- SANCHEZ, L. 1989. **Pescado: Matéria-prima e Processamento.** 61p. Fundação Cargil, Campinas.
- SAS. 1985. **Statistical Analysis System User's Guide: Statistics.** SAS Institute, Inc., Cary NC, SAS Institute Inc.
- SCOTT, D. N.; PORTER, R. W.; KUDO, G.; MILLER, R.; KOURY, B. 1988. Effect of freezing and frozen storage of alaska pollock on the chemical properties of surimi. **J. Food Sci.** 53 (2): 353-358.

- SHENOUDA, S. Y. K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res.** 56: 275-307.
- SIKORSKI, Z. E. 1978. Changes in muscle foods due to freezing and frozen storage. **Int. J. Refrig.** 1: 174.
- SIKORSKI, Z. E.; OLLEY, J.; KOSTUCH, S. 1976. Protein changes in frozen fish. **CRC- Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 6 (1): 97-129.
- SILVA, A. J. 1987. Aspectos da alimentação de pacu adulto *Colossoma mitrei* (Berg, 1885) no Pantanal do Mato Grosso, p. 26-35. **Tese de Mestrado**. UFMT, Cuiabá.
- SMITH, D. M. 1987. Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. **J. Food Sci.** 52 (1): 22-27.
- SMITH, D. M. 1988. Meat proteins: functional properties in comminuted meat products. **Food Tech.** 42 (4): 116-121.
- SRIKAR, L. N.; SESHADARI, H. S.; H. S.; FAZAL, A. A. 1989. Changes in lipids and proteins of marine catfish (*Trachysurus dussumieri*) during frozen storage. **Int. J. Food Sci. Technol.** 24: 653-658.
- STANSBY, M. E. 1962. Proximate composition of fish- proteins and general composition. In **Fish in Nutrition**, E. Heen, R. Kreuzer (ed.), p.55-56. Fishing News Books, London.
- SUZUKI, T. 1981. Characteristics of fish and fish protein. Cap. 1. In **Fish and Krill Protein**, p.1-56. Applied Science Publishers Ltd., London.

- SVASTI, J.; PANIJAN, B. 1977. SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. **J. Chem. Educ.** 54 (9): 560-562.
- SYCH, J.; LACROIX, C.; ADAMBOUNOU, L. T.; CASTAIGNE, F. 1991. The effect of low- or non- sweet additives on the stability of protein functional properties of frozen cod surimi. **Int. J. Food Sci. Technol.** 26 (2): 185-197.
- SZCZESNIAK, A. S. 1963. Classification of textural characteristics. **J. Food Sci.** 28: 385.
- TAGUCHI, T.; ISHISAKA, H.; TANAKA, M.; NAGASHIMA, Y.; AMANO, K. 1987. Protein-protein interactions of fish myosin fragments. **J. Food Sci.** 52: 1103-1104.
- TAKAMA, K. 1974. Insolubilization of rainbow trout actomyosin during storage at -20°C. Mechanism of propanal or caproic acid reaction with actomyosin to induce insolubilization. **Bull. Jap. Soc. Sci.** 40: 389-393.
- TANFORD, C. 1968a. Protein Denaturation: Part A- Characterization of the denaturated state. **Adv. Protein Chem.** 23: 121-158.
- TANFORD, C. 1968b. Protein denaturation: the transition from native to denaturated state. **Adv. Protein Chem.** 23: 219-238.
- TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNNATHAN, M. T. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 37 (1): 44-48.
- TEJADA, M. 1994. Gelation of myofibrillar fish proteins. **Rev. Esp. Ciência Technol. Alim.** 34 (3): 257-273.

- TICHIVANGANA, J. Z.; MORRISEY, P. A. 1985. Metmyoglobin and inorganic metals as pro-oxidants in raw and cooked muscle systems. **Meat Sci.** 15: 107-116.
- TOMÁS, M. C.; ANÓN, M. C. 1990. Study on the influence of freezing rate on lipid oxidation in fish (salmon) and chicken breast muscles. **Int. J. Food Sci. Tech.** 25: 718-721.
- VARELTZIS, K.; ZETOU, F.; TSIARAS, I. 1988. Textural deterioration of chub mackerel (*Scomber japonicus collias*) and smooth hound (*Mustelus mustelus* L.) in frozen storage in relation to chemical properties. **Lebensmittel-wissenschaft und Technologie** 21 (4): 206.
- VARMA, T. N. 1967. Protein-lipid interaction affecting the quality of protein foods. **J. Food Sci. Technol.** 4: 12..
- VERMA, J. K.; SRIKAR, L. N.; SUDHAKARA, N. S.; SARMA, J. 1995. Effects of frozen storage on lipid freshness parameters and some functional properties of oil sardine (*Sardinella longiceps*) mince. **Food Res. Int.** 28 (1): 87-90.
- VOJDANI, F. 1996. Ch.2. In **Methods of Testing Protein Functionality**, G. M. Hall (ed.), p.11. Blackie Academic Professional.
- WILDING, P., LILLFORD, P. J., REGENSTEIN, J. M. 1984. Functional properties of proteins in foods. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 34: 182.
- WILDING, , P., HEDGES, N., LILLFORD, P. J. 1986. Salt-induced swelling of meat: the effect of storage time, pH, ion-type and concentration. **Meat Sci.** 18: 55.

- WISMER-PETERSEN, J. 1978. Water. In **The Science of Meat and Meat Products**, J. F. Price and B. S. Schweigert, p. 177. Food and Nutr. Press Westport, Conn.
- WU, F. Y.; SMITH, S. B. 1987. Ionic strength and myofibrillar protein solubilization. **J. An. Sci.** 65: 597-608.
- XIONG, Y. L. 1995. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. **J. Muscle Foods** 6 (2): 139-160.
- XIONG, Y. L.; BREKKE, C. J. 1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during frozen storage. **J. Food Sci.** 54 (5): 1141-1146.
- XIONG, Y. L.; DECKER, E. A.; ROBE, G. H.; MOODY, W. G. 1993. Gelation of crude myofibrillar protein isolated from beef heart under antioxidative conditions. **J. Food Sci.** 58 (6): 1241-1244.
- XIONG, Y. L.; DECKER, E. A. 1995. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. **J. Muscle Foods** 6: 139-160.
- ZAITSSEV, V.; KIEVETTER, I.; LAGUNOV, L.; MAKAROVA, T.; MINDER, L.; PODSEVALV, V. 1969. Characteristics of fish as a raw material for industry. In **Fishing Curing and Processing**, p.52-59. Moscow.
- ZIEGLER, Y. L.; ACTON, J. C. 1984. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. **Food Tech.** 5: 77-82.

ANEXO 1

Tabela 1. Tabela para análise estatística do teste triangular

Número de provadores	Número necessário de respostas corretas para estabelecer o nível de significância		
	5%	1%	0,1%
7	5	6	7
8	6	7	8
9	6	7	8
10	7	8	9
11	7	8	9
12	8	9	10
13	8	9	10
14	9	10	11
15	9	10	12
16	10	11	12
17	10	11	13
18	10	12	13
19	11	12	14
20	11	13	14
21	12	13	15
22	12	14	15
23	13	14	16
24	13	14	16
25	13	15	17
26	14	15	17
27	14	16	18
28	15	16	18
29	15	17	19
30	16	17	19
31	16	18	19
32	16	18	20
33	17	19	20
34	17	19	21
35	18	19	21
36	18	20	22
37	18	20	22
38	19	21	23
39	19	21	23
40	20	22	24

*Foram utilizados 21 provadores no teste sensorial

MODELO DE FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome:

Data:

Observação: Duas destas mostras são iguais e uma é diferente

1- Prove as amostras na ordem indicada e identifique a amostra diferente circundando o número a que se refere

2- Identifique, o grau de diferença entre as amostras iguais e a amostra diferente

- ☐ Moderada
- ☐ Muita diferença
- ☐ Excessiva diferença

3- Assinale qual amostra você considera mais aceitável

- ☐ Amostra diferente
- ☐ Amostras iguais

4- Comentários

ERRATA

Página 1, 3º parágrafo, linha 3 – **onde se lê** proteínas em em sistemas de alimentos... **lê-se** proteínas em sistemas de alimentos...

Página 8, 6º parágrafo, linha 3 – **onde se lê** observaram que o teor e minerais... **lê-se** observaram que o teor de minerais...

Páginas 21 e 79, 3º parágrafo, linha 7 – **onde se lê** tais como triglicérides... **lê-se** tais como triacilgliceróis...

Página 21, 1º parágrafo, linhas 2 e 5, Página 22, 1º parágrafo, linha 4 e 2º parágrafo, linha 2, Página 79, 2º parágrafo, linhas 2 e 5, Página 80, 1º parágrafo, linha 4 e 2º parágrafo, linha 2, Página 86 (Figura 1) e Página 87 (Tabela 1); Página 106 (Figura 2) – **onde se lê** $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$... **lê-se** $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína...

Página 22, 3º parágrafo, linha 2 – **onde se lê** ($r=0,27$) com os índices de desnaturação... **lê-se** ($r^2=0,27$, $r=-0,52$) com os índices de desnaturação...

Página 24, 4º parágrafo, linha 2 e página 81, 2º parágrafo, linha 5 – **onde se lê** susceptível à ligações cruzadas... **lê-se** susceptível à formação de ligações cruzadas...

Página 55, 5º parágrafo, linha 2 – **onde se lê** que a sinerese, firmeza e a coesividade dos géis protéicos diminuiram... **lê-se** que a sinerese aumentou, e a firmeza e a coesividade dos géis protéicos diminuíram...

Página 65, 4º parágrafo, linha 2 – **onde se lê** força iônica $\leq 0,01M$... **lê-se** força iônica $\leq 0,1M$...

Página 108, 1º parágrafo, linha 13 – **onde se lê** correlação significativa (Tabela 3) com a oxidação de lipídeos... **lê-se** correlação significativa ($r=-0,97$) com a oxidação de lipídeos...

Página 127, 4º parágrafo, linha 1 – **onde se lê** Pelo decréscimo observado nos valores... **lê-se** Pelo aumento observado nos valores...

Página 127, 4º parágrafo, linha 3 – **onde se lê** que de acordo com ... **lê-se** que de acordo com ...

Página 136, 2º parágrafo, linha 2 – **onde se lê** entre elas o prejuízo causada... **lê-se** entre elas o prejuízo causado...

Estudo 5:

- Índice, item 2.2.5, Índice de tabelas (Tabelas 5 e 7); Índice de figuras (Figura 5);

Página 144, item 2.2.5, Página 149 (Figura e Tabela 5); Página 150 (Tabela 7);

Página 153 – **onde se lê** perda de peso no cozimento... **lê-se** rendimento...

- Página 144, item 2.2.5 – **onde se lê** O cálculo do percentual da perda de peso no cozimento foi estabelecido pela diferença de peso antes e depois do tratamento térmico... **lê-se** O cálculo do rendimento foi estabelecido com base nos pesos dos hambúrgueres antes e após o tratamento térmico...

- Página 150, Tabela 7 – **onde se lê** + 0,83... **lê-se** - 0,83...

- Página 150, Tabela 7 – **Excluir** a coluna referente ao parâmetro coesividade...

- Página 154, linha 4 – **onde se lê** comprovada pela maior perda pelo cozimento... **lê-se** comprovada pelo menor percentual de rendimento...

- Página 154, linha 6 – **onde se lê** resultados estes semelhantes aos de HSIEH & REGENSTEIN (1989), que ainda observou... **lê-se** resultados estes semelhantes aos de HSIEH & REGENSTEIN (1989).

- Página 156, 4º parágrafo, linha 2 – **onde se lê** O percentual da perda de peso no cozimento e a dureza de hambúrgueres correlacionaram-se positivamente... **lê-se** O percentual do rendimento e a dureza de hambúrgueres correlacionaram-se negativamente...