



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*): OBTENÇÃO,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E APLICAÇÃO EM EMBUTIDO EMULSIONADO**

**INAJARA BEATRIZ BROSE PIOTROWICZ**

ORIENTADOR: Dr<sup>a</sup> Myriam de las Mercedes Salas Mellado

RIO GRANDE, RS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*):  
OBTENÇÃO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E APLICAÇÃO EM EMBUTIDO  
EMULSIONADO**

INAJARA BEATRIZ BROSE PIOTROWICZ

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Engenharia e Ciência de  
Alimentos para a obtenção do  
título de Mestre.

Orientador: Myriam de las Mercedes Salas Mellado  
Co-orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández

RIO GRANDE, RS  
2012

Dedico este trabalho a toda minha família que sempre acreditou no meu esforço e dedicação. À Deus, que nas horas difíceis, me deu forças para seguir adiante.

*Se alguém já lhe deu a mão e não pediu  
mais nada em troca, pense bem, pois é um  
dia especial...*

*(Cidadão Quem)*

## **AGRADECIMENTOS**

Durante todo o período de trabalho muitas pessoas foram responsáveis para que este chegasse ao fim, principalmente Deus, que foi a força maior que me fez ter empenho e conseguir atravessar os obstáculos, seguindo adiante com o trabalho.

À minha família que sempre me apoiou, e continua me apoiando, para que eu seguisse com os meus estudos. Meus pais Marlene e Ricardo pela oportunidade de estudo, aos meus irmãos, Alberto, Eduardo e Márcio, às cunhadas Silvana, Caroline e Kátia, e à minha tia Salomé por acreditarem em mim e me ajudarem em momentos difíceis.

Agradeço ao meu namorado João, minha sobrinha Gabriela e às amigas Denise, Daiane e Elisete pelos momentos de descontração. Pessoas que também sempre acreditaram no meu potencial.

Quero agradecer aos meus amigos da FURG, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Sabrine, Dennis, Priscila, Meritaine, Shanise, Ana Paula, Gilberto, Márcia, Elessandra, Renata, Caroline, Ariane, Sandriane, William, Marcondes e Vilásia por terem me auxiliado em pequenas coisas, mas que foram de grande importância para a formação deste trabalho. Agradeço também ao Gabriel pela ajuda no início das pesquisas e à Janise que me acompanhou no restante do trabalho.

Agradeço aos demais amigos da Pós Graduação Bárbara, Daiane Reis e Felipe.

Agradeço aos professores Carlos e Myriam por toda a orientação durante esses dois anos de mestrado, sendo que são responsáveis por toda a experiência que fui adquirindo desde a graduação.

Agradeço aos outros laboratórios da FURG – Campus Cidade, como o Laboratório de Ciência de Alimentos, de Engenharia Bioquímica, de Bioprocessos, de Sensorial, de Biotecnologia de Alimentos e Núcleo de Alimentos pelo empréstimo de reagentes e equipamentos quando foi necessário.

Agradeço à URI, onde foi realizada a liofilização dos hidrolisados, em especial a minha amiga Juliana que foi a intermediária nesta etapa do trabalho.

Agradeço ao CNPq que financiou este trabalho e ao Projeto Anchoita, pela disposição do pescado para a elaboração dos hidrolisados e do surimi, além de reagentes que foram adquiridos através do projeto.

Quero agradecer às empresas Tovani, pela disposição das enzimas Alcalase e Flavourzyme, e à empresa Duas Rodas Industrial Ltda, pela doação dos ingredientes utilizados na elaboração das salsichas.

À banca examinadora eu agradeço por aceitarem participar da avaliação e corrigirem a Dissertação.

Aos professores do Programa de Pós Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos por estarem sempre dispostos a ajudar.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
RESUMO GERAL .....	xiv
GENERAL ABSTRACT .....	xv
CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo geral .....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
CAPÍTULO 2 .....	5
3. REVISÃO BILIOGRÁFICA.....	6
3.1. Anchoita ( <i>Engraulis anchoita</i> ).....	6
3.2. Proteínas.....	7
3.2.1. Proteínas do músculo de peixe .....	8
3.2.2. Peptídeos e aminoácidos .....	8
3.3. Enzimas proteolíticas .....	9
3.4. Hidrolisados protéicos.....	11
3.5. Grau de hidrólise.....	13
3.6. Propriedades dos hidrolisados protéicos.....	13
3.7. Antioxidantes .....	14
3.7.1. Tipos de antioxidantes .....	14
3.7.2. Peptídeos antioxidantes.....	16
3.8. Métodos de determinação da atividade antioxidante.....	17
3.9. Oxidação lipídica em alimentos.....	19
3.10. Surimi .....	20
3.11. Salsicha.....	22
3.11.1. Ingredientes da salsicha .....	22
3.12. Avaliação do produto.....	23
CAPÍTULO 3 .....	25
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....	26
ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE ANCHOITA ( <i>Engraulis anchoita</i> ) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	27
RESUMO .....	28

ABSTRACT .....	29
1. INTRODUÇÃO .....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
2.1. Matéria prima .....	31
2.2. Enzimas e reagentes químicos .....	31
2.3. Rendimento da matéria prima .....	31
2.4. Características químicas e físicas da matéria prima.....	32
2.5. Hidrólise proteica .....	32
2.6. Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados de CMS de anchoita ....	33
2.7. Medida da atividade antioxidante .....	34
2.7.1. Inibição da peroxidação lipídica .....	34
2.7.2. Efeito sequestrante do radical livre DPPH.....	35
2.7.3. Poder redutor .....	35
2.8. Análise estatística .....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
3.1. Rendimento e caracterização física e química da CMS de anchoita .....	36
3.2. Grau de hidrólise.....	37
3.3. Atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos da CMS de anchoita .....	40
3.3.1. Inibição da peroxidação lipídica .....	40
3.3.2. Efeito sequestrante do radical 2,2- difenil - 1- picrilidrazil (DPPH).....	41
3.3.3. Poder redutor .....	45
4. CONCLUSÃO.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DAS LAVAGENS NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE SURIMI DE ANCHOITA ( <i>Engraulis anchoita</i> ) .....	53
RESUMO .....	54
ABSTRACT .....	55
1. INTRODUÇÃO .....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	57
2.1. Matéria prima.....	57
2.2. Reagentes.....	57
2.3. Obtenção do surimi da CMS de anchoita .....	57
2.4. Rendimento do surimi .....	59
2.5. Caracterização química e física .....	59
2.6. Análise estatística .....	60



3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.1.	Rendimento .....	60
3.2.	Composição proximal.....	61
3.3.	N-BVT e pH da CMS de anchoita.....	62
3.4.	Cor.....	63
3.5.	Textura.....	65
4.	CONCLUSÃO.....	66
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ARTIGO 3: UTILIZAÇÃO DE SURIMI DE ANCHOITA ( <i>Engraulis anchoita</i> ) EM EMBUTIDO EMULSIONADO E EFEITO ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO .....	71
	RESUMO .....	72
	ABSTRACT.....	73
1.	INTRODUÇÃO .....	74
2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	75
2.1.	Matéria prima.....	75
2.2.	Reagentes e ingredientes .....	76
2.3.	Preparo das salsichas de surimi de CMS de anchoita.....	77
2.4.	Cor e textura das salsichas de surimi de CMS de anchoita .....	79
2.5.	Composição química das salsichas .....	79
2.6.	Características nutricionais da salsicha .....	80
2.7.	Aplicação do hidrolisado antioxidante na salsicha e na CMS de anchoita .....	80
2.8.	Análise estatística.....	81
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
3.1.	Características físicas da salsicha de surimi de anchoita .....	81
3.2.	Características química das salsichas.....	83
3.3.	Características nutricionais das salsichas .....	84
3.4.	Aplicação do hidrolisado antioxidante na salsicha.....	85
3.5.	Aplicação do hidrolisado antioxidante na CMS de anchoita .....	86
4.	CONCLUSÃO .....	88
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
	CAPÍTULO 4 .....	92
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	93
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
	CAPÍTULO 5 .....	95
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

%C = Porcentagem de carboidratos no produto

%L = Porcentagem de lipídeos no produto

%P = Porcentagem de proteínas no produto

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  = Íon ferrocianeto

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  = Ferrocianato

$a^*$  = Croma a

A1 = Hidrolisado de anchoita com a enzima Alcalase obtida em 1 hora de reação

A5 = Hidrolisado de anchoita com a enzima Alcalase obtida em 5 horas de reação

AB = Lavagens com solução de cloreto de sódio 0,3% (p/v), com solução de ácido fosfórico 0,05% (p/v) e solução de bicarbonato de sódio 0,5% (p/v)

ABS = Absorbância

AF = Lavagem com água destilada, solução de ácido fosfórico 0,05% (p/v) e solução de cloreto de sódio 0,3% (p/v)

$b^*$  = Croma b

BHA = Butil hidroxi-anisol

BHT = Butil hidroxi-tolueno

BS = Duas lavagens com soluções de bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) e uma de cloreto de sódio 0,3% (p/v)

CMS = Carne mecanicamente separada

DPPH = 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil

F1 = Hidrolisado de anchoita com a enzima Flavourzyme obtida em 1 hora de reação

F5 = Hidrolisado de anchoita com a enzima Flavourzyme obtida em 5 horas de reação

$\text{FeCl}_3$  = Cloreto férrico

GH = Grau de hidrólise

HCl = Ácido clorídrico

$L^*$  = Luminosidade

MDA = Malonaldeído

N-BVT = Nitrogênio de bases voláteis totais

P1 = Hidrolisado de anchoita com a enzima Protamex obtida em 1 hora de reação

P5 = Hidrolisado de anchoita com a enzima Protamex obtida em 5 horas de reação

PIQ = Padrão de Identidade e Qualidade

TBA = Ácido tiobarbitúrico

TBARS = Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

TCA = Ácido tricloroacético

TEP = 1,1,3,3-Tetraetóxiopropano

TNBS = 2,4,6-Ácido trinitrobenzeno sulfônico

VET = Valor Energético Total

W = Brancura

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Anchoita ( <i>Engraulis anchoita</i> ).....	6
Figura 2: Formação de um dipeptídeo através da ligação peptídica entre dois aminoácidos. ....	9
Figura 3: Atuação de enzimas endo e exopeptidases na cadeia protéica durante a hidrólise.....	11
Figura 4: Estrutura dos antioxidantes sintéticos que são adicionados em produtos alimentícios. ....	15
Figura 5: Molécula dos tocoferóis.....	16
Figura 6: Ação do antioxidante (AH) na redução do radical DPPH.....	18
Figura 7: Reação do TBA com o malonaldeído proveniente da decomposição de hidroperóxidos.....	20

### ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Figura 1: Processo de hidrólise enzimática da CMS de anchoita com diferentes enzimas e condições de hidrólise. ....	33
Figura 2: Grau de hidrólise dos hidrolisados de anchoita obtidos pela ação de diferentes enzimas e em diferentes tempos de reação. ....	38
Figura 3: Absorbâncias dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas em diferentes tempos de hidrólise pela inibição da peroxidação lipídica. ....	40
Figura 4: Efeito sequestrante do radical DPPH pelos hidrolisados da CMS de anchoita obtidos pela enzima Alcalase em diferentes tempos de hidrólise. ....	42
Figura 5: Efeito sequestrante do radical DPPH pelos hidrolisados da CMS de anchoita obtidos pela enzima Flavourzyme em diferentes tempos de hidrólise.....	43
Figura 6: Efeito sequestrante do radical DPPH pelos hidrolisados da CMS de anchoita obtidos pela enzima Protamex em diferentes tempos de hidrólise.....	44
Figura 7: Absorbância (700 nm) de hidrolisados obtidos com diferentes enzimas e em diferentes tempos de hidrólise. ....	45

**ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DAS LAVAGENS NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*)**

Figura 1: Processo de obtenção e armazenamento de surimi de anchoita.....58

**ARTIGO 3: UTILIZAÇÃO DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) EM EMBUTIDO EMULSIONADO E EFEITO ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO**

Figura 1: Produção de surimi de CMS de anchoita.....76

Figura 2: Processo de produção de salsicha de surimi de anchoita. ....77

Figura 3: Efeito dos hidrolisados F1 e F5 na formação de TBARS na salsicha de surimi de CMS de anchoita. ....85

Figura 4: Efeito dos hidrolisados F1 e F5 na formação de TBARS na CMS de anchoita. ....87

## LISTA DE TABELAS

### **ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Tabela 1: Composição proximal (base úmida) da CMS de anchoita.....36

### **ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DAS LAVAGENS NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*)**

Tabela 1: Rendimento da CMS de anchoita e dos surimis obtidos após diferentes lavagens.....60

Tabela 2: Composição proximal (base seca e base úmida) da CMS e dos surimis obtidos com diferentes lavagens. ....61

Tabela 3: Análise de cor da CMS e dos surimi de anchoita obtidos em diferentes tipos de lavagens. ....63

Tabela 4: Textura dos géis de surimi com diferentes lavagens da CMS de anchoita...65

### **ARTIGO 3: UTILIZAÇÃO DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) EM EMBUTIDO EMULSIONADO E EFEITO ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO**

Tabela 1: Componentes da salsicha de surimi de CMS de anchoita. ....78

Tabela 2: Parâmetros de cor das salsichas produzidas com diferentes concentrações de surimi de anchoita CMS e salsicha comercial de frango comercial. ....81

Tabela 3: Firmeza e resistência das salsichas de surimi de anchoita e comercial. ....82

Tabela 4: Composição proximal (b.u) de salsichas produzidas com surimi de anchoita e comercial. ....83

## RESUMO GERAL

Uma alternativa para pescados subaproveitados e subprodutos da industrialização de pescado é o desenvolvimento de processos para recuperação e/ou alteração das proteínas musculares de pescados. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de hidrolisados protéicos de carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita (*Engraulis anchoita*) e a avaliação da sua atividade antioxidante, aplicando-os bem embutido preparado com o surimi de anchoita. Foram produzidos diferentes hidrolisados com as enzimas microbianas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, fixando a concentração de substrato e de enzima e os parâmetros pH e temperatura foram variados. Os hidrolisados foram efetivos contra a inibição da peroxidação lipídica ( $43,8 \pm 0,2\%$ ) e no poder redutor, onde o hidrolisado com a enzima Flavourzyme em 1 hora de reação mostrou-se mais efetivo. No seqüestro de radicais livres, como o DPPH, o hidrolisado com a enzima Flavourzyme, obtido em tempo de hidrólise de 5 horas, alcançou valores acima de 45,0% em concentração de 5 mg/mL. Na produção de surimi foram testadas lavagens da CMS de anchoita com soluções de bicarbonato de sódio 0,5%, ácido fosfórico 0,05% e cloreto de sódio 0,3%. O maior rendimento (90,5%) e uma coloração mais clara ( $W = 50,24 \pm 1,81$ ) foram encontrados no surimi obtido por lavagens com bicarbonato de sódio e cloreto de sódio (BS), em comparação ao surimi que se utilizou água, ácido fosfórico e cloreto de sódio (AF) ou com soluções de cloreto de sódio, ácido fosfórico e bicarbonato de sódio (AB). Na força de gel o surimi AF ( $1154,25 \pm 4,37$  g.mm) obteve maior valor, sendo utilizado para a produção de salsichas. Foram analisadas diferentes concentrações de surimi (70, 75 e 80%) em salsichas, que foram submetidas às análises de cor e textura. Não houve influência da concentração de surimi nas características tecnológicas da salsicha, exceto nos valores de luminosidade. A salsicha com 75% de surimi de anchoita foi caracterizada pela composição proximal, valor energético total (VET) e conteúdo de sódio. A salsicha com surimi e comercial apresentou composição semelhante. O produto com surimi apresentou menor VET (193,7Kcal/100g) e conteúdo de sódio (520 mg/100g) que a salsicha comercial. Nas condições de estudo, no embutido emulsionado, não foi verificada ação antioxidante de hidrolisados, porém houve efeito sobre a CMS de anchoita.

**Palavras-chave:** Pescado, hidrolisado enzimático, surimi, salsicha.

## GENERAL ABSTRACT

An alternative for underutilized fish and industrialized fish by-products are the development of processes for the recovery and / or alteration of muscle proteins of fish such as anchovy (*Engraulis anchoita*), not used specie for direct consumption in Southern Brazil. The objective of this work was to obtain protein hydrolysates from mechanically separated meat (MSM) of Argentine anchovy and evaluate their antioxidant activity, and finally apply them in sausage prepared with anchovy surimi. Different hydrolysates were produced through the action of microbial enzymes Alcalase, Flavourzyme and Protamex, fixing the substrate and enzyme concentration varying pH and temperature values. The hydrolysates were effective against the inhibition of lipid peroxidation ( $43.8 \pm 0.2\%$ ) and reducing power, remaining the Flavourzyme hydrolyzate with one hour of reaction the most effective. In DPPH radical-scavenging activity the hydrolyzate with Flavourzyme, obtained with five hours of hydrolysis time, reached values above 45.0% at a concentration of 5 mg/ml. In the Argentine anchovy MSM surimi was tested different washing solutions such as 0.5% sodium bicarbonate, 0.05% phosphoric acid and sodium chloride 0.3%. It was obtained a higher yield (90.5%) and whiteness ( $W = 50.24 \pm 1.81$ ) in surimi obtained by washing with sodium bicarbonate and sodium chloride (SB), compared to surimi, which it was used water, phosphoric acid and sodium chloride (PA), and with solutions of sodium chloride, phosphoric acid and sodium bicarbonate (PS). The higher gel strength was obtained for surimi PA ( $1154.25 \pm 4.37$  g.mm), therefore was used for the production of sausages. It was analyzed the color and texture of sausages elaborated with different concentrations (70, 75 and 80%) of surimi. There was no influence of the concentration of surimi on the technological characteristics of the sausage, except in the luminosity values. The sausage with 75% Argentine anchovy surimi was characterized from the proximal composition, showing that surimi and commercial sausages were similar. The surimi product showed lower values of energy (193.7 kcal/100g) and sodium (520 mg/100 g) than the commercial sausage. It was no verified any antioxidant activity of the hydrolysates on the sausages for the conditions used in this study, however it was verified antioxidant activity of the hydrolysates on the anchovy MSM.

**Keywords:** Fish, enzymatic hydrolysed, surimi, sausage



## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul, em especial na região sul, ocorre a captura e a industrialização de pescado. O uso do pescado de baixo valor comercial como fonte para obtenção de produtos com maior valor agregado tais como os hidrolisados proteicos, é uma alternativa interessante para a sustentabilidade do setor. Para muitos pescadores e empresários, a anchoita (*Engraulis anchoita*) não é considerada um pescado de muito interesse. Esta não apresenta aplicação comercial por ser pequena (pouco mais de 10 cm) e exigir muita mão-de-obra durante o processamento (WITTER, 2010). A anchoita é uma espécie que ainda não se apresenta disponível em supermercados e na mesa do consumidor brasileiro e pode ser a matéria prima para estudo de hidrolisados protéicos.

Segundo Oetterer (1999), os hidrolisado protéicos de pescado são concentrados protéicos, obtidos do trabalho de enzimas que hidrolisam as proteínas do pescado. Algumas enzimas já tem sido bastante usadas para a produção de hidrolisados de pescado, como a Alcalase (SANTOS *et al.*, 2011; BHASKAR *et al.*, 2008; CENTENARO, 2007; NIELSEN *et al.*, 2001.; LICEAGA-GUESUALDO e LI-CHAN, 1999; HOYLE e MERRITT, 1994) , Papaina (NAZEER *et al.*, 2011, HOYLE e MERRITT, 1994), Flavourzyme (CENTENARO, 2011; SANTOS *et al.*, 2009; NIELSEN *et al.*, 2001), Neutrase (SLIZYTE *et al.*, 2004, NIELSEN *et al.*, 2001) e Protamex (SYLLA *et al.*, 2009).

Além das propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais de algumas proteínas, elas podem apresentar atividade biológica. Uma delas é a atividade antioxidante, que pode estar associada aos peptídeos bioativos presentes em determinadas seqüências da proteína, liberados após a hidrólise enzimática. Peptídeos bioativos são cadeias de peptídeos de pequeno tamanho, contendo entre dois e quinze resíduos de aminoácidos, inativos dentro da proteína, mas que podem ser liberados, e exercer efeitos benéficos para o organismo (VIOQUE *et al.*, 2006). Estes peptídeos podem ser úteis não só para a saúde do indivíduo, mas também como antioxidantes naturais para a conservação de alimentos. No entanto, sua atividade irá depender da composição e seqüência de aminoácidos, além de sua massa molecular (NEVES *et al.*, 2006).

A oxidação de lipídeos é um processo indesejável, pois leva principalmente a mudanças na coloração e no sabor dos produtos. Para retardar as mudanças

oxidativas têm-se utilizado frequentemente, substâncias antioxidantes para auxiliar o processamento e a preservação dos alimentos (SUETSUNA, 2000).

A média mundial de consumo de pescado, segundo a FAO em 2010, é de 17 Kg por pessoa (SINDROF, 2012). O Brasil apresenta um dos mais baixos índices de consumo de pescado. Em 2009 os brasileiros consumiram em média 9 Kg de pescado (SEBRAE, 2012). Este índice, dentre outros fatores, provavelmente deve-se à falta de conhecimento da importância do pescado na alimentação (RANKEN, 1993). A indústria mundial de pescado, nas últimas décadas, vem buscando o desenvolvimento de novos produtos a partir de tecnologias alternativas, dentre os quais se inclui o surimi. Surimi é um produto obtido a partir do músculo de pescado, constituído por proteínas solúveis em soluções salinas, principalmente as miofibrilares, de alta qualidade nutritiva e excelente funcionalidade (KHUN, 2006). A elaboração do surimi permite a utilização de espécies de baixo valor comercial, ou da fauna acompanhante capturada quando o alvo é outra espécie (BARRETO e BEIRÃO, 1999).

No século XX a dieta tradicional do brasileiro sofreu algumas modificações, entre estas, o consumo de embutidos como salsichas, frios e lingüiças (BRASIL, 2006). Esses produtos industrializados são mais práticos, possuem um prazo de validade bem maior do que os produtos "in natura" e tornam mais fácil a estocagem. Estes produtos representam uma solução para a vida tumultuada das grandes cidades. O uso de surimi na formulação de salsichas vem sendo muito estudado (GONÇALVES *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2007; MOREIRA, 2005).

Peptídeos antioxidantes estão sendo estudados recentemente em matriz alimentar para atuarem como antioxidantes. A inibição da oxidação de lipídeos foram estudados em carne moída (CENTENARO, 2011; ROSSINI *et al.*, 2009; SAKANAKA *et al.*, 2005), sendo encontrados resposta satisfatórias para o uso de hidrolisados proteicos antioxidantes em alimentos, visando estudos em sistemas mais complexos, com embutidos cárneos emulsionados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O trabalho teve por objetivo a obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante a partir do músculo de anchoita para aplicação em um embutido elaborado com surimi de anchoita.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Obter hidrolisados com o uso de diferentes enzimas comerciais e em diferentes tempos de hidrólise;
- Verificar o grau de hidrólise e a atividade antioxidante dos hidrolisados;
- Produzir surimi a partir da polpa de anchoita, utilizando-o como ingrediente principal para a produção de salsichas;
- Verificar a influência dos hidrolisados na inibição da oxidação lipídica da salsicha e da carne de anchoita.

## **CAPÍTULO 2**

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Anchoita (*Engraulis anchoita*)

A maior parte da captura mundial de pescado é proveniente de espécies marinhas, metade correspondente a espécies demersais e a outra a espécies pelágicas. Entre os pelágicos de pequeno porte destaca-se a anchoita (*Engraulis anchoita*), mostrada na Figura 1. Esta espécie é do gênero *Engraulis* e pertencente à família *Engraulidae*. São pequenos peixes pelágicos, forrageiros próximos da base da pirâmide trófica (CASTELLO, 1998).



Figura 1: Anchoita (*Engraulis anchoita*).

Fonte: TEODORO PENOFF, 2010.

Entre 1996 e 2006, profissionais mapearam os recursos pesqueiros da costa brasileira, em especial na faixa do Chuí ao Ceará. A expectativa era identificar os novos recursos disponíveis para a pesca nacional. A anchoita foi uma das poucas espécies consideradas novas por serem pouco ou nada exploradas no país (HOROSTEKI e BELTRÃO, 2007).

A anchoita possui hábitos costeiros, distribuindo-se principalmente desde o Golfo São Jorge na Argentina até o Rio de Janeiro. No Brasil, mais especificamente do Cabo Frio (RJ) até o Chuí (RS), este pescado encontra-se nas profundidades menores que 10 m até aproximadamente 200 m (CASTELLO e CASTELLO, 2003).

Este pescado rendeu, durante muito tempo, bons lucros para o Uruguai e Argentina (CASTELLO, 1998). Nos Portos de Mar Del Plata, desde 1927, tem-se praticado a pesca artesanal desta espécie para a produção de anchoita em salmoura ou filés em conservas com óleos ou azeites. A pesca industrial, destinada à produção de farinha, iniciou-se em 1981 com barcos arrasteiros de meia água que operavam desde o porto de La Paloma. As capturas alcançaram 17 mil toneladas em 1983 (NION e RIOS, 1991).

Hoje em dia a maioria dos estoques está em situação de sobrepesca ou já esgotada. A maior parte delas está nas regiões Norte e Nordeste. No Sul, a anchoita foi identificada como uma das poucas espécies que se apresentam em abundância em algumas épocas do ano. No extremo Sul do país, a estimativa é de um estoque de 1 milhão de toneladas. A anchoita só entra no Brasil quando temos águas muito frias e é compartilhada com Argentina e Uruguai. O consumo deste pescado não é comum no Brasil. Por isso, pesquisadores estudam as possíveis formas de preparo (ROSSI-WONGTSCHOWSKI e MADUREIRA, 2006).

### **3.2. Proteínas**

As proteínas são moléculas complexas constituídas por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e, às vezes, outros elementos como o enxofre, ferro, cobre, fósforo e zinco (ORDÓÑEZ, 2005). São componentes essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas. Elas são utilizadas na regeneração de tecidos, funcionam como catalisadores nas reações químicas que se dão nos organismos vivos e que envolvem enzimas ou hormônios são necessárias nas reações imunológicas e, juntamente com os ácidos nucleicos, são indispensáveis nos fenômenos de crescimento e reprodução. Constituem o elemento estrutural do organismo animal (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As proteínas estão presentes em aproximadamente 50% ou mais de seu peso seco nas células. Em moléculas protéicas existem resíduos de aminoácidos que se ligam covalentemente, formando longos polímeros não ramificados, que são denominados cadeias polipeptídicas (LEHNINGER, 1976).

A qualidade nutricional de qualquer proteína está ligada a sua composição de aminoácidos, digestibilidade e capacidade de fornecer os aminoácidos essenciais nas quantidades requeridas pela espécie que consome tal proteína. As proteínas são essenciais aos organismos vivos, devendo estar disponíveis na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto qualitativo, deve-se levar em conta o aspecto quantitativo das proteínas, ou seja, o seu valor nutritivo (SGARBIERI, 1996).

As proteínas da carne são muito similares em todos os animais de abate, podendo ser classificada segundo a sua solubilidade, em três grupos: miofibrilares, sarcoplasmáticas e insolúveis (ORDÓÑEZ, 2005).

### 3.2.1. Proteínas do músculo de peŕcado

As proteínas sarcoplasmáticas, localizadas dentro das células (sarcoplasma) são solúveis em água e formadas pelo conjunto chamado de conjunto miógeno. Proteínas desta categoria se incluem as enzimas oxidativas, mioglobina e outros pigmento e enzimas responsáveis pela glicólise (RANKEN, 2000).

As proteínas miofibrilares são as que formam as miofibrilas e incluem em maior quantidade actina e miosina. Estas proteínas, insolúveis em água e solúveis em solução salina, tem papel fundamental na coagulação e formação de gel quando o músculo de peŕcado é processado (TAHA, 1996). São consideradas as principais proteínas do peŕcado e estão contidas nas células musculares, tendo como função a formação dos tecidos esqueléticos, além de serem responsáveis pelo fenômeno de contração muscular (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As proteínas do estroma são geralmente referidas como as proteínas do tecido conjuntivo e fazem parte da estrutura do músculo. As principais proteínas deste grupo são os colágenos (RANKEN, 2000).

O músculo de diferentes animais é muito similar com relação ao conteúdo de proteínas e ao perfil de aminoácidos. Existe uma pequena diferença entre o músculo de peŕcado e de animais terrestres, decorrentes das necessidades de estrutura muscular requerida para nadar e flutuar (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

### 3.2.2. Peptídeos e aminoácidos

Os aminoácidos são considerados as unidades monoméricas formadoras da proteína. Estes aminoácidos contem grupos funcionais amínicos e carboxílicos. Apesar de muitas proteínas conterem outras substâncias além dos aminoácidos a estrutura tridimensional e propriedades biológicas das proteínas são determinadas pelos tipos de aminoácidos presentes em sua molécula, a ordem em que eles estão unidos entre si na formação da cadeia polipeptídica e também pela inter relação espacial de um aminoácido com o outro (MURRAY *et al.*, 1990).

Os grupos amino e carboxílico dos aminoácidos combinam-se para formar as ligações peptídicas, como mostra a Figura 2. Um peptídeo consiste de dois ou mais aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Os peptídeos com mais de dez resíduos de aminoácidos são chamados de polipeptídeos. A sequencia linear dos resíduos de



aminoácidos de um polipeptídeo constitui a sua estrutura primária (MURRAY *et al.*, 1990).

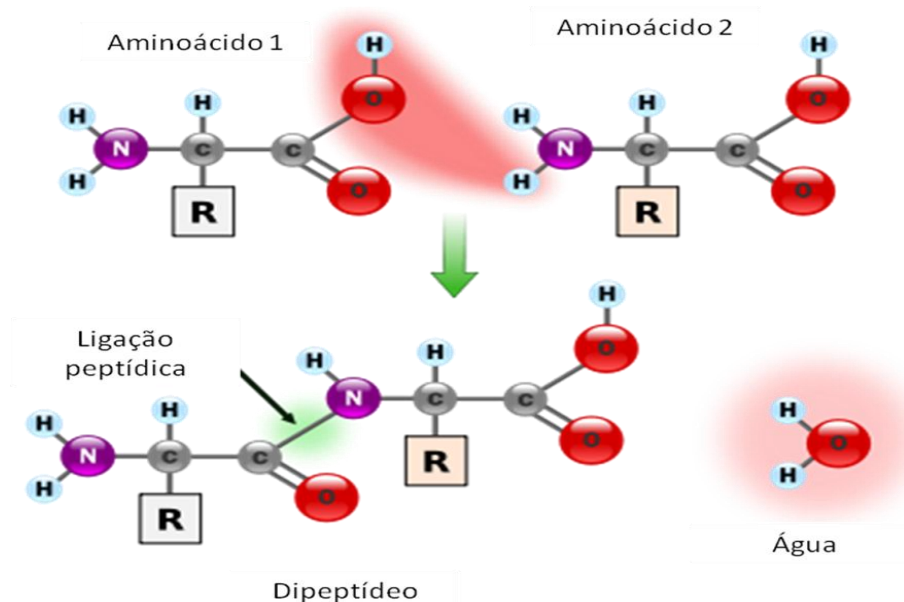


Figura 2: Formação de um dipeptídeo através da ligação peptídica entre dois aminoácidos.

Fonte: Administrador EAE, 12/12/2009. <http://bloggeae.blogspot.com/2009/12/substancias-quimicas-que-compoem-os.html>

Os aminoácidos, peptídeos e proteínas são componentes importantes dos alimentos por proporcionarem os elementos necessários para a síntese proteica e por contribuem diretamente para o sabor dos alimentos e são precursores dos componentes aromáticos e substâncias coloridas que se formam mediante as reações térmicas ou enzimáticas que ocorrem durante a obtenção, preparo e armazenamento dos mesmos (BELITZ e GROSCH, 1997).

### 3.3. Enzimas proteolíticas

As enzimas são catalisadores protéicos das reações bioquímicas. Atualmente são conhecidas diferentes enzimas, muitas delas são comercializadas, onde cada uma delas atua em um tipo diferente de reação química. Além das enzimas possuírem um alto poder catalítico apresentam alta especificidade na sua função. Cada tipo de

molécula enzimática contém um sítio ativo, onde o seu substrato específico está ligado durante uma etapa da catálise (LEHNINGER, 1976).

As proteases são enzimas que atuam na quebra de ligações peptídicas da cadeia protéica e, dependendo da sua especificidade, podem afetar no tamanho, na quantidade, na composição de aminoácidos livres, peptídeos e na sequência de aminoácidos que a compõem (WU *et al.*, 2003).

Existem as enzimas proteolíticas classificadas em endo e exopeptidases (Figura 3). As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas, geralmente em resíduos específicos, produzindo peptídeos grandes. Por outro lado, as exopeptidases atuam no nitrogênio terminal dos aminoácidos, formando as aminopeptidases, ou no carbono terminal, produzindo as carboxipeptidases (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008). Em proteínas alimentares geralmente utilizam-se as endoproteínases, podendo também estar combinadas com as exoproteínases para que ocorra a degradação completa (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008; KRISTINSSON e RASCO, 2000).

A Alcalase é uma enzima produzida por fermentação submersa pelo *Bacillus licheniformis*, sendo desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca) para a indústria de detergentes. Tem sido provado repetidamente, por muitos pesquisadores, que é a melhor enzima usada na preparação de diversos hidrolisados protéicos (SANTOS *et al.*, 2011; BHASKAR *et al.*, 2008; CENTENARO, 2007; NIELSEN *et al.*, 2001.; REVALLEC-PLÉ *et al.*, 2000; LICEAGA-GUESUALDO e LI-CHAN, 1999; HOYLE e MERRITT, 1994).

A Flavourzyme é um complexo de proteases fúngicas, constituída de exopeptidases e endopeptidases, produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* que não foi geneticamente modificada, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas. Esta enzima também tem sido bastante utilizada para produzir hidrolisados protéicos de pescado (SANTOS *et al.*, 2011; CENTENARO, 2011; NILSANG *et al.*, 2005; NIELSEN *et al.*, 2001).

A Protamex é uma protease bacteriana do *Bacillus* sp., sendo complexa pela mistura de endo e exopeptidases. É utilizada na indústria de alimentos para melhorar as propriedades funcionais, nutricionais e flavorizantes da proteína (NOVOZYMES, 2012). A enzima Protamex tem sido usada em alguns estudos (SLIZYTÉ *et al.*, 2009; LIASET *et al.*, 2003), onde os autores alegam que os hidrolisados obtidos não apresentam sabor amargo.

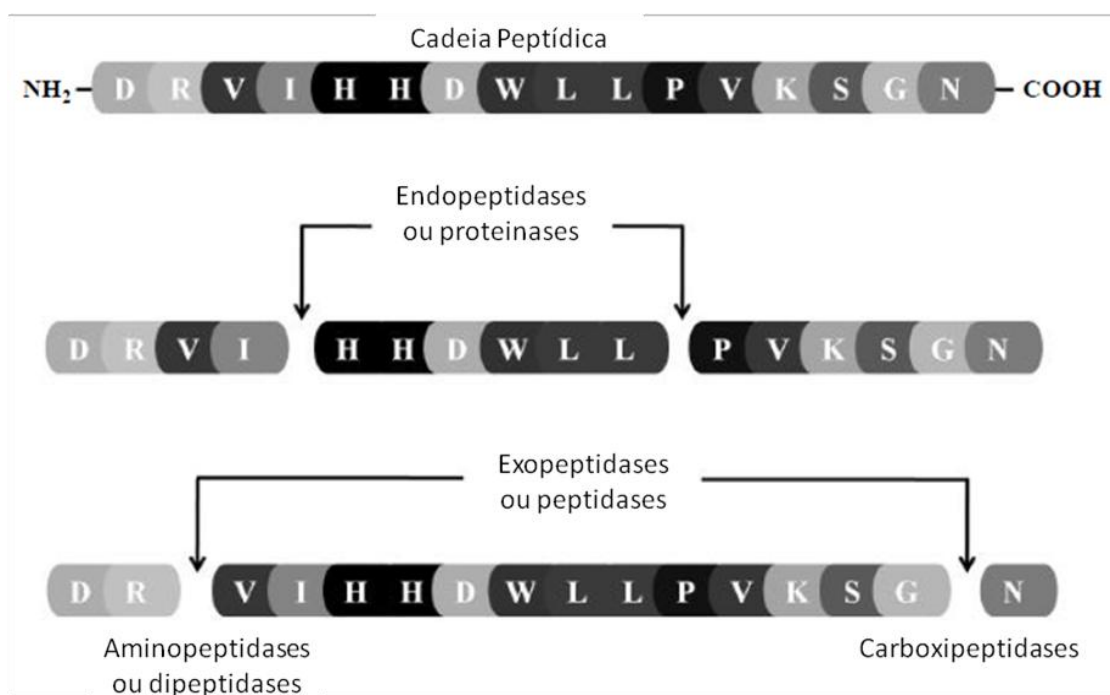


Figura 3: Atuação de enzimas endo e exopeptidases na cadeia proteica durante a hidrólise.

Fonte: TORRUCO-UCO *et al.* (2008).

Santos *et al.* (2011) utilizaram as enzimas comerciais Alcalase e Flavourzyme para a obtenção de hidrolisados de cabrinha (*Prionotus punctatus*), um pescado de baixo valor comercial, modificando as propriedades funcionais das proteínas.

Jia *et al.* (2010) utilizaram proteases como Neutrase, Flavourzyme, Alcalase, Protamex, além de Tripsina e Papaina para hidrolisar a pele da polaca do Alasca (*Theragra chalcogramma*), um subproduto da indústria pesqueira, o qual resultou em diferentes produtos com atividade antioxidante.

Kechaou *et al.* (2009) também utilizaram as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex para atuar sobre as vísceras de *Sepia officinalis* e *Sardina pilchardus*, verificando o efeito na distribuição dos lipídeos e a composição dos aminoácidos.

### 3.4. Hidrolisados protéicos

Denominado pela sigla FPH (Fish Protein Hydrolysed), conforme designado pela Food and Agriculture Organization (FAO), esse produto pode atingir uma concentração de proteína de 90%, além de apresentar propriedades funcionais úteis

para a indústria alimentícia (OETTERER, 2001). Os hidrolisados podem ser definidos como proteínas que são clivadas química ou enzimaticamente em peptídeos de vários tamanhos, ou seja, podem ser obtidos basicamente por três métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida (ADLER-NISSEN 1986).

Na hidrólise química é feita uma solubilização ácida ou alcalina das proteínas, atingindo pH extremos, seguida de uma precipitação ácida ou alcalina até atingir o seu ponto isoelétrico. A hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, porém os processos biológicos que utilizam adição de enzimas são mais promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo (MARTINS, 2009). Na hidrólise enzimática deve ser levado em conta alguns parâmetros, como o tipo de substrato e enzima, a concentração de ambos, o tempo de hidrólise (t), a temperatura (T) e o pH de reação (SANTOS *et al.*, 2011; CENTENARO, 2007).

Normalmente os hidrolisados enzimáticos são utilizados para melhorar as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos para o uso em formulação de produtos farmacêuticos e de aplicação clínica específica, reduzindo a alergenicidade da proteína, além de obter peptídeos bioativos (MOURE *et al.*, 2005).

A atividade biológica de um peptídeo pode estar presente devido ao modo de obtenção, como através da hidrólise enzimática (com enzimas digestivas ou produzidas a partir de microrganismos e plantas) e por fermentação. (KORHONEN e PIHLANTO, 2006). Os hidrolisados protéicos de pescado, obtido por hidrólise enzimática controlada, possuem boas propriedades nutricionais como a composição de aminoácidos e a alta digestibilidade (NOLSOE e UNDELAND, 2009).

Nazeer *et al.* (2011) utilizaram duas espécies de pescado (*Sphyraena barracuda* e *Lepturacanthus savala*) e três tipos de enzimas (Papaína, Pepsina e Tripsina), testando as atividades antioxidantes, como poder redutor, inibição da peroxidação lipídica e efeito sequestrante do radical DPPH. Foram obtidos peptídeos purificados com excelente atividade sequestradora de radicais livres além de potentes inibidores da peroxidação lipídica, podendo ser utilizados na preservação de alimentos.

Sampath-Kumar *et al.* (2011) utilizaram a pele de *Magalaspis cordyla* e *Otolithes ruber* como matéria prima para a obtenção de hidrolisados através da atuação das enzimas Pepsina, Tripsina e  $\alpha$ -Quimiotripsina, os quais foram purificados e identificados a atividade antioxidante, como o poder redutor, atividade quelante do íon  $Fe^{2+}$ , atividade antioxidante utilizando o sistema modelo com ácido linoléico, seqüestro de radicais livres, como DPPH e  $OH^{\cdot}$ . Foi constatado que peptídeos de

baixo peso molecular apresentaram boas propriedades antioxidantes, podendo agir contra problemas oxidativos que causam doenças degenerativas. Os autores sugeriram que a pele de *Magalaspis cordyla* foi uma boa matéria prima para a obtenção de peptídeos bioativos e nutracêuticos, porém que esses peptídeos deveriam ser avaliados *in vivo* para a verificação da sua atividade antioxidante.

### **3.5. Grau de hidrólise**

Segundo Nielsen *et al.* (2001), em hidrólise de proteínas, o parâmetro para monitorar a reação é o grau de hidrólise, definido como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas.

Durante a hidrólise das proteínas a escolha da enzima e as condições de processo influem na composição dos peptídeos e, portanto nas suas propriedades funcionais e bioativas (VAN DER VEN *et al.*, 2002), além do grau de hidrólise. Os hidrolisados podem ser classificados em parciais (GH<10%) e extensivos (GH>10%), cada um com suas características específicas e que podem afetar a sua utilização (VIOQUE *et al.*, 2006).

Há diferentes maneiras de se medir o grau de hidrólise, sendo que é vantagem usar a porcentagem de grau de hidrólise (%GH) como parâmetro de processo e que surge para determinar, sem erro, a propriedade da proteína hidrolisada para um dado sistema proteína - enzima (PETERSEN, 1994).

### **3.6. Propriedades dos hidrolisados protéicos**

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Na década de 70 assistiu-se um expressivo crescimento nos métodos de preparação e uso de hidrolisados protéicos, tanto com finalidades clínica e nutricional como para a melhoria de propriedades funcionais de alimentos de base protéica (CLEMENTE, 2000).

As proteínas são fontes de peptídeos bioativos que estão inativos e são ativados durante o processo digestório ou durante o processamento alimentar. Uma vez liberados, os peptídeos exercem diversas funções fisiológicas, como a atividade

opióide, anti-úlceras, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, antitumoral e antioxidante (KORHONEN e PILHANTO, 2003).

Os antioxidantes são compostos que podem agir como doadores de hidrogênio, estabilizando os radicais livres que são formados naturalmente no metabolismo celular e que são responsáveis por diversas doenças degenerativas, como as cardiovasculares, diabetes e Alzheimer (CHANPUT *et al.*, 2009).

### **3.7. Antioxidantes**

Segundo a ANVISA, os antioxidantes são compostos que retardam o aparecimento de alterações oxidativas em alimentos. Os antioxidantes podem agir em diferentes níveis em uma sequência de oxidação. Isso pode ser ilustrado considerando um dos muitos mecanismos cujo estresse oxidativo pode ser perigoso, como a simulação da reação do radical livre formado na peroxidação lipídica. As reações de formação de radicais livres dentro do alimento pode ser inibida pela adição de compostos químicos, que podem retardar a formação desses radicais, ou adicionando substâncias que podem competir com os radicais existentes e removê-los do meio de reação (SHIN-YOUNG *et al.*, 2004).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos capazes de possuir existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados em seu orbital. São altamente instáveis, com a meia-vida curta e muito reativos quimicamente. Isso pode causar danos, por reagir com praticamente qualquer molécula que entre em contato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A produção bioquímica de hidrolisados protéicos de pescado deve ser feita pelo emprego de processos autolíticos ou uma hidrólise acelerada. No processo acelerado há o emprego de proteases comerciais, cujo produto apresenta atividade antioxidante (JAO e KO, 2002).

#### **3.7.1. Tipos de antioxidantes**

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais que são adicionados em produtos para prevenir ou retardar a deterioração dos mesmos pela ação do oxigênio liberado no ar (HUANG *et al.*, 2005). Alguns antioxidantes sintéticos (Figura 4) como o hidróxitolueno butirato (BHT), hidróxianisol butirato (BHA), a butilhidróxiquinona

terciária (TBHQ) e o propilgalato (PG) são adicionados em produtos alimentícios para retardar a oxidação lipídica (WANITA e LORENZ, 1994).

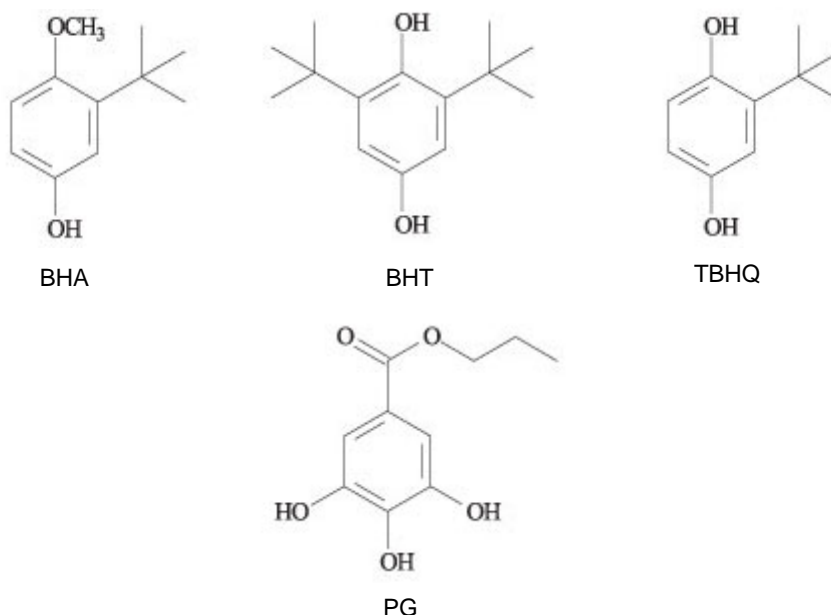


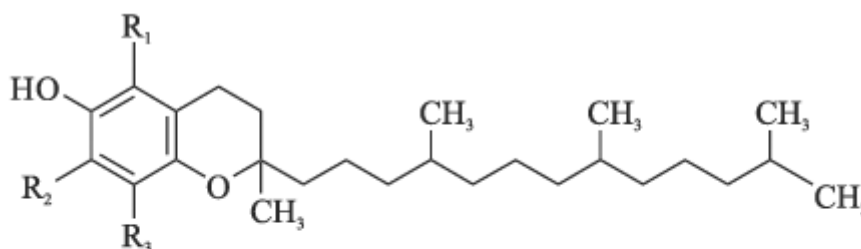
Figura 4: Estrutura dos antioxidantes sintéticos que são adicionados em produtos alimentícios.

Fonte: ALVES *et al.*, 2010

Nos últimos anos vem sendo pesquisado a produção de antioxidantes naturais, visto que os sintéticos se tem suspeita de serem carcinogênicos (SINGH *et al.*, 2002). Estudos feitos com BHA mostrou que esse antioxidante induz a hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido. Em humanos essa observação não está clara, mas a redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de TBHQ (BOTTERWECK *et al.*, 2000). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o limite para o uso destes antioxidantes em alimentos é de 200 mg/Kg para o BHA e TBHQ e 100 mg/Kg para BHT (BRASIL, 1998).

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados na indústria alimentícia, podem ser citados os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas (alecrim e sálvia). O extrato de alecrim tem sido útil na conservação da vida útil dos alimentos. Na indústria alimentícia é uma excelente alternativa de antioxidante natural. Os tocoferóis (Figura 5) são muito utilizados para prevenir a oxidação de óleos e gorduras. Sua ação se

baseia no poder de doar hidrogênios aos radicais lipídicos (DOSSIÊ ANTIOXIDANTE, 2009).



$\alpha$  - tocoferol:  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$

$\beta$  - tocoferol:  $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$

$\gamma$  - tocoferol:  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$

$\delta$  - tocoferol:  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ;  $R_3 = \text{CH}_3$

Figura 5: Molécula dos tocoferóis.

Fonte: RAMALHO E JORGE, 2006.

Os ácidos fenólicos são compostos por um anel benzênico, ou grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que confere a atividade antioxidante. (DOSSIÊ ANTIOXIDANTE, 2009).

### 3.7.2. Peptídeos antioxidantes

Segundo Babizhayev *et al.* (1994) alguns peptídeos são naturalmente encontrados no músculo como a glutathiona ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), carnosina ( $\beta$ -alanil-L-histidina), anserina ( $\beta$ -alanil-L-1-metil-histidina) e ofidina ( $\beta$ -alanil-L-3-metil-histidina). Normalmente a dieta protéica diz respeito a fonte de energia e aminoácidos essenciais, que são necessários para o crescimento e a manutenção das funções fisiológicas. Recentemente se tem tentado identificar e caracterizar os peptídeos bioativos de fontes vegetais e animais. Peptídeos bioativos são considerados fragmentos que, inativos dentro da sequência da proteína, mas que após a hidrólise adquirem diferentes propriedades bioativas. Estes peptídeos possuem de 2 a 20 unidades de aminoácidos (MEISEL e FITZGERALD, 2003) e massa molecular menor que 6000 Da (SUN *et al.*, 2004).

Há poucos anos as propriedades antioxidantes de hidrolisados tem sido demonstradas através da digestão de várias proteínas pelas enzimas gastrointestinais



ou pela hidrólise ácida (KONG E XIONG, 2007). Matérias primas como ovo, pescado, vegetais e sementes oleaginosas tem sido utilizadas para a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante (MOURE *et al.*, 2006).

O exato mecanismo da atividade antioxidante ainda não é bem compreendido, mas vários estudos demonstram que os hidrolisados são inibidores da oxidação lipídica (MOURE *et al.*, 2006; QUIAN *et al.*, 2008), tem capacidade de seqüestro de radicais livres (QUIAN *et al.*, 2008; RAJAPAKSE *et al.*, 2005) e atividade quelante de íons metálicos (RAJAPAKSE *et al.*, 2005).

As propriedades antioxidantes de peptídeos são relatadas pela sua composição, estrutura e hidrofobicidade (CHEN *et al.*, 1998). Tirosina, Triptofano, Metionina, Lisina, Cistina e Histidina são exemplos de aminoácidos que podem atuar como antioxidantes (WANG e MEJIA, 2005). Aminoácidos com resíduos aromáticos podem ser doadores de prótons para os radicais livres. A atividade antioxidante de peptídeos contendo histidina no conjunto está relacionado ao poder de doar hidrogênio e na habilidade quelante de íons metálicos do grupo imidazol (RAJAPAKSE *et al.*, 2005). Além disso, o grupo SH na cisteína tem uma importante ação antioxidante devido à interação direta com os radicais (QUIAN *et al.*, 2008).

Zong-Ji *et al.* (2008) obtiveram peptídeos antioxidantes de proteína de ostra, onde uma certa sequencia de aminoácidos (Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu), de 1,60 kDa, apresentou maior atividade contra a peroxidação do ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) comparado com o  $\alpha$ -tocoferol. Assim, os peptídeos tem sido considerados potenciais fontes para o controle de diversos processos oxidativos no corpo humano e em alimentos (SAMARANAYAKA e LI-CHAN, 2011).

### **3.8. Métodos de determinação da atividade antioxidante**

Existem diferentes métodos para a determinação da atividade antioxidante de peptídeos, entre estes a capacidade de sequestrar o radical DPPH, o poder redutor e a inibição da peroxidação lipídica (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude do desemparelhamento do elétron na molécula, que confere a coloração violeta (RUFINO *et al.*, 2007). A capacidade de redução do radical DPPH é indicada pela diminuição da absorbância, em um determinado comprimento de onda característico, após a ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•). Na Figura 6 é

mostrada a reação que ocorre durante a redução do DPPH• (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

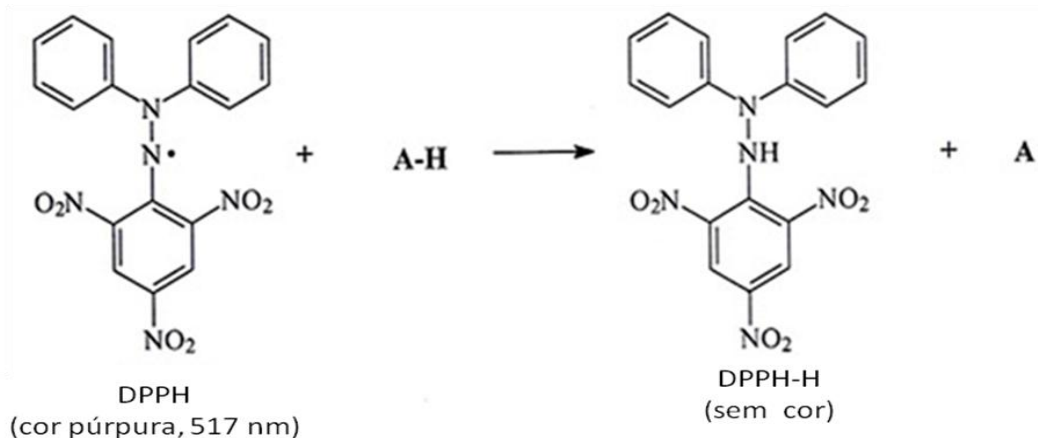


Figura 6: Ação do antioxidante (AH) na redução do radical DPPH.

Fonte: Halliwell e Gutteridge (2007).

O poder redutor é outro método utilizado baseado na capacidade do antioxidante reduzir o íon ferrocianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) a ferrocianato ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) que na presença do íon férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) forma um composto azul prússia, devido a habilidade do antioxidante de transferir um elétron para a redução de radicais (SUN e TANUMIHARDJO, 2007). O aumento da absorbância indica um maior poder redutor do antioxidante (YEN E CHEN, 1995).

A medida da inibição da peroxidação lipídica consiste na medição da inibição da oxidação de um lipídeo, de um sistema modelo, pelo antioxidante a ser testado (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Os hidroperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoléico reagem com o sulfato ferroso, originando o sulfato férrico e após, com adição do tiocianato férrico, ocorre a formação de um complexo de cor vermelho sangue, sendo analisado a 500 nm (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Após ser iniciado, o processo oxidativo ao torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A diminuição da densidade ótica, pela ação do antioxidante, corresponde a interrupção da oxidação, pois o ácido linoléico não está disponível no meio e ocorre o

surgimento de outros produtos secundários da degradação dos hidroperóxidos (CHEN *et al.*, 1998).

### 3.9. Oxidação lipídica em alimentos

A oxidação é uma das maiores preocupações, tanto das indústrias alimentícias quanto dos consumidores. É um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial quer dos elementos graxos, quer de todos os produtos que a partir deles são formados. A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos lipídeos e matérias graxas. Em processos de transformação e armazenamento a matéria prima fica afastada do seu contexto de proteção natural, sofrendo alterações do tipo oxidativo, as quais tem como principal consequência a modificação do *flavor* original e o aparecimento de odores e gostos característicos do ranço, que representa para o consumidor, ou para o transformador industrial, uma importante causa de depreciação ou rejeição (SILVA *et al.*, 1999).

O tipo de oxidação é dependente da atividade de água, da composição química dos lipídeos e sua distribuição na matriz (HAMILTON *et al.*, 1983). Dados experimentais permitiram verificar que as velocidades mais baixas do processo de oxidação dos lipídeos se observam para valores de atividade da água ( $a_w$ ) compreendidos entre 0,2 e 0,3 (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A velocidade de oxidação aumenta em atividade de água muito abaixo de 0,2 (quando desidratados), ou superiores a 0,3. O primeiro caso pode explicar-se pela formação de canais na matriz como resultado da eliminação de água, através dos quais é favorecida a migração do oxigênio. O segundo resulta provavelmente do favorecimento de reações de oxidação enzimática e da capacidade de mobilização de metais de transição (pró-oxidantes) pela água (FRANKEL, 1994).

Existem algumas análises que são capazes de fornecer informações sobre o estado oxidativo dos alimentos. Análises como o índice de peróxidos, ácidos graxos livres, anisidina, Kreis, TBA (ácido 2-tiobarbitúrico), valor Totox (valor total de oxidação) e compostos voláteis são utilizados no controle de qualidade de óleos, gorduras e produtos na predição da rancidez do alimento analisado (OSAWA *et al.*, 2005). O teste de TBA quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. O MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3 (ANGELO, 1996). A reação envolve o ácido 2-

tiobarbitúrico com o malonaldeído (Figura 7), produzindo um composto de cor vermelha, podendo ser medido espectrofotometricamente a um comprimento de onda 532 nm.

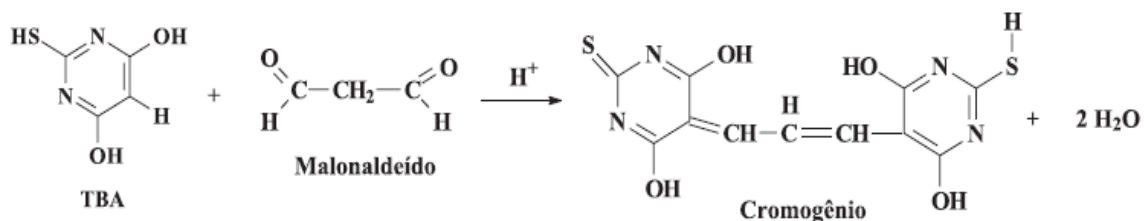


Figura 7: Reação do TBA com o malonaldeído proveniente da decomposição de hidroperóxidos.

Fonte: Araújo, 1995.

Ao optar pela análise de TBA, deve-se conhecer a composição em ácidos graxos do alimento em análise, uma vez que o teste mede a extensão da oxidação de lipídeos com três ou mais duplas ligações. Para sistemas mais complexos, em que estão presentes misturas de constituintes, a medida de TBA tem apenas significado qualitativo e comparativo embora seja de grande utilidade na comparação de um único material em diferentes estágios de oxidação (FENNEMA, 1996).

Como pode haver interações covalentes do malonaldeído com os grupos aminas livres presentes em proteínas (OSAWA *et al.*, 2005; ARAÚJO, 1995), deve-se medir a extensão geral da oxidação de lipídeos. Assim, a terminologia correta para se utilizar seria de substâncias reativas com TBA (TBARS) e não número ou valor de TBA.

### 3.10. Surimi

No *Codex alimentarius*, o surimi é definido como um produto protéico de pescado para uso posterior, obtido por meio da separação mecânica em que é moído, lavado, purificado, drenado, misturado com ingredientes crioprotetores e congelado (FAO/WHO, 2003).

A lavagem é a operação principal na obtenção de surimi, pois remove principalmente as proteínas sarcoplasmáticas favorecendo a formação de gel, pela concentração das proteínas miofibrilares. O número de ciclos de lavagem e as

proporções água/carne empregadas podem variar, sendo a repetição de 3 a 4 vezes suficiente para a efetiva remoção das proteínas sarcoplasmáticas (NEIVA, 2003), além de pigmentos, modificando a cor do produto. Quando se aquece o músculo de pescado, as proteínas sarcoplasmáticas coagulam com o calor e aderem-se às proteínas miofibrilares. Esse fenômeno impede a formação de gel a partir do músculo de pescado. Os lipídeos também são extraídos, reduzindo assim a possibilidade de haver modificações do músculo causada pela oxidação lipídica. O músculo de pescado pode ser claro ou escuro, dependente do teor de lipídeos, sendo que quanto mais claro menos gordura este possui (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

Após as lavagens, antes de ser congelado, são adicionados crioprotetores no surimi de modo a prevenir a desnaturação das proteínas miofibrilares e a perda dos atributos nutricionais e funcionais durante o armazenamento a baixas temperaturas. Uma combinação de crioprotetores adequada seria a mistura de 5% de sorbitol e 0,3% de tripolifosfato de sódio (AFDF, 1987). O mecanismo de estabilização da proteína do músculo de pescado com o crioprotetor é devido a sua interação e as ligações com os grupos funcionais na superfície das moléculas protéicas. Com isso cada molécula de proteína fica envolvida por moléculas de crioprotetores hidratados, diminuindo a agregação das proteínas (DEY e DORA, 2010).

Parvati e George (2011) estudaram diferentes concentrações de crioprotetores (sorbitol e sacarose) no surimi de *Nemipterus japonicus* e a percepção da doçura em produtos como a salsicha, o hambúrguer e o bolo. De acordo com a presente investigação, uma concentração de mistura de açúcar de 2 a 4% foi sugerida como adequada para um tempo de armazenamento do surimi de pelo menos 5 meses a -20°C, não havendo a percepção da doçura no produto.

O surimi não deve ser considerado um produto alimentar propriamente dito, mas um ingrediente intermediário utilizado na elaboração de diversos produtos. Podem ser utilizados como matéria prima para a fabricação de *fishburger*, salsichas, empanados e enlatados, tirinhas de peixes, nuggets etc. ou como ingredientes na composição de *fish cakes*, lasanhas, risoles e croquetes de pescado. Tais produtos podem ser direcionados para o atendimento do consumidor institucional, como escolas, creches, asilos, restaurantes, hospitais, etc. devido ao seu alto valor nutricional, ausência de espinhas e de sabor suave (KIRSCHNIK, 2007).

### **3.11. Salsicha**

A salsicha é definida como o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, ou artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado (RIISPOA, 2011).

Pode-se definir a emulsão como uma suspensão coloidal de dois líquidos insolúveis entre si (imiscíveis), mas que, mantém-se harmoniosamente dispersos um no outro pela ação de um agente emulsificante interfacial. Para que ocorra a união entre o óleo e a água, há a necessidade da presença de um terceiro componente - a proteína - agente denominado emulsificante. A proteína, por possuir uma porção hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), atua na interface entre a gordura e a água, diminuindo a tensão interfacial entre as duas, unindo-as e evitando a saída e coalescência da gordura (OLIVO, 2006).

A matéria prima da salsicha, conforme Instrução Normativa Nº4 de 2000, é basicamente composta de carne de diferentes espécies de animais de açougue, carne mecanicamente separada, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue, tendões, pele, gordura e alguns ingredientes opcionais como: água, proteína vegetal e/ou animal, agentes de liga, aditivos intencionais, açúcares, aromas, especiarias e condimentos (BATTISTELLA, 2008).

Os embutidos emulsionados são produtos prontos para o consumo, feitos a partir de produtos cárneos cominutados e homogeneizados, tecido graxo, água e saborizantes, usualmente defumados (FAO, 1985).

A produção de salsichas de carne de pescado pode se tornar uma opção de produto com valor agregado, ou seja, com alto valor nutritivo. Alguns estudos, como o de Oliveira-Filho (2010), que desenvolveu uma salsicha com carne mecanicamente separada de resíduos de tilápia, demonstram a viabilidade da elaboração deste tipo de alimento embutido.

#### **3.11.1. Ingredientes da salsicha**

Existe muita versatilidade nos ingredientes usados na elaboração de embutidos. Os ingredientes mais utilizados são aqueles que possuem os seguintes requisitos: fácil obtenção ou compra, baixo preço, disponibilidade durante todo o ano, além de segurança microbiológica (PARDI *et al.*, 1994).

A proteína isolada de soja é um ótimo ingrediente usado na elaboração de uma emulsão de qualidade em produtos embutidos, por possuir grande capacidade de ligar a água e o lipídeo (RUUSUNEN *et al.*, 2003).

O amido é outro ingrediente amplamente usado em embutidos cárneos devido sua capacidade de formar gel quando submetido ao calor e ligação com a água (PARDI *et al.*, 1994), sendo o máximo permitido pela Legislação Brasileira, para salsichas, de 2% (BRASIL, 2000).

O sal, além de ser usado como condimento, contribui também na solubilização das proteínas miofibrilares, transformando-as do estado nativo em proteína solubilizada, e quando aquecidos, esta proteína solubilizada fixa-se como uma estrutura de rede, imobilizando a água, tornando esta pasta com a consistência de um gel e melhorando conseqüentemente a textura das salsichas (OLIVO, 2006).

Os fosfatos atuam nos produtos cárneos elevando o pH do meio, melhorando a capacidade de retenção de água, protegendo contra a perda de umidade, aumentando a suculência e melhorando a textura (PARDI *et al.*, 1994).

O sal de cura (nitrito e nitrato de sódio) quando adicionado em produtos cárneos tem as funções de formar a coloração rosada típica de produto curado, contribuir para o desenvolvimento do aroma característico de carne curada, inibir o agente causador do botulismo (*Clostridium botulinum*) e atuar como antioxidante (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Os condimentos ou especiarias são substâncias que adicionadas aos alimentos imprimem sabores e odores característicos, além de atuarem como agentes antioxidantes e bactericidas. Dentre as especiarias que mais possuem essas ações são: cravo, canela, pimenta, mostarda, noz-moscada, gengibre, tomilho, louro, manjerona, segurelha, alecrim, além do alho e cebola (PARDI *et al.*, 1994).

### **3.12. Avaliação do produto**

Cada alimento ou produto alimentício tem características bem definidas que geralmente são percebidas em primeira instância como características de textura. Primeiramente o consumidor deve estar inteiramente satisfeito com as propriedades sensoriais do produto. A textura de um alimento é um dos atributos primordiais na aceitação perante o consumidor (SMEWING, 2001).

O estudo das medidas reológicas dos alimentos contribui para o conhecimento da sua estrutura e é de grande utilidade para o controle dos processos. Existem três

parâmetros para medir a textura, como força, distância e tempo. A força é a medida do estresse, onde inclui penetração, compressão-extrusão, corte, quebra, tensão, torque e dobra. A distância pode ser relacionada com o esforço realizado causado pela aplicação do estresse. Pode ser medida linearmente (L), como medidas de área ( $L^2$ ) ou volume ( $L^3$ ). O tempo é medido em segundos correlacionado com a variação da deformação do alimento no momento que a força é aplicada (SMEWING, 2001).

Outra avaliação que possui importante papel na evolução da qualidade do produto consumido é a percepção da cor (CHAMBERS e BOWERS, 1993). O colorímetro usa sensores que simulam o modo como o olho humano vê a cor, expressando a cor na forma numérica e quantificando a diferença de cor entre um padrão e uma amostra de produção.



## **CAPÍTULO 3**

## DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Esta dissertação foi dividida em três artigos:

Artigo 1: Obtenção de hidrolisados enzimáticos de anchoita (*Engraulis anchoita*) e avaliação da atividade antioxidante

Artigo 2: Influência das lavagens nas características tecnológicas de surimi de anchoita (*Engraulis anchoita*)

Artigo 3: Utilização de surimi de anchoita (*Engraulis anchoita*) em embutido emulsionado e efeito antioxidante do hidrolisado

**ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE ANCHOITA  
(*Engraulis anchoita*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

## OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### RESUMO

O processo de hidrólise de pescado tem se mostrado muito eficiente para a obtenção de peptídeos e aminoácidos com atividade antioxidantes tanto no metabolismo humano quanto nas características de produtos alimentícios. Foram produzidos diferentes hidrolisados de carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita através do uso das enzimas comerciais Alcalase, Flavourzyme e Protamex, verificando o grau de hidrólise. Foram analisadas as atividades antioxidantes pela inibição da peroxidação lipídica do ácido linoléico, pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e pelo poder redutor do ferrocianeto. Obtiveram-se valores de grau de hidrólise máximo de 80% com a enzima Alcalase e mínimo próximo a 30% com a enzima Flavourzyme. Na atividade antioxidante, pela inibição da peroxidação lipídica, houve um aumento da oxidação do ácido linoléico com o passar dos dias para todas as amostras, sendo que aquelas que continham os hidrolisados foram menos efetivas em comparação com o padrão  $\alpha$ -Tocoferol, que inibiu a oxidação em  $80,3 \pm 0,5\%$ , ao final de seis dias de incubação. O hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme, em 1 hora de reação, foi o que se manteve mais efetivo, apresentando uma inibição de  $43,8 \pm 0,2\%$ . A ação de sequestro do radical livre DPPH foi maior com o aumento da concentração de hidrolisado, sendo que a enzima Flavourzyme, na concentração de 5 mg/mL, foi a mais efetiva na captura desse radical, comparada com as demais enzimas na mesma concentração. Com relação ao poder redutor, a enzima Flavourzyme também produziu hidrolisados com maior atividade doadora de elétrons.

**Palavras-chave:** pescado, enzimas, peptídeos, antioxidantes.

## PRODUCTION OF ARGENTINE ANCHOVY (*ENGRAULIS ANCHOITA*) ENZYMATIC HYDROLYZATES AND VERIFYING ANTIOXIDANT PROPERTIES

### ABSTRACT

The process of fish hydrolysis is very efficient for obtaining peptides and amino acids with antioxidant activity both in human metabolism and in food products. Different Argentine anchovy's hydrolysates were produced using commercial enzymes like Alcalase, Flavourzyme and Protamex, verifying the degree of hydrolysis. The antioxidant activity was tested by Inhibition of linoleic acid autoxidation, DPPH radical-scavenging activity and reducing power. The high degree value of hydrolysis was 80% with the Alcalase enzyme and the low degree value was around 30% with the Flavourzyme. The oxidation of linoleic acid increased over the days, while the samples containing the hydrolysates were less effective compared with  $\alpha$ -tocopherol, which inhibited oxidation in  $80.3 \pm 0.5\%$  at the end of six days. The hydrolyzate obtained with the Flavourzyme in one hour of reaction was more effective with an inhibition of  $43.8 \pm 0.2\%$ . The action of DPPH radical-scavenging was higher with the increase in the hydrolyzed concentration, and the Flavourzyme at a concentration of 5 mg/mL, was the most effective in the capture of this radical compared with the other enzymes at the same concentration. With respect to reducing power, the Flavourzyme also produced hydrolyzates with high donor activity.

**Keywords:** fish, enzymes, peptides, antioxidant

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas hidrolisadas de pescado são obtidas mediante um processo proteolítico enzimático em que as enzimas vegetais e/ou microbianas atuam como catalisadores biológicos que aceleram a hidrólise das proteínas, promovendo seu isolamento a partir do pescado. As proteínas, como resultado da clivagem de suas ligações peptídicas, são transformadas em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres (ZAVAREZE *et al.*, 2009).

A produção de materiais solúveis, que constituem o produto final da hidrólise, depende de diversos fatores, tais como reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima (ADLER-NISSEN, 1986). Muitos estudos demonstram o uso de enzimas como a Alcalase (SANTOS *et al.*, 2009; BHASKAR *et al.*, 2008), Flavourzyme (SANTOS *et al.*, 2009; NILSANG *et al.*, 2005) e Protamex (SLIZYTÉ *et al.*, 2009; LIASET *et al.*, 2003) para a hidrólise de diferentes espécies de pescado.

Peptídeos bioativos, como produtos de hidrólise de proteínas de diversos alimentos, são o foco das pesquisas atuais. Esses produtos exercem diversas funções biológicas, como a atividade antioxidante (SARMADI e ISMAIL, 2010). Diferentes matérias primas como o soro, proteína de soja (PENA-RAMOS e XIONG, 2003), gema de ovo (SAKANAKA *et al.*, 2003), pescados como Polaca do Alasca (JE *et al.*, 2005) e outras espécies (SATHIVEL *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2003; AMAROWICZ E SHAHIDI, 1997) tem apresentado atividade antioxidante, onde o número e a composição de aminoácidos presentes nos peptídeos são os responsáveis por tal atividade.

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos (SANCHEZ-MORENO, 2002). O efeito do sequestro de radicais é determinado não somente pela reatividade do antioxidante com o radical, mas também pela sua concentração (ALVES *et al.*, 2010). Os testes de antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídeo ou substrato lipoproteico em condições padrão são usados e o grau de inibição da oxidação é medido; e os ensaios usados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres (SANCHEZ-MORENO, 2002).

O objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados protéicos de anchoita pela ação de diferentes proteases em diferentes tempos de hidrólise e verificar a atividade antioxidante medida pela inibição da oxidação lipídica, seqüestro do radical livre DPPH e o poder redutor.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Matéria prima

A matéria prima utilizada neste trabalho foi a carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita (*Engraulis anchoita*). A anchoita foi capturada na região sul do Rio Grande do Sul, onde foi levada diretamente à indústria para que fosse feita a lavagem, retirada da cabeça e das vísceras. O pescado foi despolpado (HIGH TECH HT/2500-Brasil) obtendo assim a CMS de anchoita, que foi armazenada a -20°C (CONSUL CHB/53), em embalagens plásticas, até a sua utilização.

### 2.2. Enzimas e reagentes químicos

As enzimas proteolíticas utilizadas foram a Alcalase<sup>®</sup> 2.4L e Flavourzyme<sup>®</sup> 1000L, ambas doadas pela representante da Novozymes Latin America Ltda (Tovani Benzaquen Rep. Ltda) e a enzima Protease do *Bacillus* sp. (Protamex) adquirida da Sigma-Aldrich.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P. A.).

### 2.3. Rendimento da matéria prima

O rendimento da matéria prima foi determinado através da relação entre as quantidades de CMS obtida e o pescado sem cabeça e eviscerado, conforme a Equação 1.

$$R = \frac{m_{polpa}}{m_{pescado}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

#### 2.4. Características químicas e físicas da matéria prima

Foi realizada a análise de composição proximal: umidade, proteína (%N x 6,25), lipídeos e cinzas, da CMS de anchoita, segundo a AOAC (2000).

Foi determinado também o frescor da CMS através da análise de pH e N-BVT, segundo o método da AOAC (1990).

#### 2.5. Hidrólise proteica

A obtenção do hidrolisado proteico de anchoita foi baseada no processo descrito por Kristinsson e Rasco (2000), utilizando as mesmas condições de concentração de enzima e substrato utilizadas por Gilberg *et al.* (2002). Na Figura 1 está mostrado o diagrama geral do processo de hidrólise enzimática da anchoita.

Para a obtenção dos hidrolisados de anchoita foram utilizadas três enzimas em separado, a Alcalase, a Flavourzyme e a Protamex, na concentração de 1,0% ( $p_{enzima}/p_{proteína}$ ). Cada enzima foi submetida a um pH de atuação, sendo a Alcalase em pH 8,0, Flavourzyme em pH 7,0 e Protamex em pH 6,5. A reação se procedeu em um reator de vidro, de parede dupla, conectado a um banho termostatizado BROOKFIELD TC/102 – EUA, a uma temperatura de 50°C para todos os experimentos. Foram testados também dois tempos de reação de 1 e de 5 horas. Após o período indicado de hidrólise foi feita a desativação da enzima através do aumento da temperatura do meio, em banho termostatizado, para 90°C por 15 minutos (QUIMIS Q/215-1/2 – Brasil). Após o resfriamento, a temperatura ambiente, o hidrolisado foi centrifugado (3.220 g/15 minutos) (BIOSYSTEMS MPW-350/350-R – Brasil). O sobrenadante foi submetido a filtração, em papel WHATMAN nº 1, e o filtrado coletado foi liofilizado (EDWARDS, Brasil). Nos hidrolisados liofilizados foram determinados o grau de hidrólise, seguindo o método descrito por ADLER-NISSEN (1979).



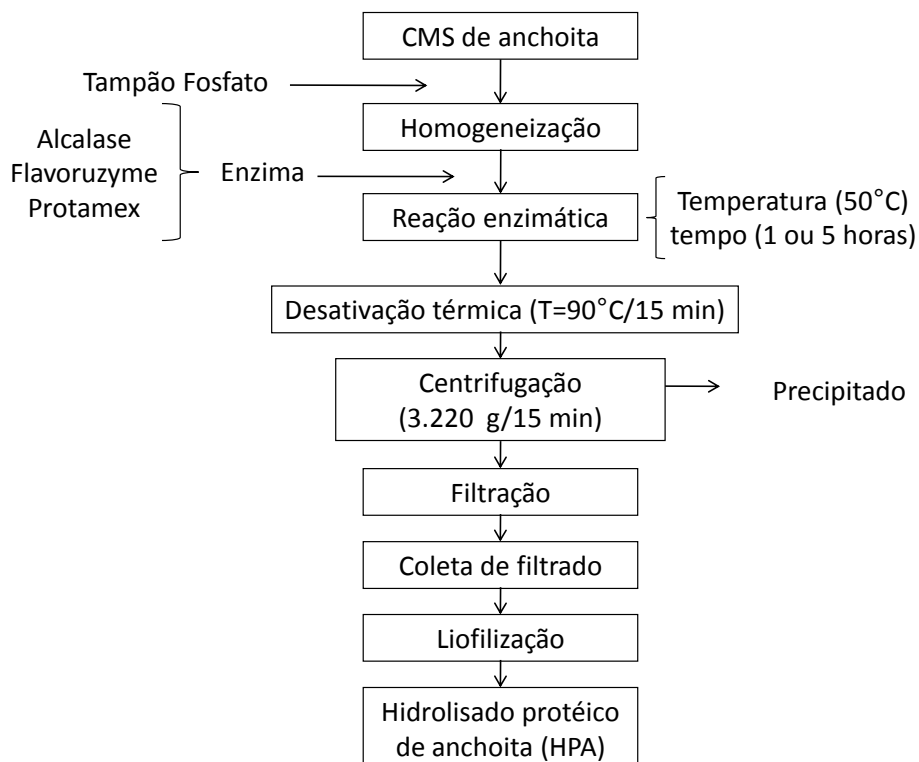


Figura 1: Processo de hidrólise enzimática da CMS de anchoita com diferentes enzimas e condições de hidrólise.

## 2.6. Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados de CMS de anchoita

Para a determinação do grau de hidrólise (GH) foi utilizado o método descrito em 1979 por Adler-Nissen, utilizando o ácido trinitro-benzeno-sulfônico (TNBS).

Para o preparo da amostra foi utilizado 125 mg de amostra diluída em 25 mL de SDS 1,0%. A solução foi aquecida a 50°C por 15 minutos (QUIMIS Q/215-1/2 – Brasil) e, em seguida, resfriada a temperatura ambiente. Após isso foi submetida a centrifugação a 3000 g por 20 minutos (BIOSYSTEMS MPW 350/350R – Brasil). Do sobrenadante foram coletado 250 µL, adicionados 2 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 8,2 e 2 mL do TNBS 0,1% que foram colocados em frascos âmbar, misturados e aquecidos em banho-maria a 50°C por 60 minutos. A reação foi inibida pela adição de 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M. As amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente durante 30 minutos e foram submetidas a leitura em espectrofotômetro de UV a 340 nm (VARIAN CARY/100 UV-VISIBLE – EUA). Para a

quantificação utilizou-se uma curva padrão de L-leucina e aplicando a Equação 2 foi determinado grau de hidrólise.

$$\%GH = \frac{x_1 \cdot 14,007 \cdot V_1 \cdot d \cdot 100}{m \cdot V_2 \cdot 10000} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde foi relacionado a concentração ( $x_1$ ) de proteína da amostra hidrolisada ( $\eta\text{mol}$  L-leucina), o volume ( $V_1$ ) de amostra inicial preparada (25 mL), o fator de diluição ( $d$ ) com a massa ( $m$ ) posta em teste (125 mg) e o volume ( $V_2$ ) utilizado para a reação (250  $\mu\text{L}$ ).

## 2.7. Medida da atividade antioxidante

### 2.7.1. Inibição da peroxidação lipídica

A atividade antioxidante foi medida segundo Osawa e Namiki (1985) empregando um sistema modelo contendo ácido linoléico. Foi utilizado como padrão o antioxidante comercial  $\alpha$ -tocoferol diluído em etanol 99,5%, na mesma concentração. Uma amostra controle foi preparada usando o mesmo procedimento das amostras, mas sem adição de hidrolisado ou qualquer antioxidante comercial, sendo adicionado apenas o tampão fosfato.

Foram dissolvidos 5 mg de hidrolisado em 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0). Adicionou-se 0,13 mL de ácido linoléico e 10 mL de etanol 99,5%. A suspensão foi homogeneizada em agitador de soluções (PHOENIX AP56 – São Paulo) e avolumada para 25 mL. O conjunto foi incubado em estufa BIOPAR 5150/BA, no escuro, a 40°C, sendo então analisado a cada 24 horas durante seis dias. A análise diária consistiu em medir a oxidação do ácido linoléico, segundo Mitsuda *et al.* (1966). Assim, 100 $\mu\text{L}$  de amostra incubada foram misturadas com 4,7 mL de etanol 75%, 100 $\mu\text{L}$  de tiocianato de amônio 30% e 100  $\mu\text{L}$  de cloreto ferroso 0,02 M em HCl 3,5% em frascos âmbar. Esta mistura foi deixada em repouso durante 3 minutos e lida em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP/22) a 500 nm. A porcentagem de inibição da oxidação apresentada pelos hidrolisados foi calculada através da Equação 3.

$$\% \text{Inibição} = \frac{(1 - ABS_{amostra})}{ABS_{controle}} \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

Foi relacionada a absorvância da amostra ( $ABS_{amostra}$ ) com a absorvância do controle ( $ABS_{controle}$ ) que não possui nenhum antioxidante.

### 2.7.2. Efeito sequestrante do radical livre DPPH

A medida de atividade antioxidante foi realizada segundo Shimada *et al.*(1992) baseada no efeito sequestrante dos hidrolisados no radical livre 2,2- difenil - 1- picrilidrazil, (DPPH), sendo expresso em porcentagem, conforme a Equação 4.

Foram utilizadas quatro concentrações diferentes de cada hidrolisado (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 mg/mL). Um volume de 1,5 mL de amostra foi misturado com 1,5 mL de solução de DPPH 0,1mM em etanol 95%. Após 30 minutos de repouso as amostras foram lidas em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP/22) a 517 nm. A menor absorvância representa um maior efeito sequestrante do hidrolisado pelo radical DPPH.

$$\% ES = \left( \frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

O efeito sequestrante (ES) foi relacionado com a absorvância do branco ( $ABS_{branco}$ ), que foi referente a mistura da solução de DPPH com água, e a absorvância da amostra ( $ABS_{amostra}$ ), que foi a mistura da amostra hidrolisada com a solução de DPPH.

### 2.7.3. Poder redutor

O poder redutor foi medido segundo o método realizado por Oyaziu (1988). Para esta determinação uma amostra de 2 mL de solução de hidrolisado 5,0 mg/mL foi misturada com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL ferrocianeto de potássio 1,0%. Essa mistura foi incubada em banho a 50°C (QUIMIS Q-215-1/2 – Brasil) por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de TCA 10,0%. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 minutos a absorvância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP/22). O aumento da absorvância da mistura da reação indica um aumento do poder redutor.

## 2.8. Análise estatística

Os dados foram avaliados através da análise de variância e teste de Tukey, com um nível de confiança de 95,0%, utilizando o programa Statistica 7.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Rendimento e caracterização física e química da CMS de anchoita

A partir da anchoita sem cabeça e eviscerada obteve-se um rendimento de 80,8% de CMS de anchoita. Se for considerado o pescado inteiro o rendimento seria menor, porém como o processo de evisceração foi feito na indústria não foi possível obter o quanto de subproduto que foi obtido.

Na Tabela 1 apresenta-se a composição proximal da carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita.

Tabela 1: Composição proximal (base úmida) da CMS de anchoita.

Componentes	Experimental	Teórico*
	%(g/100g)	%(g/100g)
Umidade	79,7±0,3	78,1±0,37
Proteína	16,5±0,6	17,5±0,20
Lipídeos	2,0±0,5	2,4±0,13
Cinzas	1,2±0,2	2,0±0,19

\* Furlan *et al.*, 2009

Foi possível verificar alguma diferença nos valores dos componentes entre o experimental e o teórico (FURLAN *et al.*, 2009). Segundo Yeannes e Almandos (2003), a composição varia com os tecidos, sexo, idade do pescado e estação do ano, o que pode explicar as diferenças com a literatura para esta espécie. Bertolotti e Manca (1986) reportam que os valores médios de proteínas encontram-se entre 16,1 e 17,9%, próximo ao que foi encontrado neste trabalho. A composição da anchoita capturada no Rio da Plata foi estudada por Fuselli *et al.* (1994), mostrando a variação no teor de lipídeos e umidade conforme a época, sendo estes valores proporcionais,

ou seja, quanto maior a quantidade de gordura presente no músculo, menor será a quantidade de umidade contida nele.

Com relação às condições da CMS, o valor de pH encontrado foi de  $6,5 \pm 0,1$  e de N-BVT foi de  $15,3 \pm 0,9$  mgN/100g. O pH é um parâmetro que indica a qualidade do alimento, pois é afetado por reações que ocorrem após a morte do animal, e indica a presença de microrganismos que através de seu metabolismo causam o acúmulo de material metabólico alcalino, elevando o valor do pH e diminuindo a qualidade do produto (MARTIN, 1982). Furlan *et al.* (2009), analisando o músculo de anchoita, obtiveram um pH de 6,7 considerando a matéria prima em boas condições, visto que não ultrapassou o valor exigido pela legislação, que é de 6,8. Estes autores obtiveram um valor de N-BVT de 20,0 mg /100g. Segundo a legislação o valor máximo de N-BVT, para que o pescado possa ser comercializado, é de 30 mg/100g (BRASIL, 1981).

### 3.2. Grau de hidrólise

A extensão da degradação das proteínas pelas enzimas proteolíticas foi medida pela avaliação do grau de hidrólise, que é o indicador mais utilizado para a comparação de diferentes hidrolisados protéicos (BOUGATEF *et al.*, 2010). Na Figura 2 estão apresentados os valores de grau de hidrólise, em porcentagem, dos hidrolisados de CMS de anchoita.

Foi possível verificar que todas as enzimas apresentaram um incremento no grau de hidrólise com o aumento do tempo de reação, não sendo significativo somente para a enzima Protamex. A enzima Alcalase, com 5 horas de reação, se destacou comparada com os hidrolisados das enzimas Flavourzyme e Protamex, pois apresentou valores superiores de grau de hidrólise, alcançando o valor de  $78,6 \pm 1,7\%$ . Isto pode ter ocorrido pelo fato da Alcalase ser uma endopeptidase, provocando a liberação de peptídeos de diferentes tamanhos com grupamentos amino expostos para agir com o ácido trinitrobenzeno sulfônico. Tanto a Flavourzyme quanto a Protamex, por ser uma mistura de endo e exopeptidase, atuam diferentemente na proteína, causando a diferença no grau de hidrólise.

Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999) obtiveram hidrolisados de "*Cuplea harengus*", utilizando a enzima Alcalase, com um grau de hidrólise de 60,0% após 1 hora de reação, sendo que neste trabalho, para o mesmo tempo de reação, se obteve

65,6±2,1%, demonstrando a suscetibilidade da anchoita frente à ação da enzima Alcalase.

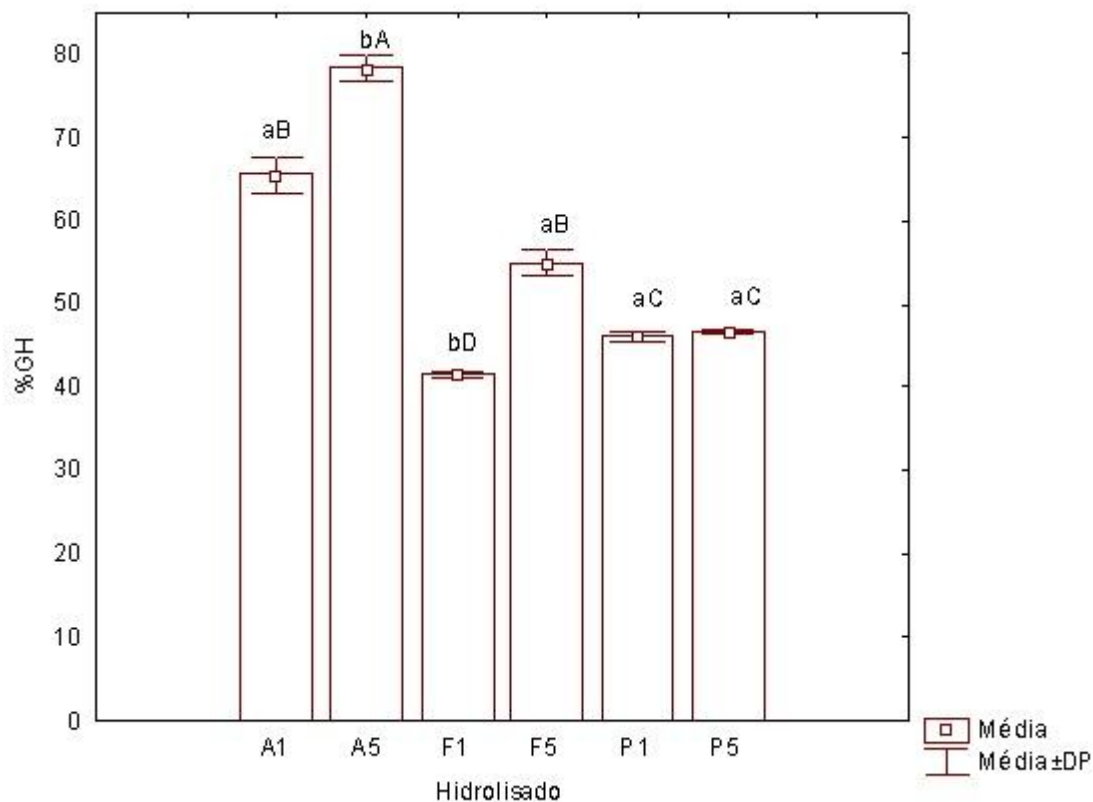


Figura 2: Grau de hidrólise dos hidrolisados de anchoita obtidos pela ação de diferentes enzimas e em diferentes tempos de reação.

Hidrolisado com a enzima Alcalase (A1: 1 hora; A5: 5 horas); Flavourzyme (F1: 1 hora; F5: 5 horas); Protamex (P1: 1 hora; P5: 5 horas). Valores correspondem à média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do grau de hidrólise (%GH) entre os tempos de hidrólise para a mesma enzima. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença do grau de hidrólise (%GH) entre os hidrolisado ( $p < 0,05$ ).

A enzima Flavourzyme obteve um maior grau de hidrólise no período de 5 horas de incubação (68,9±1,6%), apresentando diferença significativa com o tempo de 1 hora, que foi de 43,2±0,7. Thiansilakul *et al.* (2007) obteve hidrolisados de “*Decapetrus maruads*” com a enzima Flavourzyme, agindo por 1 hora, com grau de hidrólise de 60,0%, sendo menor que os obtidos neste estudo para a mesma enzima. A diferença nos valores de grau de hidrólise entre as diferentes matérias primas pode ser referente à disposição dos aminoácidos presentes na proteína do músculo, além

da atuação da enzima nessas proteínas, que é diferenciada. A enzima Flavourzyme, por ser uma mistura de endo e exopeptidase, precisou de 5 horas para alcançar o mesmo nível de grau de hidrólise que a Alcalase obteve em 1 hora.

Com a enzima Protamex o grau de hidrólise variou de  $46,1 \pm 0,6$  para  $46,6 \pm 0,3$ , para os hidrolisados obtidos por 1 e 5 horas de reação da CMS de anchoita com a enzima Protamex, respectivamente. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grau de hidrólise após o período de reação de 1 e 5 horas. Isto pode ser devido à especificidade da enzima perante o substrato.

Hidrolisados com a enzima Protamex também tem sido estudados, onde se tem obtido diferentes graus de hidrólise, dependente do tipo de matéria prima, concentração de substrato e enzima, tempo de hidrólise, além do tipo de método para a sua determinação. Os valores de grau de hidrólise encontrados para hidrolisados produzidos pela enzima Protamex ficaram em torno de 3,2% e 3,1% (KECHAOU *et al.*, 2009) até 29,78% (JIA *et al.*, 2010). Durante a hidrólise protéica a escolha da enzima e as condições de processo influem no tamanho e na composição dos peptídeos (VAN DER VEN *et al.*, 2002). Dependendo do grau de hidrólise pode-se classificar os produtos em parcialmente hidrolisados ( $\text{GH} < 10\%$ ) e altamente hidrolisados ( $\text{GH} > 10\%$ ) (VIOQUE *et al.*, 2006). Segundo Vioque *et al.* (2001) os hidrolisados podem ser categorizados em três grupos principais com base no seu grau de hidrólise, o que determina a sua aplicação: hidrolisados com GH baixo melhoram as características funcionais das proteínas; hidrolisados com GH variados, geralmente são usados como aromatizantes; hidrolisados com alto GH, são usados como suplementos nutricionais e dietas especiais em medicina.

Os produtos obtidos neste trabalho podem ser considerados como altamente hidrolisados, podendo ser utilizados em alimentos como aporte de nutrientes e compostos bioativos, que podem impedir a formação de doenças degenerativas. Os compostos bioativos podem agir na captura de radicais livres que são produzidos normalmente pelo metabolismo humano e que são capazes de desenvolver ou produzir doenças como a diabetes (JOHANSEN *et al.*, 2005).

### 3.3. Atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos da CMS de anchoita

#### 3.3.1. Inibição da peroxidação lipídica

Os hidrolisados obtidos com as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, em diferentes tempos, foram submetidos ao teste de inibição da peroxidação lipídica utilizando o sistema modelo com ácido linoléico. Na Figura 3 estão presentes os valores de absorbância, que expressam a inibição da peroxidação lipídica, para cada hidrolisado avaliado,  $\alpha$ -Tocoferol e o controle, sendo que quanto maior a absorbância maior é a oxidação do ácido linoléico.

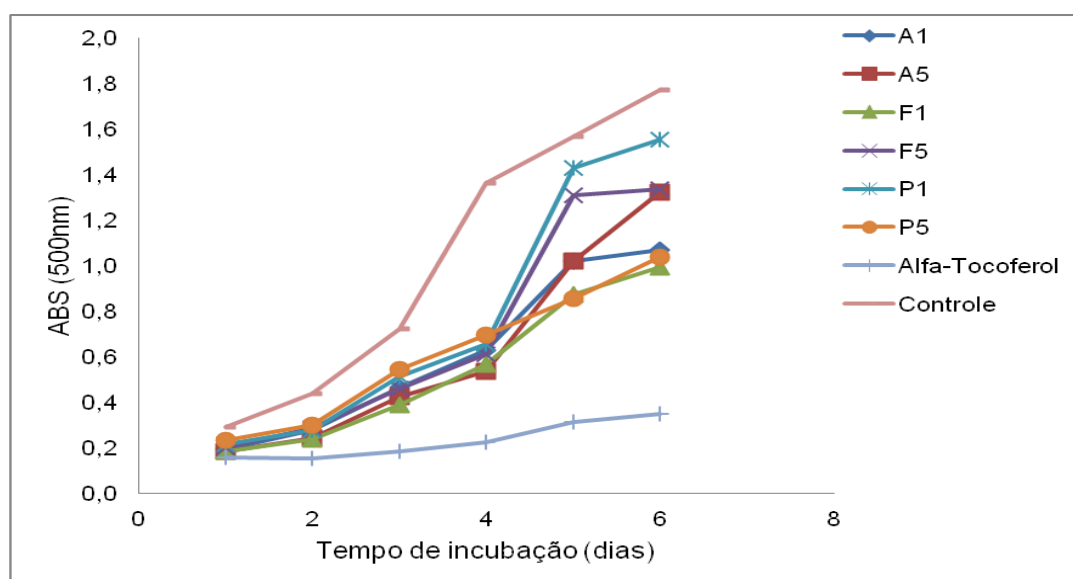


Figura 3: Absorbâncias dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas em diferentes tempos de hidrólise pela inibição da peroxidação lipídica.

Hidrolisado com a enzima Alcalase (A1: 1 hora; A5: 5 horas); Hidrolisado com a enzima Flavourzyme (F1: 1 hora; F5: 5 horas); Hidrolisado com a enzima Protamex (P1: 1 hora; P5: 5 horas).

Foi possível perceber que com o aumento do tempo de incubação houve um incremento no nível de oxidação do ácido linoléico tanto para os hidrolisados como para o  $\alpha$ -Tocoferol). Verificou-se que as amostras de hidrolisados foram menos eficazes na prevenção da oxidação do sistema comparado com o padrão  $\alpha$ -Tocoferol. Nazzari *et al.* (2011) iniciou com valores de absorbância entre 0,1 e 0,3, terminado após cinco dias entre 0,4 e 0,9 para hidrolisados com a espécie *Lepturacanthus*



savala. Para a espécie *Sphyraena barracuda* iniciou-se entre 0,1 e 0,4 e terminou-se também ambos entre 0,4 e 0,9. Neste trabalho iniciou-se com uma variação de 0,1 a 0,3, chegando ao final de seis dias com valores de absorvância que variaram de 0,3 a 1,8, ambos valores referentes ao padrão e ao controle (sem hidrolisado), respectivamente. A amostra controle demonstra a maior absorvância e conseqüentemente o menor poder oxidante no ácido linoléico ao final de seis dias.

Comparando a atividade de inibição da peroxidação lipídica entre os hidrolisados observa-se que o hidrolisado de 1 hora da enzima Flavourzyme, junto com o hidrolisado de 5 horas da enzima Protamex, foram mais efetivos, seguidos dos hidrolisados de 1 hora com a enzima Protamex e de 5 horas com a enzima Flavourzyme que apresentaram valores semelhantes no fim de seis dias de incubação. O hidrolisado de 1 hora com a enzima Protamex foi o menos efetivo.

Ao final de seis dias se verificou que não houve relação da atividade antioxidante dos hidrolisados com o grau de hidrólise verificado anteriormente. Assim a diferença da atividade inibitória da oxidação do ácido linoleico pode ser referente à composição dos peptídeos, além da ordem em que os aminoácidos estão colocados na cadeia peptídica (NAZZER *et al.*, 2011).

### **3.3.2. Efeito sequestrante do radical 2,2- difenil - 1- picrilidrazil (DPPH)**

A capacidade dos hidrolisados de doar prótons ( $H^+$ ) ao radical DPPH foi observado pela queda da absorvância a 517 nm. Nas Figuras 4, 5 e 6 estão ilustrados os valores do poder sequestrante dos hidrolisados obtidos com as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, respectivamente, em relação a diferentes concentrações dos hidrolisados.

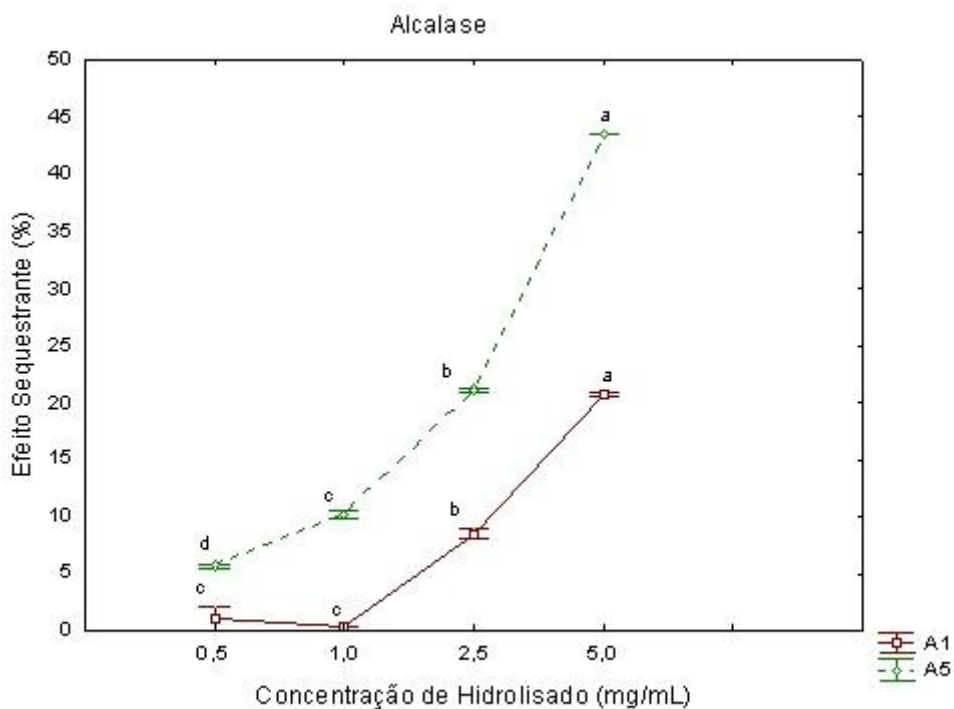


Figura 4: Efeito sequestrante do radical DPPH pelos hidrolisados da CMS de anchoita obtidos pela enzima Alcalase em diferentes tempos de hidrólise.

A1: Hidrolisado obtido por 1 hora de reação com a enzima Alcalase; A5: Hidrolisado obtido por 5 horas de reação com a enzima Alcalase. Valores referentes à média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma curva correspondem à diferença significativa entre as concentrações de hidrolisado.

O hidrolisado obtido com a enzima Alcalase em 1 hora de hidrólise apresentou valores em torno de 20% na ação sequestrante do radical DPPH, sendo que para maior tempo de hidrólise e maior concentração do hidrolisado maior foi o efeito sequestrante (43,4%). Valor próximo foi obtido por Li *et al.* (2011), que foi de 49,5% para o hidrolisado de carpa, utilizando a enzima Alcalase. Este valor pode ter sido maior por ter sido utilizada uma concentração de 7 mg/mL, maior ao utilizado neste estudo.

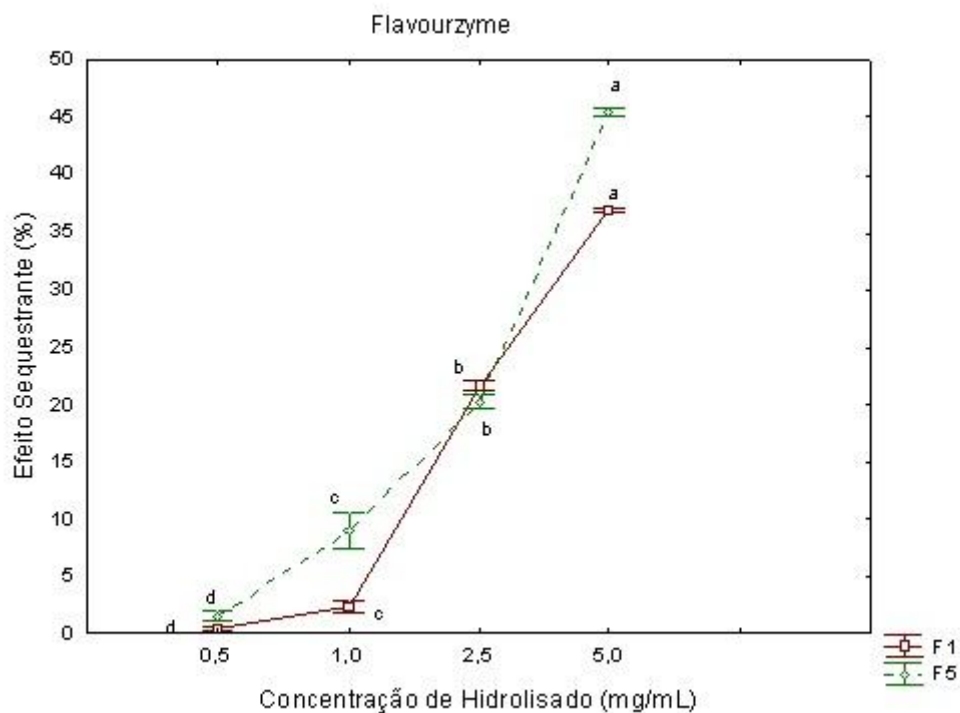


Figura 5: Efeito sequestrante do radical DPPH pelos hidrolisados da CMS de anchoita obtidos pela enzima Flavourzyme em diferentes tempos de hidrólise.

F1: Hidrolisado obtido por 1 hora de reação com a enzima Flavourzyme; F5: Hidrolisado obtido por 5 horas de reação com a enzima Flavourzyme. Valores referentes à média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma curva correspondem à diferença significativa entre as concentrações de hidrolisado.

Os produtos obtidos com a enzima Flavourzyme, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações analisadas. O hidrolisado de 5 horas se destacou com relação ao efeito sequestrante do radical DPPH, com o máximo de 45,4% na concentração de 5 mg/mL. Em hidrolisados obtidos a partir de *Selaroides leptolepis*, com a enzima Flavourzyme, foi obtido valores próximos a 80% de efeito sequestrante (KLOMPONG *et al.*, 2007). Esta diferença pode ter sido causada pela proporção de amostra e DPPH dispostos a reação, que foi de 4:1 mL, comparado com o deste estudo que foi de 1:1 mL. Assim, com uma maior quantidade de antioxidante presente maior poderá ser o efeito sequestrante.

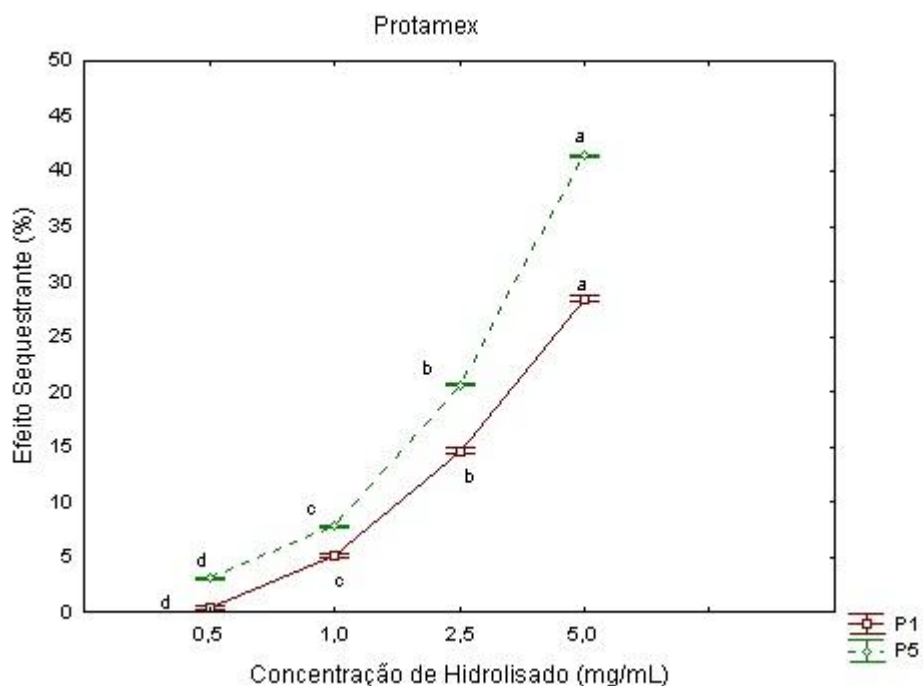


Figura 6: Efeito sequestrante do radical DPPH pelos hidrolisados da CMS de anchoita obtidos pela enzima Protamex em diferentes tempos de hidrólise.

P1: Hidrolisado obtido por 1 hora de reação com a enzima Protamex; P5: Hidrolisado obtido por 5 horas de reação com a enzima Protamex. Valores referentes à média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma curva correspondem à diferença significativa entre as concentrações de hidrolisado.

Com a enzima Protamex também se observou uma maior atividade antioxidante no hidrolisado de 5 horas ( $41,38 \pm 0,12\%$ ), aumentando conforme o aumento de concentração. You *et al.* (2009), com hidrolisados de *Misgurnus anguillicaudatus*, com a enzima Protamex, obtiveram valores de sequestro do radical DPPH entre 80% e 90%, com uma solução de concentração de 40 mg de proteína/mL, sendo bem maior aos utilizados neste trabalho.

Considerando os resultados obtidos pelas três enzimas, as diferenças apresentadas podem ser decorrentes do tipo de aminoácidos que formam os peptídeos, liberados durante a hidrólise, e da sua posição que pode ser diferenciado devido ao modo de atuação das enzimas serem diferenciadas, assim como os parâmetros de hidrólise (BASKAR *et al.*, 2008; KLOMPONG *et al.*, 2007; JE *et al.*, 2005).

### 3.3.3. Poder redutor

Através da medida do poder redutor é possível verificar a capacidade de um antioxidante reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  (na forma de ferrocianeto) para  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa), havendo a modificação da cor amarela para tons verde e azul (azul Prússia) da solução. (FERREIRA *et al.*, 2007). Na Figura 5 apresentam-se os valores de absorvância (ABS 700 nm) ao final da reação apresentada pelos hidrolisados, que foi considerado como poder redutor.

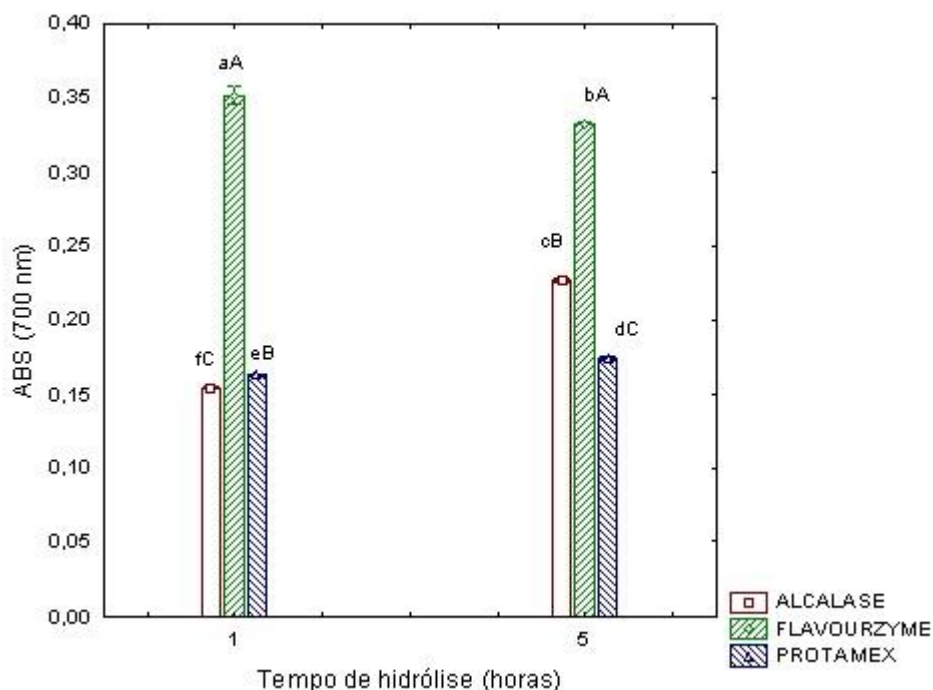


Figura 7: Absorbância (700 nm) de hidrolisados obtidos com diferentes enzimas e em diferentes tempos de hidrólise.

Hidrolisado com a enzima Alcalase (A1: 1 hora; A5: 5 horas); Flavourzyme (F1: 1 hora; F5: 5 horas); Protamex (P1: 1 hora; P5: 5 horas). Média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os hidrolisados com tempos diferentes de hidrólise. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as enzimas em cada tempo de hidrólise.

Quanto maior o valor de absorvância maior foi a redução ocorrida do ferrocianeto, ou seja, maior foi a atividade antioxidante. Observou-se que nos tempos

de 1 e 5 horas os hidrolisados que apresentaram maior poder redutor foram os obtidos com a enzima Flavourzyme, sendo que o período de 1 hora foi significativamente maior que o de 5 horas. Isto pode ser referente ao tipo de peptídeo que se formou durante a hidrólise, ou seja, dependendo da conformação desses peptídeos. Foi verificado que houve diferença significativa tanto entre os hidrolisados, quanto entre as enzimas nos tempos de 1 e 5 horas.

Segundo o estudo feito por Klompong *et al.* (2007), somente o hidrolisado com 25% de grau de hidrólise com a enzima Flavourzyme foi o que possuiu maior poder redutor, comparado com a enzima Alcalase, o que não ocorreu neste trabalho, pois para ambos hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme reduziu mais o ferrocianeto a ferrocianato. Esta diferença na resposta do poder redutor para a enzima Flavourzyme, comparado com a Alcalase, pode ter sido devido a diferentes fatores como indicam RAJAPAKSE *et al.* (2005) e CHEN *et al.* (1996) e que explicam que fatores que atuam durante um processo de hidrólise, como o tipo de enzima e substrato, as suas concentrações e o meio de reação, a composição, estrutura e hidrofobicidade dos peptídeos também são muito importantes para a presença de propriedades antioxidantes em hidrolisados, assim como a presença do aminoácido na posição correta dentro da sequência que forma o peptídeo.

#### **4. CONCLUSÃO**

Obteve-se hidrolisados proteicos com diferentes graus de hidrólise, sendo a Alcalase a enzima que apresentou os maiores valores. A enzima Flavourzyme foi mais efetiva para produzir hidrolisados capazes de inibir a oxidação de lipídeos, de capturar radicais livres e de reduzir íons ferro, podendo ser utilizada para a aplicação em produtos alimentícios. O comportamento diferenciado das enzimas em relação à atividade antioxidante sugere atividade hidrolítica e especificidade diferentes.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food feed protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, 1256-1262, 1979.

ADLER-NISSEN, J. Enzimic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science**, p. 427, 1986.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 58, p. 355–359, 1997.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 17<sup>o</sup> ed., v. 2, Gaithersburg, 2000.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15<sup>o</sup> ed., Washington, 1990.

BERTOLOTTI, M. I.; MANCA, E. Processamiento y comercialización de la anchoita (*Engraulis anchoita*) del Mar Argentino. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, n. 5, p. 224-246, 1986.

BHASKAR, N.; BENIA, T.; RADHA, C.; LATITHA, R. G. Optimisation of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 335-343, 2008.

BOUGATEF, A .; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559–565, 2010.

BRASIL. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Métodos físicos e químicos, Ministério da Agricultura, v. II, Brasília, 1981.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2619-23, 1996.

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual carp and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FURLAN, V. J. M.; SILVA, A. P. R.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoita (*Engraulis anchoita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n. 4, p. 834-839, 2009.

FUSELLI, S. R.; CASALES, M. R.; FRITZ, R.; YEANNES, M. I. Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis anchoita*) production. **LWT-Food Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 214-218, 1994.

GILBERG, A.; ARNESEN, J. A.; CARLEOG, M. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 475, 2002.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antioxidant activity of peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, p. 45–50, 2005.

JIA, J.; MA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L.; HE, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336-342, 2010.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, n. 5, 2005.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and



sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158-164, 2009.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1317–1327, 2007.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolations and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p.1135-1143, 2007.

LIASET, B.; JULSHAMN, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 17, p. 1747-1759, 2003.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, 1999.

MARTIN, R. E. **Chemistry and biochemistry of marine food products**. Westport: AVI Publishing Company, 1982.

MITSUDA, H. K.; YASUMOTO, K.; IWAMI, E. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyo Shokuryo**, v. 19, p. 210–214, 1996.

NAZEER, R. A.; DEEPTHA, R.; JAIGANESH, R.; SAMPATHKUMAR, N. S.; NAQASH, S. Y. Radical scavenging activity of seela (*Sphyraena barracuda*) and ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209–216, 2011.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 571–57, 2005.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 777-778, 1985.

OYAZU, M. Antioxidative activitie of browng products of glucosamine fractioned by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.

PENA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. **Meat Science**, v. 64, p. 259–263, 2003.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v.38, p.175–82, 2005.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**, v. 86, p. 99–103, 2003.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 2009.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. J.; BABBITT, J.; SMILEY, S.; CRAPO, C.; REPPOND, K. D. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. **Journal of Food Science**, v.68, p. 2196–2200, 2003.

SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 945–948, 1992.

SLIZYTÉ, R.; MOZURAITYTÉ, R.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668–677, 2009.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, v. 103, p. 1385–1394, 2007.

VAN DER VEN, C.; GRUPPEN, H.; DE BONT, A. B. D.; VORAGEN J. G. A. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2938-2946, 2002.

VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MILLÁN, F. Obtencion y aplicaciones de hidrolizados proteicos. **Grasas Aceites**, v. 52, p.132–136, 2001.

VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Peptídeos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 99-102, 2006.

WU, C. H. ; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949–957, 2003.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n. 1, p. 81-92, 2003.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 235–240, 2009.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.

**ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DAS LAVAGENS NAS CARACTERÍSTICAS  
TECNOLÓGICAS DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoíta*)**

## INFLUÊNCIA DAS LAVAGENS NAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*)

### RESUMO

O surimi é um concentrado de proteínas miofibrilares obtido por lavagens da CMS de pescado. Neste estudo avaliou-se a influência de diferentes soluções de lavagem da carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita (*Engraulis anchoita*) nas características químicas e físicas do surimi. Foram testados diferentes processos de lavagem: no primeiro teste (BS) efetuaram-se duas lavagens com bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) e uma com cloreto de sódio 0,3% (p/v); no segundo (AF) fez-se uma lavagem com água destilada, uma com solução de ácido fosfórico 0,05% (p/v) e uma com cloreto de sódio 0,3% (p/v); no terceiro teste (AB) utilizaram-se as soluções de cloreto de sódio 0,3% (p/v), ácido fosfórico 0,05% (p/v) e bicarbonato de sódio 0,5% (p/v). As lavagens foram realizadas a uma temperatura de  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. Eliminou-se a água com o hidroextrator e por fim adicionaram-se os crioprotetores sorbitol 3% (p/p) e tripolifosfato 0,25% (p/p). As amostras de surimi foram armazenadas em embalagens de polipropileno a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os surimi foram avaliados segundo o seu rendimento, composição proximal e parâmetros de cor e textura. Obteve-se um rendimento maior no surimi BS (90,5%) em comparação aos surimis AF e AB devido a maior retenção de água, o que pode ser verificado pelo conteúdo de umidade ( $86,2\pm 0,1\%$ ). Os componentes como proteína, lipídeos e cinzas diminuíram após os processos de lavagens quando comparados com a CMS. O surimi obtido pela lavagem com bicarbonato de sódio apresentou uma coloração mais clara ( $W= 50,24\pm 1,81$ ) em comparação com os surimis AF e AB. Na força de gel obteve-se um maior valor com o surimi AF ( $1154,25 \pm 4,37$  g.mm), tornando-se mais adequado para ser utilizado na formulação de embutidos emulsionados.

**Palavras-chave:** pescado, lavagem, surimi, características físicas.

INFLUENCE OF WASHING PROCESS ON THE TECHNOLOGICAL  
CHARACTERISTICS OF THE SURIMI OBTAINED FROM ARGENTINE ANCHOVY  
(*Engraulis anchoita*)

**ABSTRACT**

Surimi is a myofibrillar protein concentrate obtained by a washing process of the fish muscle. The influence of different washing solutions of CMS anchovy (*Engraulis anchoita*) on the chemical and physical characteristics of surimi was evaluated in this study. Different washing processes were tested: in the first test (SB) were done two washes steps with sodium bicarbonate 0.5% (w / v) and one steps with sodium chloride solution 0.3% (w / v); another called (PA) that was tested one washing with distilled water, one washing with phosphoric acid solution 0.05% (w / v) and one with sodium chloride solution 0.3% (w / v); in the third test (PS) were used sodium chloride 0.3% (w / v), phosphoric acid 0.05% (w / v) and sodium bicarbonate 0.5% (w / v) solutions. The washing steps done at  $6 \pm 1$  ° C during 3 minutes. The liquid phase was eliminated with a hydroextractor and finally it was added the cryoprotectants sorbitol 3% (w / w) and tripolyphosphate 0.25% (w / w). The samples of surimi were stored in polypropylene package at -20 ° C. It was measured yield, proximal composition, parameters of color and texture of the surimi samples. Surimi SB presented a higher yield value (90.5%) than surimis PA and PS due to higher water retention, which can be confirmed by moisture content ( $86.2 \pm 0.1\%$ ). Other components such as protein, lipids and ash decreased after the washing processes compared to the raw material CMS. Surimi sample obtained by washing with sodium bicarbonate presented a higher whiteness ( $50.24 \pm 1.81$ ) compared with the surimis PA and PS. Surimi PA has obtained a greater gel strength value ( $1154.25 \pm 4.37$  g.mm), becoming more appropriate to be used in the sausages formulation.

**Keywords:** fish, washing, surimi, physical characteristics

## 1. INTRODUÇÃO

O pescado é um importante constituinte da alimentação humana, pois apresenta um alto valor nutricional, referindo-se a qualidade das proteínas, vitaminas, minerais e lipídeos (VISENTAINER *et al.*, 2007). O surimi é um concentrado de proteínas miofibrilares que pode ser obtido a partir do músculo de pescado, o qual foi submetido a lavagens e, por fim, estabilizado por uma mistura de compostos crioprotetores. Esses compostos atuam na proteção das proteínas do músculo, principalmente a miosina, que pode ser degradada durante o armazenamento congelado (DEY e DORA, 2010).

O surimi vem se tornando cada vez mais uma alternativa para o uso de espécies de pescado subutilizado por estarem ligadas a problemas tecnológicos (PÉREZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2007), como por exemplo o tamanho de alguns peixes pelágicos (KARAYANNAKIDIS *et al.*, 2008) e a cor (NAVARRO, 2007). No entanto, segundo a FAO em 2007 a captura destas espécies de pequeno porte vem sendo cada vez mais comparada com outras espécies mais valiosas, que sofrem declínio (KARAYANNAKIDIS *et al.*, 2008).

A carne mecanicamente separada (CMS) é obtida pelo uso de uma separadora mecânica (despolpadeira) e pode ser utilizada como matéria prima para diversos produtos cárneos (OZKECECI *et al.*, 2008). No entanto, essa matéria prima apresenta baixa vida útil, alta suscetibilidade à oxidação, cor escura e baixas propriedades funcionais inadequadas devido ao estresse do processo rigoroso. A CMS contém lipídeos, tecido conectivo e medula óssea (SOUZA *et al.*, 2009). Através de lavagens se faz a remoção de componentes indesejáveis como o sangue, a gordura, as proteínas sarcoplasmáticas e pigmentos (PIYADHAMMAVIBOON e YONGSAWATDIGUI, 2010), melhorando a formação de gel durante o cozimento (HAN *et al.*, 2009).

Estudos anteriores reportaram que a água e soluções, como cloreto de sódio, bicarbonato de sódio e tampão fosfato de sódio são utilizadas nas lavagens para o processamento do surimi. No entanto, cada uma dessas soluções afeta as propriedades do produto, como a coloração do surimi, devido à retirada de pigmentos, e ao aumento da capacidade de retenção de água (ISMAIL *et al.*, 2010). Alguns trabalhos tem sugerido a utilização de compostos clarificantes, como ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) ou cloreto de



sódio (NaCl), com a finalidade de melhorar a aparência do surimi (GONÇALVES e PASSOS, 2003). Chen *et al.* (1997) utilizou bicarbonato de sódio para a obtenção de surimi de cavalo marinho (*Trachurus japonicus*), onde estes relatam ser adequado para melhorar a coloração do surimi de pescado com polpa escura. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes soluções de lavagens nas características tecnológicas de surimi de CMS de anchoita.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria prima**

A matéria prima utilizada para a obtenção do surimi foi a carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita (*Engraulis anchoita*).

As anchoitas foram obtidas congeladas da indústria Leal Santos, de Rio Grande, a -20°C, previamente lavadas, sem cabeça, sem cauda e evisceradas. Foram levadas diretamente ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos, mantidas na mesma temperatura até o seu uso.

Para a obtenção da CMS as anchoitas foram descongeladas em temperatura de 4°C, sendo lavadas com solução de cloreto de sódio 0,3% (p/v) e submetidas ao despulpamento em uma separadora mecânica (HIGH TECH HT/2500 – Brasil).

### **2.2. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade P. A. O bicarbonato de sódio, ácido fosfórico, cloreto de sódio e o tripolifisfato foram da marca Synth e o sorbitol foi da marca Vetec.

### **2.3. Obtenção do surimi da CMS de anchoita**

Na Figura 1 está ilustrado o processo de obtenção do surimi com a aplicação de três lavagens da CMS de anchoita.

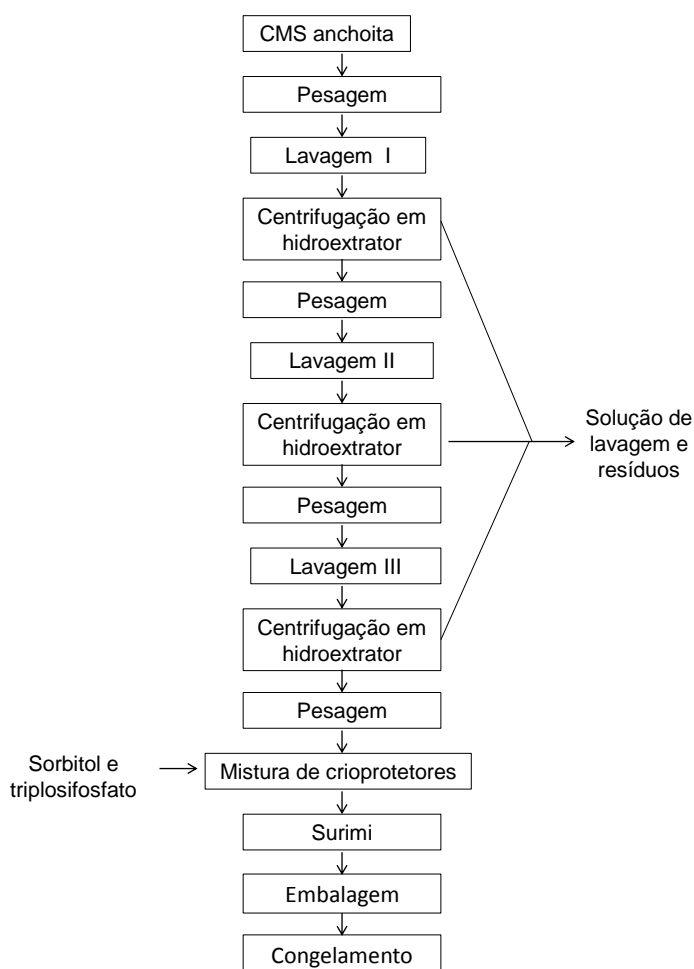


Figura 1: Processo de obtenção e armazenamento de surimi de anchoita.

A CMS de anchoita foi inicialmente pesada e submetida a lavagens, com diferentes soluções, na proporção 1:3 (p/v) (CMS: solução). Foram testados três tipos de lavagens, em três etapas, para a obtenção do surimi. O primeiro teste (BS) foi feito com duas lavagens utilizando solução de bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) e uma terceira com solução de cloreto de sódio 0,3% (p/v). O segundo teste (AF) foi realizado com água, na primeira lavagem, logo após com solução de ácido fosfórico 0,05% (p/v) e depois com cloreto de sódio 0,3% (p/v). O terceiro teste foi feito com as soluções de cloreto de sódio 0,3% (p/v), ácido fosfórico 0,05% (p/v) e a última com bicarbonato de sódio 0,5% (p/v). A CMS ficou em contato com as soluções a temperatura de  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos com agitação manual. Após cada lavagem a suspensão foi submetida a retirada da solução em hidro extrator (ANCO FOOD MACHINE YL/15 – Taiwan), sendo por fim adicionado os crioprotetores sorbitol 3% e tripolisfosfato 0,25%. Os

surimis foram acondicionados em embalagens de polipropileno e congelados em freezer (CONSUL CHB 53) a -20°C até o momento de uso.

#### 2.4. Rendimento do surimi

O rendimento (p/p) foi obtido a partir do peso do surimi em relação ao peso inicial da CMS de anchoita.

#### 2.5. Caracterização química e física

A matéria prima e o surimi foram avaliados quanto ao teor de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, segundo AOAC (2000). Foi determinado também o frescor da polpa *in natura* através da análise de pH e N-BVT, segundo o método da AOAC (1990).

Foi determinada a cor da polpa e dos surimis utilizando-se colorímetro (CHROMA METER KONICA MINOLTA CR-400/410 – Japão), sendo avaliados parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ) e cromaticidade ( $a^*$  e  $b^*$ ). A brancura ( $W$ ) foi determinada seguindo a Equação 1, conforme KRISTINSSON *et al.* (2005).

$$W = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq.1})$$

A análise de penetração no gel foi feita com o uso do analisador de textura TA.XT.plus – Reino Unido. Os parâmetros analisados foram força de quebra (g), distância de ruptura (mm) e força do gel (g.mm). Foi utilizado um probe esférico com 5 mm P/5S (velocidade de teste 1,1 mm/s, força de 10 g e distância de 15 mm da amostra). O gel foi produzido com a adição de 1% (p/p) de sal, baseada no peso do surimi, e em seguida foi adicionado 4% de fécula de mandioca. O surimi foi embutido em envoltório de celulose (2 cm de diâmetro) e cozidos em banho a 90 °C por 15 minutos. Foram resfriados e guardados sob refrigeração para serem analisados no dia seguinte.

## 2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, com um nível de confiança de 95%, utilizando o programa Statistica 7.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Rendimento

Na Tabela 1 apresentam-se os valores de rendimento obtidos após o despulpamento da anchoita e das três lavagens feitas na CMS para a retirada de pigmentos, proteínas sarcoplasmáticas e substâncias que conferem odor e sabor a pescado.

O rendimento inicial para a obtenção da CMS, com o auxílio de uma despulpadeira, foi de 80,8%, em relação à CMS de anchoita. Como essa matéria prima foi obtida diretamente da indústria, não foi possível calcular o rendimento em relação ao pescado inteiro. Segundo Mira e Lanfer-Marquez (2005), que trabalharam com surimi de Maria-luíza (*Paralichthys brasiliensis*) e Perna-de-moça (*Cynoscion virescens*), obtiveram em média, 50% de rendimento, de polpa a partir do pescado inteiro.

Tabela 1: Rendimento dos surimis obtidos após diferentes lavagens.

Materia prima/Produto	Rendimento (%)
Surimi (BS)	90,5
Surimi (AF)	57,9
Surimi (AB)	81,0

BS: lavagem com bicarbonato de sódio 0,5%, e cloreto de sódio 0,3%; AF: lavagem com água, ácido fosfórico 0,05% e cloreto de sódio 0,3%; AB: lavagem com cloreto de sódio 0,3% 9 (p/v), ácido fosfórico 0,05% (p/v) e bicarbonato de sódio 0,5% (p/v).

Após as lavagens foi possível verificar que o rendimento dos surimis em que foram utilizadas as soluções de bicarbonato de sódio 0,5% (BS e AB) foram maiores que o surimi obtido por lavagens com ácido fosfórico (AF). Este aumento pode ser proveniente de um aumento na retenção de água da CMS quando expostas a essa

solução alcalina. Gonçalves e Passos (2010) utilizaram diferentes soluções de lavagens, em diferentes concentrações, para a obtenção de surimi de corvina (*Micropogonias furnieri*), na qual obtiveram, no final do processo, um rendimento de 98,13%. Este alto rendimento pode ser decorrente do processo de extração de água de lavagem, que foi feito manualmente com o uso de tecido, que permitiu maior retenção do líquido pelas proteínas do músculo do pescado.

### 3.2. Composição proximal

Na Tabela 2 apresenta-se composição proximal da CMS e dos surimis de anchoita em base úmida e base seca.

Tabela 2: Composição proximal (base seca e base úmida) da CMS e dos surimis obtidos com diferentes lavagens.

Componentes	g/100 g amostra			
	CMS	Surimi BS	Surimi AF	Surimi AB
Umidade*	81,3±0,1 <sup>d</sup>	86,2±0,01 <sup>a</sup>	81,9±0,3 <sup>c</sup>	85,8±0,1 <sup>b</sup>
Proteína*	15,4±0,5 <sup>a</sup>	7,9±0,3 <sup>c</sup>	12,0±0,9 <sup>b</sup>	7,7±0,2 <sup>c</sup>
Lipídeos*	0,6±0,2 <sup>a</sup>	0,1±0,1 <sup>b</sup>	0,2±0,1 <sup>b</sup>	0,2±0,1 <sup>b</sup>
Cinzas*	1,2±0,05 <sup>a</sup>	1,0±0,06 <sup>a</sup>	0,8±0,05 <sup>a</sup>	0,6±0,1 <sup>a</sup>
Proteína**	83,9 ±2,9 <sup>a</sup>	57,1±2,3 <sup>bc</sup>	63,6 ±4,7 <sup>b</sup>	54,0±1,4 <sup>c</sup>
Lipídeos**	3,1±0,2 <sup>a</sup>	0,6±0,1 <sup>c</sup>	0,9±0,1 <sup>c</sup>	1,6±0,1 <sup>b</sup>
Cinzas**	6,7±0,3 <sup>a</sup>	7,4±0,5 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>b</sup>	4,3±0,5 <sup>b</sup>

\*Base úmida. \*\*Base seca. Surimi BS: surimi obtido por duas lavagens da CMS com bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) e uma lavagem com cloreto de sódio 0,3% (p/v); Surimi AF: surimi obtido pela lavagem da CMS com água, com ácido fosfórico 0,05% (p/v) e cloreto de sódio 0,3% (p/v); Surimi AB: lavagem da CMS com cloreto de sódio 0,3%, ácido fosfórico 0,05% e bicarbonato de sódio 0,5%. Valores correspondem à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras, com  $p > 0,05$ .

Todos os surimis apresentaram um teor de umidade maior que o da CMS (81,3±0,1) devido às lavagens, tendo diferença significativa com as amostras de surimi, comportamento também demonstrado por Karthikeyan *et al.* (2006) com surimi de *Nemipterus japonicus*. Pelos valores de umidade pode-se entender o aumento de rendimento causado nos surimi obtidos por lavagens com bicarbonato de sódio (BS e AB), sendo que AB apresentou um resultado médio entre BS e AF, que pode ter sido

referente ao uso da solução de ácido fosfórico em uma das lavagens. O conteúdo protéico, lipídico e de cinzas foi menor para as amostras de surimi comparadas com a CMS.

O aumento de umidade pode ser referente à diminuição do conteúdo de proteínas e lipídeos (ISMAIL, 2010). Estes autores também reportaram que o aumento da umidade pode ser influência do pH. Neste caso pH das soluções de lavagens pode ter possibilitado a ocorrência de maior ou menor umidade do surimi de CMS de anchoita obtido. Parvathy e George (2011) também obtiveram um aumento de umidade do surimi comparado com a matéria prima, que foi de 79,9% para 83,2%, tendo conseqüentemente uma diminuição dos demais componentes proteína, lipídeos e cinzas.

Com as lavagens são extraídas as proteínas sarcoplasmáticas, que são prejudiciais para a formação do gel de surimi durante o cozimento (PARK e LIN, 2004). É possível verificar que os surimis obtidos por lavagens com solução de bicarbonato de sódio (BS) apresentaram menor teor de proteína, comparado com o obtido com ácido fosfórico. Isto pode ser decorrente de uma maior solubilização das proteínas da CMS em pH alcalino do que em pH ácido.

De acordo com Hultin e Kelleher (2000) a adição de soluções alcalinas na lavagem da polpa produz um produto de maior qualidade, quando lavada apenas com água. Diferentes concentrações de bicarbonato de sódio podem ser aplicadas em uma ou mais lavagens da polpa. O cloreto de sódio também é bastante utilizado.

### **3.3. N-BVT e pH da CMS de anchoita**

O valor de N-BVT obtido para a CMS foi de  $4,8 \pm 0,9$  mg N/100g de CMS e o pH foi de  $6,6 \pm 0,1$ . Isto mostra as boas condições em que a matéria prima se encontrava para a obtenção dos surimis, pois o limite estabelecido pela legislação nacional vigente para N-BVT é de 30 mg N/100g de pescado (BRASIL, 1980). Existem parâmetros que indicam a qualidade do alimento. O pH é um deles, pois é afetado por reações que ocorrem após a morte do animal, e indica a presença de microrganismos que através de seu metabolismo causam o acúmulo de material metabólico alcalino, elevando o valor do pH e diminuindo a qualidade do produto (MARTIN, 1982). Furlan *et al.* (2009), no músculo de anchoita, obteve um pH de 6,7, sendo maior que o deste estudo. Ambos os valores são considerados bons indicativos de uma matéria prima

em boas condições, visto que não ultrapassou o valor exigido pela legislação, que é de 6,8.

### 3.4. Cor

Através das lavagens foi possível extrair pigmentos que conferiam a coloração escura da CMS de anchoita. Assim, na Tabela 3 estão presentes os parâmetros luminosidade  $L^*$ , que varia de 0 (preto) a 100 (branco), além da cromaticidade  $a^*$ , de -60 (verde) a +60 (vermelho),  $b^*$ , de -60 (azul) a +60 (amarelo) e a brancura (W) dos surimis obtidos.

Tabela 3: Análise de cor da CMS e dos surimi de anchoita obtidos em diferentes tipos de lavagens.

Matéria Prima	$L^*$	$a^*$	$b^*$	W
CMS	44,25±1,06 <sup>bc</sup>	3,30±0,23 <sup>a</sup>	8,64±0,39 <sup>a</sup>	43,49±1,10 <sup>bc</sup>
Surimi (BS)	50,43±1,87 <sup>a</sup>	-1,08±0,06 <sup>d</sup>	4,23±0,60 <sup>c</sup>	50,23±1,82 <sup>a</sup>
Surimi (AF)	46,43±0,36 <sup>b</sup>	0,98±0,12 <sup>b</sup>	6,72±0,21 <sup>b</sup>	46,00±0,33 <sup>b</sup>
Surimi (AB)	42,70±0,76 <sup>c</sup>	-1,08±0,13 <sup>c</sup>	5,40±0,61 <sup>c</sup>	42,45±0,70 <sup>c</sup>

Surimi BS: surimi obtido por duas lavagens com bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) e uma lavagem com cloreto de sódio 0,3% (p/v); Surimi AF: surimi obtido pela lavagem com água, com ácido fosfórico 0,05% (p/v) e cloreto de sódio 0,3% (p/v). Surimi AB: surimi obtido pela lavagem com cloreto de sódio 0,3%, com ácido fosfórico 0,05% (p/v) e bicarbonato de sódio 0,5% (p/v). Valores correspondem à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras, com  $p < 0,05$ .

A polpa de anchoita foi considerada escura e com tonalidades ao redor do vermelho/amarelo, pois os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram 44,25±1,06, 3,30±0,23 e 8,64±0,39, respectivamente. O surimi obtido com lavagens da polpa com bicarbonato de sódio 0,5% e cloreto de sódio 0,3% (BS) apresentou-se mais claro, sendo o valor de luminosidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o surimi (AF), obtido por lavagens com água, ácido fosfórico 0,05% e cloreto de sódio 0,3%, e (AB), com cloreto de sódio 0,3%, ácido fosfórico 0,05% e bicarbonato de sódio 0,5%. Não houve diferença significativa entre os surimis obtidos pela lavagem da CMS com ácido fosfórico 0,05% (AF e AB) e a CMS, ou seja, estes tipos de lavagens não foram eficientes para se obter um surimi de CMS de anchoita com uma coloração mais clara.

Alguns autores consideram que a lavagem da polpa é significativa na redução de componentes solúveis em água (pigmentos heme), melhorando a qualidade da textura (TENUTA e JESUS, 2003). Jafarpour e Goczyca (2008), com o surimi de *Cyprinus carpio* obtiveram uma luminosidade em torno de 40 a 60, estando próximo aos valores encontrados nos surimis de anchoita. Chen *et al.* (1997) obtiveram valores menores que o deste estudo com o surimi obtido através da lavagem da polpa, com bicarbonato de sódio 0,5%, de cavalo marinho. A luminosidade apresentou-se abaixo de 40 após 15 minutos de lavagem. Valores próximos de 50, como foi apresentado neste trabalho com a mesma solução de lavagem, foram obtidos após 90 minutos de lavagem, o que se tornaria inviável para um processo industrial.

Com relação aos parâmetros de cromaticidade observou-se que houve diferença significativa entre as amostras, sendo que o croma  $a^*$  apresentou valores negativos para as amostras que foram utilizadas como solução de lavagem o bicarbonato de sódio, apresentando-se em tons esverdeados. Este comportamento também foi verificado por Chen *et al.* (1997) quando utilizou bicarbonato de sódio 0,5%. O croma  $b^*$  apresentou valores positivos constatando-se que as amostras apresentavam-se em tonalidade amarelada, onde os produtos obtidos pelas lavagens com bicarbonato (BS e AB) foram os que apresentaram esta coloração mais fraca. Para os dados de cromaticidade todas as amostras diferiram significativamente entre si.

A brancura é um dado importante para a escolha de um surimi, pois as indústrias de surimi exigem pescado de carne branca (NAVARRO, 2007) para a produção do surimi. Porém quando se utilizam espécies de pescado que apresentam a carne escura, como a anchoita, se faz uso de métodos, como as lavagens com soluções químicas, para fazer a clarificação da CMS. Neste estudo foi possível observar que o surimi que apresentou significativamente a maior brancura foi o lavado com bicarbonato de sódio 0,5% e cloreto de sódio 0,3% (BS). Jafarpour e Goczyca (2008) obtiveram surimi com valores de brancura em torno de 40,0 a 70,0, tendo valores semelhantes neste estudo. Panpipat *et al.* (2006) obtiveram surimi de *Croaker mackerel* com brancura em torno de 50,0 e 58,0, valores semelhantes ao deste trabalho.



### 3.5. Textura

A máxima força para romper o gel e a distância que o probe (com uma esfera na extremidade) perfura o surimi são respostas importantes nas características do gel de surimi. Além destes dois parâmetros existe um terceiro que é a força do gel (força máxima de ruptura x distância da ruptura). Na Tabela 4 apresentam-se os parâmetros de textura dos géis de surimi.

Tabela 4: Textura dos géis de surimi com diferentes lavagens da CMS de anchoita.

Surimi	Força de ruptura (g)	Distância (mm)	Força do gel (g x mm)
BS	35,11 ± 0,64 <sup>c</sup>	12,97 ± 0,69 <sup>a</sup>	455,10 ± 15,8 <sup>b</sup>
AF	133,54 ± 0,97 <sup>a</sup>	8,65 ± 0,10 <sup>b</sup>	1154,25 ± 4,37 <sup>a</sup>
AB	72,01 ± 1,57 <sup>b</sup>	3,46 ± 0,44 <sup>c</sup>	248,62 ± 26,36 <sup>c</sup>

Surimi BS: surimi obtido por duas lavagens com bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) e uma lavagem com cloreto de sódio 0,3% (p/v); Surimi AF: surimi obtido pela lavagem com água, com ácido fosfórico 0,05% (p/v) e cloreto de sódio 0,3% (p/v). Surimi AB: surimi obtido pela lavagem com cloreto de sódio 0,3%, com ácido fosfórico 0,05% (p/v) e bicarbonato de sódio 0,5% (p/v). Valores correspondem à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras, com  $p < 0,05$ .

Nos surimis estudados foi possível verificar que a maior força de ruptura do gel foi encontrada no surimi AF (133,54 ± 0,97 g), obtido por lavagens da CMS de anchoita com água, ácido fosfórico 0,05% e cloreto de sódio 0,3%, sendo também o surimi que apresentou maior força do gel. Esses valores maiores podem ser devido à menor umidade presente no surimi AF (81,9 ± 0,3%) em comparação com o BS e AB. Para o gel de surimi BS a força do gel foi maior que o AB devido à distância de ruptura ter sido menor em AB, porém a força de ruptura foi menor em BS. Isto pode ser proveniente da maior umidade presente no surimi BS comparado com os surimis AF e AB. Todas as amostras e em todos os parâmetros apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Jafarpour e Gorczyca (2008) produziram surimi de *Cyprinus carpio* pelo método convencional, obtendo um valor de força de gel de 1073,56 g x mm, sendo menor ao obtido com o surimi AF. Pérez-Mateos *et al.* (2004) obtiveram valores de força de deformação abaixo de 100,0 g e distância de deformação entre 4,0 e 6,0 mm de surimi

de *Micropogonias undulates*, semelhantes aos obtidos neste estudo com o surimi de CMS de anchoita. DONDERO *et al.* (2002) estudaram a adição de transglutaminase (TG) em surimi de *Trachurus Murphyi*, com umidade de 76%, sendo que na amostra que não foi adicionada a enzima TG foi obtido valores entre 5000 e 10.000 g x mm. Estes valores são bem maiores aos obtidos neste estudo.

Rupsankar (2010) reportou que a redução da umidade na carne melhorou a capacidade de formação do gel. Certa quantidade de água é necessária para a adequada solubilização das proteínas e a formação da rede de gel, que deve ser acima de 74%, o ponto crítico de umidade (LANIER e LEE, 2000). Segundo OGAWA e MAIA (1999) valores de umidade abaixo de 80% são determinantes para a formação de um gel de boa qualidade, com reestruturação adequada das fibras, uma condição fundamental para obter melhor textura no produto final. Assim, a força do gel pode ter sido influenciada pela umidade do surimi que foi acima de 80%.

#### **4. CONCLUSÃO**

Verificou-se efeito positivo das lavagens da CMS nas características tecnológicas dos surimis obtidos. O surimi obtido pela lavagem da CMS com solução de bicarbonato e cloreto de sódio mostrou maior luminosidade e brancura que a CMS e os demais surimis. O surimi obtido por lavagens com água e soluções de ácido fosfórico e cloreto de sódio apresentou o maior valor de força do gel, sendo assim, devido a esta característica escolhido como o mais adequado para a formulação de embutido emulsionado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 17° ed., v. 2. Gaithersburg, 2000.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15° ed., Washington, 1990.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 165p, Brasília, 1980.

CHEN, H. H.; CHIU, E. M.; HUANG, J. R. Color and gel-forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 985-991, 1997.

DEY, S. S.; DORA, K. C. Effect of sodium lactate as cryostabilizer on physic-chemical attributes of croaker (*Johnius gangeticus*) muscle protein. **Journal of Food Science Technology**, v. 47, n. 4, p. 432–436, 2010.

DONDERO, M.; CUROTTO, E.; FIGUEROA, V. Transglutaminase Effects on Gelation of Jack Mackerel Surimi (*Trachurus Murphyi*). **Food Science Technology Int**, v. 8, n. 1, p. 49–54, 2002.

FURLAN, V. J. M.; SILVA, A. P. R.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoíta (*Engraulis anchoita*). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 834-839, 2009.

GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G. Restructured fish product from white croaker (*Micropogonias furnieri*) mince using microbial transglutaminase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, p. 987-995, 2010.

GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G. Uso da enzima transglutaminase na elaboração de um produto reestruturado à base de pescado. **Revista Nacional da Carne**, v. 28, n. 317, p. 123-132. 2003.

HAN, M.; ZHANG, Y.; FEI, Y.; XU, X. ;ZHOU, G. Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 665– 670, 2009.

HULTIN, H.O.; KELLEHER, S.D. Surimi processing from dark muscle fish. In: Park, J. W. **Surimi and Surimi Seafood**. New York: Marcel Dekker Inc., cap. 3, p. 59-77, 2000.

ISMAIL, I., HUDA, N., ARIFFIN, F.; ISMAIL, N. Effects of Washing on the Functional Properties of Duck Meat. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 6, p. 556-561, 2010.

JAFARPOUR, A.; GORCZYCA, E. M. Alternative techniques for producing a quality surimi and kamaboko from common carp (*Cyprinus carpio*). **Food Engineering and Physical Properties**, v. 73, n. 9, p. 415-424, 2008.

KARAYANNAKIDIS, P. D.; ZOTOS, A.; PETRIDIS, D.; TAYLOR, K. D. A. Physicochemical changes of sardines (*Sardina pilchardus*) at  $-18^{\circ}\text{C}$  and functional properties of Kamaboko gels enhanced with  $\text{Ca}^{2+}$  ions and MTGase. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, n. 3, p. 372–97, 2008.

KARTHIKEYAN, M.; DILEEP, A. O.; SHAMASUNDAR, B. A. Effect of water washing on the functional and rheological properties of proteins from threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1002–1010, 2006.

KRISTINSSON, H. G.; THEODORE, T.; DEMIR, D.; INGADOTTIR, B. A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. **Journal of Food Science** – v. 70, n. 4, 2005.

LANIER, T. C.; LEE, C. M. **Surimi technology**. New York. Marcel Dekker Inc., p. 220-287, 2000.

MARTIN, R. E. **Chemistry and biochemistry of marine food products**. Westport: AVI Publishing Company, 1982.

MIRA, N. V. M.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Avaliação da composição centesimal, aminoácidos e mercúrio contaminante de surimi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 665-671, 2005.

NAVARRO C. Tecnología de los productos gelificados. In: PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E. **Industrialización de productos de origen animal**. 3° ed., Alicante, Spain: Univ. Miguel Hernández. p 139–159, 2007.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OZKECECI, R.; KARAKAYA, M.; YILMAZ, M.; SARICOBAN, C.; OCKERMAN, H. The effect of carcass part and packaging method on the storage stability of mechanically deboned chicken meat. **Journal of Muscle Foods**, v. 19, p. 288–301, 2008.

PANPIPAT, W.; CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S. Gel properties of croaker–mackerel surimi blend. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1122–1128, 2010.

PARK, J.W.; LIN, J.T.M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J.W. **Surimi and surimi seafood**. 2° ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, cap.2, p.33-106, 2004.

PARVATHY, U.; GEORGE, S. Influence of cryoprotectant levels on storage stability of surimi from *Nemipterus japonicus* and quality of surimi-based products. **Journal of Food Science and Technology**, 2011. [DOI 10.1007/s13197-011-0590-y](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0590-y)

PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E. **Industrialización de productos de origen animal**. 3° ed., Vol. 2, p 7–172, 2007.

PÉREZ-MATEOS, M.; AMATO, P. M.; LANIER, T. C. Gelling properties of Atlantic Croaker surimi processed by acid or alkaline solubilization. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 4, p. 328-333, 2004.

PIYADHAMMAVIBOON, P.; YONGSAWATDIGUL, J. Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 291–298, 2010.

RUPSANKAR, C. Improvement of cooking quality and gel formation capacity of Bombay duck (*Harpodon nehereus*) fish meat. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 5, p. 534–540, 2010.

SOUZA, C. F. V. D.; VENZKE, J. G.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Nutritional effects of mechanically deboned chicken meat and soybean proteins cross-linking by microbial transglutaminase. **Food Science and Technology International**, v. 15, p. 337–344, 2009.

TENUTA, F. A.; JESUS, R. S. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria prima industrial. **Boletim da SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 59-64, 2003.

VISENTAINER, J. V.; NOFFS, M. D.; CARVALHO, P. O.; ALMEIDA, V. V.; OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, N. E. Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the southeast coast of Brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 543–547, 2007.

**ARTIGO 3: UTILIZAÇÃO DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) EM  
EMBUTIDO EMULSIONADO E EFEITO ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO**

## UTILIZAÇÃO DE SURIMI DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) EM EMBUTIDO EMULSIONADO E EFEITO ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO

### RESUMO

O surimi pode servir de base para a produção de diversos alimentos através da adição de conservantes e saborizantes para obter as características desejáveis no produto final. Neste estudo analisou-se a influência das concentrações de surimi de anchoita de 70, 75 e 80% nas características tecnológicas das salsichas, com o objetivo de se obter um produto com características próximas às comerciais, determinando a influência de hidrolisados antioxidantes na inibição da oxidação lipídica deste tipo de produto. Foram analisadas a cor e a textura das salsichas de surimi de anchoita, sendo que a mais semelhante à salsicha comercial foi caracterizada química e nutricionalmente. Os parâmetros de cor e textura das salsichas de surimi diferiram significativamente da salsicha comercial ( $p < 0,05$ ). Não houve influência da concentração de surimi nas características tecnológicas, exceto nos valores de luminosidade, que apresentaram diferença significativa entre a salsicha com 70% de surimi comparada com a de 75 e 80%, sendo escolhida a salsicha com 75% de surimi de anchoita para a caracterização. A salsicha com 75% de surimi apresentou composição proximal semelhante à comercial, estando dentro das especificações do Padrão de Identidade e Qualidade da Salsicha. O produto com surimi também apresentou valor energético total menor (193,7 Kcal/100g) e menor teor de sódio (520 mg/100g) comparado com a salsicha comercial, sendo considerado um produto mais saudável para o consumo. Nas condições de análise das salsichas não foi verificada ação antioxidante de hidrolisados através da formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), porém foi verificada ação antioxidante na CMS de anchoita.

**Palavras-chave:** anchoita, surimi, salsicha, oxidação.



USE OF ARGENTINE ANCHOVY (*Engraulis anchoita*) SURIMI IN  
EMULSIFIED PRODUCT AND ANTIOXIDANT EFFECT OF THE HYDROLYSATE

**ABSTRACT**

Surimi can be used to obtain several foods through adding preservatives and flavoring to conduce a desired characteristic in the final product. The influence of Argentine anchovy surimi concentrations on the technological characteristics of the sausage was tested in this study. It was used 70, 75 and 80% of surimi to produce sausages, with the objective to obtain a similar commercial product, checking at the end the influence of hydrolysates in inhibiting the lipid oxidation in this product. It was determined the color and texture of the sausages, and the most similar to the commercial sausage was characterized chemically and nutritionally. The value of surimi sausages for color and texture differ significantly from commercial sausage ( $p > 0.05$ ). There was no influence of the concentration of surimi on the technological characteristics of the sausages, except the luminosity, which showed significant difference between the sausage with 70% surimi compared with the 75 and 80%. Then the sausage with 75% Argentine anchovy surimi was chosen to characterization and verification of the antioxidant activity. It was obtained similar results to the proximal composition between the surimi sausage and the commercial sausage, being within the specifications of the Sausage Identity and Quality Standard. The surimi product also showed the lowest results of total energy value (193.7 kcal/100g) and sodium (520 mg/100 g) compared with the commercial sausage, and was considered a healthier product for consumption. It wasn't verified antioxidant activity of the hydrolysate in the sausage, but it was verified antioxidant activity on the anchovy mechanically separated meat (MSM).

**Keywords:** Argentin anchovy, surimi, sausage, oxidation.

## 1. INTRODUÇÃO

A anchoíta (*Engraulis anchoita*) é uma espécie pouco explorada pela pesca comercial ou artesanal. Além disso, não existem impedimentos legais ou ecológicos que inviabilizem o início de uma atividade de pesca sobre este recurso (MADUREIRA et al., 2007).

O surimi é um termo japonês para um concentrado de proteínas miofibrilares da carne de pescado que é preparado pela lavagem da polpa de pescado, estabilizado por uma mistura de crioprotetores (DEY e DORA, 2010). Este pode ser utilizado para a produção de kamaboko (JAFARPOUR e GORCZYCA, 2008), imitações de camarões e caranguejo (GUENNEUGUES e MORRISSEY, 2005), além de embutidos emulsionados como a salsicha (JIN et al., 2007; LEMPECK et al., 2007). Hoje o surimi é considerado uma matéria prima conveniente para a obtenção de vários produtos de pescado cominutado, além de outros produtos (PARVATHY e GEORGE, 2011). Produtos a base de surimi, por influência da cultura japonesa, podem ser preparados de diversas maneiras, apresentando diferentes texturas e sabores, atraindo atenção cada vez maior na América do Norte, Europa e em outros lugares no mundo (PEPE, 2007).

A salsicha de pescado é um produto feito com surimi ou a polpa de pescado, podendo ser produzido a partir de diferentes espécies com a adição de saborizantes e conservantes (ISMAIL et al., 2011). Murphy et al. (2004) estudaram a substituição parcial da carne suína pelo surimi (0 a 40%), em salsichas. Gonçalves et al. (2009) obtiveram surimi utilizando descartes do processamento de piratuba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e utilizaram para a produção de salsichas. Paravathy e George (2011) adicionaram surimi com diferentes concentrações de crioprotetores em diferentes concentrações no surimi e adicionaram em produtos como salsicha, hambúrgueres e bolos, verificando a influência das concentrações de sacarose-sorbitol contidos nos surimis. Lempeck et al. (2007) aplicaram surimi de castanha em salsichas, verificando a influência da proteína de soja, fécula de batata e a temperatura de cozimento na textura das salsichas.

A oxidação lipídica é a maior causa da deterioração de carnes e produtos cárneos e leva a formação do malonaldeído, que é carcinogênico (LADIKOS e LOUGOVOIS, 1990). A adição de antioxidantes sintéticos em produtos cárneos é muito comum. Embora os compostos sintéticos sejam eficientes e relativamente de

baixo custo, se tem dado atenção aos antioxidantes naturais, devido à tendência de evitar e minimizar o uso desses aditivos sintéticos (QIAN *et al.*, 2008).

Neste trabalho o objetivo foi produzir salsichas, com diferentes concentrações de surimi de CMS de anchoita, verificando as características físicas comparadas a uma salsicha comercial, estudando no fim a influência de hidrolisados com atividade antioxidante na oxidação lipídica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Matéria prima

Foi utilizada a carne mecanicamente separada (CMS) de anchoita (*Engraulis anchoita*) para a obtenção do surimi.

As anchoitas foram obtidas congeladas da indústria Leal Santos, de Rio Grande, a -20°C, previamente lavadas, sem cabeça, sem cauda e evisceradas. Foram levadas diretamente ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos, mantidas na mesma temperatura até o seu uso.

Para a obtenção da CMS as anchoitas foram descongeladas em temperatura de 4°C, sendo lavadas com solução de cloreto de sódio 0,3% (p/v) e submetidas ao despulpamento em uma separadora mecânica (HIGH TECH HT/2500 – Brasil).

O surimi de anchoita foi a matéria prima utilizada para a produção das salsichas. O surimi foi preparado através de lavagens da CMS de anchoita. As lavagens foram feitas em três etapas, utilizando a proporção 1:3 (p/v) de CMS: solução, em temperatura de  $6\pm 1^\circ\text{C}$  durante três minutos. Na primeira lavagem utilizou-se água destilada; na segunda foi aplicada solução de ácido fosfórico 0,05% (p/v); e na terceira lavagem foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,3% (p/v). Após cada etapa de lavagem foram feitas a retirada da solução através do hidroextrator e a pesagem da massa úmida restante. Após a última lavagem, para a estabilização do surimi durante o congelamento, foram adicionados como crioprotetores o sorbitol 3% e o tripolofosfato 0,25%, sendo embalados e congelados imediatamente, a -20°C até o seu uso.

Na Figura 1 está ilustrado o processo de produção do surimi de CMS de anchoita nas condições citadas.

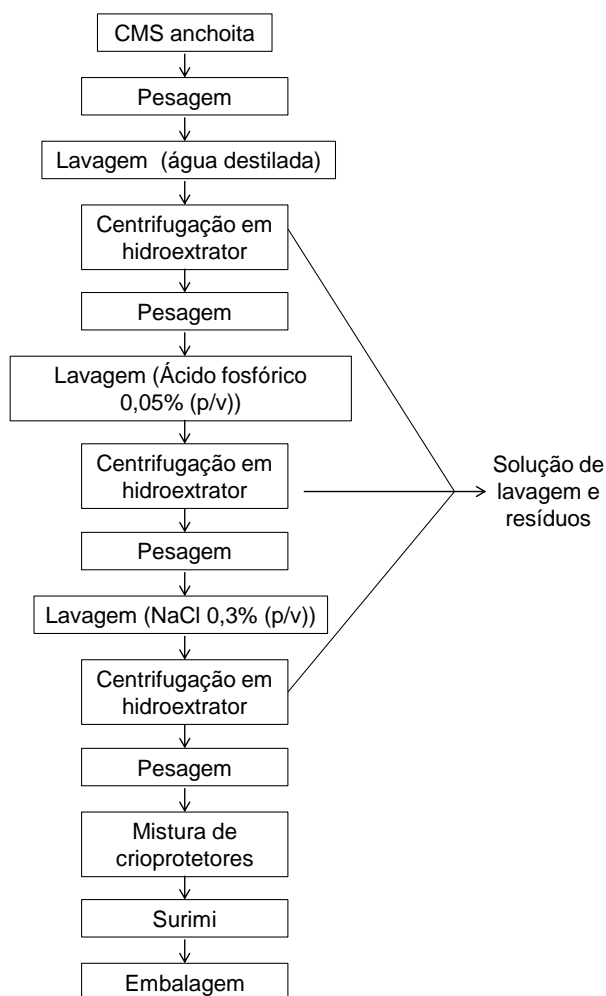


Figura 1: Produção de surimi de CMS de anchoita.

## 2.2. Reagentes e ingredientes

Foi utilizada a enzima Flavourzyme<sup>®</sup> 1000L doada pela representante da Novozymes Latin America Ltda (Tovani Benzaquen Rep. Ltda).

O ácido fosfórico, cloreto de sódio e tripolifosfato foram da marca Synth e o sorbitol foi da marca Vetec.

A maior parte dos ingredientes utilizados nas salsichas foi doada pela empresa Duas Rodas Industrial Ltda, como mix para salsicha, estabilizante, realçador de sabor, corante carmim, sal de cura, aroma de fumaça e antioxidante. Os demais ingredientes como sal, e alho em pó foram adquiridos do comércio local.

O mix para salsicha possuía sal, especiarias (pimenta preta e branca), estabilizantes (tripolifosfato de sódio e pirofosfato de sódio), realçador de sabor

(glutamato monossódico), antioxidante (isoascorbato de sódio), aromatizante sintético idêntico ao natural.

O sal de cura apresentou sal e os conservantes nitrito e nitrato de sódio. O estabilizante a base de polifosfato estava constituído de tripolifosfato de sódio e pirofosfato ácido de sódio. O preparado a base de realçador de sabor continha sal, realçadores de sabor (glutamato monossódico e inosinato dissódico) e aromatizante sintético idêntico ao natural. Havia também derivados de soja e de aipo. O antioxidante apresentava óleo de soja e os antioxidantes hidroxitolueno butirato (BHT) e hidroxianisol butirato (BHA). Nenhum destes componentes citados apresentava glúten.

### 2.3. Preparo das salsichas de surimi de CMS de anchoita

Na Figura 2 está ilustrado o processo de produção de salsicha utilizando o surimi de CMS de anchoita.

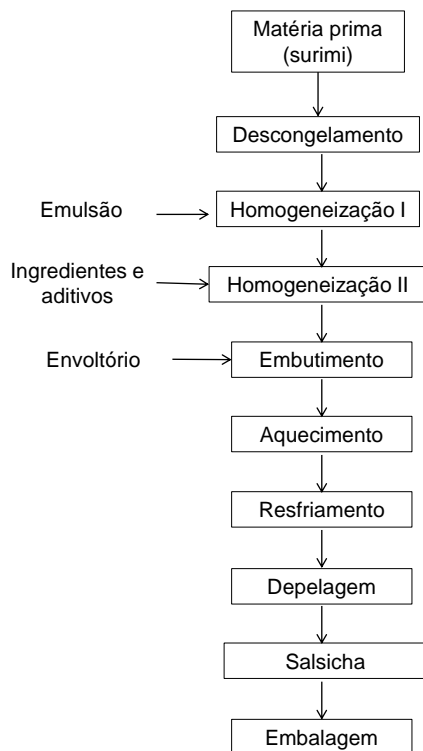


Figura 2: Processo de produção de salsicha de surimi de anchoita.

Para a produção das salsichas, o surimi de CMS de anchoita foi descongelado até atingir a temperatura de 4°C. Foram testadas três formulações diferentes com a adição de 70, 75 e 80 % de surimi, cuja composição de ingredientes e aditivos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Componentes da salsicha de surimi de CMS de anchoita.

Ingredientes	Formulação A (%)	Formulação B (%)	Formulação C (%)
Surimi de CMS de anchoita	70	75	80
Emulsão*	25	20	15
Fécula de mandioca	2	2	2
Sal	1	1	1
Mix para salsicha	0,7	0,7	0,7
Estabilizante	0,5	0,5	0,5
Realçador de sabor	0,3	0,3	0,3
Alho desidratado em pó	0,3	0,3	0,3
Corante carmim	0,1	0,1	0,1
Sal de cura	0,045	0,045	0,045
Aroma de fumaça	0,007	0,007	0,007
Antioxidante	0,0005	0,0005	0,0005

\*Emulsão: Proteína de soja, água e óleo vegetal.

A emulsão foi formada pela mistura de proteína de soja, água gelada e óleo vegetal (FURTADO *et al.*, 2005). O máximo de proteína de soja que pode ser adicionada em salsichas, segundo OLIVEIRA (2000), é de 4,0%. Foram utilizados 9,0% de água e 12,0% de óleo de girassol. Os demais ingredientes adicionados na salsicha foram: fécula de mandioca, sal, mix para salsicha, estabilizante, realçador de sabor, alho em pó, corante carmim, sal de cura, aroma de fumaça e antioxidante. A fécula que foi adicionada considerou-se o máximo permitido pela legislação (OLIVEIRA, 2000) que é de 2,0%. Os demais ingredientes foram relacionados com as especificações da fabricante Duas Rodas Industrial Ltda.

Para o preparo da emulsão foi manualmente misturando primeiro a proteína de soja com a água e, em seguida, adicionado o óleo, vagarosamente, formando a emulsão, que foi misturada ao surimi por 1 minuto em cutter. Os outros ingredientes

secos, foram pesados e adicionados na massa juntamente com o antioxidante e o aroma de fumaça, sendo misturados por mais 2 minutos. Com a massa pronta, foi feito o embutimento em tripas de celulose previamente hidratadas em água destilada fria ( $<10^{\circ}\text{C}$ ). O tamanho das salsichas foi padronizado em um comprimento entre 9 a 12 cm, sendo amarradas com barbante.

As temperaturas de cozimento basearam-se nas condições descritas por GUERREIRO (2006). Assim, foi aplicado calor seco em estufa com circulação de ar, (QUIMIS 314-D, Brasil), por 20 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ . Em seguida submeteu-se ao cozimento, em banho termostatzado (QUIMIS Q-215-1/2 – Brasil), a  $70^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e, por fim, cozimento a  $80^{\circ}\text{C}$  por mais 30 minutos. Após as etapas de cozimento as salsichas foram submetidas a um choque térmico em água gelada ( $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 20 minutos. Então as salsichas foram armazenadas em refrigerador CONSUL, Pratices 340 – Brasil, por 18 horas para serem analisadas juntamente com uma salsicha comercial, que foi adquirida no comércio local.

Para a comparação utilizou-se uma salsicha comercial de frango.

#### **2.4. Cor e textura das salsichas de surimi de CMS de anchoita**

Foi verificada a cor das salsichas utilizando o colorímetro (CHROMA METER KONICA MINOLTA CR-400/410 – Japão), avaliando parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ) e cromaticidade ( $a^*$  e  $b^*$ ).

A textura foi verificada pela força de corte, expressa como firmeza (Kg) e resistência (kg.s) das salsichas utilizando o analisador de textura TA.XT. plus – Reino Unido, equipado com o probe HDP/BS Warner-Bratzler (velocidade no pré-teste de 2 mm/s e pós-teste de 10 mm/s).

#### **2.5. Composição química das salsichas**

As salsichas foram analisadas quanto ao teor de umidade, proteína, lipídeos e cinzas segundo a AOAC (2000) e os carboidratos foram calculados por diferença.

## 2.6. Características nutricionais da salsicha

Foi feita a análise de cloretos segundo o ZENEBON (2005), sendo expressado em mg de sódio/100g de salsicha. O valor energético total (VET) do produto foi obtido conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), levando em consideração os valores de lipídeos, proteínas e carboidratos obtidos pela composição proximal, seguindo a Equação 1.

$$VET = (\%L \times 9) + (\%P \times 4) + (\%C \times 4) \quad \text{Eq. 1}$$

Sendo que %L, %P, %C foram considerados as porcentagens de lipídeos, proteínas e carboidratos, respectivamente.

## 2.7. Aplicação do hidrolisado antioxidante na salsicha e na CMS de anchoita

Foi testada a atividade antioxidante de dois hidrolisados diferentes na salsicha, seguindo o método descrito por Sakanaka *et al.* (2005) com algumas modificações das quantidades de amostra e volumes de soluções, que foram maiores para facilitar a determinação. Os hidrolisados utilizados no teste foram obtidos pela hidrólise da CMS de anchoita com a enzima Flavourzyme, por um período de 1 hora (F1) e 5 horas (F5).

Foram pesados 10 g de amostra e homogeneizados em 50 mL de tampão HEPES 50 mM a pH 7,0 durante 5 minutos com homogeneizador DURABRAND HL-3022-China. Foram retiradas 1,6 mL da suspensão e colocada em tubos, onde se adicionou 0,4 mL de solução de hidrolisado preparados em tampão HEPES (10 mg hidrolisado/mL tampão). Os tubos foram incubados em estufa, BIOPAR 5150/BA, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Após o término da incubação foram adicionados 4 mL de solução de TBA/TCA, consistindo em TCA 0,9 M e TBA 0,03 M em HCl 0,25 M. Os tubos foram aquecidos em banho, QUIMIS Q-215-1/2 – Brasil, a  $90^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Após este tempo os tubos foram resfriados em água corrente, sendo filtrados para posterior análise em espectrofotômetro, BIOSPECTRO SP/22 - Brasil. As substâncias reagentes com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas através de leituras de absorbância a 532 nm, utilizando a curva padrão de 1,1,3,3-Tetraetóxiopropano (TEP) Sigma-Aldrich, sendo quantificada em mg de malonaldeído/Kg de produto.



Como controle aplicou-se o mesmo método nas amostras de salsicha e CMS sem adição de hidrolisado.

## 2.8. Análise estatística

Para a avaliação dos resultados foram realizadas a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com um nível de confiança de 95%, utilizando o programa Statistic 7.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Características físicas da salsicha de surimi de anchoita

As características físicas das salsichas produzidas com diferentes concentrações de surimi de CMS anchoita foram cor e textura. Na Tabela 2 estão apresentados os valores de luminosidade  $L^*$ , que varia de 0 (preto) a 100 (branco), além da cromaticidade  $a^*$ , de -60 (verde) a +60 (vermelho),  $b^*$ , de -60 (azul) a +60 (amarelo).

Tabela 2: Parâmetros de cor das salsichas produzidas com diferentes concentrações de surimi de anchoita CMS e salsicha comercial de frango comercial.

Salsicha	$L^*$	$a^*$	$b^*$
70% Surimi	68,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,36 ± 0,02 <sup>b</sup>	11,50 ± 0,07 <sup>b</sup>
75% Surimi	65,64 ± 0,10 <sup>b</sup>	4,63 ± 0,10 <sup>b</sup>	11,46 ± 0,37 <sup>b</sup>
80% Surimi	65,33 ± 0,34 <sup>b</sup>	4,44 ± 0,06 <sup>b</sup>	11,49 ± 0,03 <sup>b</sup>
Comercial	61,03 ± 0,97 <sup>c</sup>	21,75 ± 0,32 <sup>a</sup>	12,91 ± 0,15 <sup>a</sup>

Valores referentes à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Verificou-se que em todos os parâmetros a salsicha comercial de frango diferiu das salsichas com surimi de CMS de anchoita ( $p < 0,05$ ). Foi possível observar que as salsichas com surimi de anchoita apresentaram maior luminosidade, comparada com a comercial. A presença da emulsão foi o que conferiu a coloração mais clara na massa da salsicha após a mistura com o surimi. Além disso, a ausência de pigmentos heme na matéria prima, devido a sua extração nos processos de lavagem, impediu a

formação da cor avermelhada como ocorre na salsicha comercial. Isto pode ser verificada pelo croma  $a^*$  da salsicha comercial, que foi de  $21,75 \pm 0,32$ , bem superior às salsichas com surimi, que ficaram na faixa de  $4,36 \pm 0,10$  e  $4,63 \pm 0,02$ . As salsichas produzidas com surimi de anchoita não apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) nos valores de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$ .

Nas salsichas estudadas por Jin *et al.* (2007), com surimi de peito de frango, a luminosidade foi maior quanto maior a concentração de surimi, tendo valores em torno de 75 a 95. A cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  ficou na faixa de 10,5 a 11,5 e de 3 a 7, respectivamente. Juntamente com o surimi de frango foi adicionado carne de porco, o que explicaria um maior valor de croma  $a^*$ . Oliveira-Filho *et al.* (2010) produziram salsichas de Tilápia do Nilo com os parâmetros de cor semelhantes aos deste estudo. Assim, pode ser considerado que a produção deste tipo de produto emulsionado, utilizando carne de pescado, apresenta-se com uma coloração mais clara comparada com o mesmo produto elaborado com outros tipos de carnes vermelhas.

A textura também foi outro parâmetro estudado nas salsichas de surimi de anchoita. Na Tabela 3 estão apresentados os valores de textura das salsichas obtidas com diferentes concentrações de surimi de CMS de anchoita e da salsicha comercial.

Tabela 3: Firmeza e resistência das salsichas de surimi de anchoita e comercial.

Salsicha	Firmeza (Kg)	Resistência (Kg.s)
70% Surimi	$0,27 \pm 0,01^b$	$2,27 \pm 0,17^b$
75% Surimi	$0,27 \pm 0,01^b$	$2,45 \pm 0,16^b$
80% Surimi	$0,29 \pm 0,01^b$	$2,34 \pm 0,21^b$
Comercial	$0,72 \pm 0,05^a$	$5,94 \pm 0,36^a$

Valores referentes à média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Pode-se observar que a salsicha comercial apresentou maior firmeza e resistência comparada com as salsichas de surimi de anchoita. Das salsichas de surimi a que apresentou maior firmeza foi a com 80% de surimi ( $0,29 \pm 0,01$  Kg), porém não se diferenciou significativamente entre as salsichas com 70 e 75% surimi ( $p < 0,05$ ). A resistência das salsichas de surimi também não diferiu significativamente entre si.

Jin *et al.* (2007), trabalhando com salsichas de surimi de frango, apresentaram os mesmos valores de firmeza deste trabalho. Neste estudo a concentração de surimi de CMS de anchoita não influenciou nos parâmetros de textura analisados.

Em vista dos resultados de cor e textura das salsichas de surimi de CMS de anchoita foi possível verificar que a comparação com a salsicha comercial tornou-se difícil, pois os produtos são muito diferentes em aspecto geral de cor e textura. Entre as salsichas com surimi não houve diferença nesta caracterização, porém, levando em conta que a luminosidade mostrou diferença significativa entre a salsicha com 70% de surimi e as com 75 e 80%, além de obter um produto com um conteúdo médio de proteínas e um rendimento maior em salsicha, optou-se pela formulação intermediária, com 75% de surimi de CMS de anchoita, para seguir com as análises de caracterização química e nutricional.

### 3.2. Características química das salsichas

Na Tabela 4 está apresentada a composição proximal da salsicha produzida com 75% de surimi de anchoita e da salsicha comercial.

Tabela 4: Composição proximal (b.u) de salsichas produzidas com surimi de anchoita e comercial.

Componentes (%)	Salsicha com Surimi	Salsicha Comercial	PIQ
Umidade	63,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	64,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	Máx 65%
Proteína	15,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	13,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	Mín. 12%
Cinzas	3,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	-
Lipídeos	12,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	15,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	Máx 30%
Carboidratos	4,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,0-7,0%

PIQ: Padrão de Identidade e Qualidade da salsicha (OLIVEIRA, 2000). Valores referentes à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Foi possível observar que as salsichas apresentaram composição semelhante. A salsicha produzida com surimi de anchoita apresentou significativamente menor umidade ( $63,6 \pm 0,1$ ) e lipídeos ( $12,5 \pm 0,6$ ), porém o teor de proteína ( $15,5 \pm 0,4$ ) e carboidratos ( $4,8 \pm 0,2$ ) foi maior, comparada com a salsicha comercial. O teor de cinzas não diferiu significativamente. Segundo o regulamento técnico de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da salsicha (OLIVEIRA, 2000) a umidade máxima da salsicha deve ser de 65,0%, proteína no mínimo 12,0%, gordura máximo de 30,0% e

carboidratos totais de 1,0-7,0%. Assim, o produto feito com surimi de CMS de anchoita está dentro do PIQ da salsicha.

Jin *et al.* (2007) obtiveram um teor de umidade na faixa de 60,2 a 63,5% na salsicha de surimi de peito de frango, concordando com os resultados obtidos neste estudo. Gonçalves *et al.* (2009) obtiveram salsichas de piramutaba que possuíam saborizantes de camarão e carne de camarão com valores de composição semelhantes aos obtidos neste estudo.

FURTADO *et al.* (2005) produziu salsichas processadas com carne de rã, onde também utilizaram uma emulsão com proteína isolada de soja, água e óleo vegetal de soja apresentaram um valor superior de lipídeos comparado com o deste estudo. Isto pode ser devido à quantidade reduzida de lipídeos no surimi, que foram retirados nos processos de lavagens. Ferreira *et al.* (2003) substituíram o toucinho por óleo de girassol na produção de salsichas do tipo Viena e obtiveram um produto com um teor de umidade menor que as deste estudo e, em contrapartida, um maior teor de lipídeos.

Em geral, nas pesquisas feitas com salsicha de diferentes tipos de matérias primas e formulações, pode-se observar que o que apresentou maior variação dentre os valores de composição química foi a umidade e os lipídeos. A quantidade de proteína manteve-se semelhante nos produtos.

### **3.3. Características nutricionais das salsichas**

Através dos valores obtidos com a composição proximal da salsicha de surimi de anchoita foi possível calcular o valor energético total (VET), obtendo um valor de 193,7Kcal a cada 100 gramas de produto. Comparando com a salsicha comercial (208,4 Kcal/100g) este valor foi mais baixo. Furtado *et al.* (2005) obtiveram salsichas com carne de rã com VET de 180 Kcal/100g. O conteúdo lipídico das salsichas pode ter sido um fator importante para o resultado reduzido no VET.

O teor de sódio presente na salsicha de surimi que foi de 520 mg em 100 gramas de produto. Seguindo o rótulo do produto, o teor de sódio presente na salsicha comercial foi de 604 mg para cada 100 gramas de produto, sendo assim maior que a salsicha com surimi. O excesso de sal pode causar problemas futuros de hipertensão arterial, juntamente com outros fatores como sedentarismo, estresse, tabagismo e bebidas alcoólicas (MOLINA *et al.*, 2003). Assim, pode-se considerar o consumo de

salsicha de surimi mais adequado por apresentar menor conteúdo de sódio, além de apresentar menor valor energético comparado com a salsicha comercial.

### 3.4. Aplicação do hidrolisado antioxidante na salsicha

Para verificar a influência de hidrolisados na inibição da oxidação dos lipídeos nas salsichas foi realizado o teste de TBARS, estando ilustrado na Figura 3. Segundo Araújo (1995) a análise fundamenta-se na formação de um complexo de coloração vermelha, resultante da condensação de dois moles de TBA com um mol de malonaldeído (MDA).

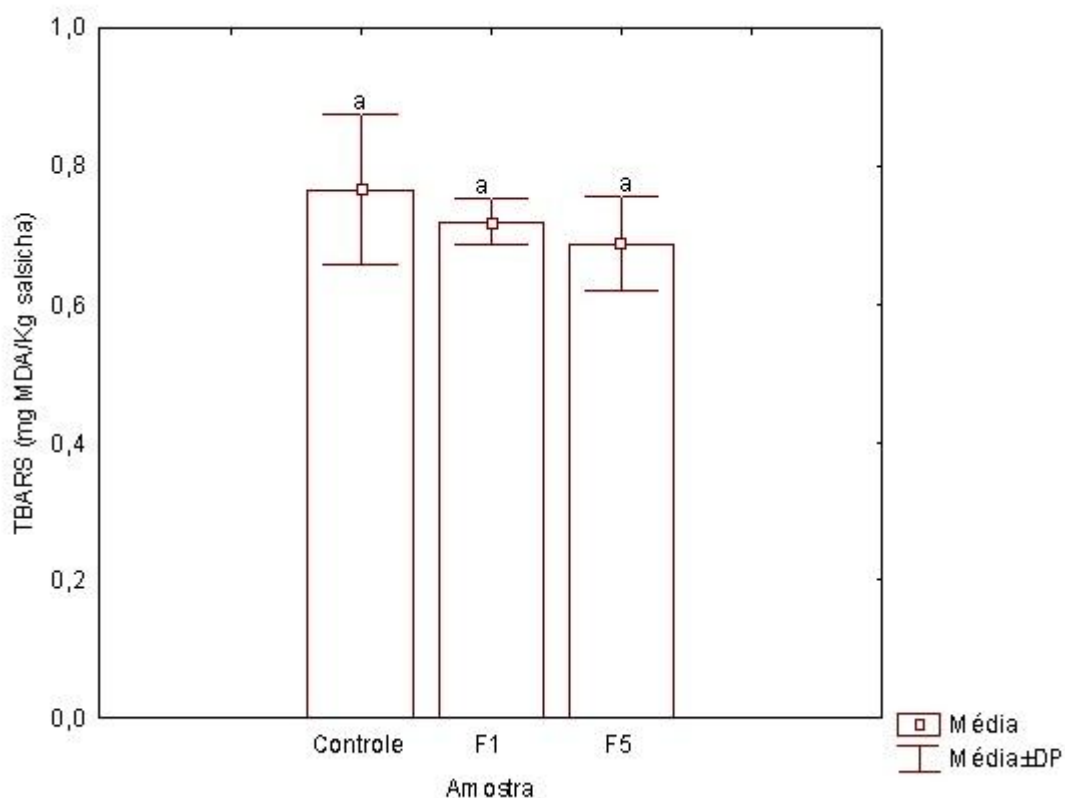


Figura 3: Efeito dos hidrolisados F1 e F5 na formação de TBARS na salsicha de surimi de CMS de anchoita.

Hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme (F1: 1 hora; F5: 5 horas). Valores referentes à média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 3 é possível verificar que houve uma diminuição no nível de formação de TBARS, comparando a amostra controle, que não continha hidrolisado,

com as que foram adicionadas dos hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme durante 1 hora (F1) e 5 horas (F5) de hidrólise. Porém, não houve diferença significativa entre as amostras, com hidrolisado e o controle, e também na atuação entre os hidrolisados F1 e F5, não sendo constatada atividade antioxidante nestas condições. Alguns estudos foram reportados que peptídeos com atividade antioxidante podem atuar como inibidores da oxidação lipídica em carne moída (CENTENARO, 2011; ROSSINI *et al.*, 2009; SAKANAKA *et al.*, 2005). Para uma melhor ação antioxidante dos hidrolisados de anchoita em produtos alimentícios poderia ser feito o fracionamento dos peptídeos através da ultrafiltração, utilizando as frações que apresentariam melhor atividade, como foi feito por Centenaro (2011). Outra opção seria hidrolisar a matéria prima por um tempo maior, como foi feito por Sakanaka *et al.* (2005), produzindo assim peptídeos de tamanhos menores e que possam apresentar maior efeito antioxidante nos alimentos.

Não somente os hidrolisados podem não ter agido como antioxidantes, mas também a amostra utilizada continha diversos interferentes, além de já possuir antioxidantes na sua formulação, que pode ter influenciado na análise de TBARS. Para uma melhor avaliação desses hidrolisados na salsicha deveria ser utilizado um maior tempo de incubação para que os compostos presentes no produto pudessem sofrer oxidação e formar substâncias que reagiriam com TBA.

Os valores de TBARS encontrados na salsicha de surimi podem ser confirmados pelos resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2002) com salsichas do tipo Viena e Oliveira-Filho *et al.* (2010) com salsichas produzidas com polpa de Tilápia do Nilo, que apresentaram-se entre 0,30-0,35 mg MDA/Kg e 0,7-1,5 mg MDA/Kg, respectivamente.

Na legislação brasileira não há indicativo do valor máximo de TBARS permitido para produtos de pescado (OSAWA *et al.*, 2005), no entanto, altos valores de TBARS comprometem a comercialização e aceitação do produto final (OLIVEIRA -FILHO, 2010).

### **3.5. Aplicação do hidrolisado antioxidante na CMS de anchoita**

Em vista dos resultados obtidos com a salsicha não terem sido satisfatórios para a verificação da ação antioxidante dos hidrolisados, fez-se um teste com a CMS

de anchoita, que não apresentava nenhum composto ou aditivo que pudesse interferir na análise.

Na Figura 4 está ilustrado o efeito dos hidrolisados F1 e F5 no impedimento da formação de TBARS na CMS de anchoita.

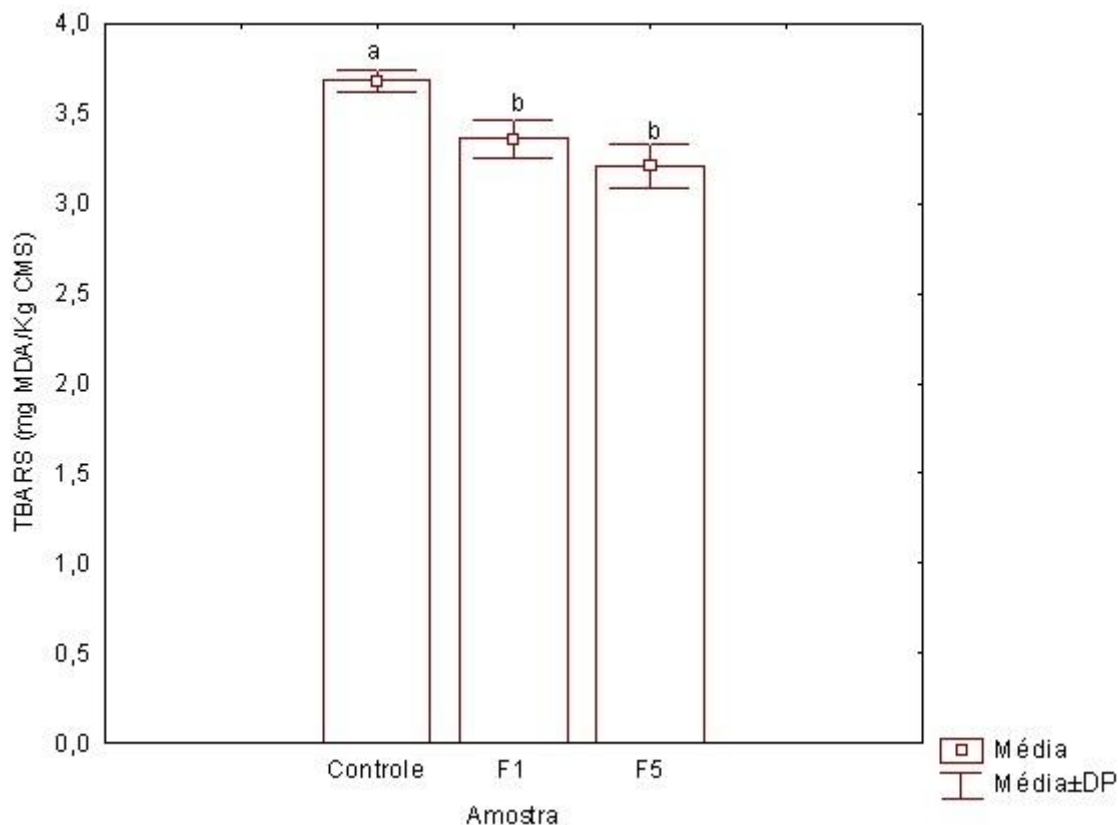


Figura 4: Efeito dos hidrolisados F1 e F5 na formação de TBARS na CMS de anchoita. Hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme (F1: 1 hora; F5: 5 horas). Valores referentes à média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Neste teste do efeito dos hidrolisados na CMS de anchoita foi possível observar que houve efeito antioxidante, verificado pela diferença significativa entre a CMS adicionado de hidrolisados antioxidantes comparada com o controle. Os valores de TBARS variaram de  $3,22 \pm 0,12$  mg MDA/Kg de produto, com a amostra que continha o hidrolisado F5, até  $3,68 \pm 0,06$  mg MDA/Kg de produto, como controle. Não se observou diferença de resposta entre os hidrolisados. No estudo de Rossini *et al.* (2009) com peptídeos antioxidantes de caseína aplicados em carne moída, na concentração de 10 mg/mL de hidrolisado obtiveram o valor próximo de 0,5 mg MDA/Kg de homogeinato. Centenaro (2011) que também estudou diferentes concentrações de hidrolisados de pescado com a enzima Flavourzyme, obteve

resultados na faixa de 0,5 a 6 mg MDA/Kg de homogênio, e com a concentração de 10 mg/mL foi de aproximadamente de 2,4 mg MDA/ Kg, estando próximo aos obtidos neste trabalho.

Neste estudo foi constatado que a presença de aditivos e conservantes em produtos alimentícios pode interferir na atuação de hidrolisados antioxidantes na inibição da oxidação lipídica.

#### **4. CONCLUSÃO**

O surimi de anchoita nas concentrações estudadas não influenciou as características de cor e textura, exceto o parâmetro de luminosidade, da salsicha. A salsicha com 75% de surimi apresentou composição química semelhante à salsicha comercial, porém mais saudável pelo menor conteúdo de sódio e de valor energético. No teste de oxidação, os hidrolisados não apresentaram influência na formação das substâncias reagentes com o ácido tiobarbitúrico na salsicha, mas sim na CMS de anchoita.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 17° ed., v. 2. Gaithersburg, 2000.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Ed. Universitária, 335 p., 1995.

BRASIL. **Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm). Acessado em: 13/01/2012.

CENTENARO, G. S. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

DEY, S. S.; DORA, K. C. Effect of sodium lactate as cryostabilizer on physic-chemical attributes of croaker (*Johnius gangeticus*) muscle protein. **Journal of Food Science Technology**, v. 47, n. 4, p. 432–436, 2010.

FERREIRA, M. F.; SILVA, A. T.; ROBBS, P. G.; GASPAR, A.; SCHMELZER-NAGEL, W. Avaliação físico-química de salsichas tipo viena com substituição de gordura animal por óleo de girassol. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.1-7, 2003.

FURTADO, A. A. L.; MODESTA, R. C. D.; SIQUEIRA, R. S.; FREITAS, S. C. Processamento de salsicha de carne de rã. **Comunicado Técnico – Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento**. ISSN 0103-5231, Rio de Janeiro, Dez. 2005.

GONÇALVES, A. A.; NOGUEIRA, W. M.; LOURENÇO, L. F. H. Aproveitamento do descarte do processamento da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e do camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*) na produção de salsicha sabor camarão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 4, p. 623 - 635, 2009.

GUENNEUGUES, P.; MORRISSEY, M. T. Surimi resource. In: PARK, J. W. **Surimi and surimi seafood**, Florida, CRC Press Taylor & Francis Group, p. (1-32), 2005.

GUERREIRO, L. **Dossiê técnico produção de salsicha**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2006.

ISMAIL, M. A. B.; KASAPIS, S.; DYKES, G. A.; AL-WAILI, H.; GUIZANI, N.; AL-OUFI, H. Effect of frozen storage on the characteristics of a developed and commercial fish sausages. **Journal of Food Science**, junho 2011. DOI: 10.1007/s13197-011-0441-x

JAFARPOUR, A.; GORCZYCA, E. M. Alternative techniques for producing a quality surimi and Kamaboko from common carp (*Cyprinus carpio*). **Food Engineering and Physical Properties**, v. 73, n. 9, p. 415-424, 2008.

JIN, S. K.; KIM, I. S.; JUNG, H. J.; KIM, D. H.; CHOI, Y. J.; HUR, S. J. The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. **Poultry Science**, v. 86, p. 2676–2684, 2007.

LEMPECK, T. S.; MARTINS, V. G.; PRENTICE, C. Rheology of surimi-based products from fatty fish underutilized by the industry. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.16, n. 4, p. 27-44, 2007.

LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food Chemistry**, v. 35, p. 295-314, 1990.

MADUREIRA, L. S. P. Use of wild fish and/or other aquatic species to feed. Case study: South American anchovy, (*Engraulis anchoita*). In: Food and Agricultural Organization of the United Nations. (Org.). FAO Fisheries Technical Paper: Towards Sustainable Aquaculture: Selected Issues and Guidelines. 1 ed. Rome: FAO Fish Utilization and Marketing Service, v. 466, p. 1-29, 2007.

MOLINA, M. C. B.; CUNHA, R. S.; HERKENHOFF, L. F.; MILL, J. G. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 743-750, 2003.

MURPHY, S. C.; GILROY, D.; KERRY, J. F.; BUCKLEY, D. J.; KERRY, J. P. Evaluation of surimi, fat and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface methodology. **Meat Science**, v. 66, p. 689–701, 2004.

OLIVEIRA, L. C. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha.** (Anexo IV). Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; TRINDADE, M. A.; CARVALHO BALIEIRO, J. C. C.; VIEGAS, E. M. M. Quality of sausage elaborated using minced Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, v.67, n.2, p.183-190, 2010

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PARVATHY, U.; GEORGE, S. Influence of cryoprotectant levels on storage stability of surimi from *Nemipterus japonicus* and quality of surimi-based products. **Journal of Food Science and Technology**, 2011. [DOI 10.1007/s13197-011-0590-y](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0590-y)

PEPE, T.; TROTTA, M.; DI MARCO, I.; ANASTASIO, A.; BAUTISTA, J. M.; CORTESI, A. L. Fish Species Identification in Surimi-Based Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3681–3685, 2007.

QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catebeiana shaw*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1690-1698, 2008.

ROSSINI, K.; NOREÑA, C. P. Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 862–867, 2009.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. R. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 464-468, 2005.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Instituto Adolfo Lutz, 4ª edição, São Paulo, 2005.

## **CAPÍTULO 4**

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

A partir da CMS de anchoita foi possível obter hidrolisados com diferentes graus de hidrólise e características antioxidantes.

Os hidrolisados com a enzima Flavourzyme apresentaram melhores resultados na inibição da peroxidação lipídica, no efeito sequestrante do radical livre DPPH e também no teste de poder redutor.

No surimi obtido pela lavagem da CMS com solução de bicarbonato de sódio e cloreto de sódio obteve um produto com maior luminosidade e brancura.

A força de gel foi maior no surimi obtido por lavagens com água e soluções de ácido fosfórico e cloreto de sódio, sendo uma característica importante para a escolha do surimi AF para a formulação de embutido emulsionado.

Não houve influência significativa da quantidade de surimi de anchoita na maioria dos parâmetros de cor e textura estudados, exceto na luminosidade do produto.

A salsicha com surimi apresentou uma composição semelhante à comercial, sendo considerado um produto nutricionalmente menos calórico e com um teor de sódio reduzido.

No teste de oxidação nas salsichas não houve influência dos hidrolisados na formação das substâncias reagentes com o ácido tiobarbitúrico. Porém no mesmo teste com a CMS foi verificada a ação antioxidante dos hidrolisados.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar os hidrolisados de anchoita (*Engraulis anchoita*) quanto ao peso molecular e composição de aminoácidos dos peptídeos;
- Separação dos peptídeos por ultrafiltração com o intuito de verificar a atividade antioxidante dos peptídeos purificados;
- Avaliar sensorialmente as salsichas produzidas a partir de surimi de anchoita (*Engraulis anchoita*);
- Adicionar hidrolisados antioxidantes na formulação de salsichas de surimi de anchoita (*Engraulis anchoita*) e verificar a estabilidade do produto com relação à oxidação lipídica durante o armazenamento;
- Estudar a elaboração de outros produtos alimentícios com a inclusão de surimi de anchoita (*Engraulis anchoita*) na formulação.

## **CAPÍTULO 5**

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food feed protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, 1256-1262, 1979.

ADLER-NISSEN, J. Enzimic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science**, p. 427, 1986.

ADMINISTRADOR EAE, 12/12/2009. Disponível em: <http://bloggeae.blogspot.com/2009/12/substancias-quimicas-que-compoem-os.html>. Acessado em 13/3/2011.

AFDF. **Surimi it's American now**. Alaska Fisheries Development Foundation, p. 01-19, 1987.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 58, p. 355–359, 1997.

ANGELO, A. J. S.; Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, p. 175, 1996.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 17° ed., v. 2. Gaithersburg, 2000.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15° ed., Washington, 1990.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Ed. Universitária, 335 p., 1995.



BABIZHAYEV, M. A. Biological activities of the natural imidazole-containing peptidomimetics *n*-acetylcarnosine, carbinine and L-carnosine in ophthalmic and skin care products. **Life Sciences**, v. 78, p. 2343 – 2357, 2006.

BARRETO, P. L. M.; BEIRÃO, L. H. Influência do amido e carragena nas propriedades texturiais de surimi de tilápia (*Oreochromis sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.183-188, 1999.

BATTISTELLA, M. D. Análise de sobrevivência aplicada à estimativa da vida de prateleira de salsicha. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. 2º ed., Editora Acribia, S.A., Zaragoza, Espanha, 1997.

BERTOLOTTI, M. I.; MANCA, E. Processamiento y comercialización de la anchoita (*Engraulis anchoita*) del Mar Argentino. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, n. 5, p. 224-246, 1986.

BHASKAR, N.; BENIA, T.; RADHA, C.; LATITHA, R. G. Optimisation of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 335-343, 2008.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 80p, 1992.

BOTTERWECK, A. A.; VERHAGEM, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DER BRAND, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559–565, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Carneos**. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm)>. Acesso em: 13/12/2011.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira**. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. 1º ed, Brasília, 210 p, 2006.

BRASIL. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Métodos físicos e químicos, Ministério da Agricultura, v. II, Brasília, 1981.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 165p, Brasília, 1980.

BRASIL. **Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm). Acessado em: 13/01/2012.

BRASIL. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha**. Diário Oficial, Instrução Normativa nº 4 de 31 de mar. 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Seção 1, p.6-10, 05 abr. 2000.

CASTELLO, J. P. A. **Anchoita *Engraulis anchoita* (Engraulidae, Teleostei) no sul do Brasil. Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva MMA - REVIZEE**. Anexo 2, v. 31, n. 3, 61 p, 1998.

CASTELLO, L.; CASTELLO, J. P. Anchovy stocks (*Engraulis anchoita*) and larval growth in the SW Atlantic. **Fisheries Research**, v. 59, n. 3, p. 409-421, 2003.

CENTENARO, G. S. **Efeito do grau de hidrólise nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

CENTENARO, G. S. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

CHAMBERS, I. V. E.; BOWERS, J. Consumer perception of sensory quality in muscle foods: sensory characteristics of meat influence consumer decisions. **Food Technology**, v. 47, p. 116–120, 1993.

CHANPUT, W.; THEERAKULKAIT, C.; NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 422–428, 2009.

CHEN, H. H.; CHIU, E. M.; HUANG, J. R. Color and gel-forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 985-991, 1997.

CHEN, H. M; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p.49-53, 1998.

CHEN, H. M; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2619-23, 1996.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Food Science Technology**, v.11, p.254-262, 2000.

DEY, S. S.; DORA, K. C. Effect of sodium lactate as cryostabilizer on physic-chemical attributes of croaker (*Johnius gangeticus*) muscle protein. **Journal of Food Science Technology**, v. 47, n. 4, p. 432–436, 2010.

DONDERO, M.; CUROTTO, E.; FIGUEROA, V. Transglutaminase Effects on Gelation of Jack Mackerel Surimi (*Trachurus Murphyi*). **Food Science Technology Int**, v. 8, n. 1, p. 49–54, 2002.

DOSSIÊ ANTIOXIDANTE. Os antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 6, 2009.

FAO. Small-scale sausage production Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1985.

FAO/WHO. **Codex alimentarius: food standards**. Code practice for fish and fishery products (CAC/RCP 52-2003), Roma, p.1-146, 2003. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=en](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en). Acesso em: 10/10/2011.

FENNEMA, O. R. In: NAWAR, W.W. Em **Lipids**. Marcel Dekker: Nova Iorque, cap. 5, 1996.

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual carp and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FERREIRA, M. F.; SILVA, A. T.; ROBBS, P. G.; GASPAR, A.; SCHMELZER-NAGEL, W. Avaliação físico-química de salsichas tipo viena com substituição de gordura animal por óleo de girassol. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.1-7, 2003.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S.-W.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1054-1059, 1994.

FURLAN, V. J. M.; SILVA, A. P. R.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoita (*Engraulis anchoita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n. 4, p. 834-839, 2009.

FURTADO, A. A. L.; MODESTA, R. C. D.; SIQUEIRA, R. S.; FREITAS, S. C. Processamento de salsicha de carne de rã. **Comunicado Técnico – Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento**. ISSN 0103-5231, Rio de Janeiro, Dez. 2005.

FUSELLI, S. R.; CASALES, M. R.; FRITZ, R.; YEANNES, M. I. Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis anchoita*) production. **LWT-Food Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 214-218, 1994.

GILBERG, A.; ARNESEN, J. A.; CARLEOG, M. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 475, 2002.

GONÇALVES, A. A.; NOGUEIRA, W. M.; LOURENÇO, L. F. H. Aproveitamento do descarte do processamento da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e do camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*) na produção de salsicha sabor camarão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 4, p. 623 - 635, 2009.

GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G. Restructured fish product from white croacker (*Micropogonias furnieri*) mince using microbial transglutaminase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, p. 987-995, 2010.

GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G. Uso da enzima transglutaminase na elaboração de um produto reestruturado à base de pescado. **Revista Nacional da Carne**, v. 28, n. 317, p. 123-132. 2003.

GUENNEUGUES, P.; MORRISSEY, M. T. Surimi resource. In: PARK, J. W. **Surimi and surimi seafood**, Florida, CRC Press Taylor & Francis Group, p. 1-32, 2005.

GUERREIRO, L. **Dossiê técnico produção de salsicha**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2006.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4<sup>o</sup> Ed.; Oxford University Press; pg 268 – 340, 2007.

HAMILTON, R.J. The chemistry of rancidity in foods. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in Foods**. London: Applied Science, 1983. p. 1-20.

HAN, M.; ZHANG, Y.; FEI, Y.; XU, X. ;ZHOU, G. Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 665– 670, 2009.

HOROSTECKI, M.; BELTÃO, T. Brasil quer explorar novas espécies de pescado. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. **Revista on line Instituto de Pesca SP**, São Paulo, 2007.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from Herring (*Cuplea harengus*). **Journal of Food Science**, v.59, n. 1, p. 76-79, 1994.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODIL, M.; FLANAGAM, J. A.; DEEMER, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic

antioxidant using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1815-1821, 2005.

HULTIN, H. O.; KELLEHER, S. D. Surimi processing from dark muscle fish. In: PARK, J. W. **Surimi and Surimi Seafood**. New York: Marcel Dekker Inc., cap. 3, p. 59-77, 2000.

ISMAIL, I.; HUDA, N.; ARIFFIN, F.; ISMAIL, N.; Effects of washing on the functional properties of duck meat. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, 2010.

ISMAIL, M. A. B.; KASAPIS, S.; DYKES, G. A.; AL-WAILI, H.; GUIZANI, N.; AL-OUFI, H. Effect of frozen storage on the characteristics of a developed and commercial fish sausages. **Journal of Food Science**, junho 2011. DOI: 10.1007/s13197-011-0441-x

JAFARPOUR, A.; GORCZYCA, E. M. Alternative techniques for producing a quality surimi and Kamaboko from common carp (*Cyprinus carpio*). **Food Engineering and Physical Properties**, v. 73, n. 9, p. 415-424, 2008.

JAO, C. L.; KO, W. C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. **Fisheries Science**, v. 68, n. 2, p. 430–435, 2002.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antioxidant activity of peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, p. 45–50, 2005.

JIA, J.; MA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L.; HE, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336-342, 2010.

JIN, S. K.; KIM, I. S.; JUNG, H. J.; KIM, D. H.; CHOI, Y. J.; HUR, S. J. The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. **Poultry Science**, v. 86, p. 2676–2684, 2007.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, n. 5, 2005.

KARAYANNAKIDIS, P. D.; ZOTOS, A.; PETRIDIS, D.; TAYLOR, K. D. A. Physicochemical changes of sardines (*Sardina pilchardus*) at  $-18^{\circ}\text{C}$  and functional

properties of Kamaboko gels enhanced with Ca<sup>2+</sup> ions and MTGase. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, n. 3, p. 372–97, 2008.

KARTHIKEYAN, M.; DILEEP, A. O.; SHAMASUNDAR, B. A. Effect of water washing on the functional and rheological properties of proteins from threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1002–1010, 2006.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158-164, 2009.

KIRSCHNIK, P. G. Avaliação da estabilidade de produtos obtidos de carne mecanicamente separada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1317–1327, 2007.

KONG, B., XIONG, Y.L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6059–6068, 2007.

KORHONEN H, PIHLANTO A. Review: bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945–60, 2006.

KORHONEN, H; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides: opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1297-1308, 2003.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

KRISTINSSON, H. G.; THEODORE, T.; DEMIR, D.; INGADOTTIR, B. A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. **Journal of Food Science** – v. 70, n. 4, 2005.

KUHN, C.R. Geleificação termo-induzida do surimi de Jundia (*Rhamdia quelen*) com inibidores de proteases. Tese (Doutorado em Ciências)– Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 95p, 2006.

LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food Chemistry**, v. 35, p. 295-314, 1990.

LANIER, T. C.; LEE, C. M. **Surimi technology**. New York. Marcel Dekker Inc., p. 220-287, 2000.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. V. 1, 2º Ed., Edgard Blücher, São Paulo, 1976.

LEMPECK, T. S.; MARTINS, V. G.; PRENTICE, C. Rheology of surimi-based products from fatty fish underutilized by the industry. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.16, n. 4, p. 27-44, 2007.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolations and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p.1135-1143, 2007.

LIASET, B.; JULSHAMN, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex<sup>TM</sup>. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 17, p. 1747-1759, 2003.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, 1999.

MADUREIRA, L. S. P. **Use of wild fish and/or other aquatic species to feed. Case study: South American anchovy, (*Engraulis anchoita*)**. In: Food and Agricultural Organization of the United Nations. (Org.). FAO Fisheries Technical Paper: Towards Sustainable Aquaculture: Selected Issues and Guidelines. 1 ed. Rome: FAO Fish Utilization and Marketing Service, v. 466, p. 1-29, 2007.



MARTIN, R. E. **Chemistry and biochemistry of marine food products**. Westport: AVI Publishing Company, 1982.

MARTINS, V. G. Obtenção de um hidrogel proveniente de proteínas da Corvina (*Micropogonias furnieri*) e solubilização das proteína fibrosas residuais. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1289–1295, 2003.

MIRA, N. V. M.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Avaliação da composição centesimal, aminoácidos e mercúrio contaminante de surimi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 665-671, 2005.

MITSUDA, H. K.; YASUMOTO, K.; IWAMI, E. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyo Shokuryo**, v. 19, p. 210–214, 1996.

MOLINA, M. C. B.; CUNHA, R. S.; HERKENHOFF, L. F.; MILL, J. G. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 743-750, 2003.

MOREIRA, R.T. Desenvolvimento de embutido emulsionado de tilápia (*Oreochromis niloticus*) estabilizado com hidrocolóides. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 447–456, 2006.

MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 7600–7608, 2005.

MURPHY, S. C.; GILROY, D.; KERRY, J. F.; BUCKLEY, D. J.; KERRY, J. P. Evaluation of surimi, fat and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface methodology. **Meat Science**, v. 66, p. 689–701, 2004.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 6° ed., São Paulo, Atheneu, 1990.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NAVARRO C. Tecnología de los productos gelificados. In: PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E. **Industrialización de productos de origen animal**. 3° ed., Alicante, Spain: Univ. Miguel Hernández. p 139–159, 2007.

NAZEER, R. A.; DEEPTHA, R.; JAIGANESH, R.; SAMPATHKUMAR, N. S.; NAQASH, S. Y. Radical scavenging activity of seela (*Sphyræna barracuda*) and ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209–216, 2011.

NEIVA, C. R. P. **Obtenção e caracterização de minced fish de sardinha e sua estabilidade durante a estocagem sob congelamento**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NEVES, R. A. M., CAMPOS, T., MARQUEZ, U. M. L. Modulação da pressão arterial por hidrolisados protéicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 14, p. 81-86, 2006.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMAN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 66, n. 5, 2001.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 571–57, 2005.

NION, H.; RIOS, C. Los recursos pelágicos del Uruguay. **Atlântica**, v. 13, n. 1, p. 201-215, 1991.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p.1–27, 2009.

NOVOZYMES. **Products and solutions** - Protamex®. 2012. Disponível em: <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Meat+processing/Functional+meat+protein+FMP/Protamex/Protamex>. Acessado em: 16/01/2012.

OETTERER, M. **Produtos Obtidos por Interferência na Fração Proteica do Pescado**. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OETTERER, M. Química do pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, p. 353-359, 1999.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, L. C. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha**. (Anexo IV). Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; TRINDADE, M. A.; CARVALHO BALIEIRO, J. C. C.; VIEGAS, E. M. M. Quality of sausage elaborated using minced Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, v.67, n.2, p.183-190, 2010

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, p.155-163, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal**, v.2. São Paulo: Artmed, 2005.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 777-778, 1985.

OYAZU, M. Antioxidative activitie of browng products of glucosamine fractioned by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.

OZKECECI, R.; KARAKAYA, M.; YILMAZ, M.; SARICOBAN, C.; OCKERMAN, H. The effect of carcass part and packaging method on the storage stability of mechanically deboned chicken meat. **Journal of Muscle Foods**, v. 19, p. 288–301, 2008.

PANPIPAT, W.; CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S. Gel properties of croaker–mackerel surimi blend. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1122–1128, 2010.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**, v.2. Goiânia: Universitária, 1107p, 1994.

PARK, J.W.; LIN, J.T.M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J.W. **Surimi and surimi seafood**. 2° ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, cap.2, p.33-106, 2004.

PARVATHY, U.; GEORGE, S. Influence of cryoprotectant levels on storage stability of surimi from *Nemipterus japonicus* and quality of surimi-based products. **Journal of Food Science and Technology**, 2011. [DOI 10.1007/s13197-011-0590-y](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0590-y)

PENA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. **Meat Science**, v. 64, p. 259–263, 2003.

PEPE, T.; TROTTA, M.; DI MARCO, I.; ANASTASIO, A.; BAUTISTA, J. M.; CORTESI, A. L. Fish Species Identification in Surimi-Based Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3681–3685, 2007.

PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E. **Industrialización de productos de origen animal**. 3° ed., Vol. 2, p 7–172, 2007.

PÉREZ-MATEOS, M.; AMATO, P. M.; LANIER, T. C. Gelling properties of Atlantic Croaker surimi processed by acid or alkaline solubilization. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 4, p. 328-333, 2004.

PETERSEN, B. R. Removing bitternes from protein hydrolysates. **Food Technology**, v. 58, n. 10, p. 96, 1994.

PIYADHAMMAVIBOON, P.; YONGSAWATDIGUL, J. Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 291–298, 2010.

QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catebeiana shaw*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1690-1698, 2008.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v.38, p.175–82, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RANKEM, M.D. Handbook of Meat Product Technology . Oxford: Blackwell Science, 2000. 212p.

RANKEN, M. D. **Manual de Industrias de los Alimentos**. Editorial Acribia, S.A. 2<sup>a</sup> ed. España, 1993.

REVALLEC-PLÉ, R.; GILMARTIN, L.; WORMHOUDT, A. V.; GAL, Y. L. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 2176-2180, 2000.

RIISPOA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>>. Acesso em: 22/11/2011.

ROSSINI, K.; NOREÑA, C. P. Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 862–867, 2009.

ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. B.; MADUREIRA, L. S. P. Estoque de peixes em rota de esgotamento no Brasil. **Diário de Bordo, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo**, ano 2, nº 10, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Deteminação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>. Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico 128**, ISSN 1674-6535, 1º edição on line: julho de 2007.

RUPSANKAR, C. Improvement of cooking quality and gel formation capacity of Bombay duck (*Harpodon nehereus*) fish meat. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 5, p. 534–540, 2010.

RUUSUNEN, M.; VAINIONPAA, J.; POULANNE, E.; LYLTY, M.; LAHTEENMAKI, L.; NIEMISTO, M.; AHVENAINEN, R. Physical and sensory properties of low-salt phosphate free frankfurters composed with various ingredients. **Meat Science**, v.63, p. 9-16, 2003.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. R. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 464-468, 2005.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**, v. 86, p. 99–103, 2003.

SAMARANAYAKA, A. G.P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229-254, 2011.

SAMPATH-KUMAR, N. S.; NAZEER, R. A.; JAIGANESH, R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). **Biochemical and Life Science**, p. 1087-1094, 2011. DOI 10.1007/s00726-011-0858-6

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p.1399–1406, 2011.

SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 2009.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. J.; BABBITT, J.; SMILEY, S.; CRAPO, C.; REPPOND, K. D. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. **Journal of Food Science**, v.68, p. 2196–2200, 2003.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Aquicultura e Pesca. Consumo de pescado. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/aquicultura-e-pesca/o-setor/mercado/consumo-de-pescado/> Acessado em: 21/03/2012.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo, Livraria Varela, 1996.

SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 945–948, 1992.

SHIN-YOUNG, J.; PYO-JAM, P.; WON-KYO, J.; SE-KWON, K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **Europe Food Research Technology**, v. 219, p. 20–26, 2004.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

SINDROF. Sindicato Rural de Ouro Fino. Consumo de peixe cresce no mundo, diz FAO. Disponível em: <http://www.sindrof.com.br/consumo-de-peixe-cresce-no-mundo-diz-fao/>, acessado em: 22/02/2012.

SINGH, R. P.; MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies of the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extract using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 81-86, 2002.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORO, I.; RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, 2004.

SLIZYTÉ, R.; MOZURAITYTÉ, R.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668–677, 2009.

SMEWING, J. Hidrocoloides In: ROSEBTHAK, A. **Textura de los Alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia, p. 273-290, 2001.

SOUZA, C. F. V. D.; VENZKE, J. G.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Nutritional effects of mechanically deboned chicken meat and soybean proteins cross-linking by microbial transglutaminase. **Food Science and Technology International**, v. 15, p. 337–344, 2009.

SUETSUNA, K. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. **Marine Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 2000.

SUN J., HE H., XIE B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6646–6652, 2004.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S. A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 159-165, 2007.



SYLLA, K. S. B.; BERGE J. P.; PROST, C.; MUSABYEMARIYA, B.; SEYDI, M. Sensory and aromatic characteristics of tongue sole by-products hydrolysates (*Cynoglossus senegalensis*). **Microbiologie et Higiène Alimentarie**, v. 21, n. 60, p. 35-43, 2009.

TAHA, P. **Estudo de viabilidade técnico-econômica da produção de surimi**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

TENUTA, F. A.; JESUS, R. S. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria prima industrial. **Boletim da SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 59-64, 2003.

TEODORO PENOFF PRODUCCIONES PUBLICITARIAS. "Alternativa Deportiva", Mar del Plata, Argentina. Disponível em: <http://www.alternativadeportiva.com/paginas/peces.htm>. Acessado em: 15/10/2011.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, v. 103, p. 1385–1394, 2007.

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMINGUEZ-MAGAÑA, M. A.; DAVILA-ORTIZ, G.; MARTINEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A.; Péptidos antihipertensivos, uma alternativa de tratamento de origen natural: uma revisão. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v. 6, n. 2, p. 158-168, 2008.

VAN DER VEN, C.; GRUPPEN, H.; DE BONT, A. B. D.; VORAGEN J. G. A. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2938-2946, 2002.

VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MILLÁN, F. Obtencion y aplicaciones de hidrolizados proteicos. **Grasas Aceites**, v. 52, p.132–136, 2001.

VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Peptídeos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 99-102, 2006.

VISENTAINER, J. V.; NOFFS, M. D.; CARVALHO, P. O.; ALMEIDA, V. V.; OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, N. E. Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the southeast coast of Brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 543–547, 2007.

WANG, W. Y.; DE MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**, v. 4, p. 63-78, 2005.

WANITA, A.; LORENZ, K. Antioxidant potential of 5-N-pentadecylresorcinol. **Journal of Food Process Preservation**, v. 20, p. 417–429, 1994.

WITTER, R. **Incentivo para a Anchoita**. RBS TV Rio Grande. Maio, 2010. Disponível em: <http://wp.clicrbs.com.br/rbstvriogrande/tag/anchoita/?topo=77,1,1> . Acessado em: 22/09/2011.

WU, C. H. ; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949–957, 2003.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n. 1, p. 81-92, 2003.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 235–240, 2009.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, 4ª edição, São Paulo, 2005.

ZHONG-JI, Q.; WON-KYO, J.; HEE-GUK, B.; SE-KWON, K. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3365–3371, 2008.