

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**VALOR AGREGADO AOS RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DE TILÁPIA: ASPECTOS
TECNOLÓGICOS, QUÍMICOS E
MICROESTRUTURAIS**

Mestranda: Eliriane Jamas

**Jaboticabal, São Paulo
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**VALOR AGREGADO AOS RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DE TILÁPIA: ASPECTOS
TECNOLÓGICOS, QUÍMICOS E
MICROESTRUTURAIS**

Eliriane Jamas

Orientadora: Prof^a Dr^a Léa Sílvia Sant´Ana

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- graduação em
Aquicultura do Centro de
Aquicultura da Unesp - CAUNESP,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

J27v Jamas, Eliriane, 1981-
Valor agregado aos resíduos do processamento de tilápia:
aspectos tecnológicos, químicos e microestruturais / Eli-
riane Jamas. - Jaboticabal: [s.n.], 2012
ii, 48 f. : il., color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista
Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2012
Orientador: Léa Sílvia Sant'Ana
Inclui bibliografia

1. CMS. 2. Amido de mandioca. 3. Hambúrguer de peixe.
4. Hidrolisado proteico. 5. Microscopia eletrônica de var-
redura. 6. Eletroforese. I. Sant'Ana, Léa Sílvia. II. Uni-
versidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Cen-
tro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. III. Título.

Sumário

Agradecimentos	2
Agradecimento Especial.....	3
Apoio Financeiro	4
Resumo	5
Abstract.....	6
Lista de Figuras.....	7
Lista de tabelas.....	8
Lista de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	10
2. Objetivo.....	11
3. Revisão Bibliográfica	11
3.1. Utilização do Pescado	11
3.2. Surimi	12
3.3. Amido	13
3.4. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	15
3.5. Análise de proteínas.....	16
4.2. Balanço de massa e de proteínas.....	21
4.2.1 Balanço de massa.....	21
4.2.2. Balanço de massa de proteínas.....	21
4.3.2. Análise de aminoácidos.....	22
4.3.3. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	23
4.3.4. Atividade de água.....	23
4.3.5. Análises morfológicas	23
4.4. Produção de hidrolisado protéico com água de lavagem.....	23
4.4.1. Análise de peptídeos e aminoácidos do hidrolisado.....	24
4.4.2. Eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE	24
5. Análise Estatística.....	25
6. Resultados	25
6.1. Balanço de Massa.....	25
6.2. Balanço de proteínas.....	26
6.3. Análises químicas do surimi e dos produtos formulados	26

6.3.1. Perfil aminoacídico do surimi e dos hambúrgueres.....	28
6.3.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	30
6.3.3. Atividade de Água	31
6.4. Microestruturas do surimi e dos hambúrgueres	32
6.5. Hidrolisado proteico.....	36
7. Conclusões	40
8. Referências.....	40

Dedico aos meus pais Manoel e Clarice por acreditarem sempre em mim e não me deixarem desistir e ao Luís Fernando pela paciência, apoio e o incentivo para seguir em frente.

Agradecimentos

A Deus por ter me concedido a sabedoria, o discernimento e a compreensão para os pequenos e grandes adventos da vida;

Aos meus pais Manoel e Clarice pelo amor, paciência e me fazerem seguir em frente;

Ao Luís Fernando por ser um companheiro em todas as horas e por demonstrar amor e paciência enorme comigo;

A Elenize por sempre me ouvir, me dar conselhos e ser minha amiga em todas as horas...obrigada por tudo que passamos juntas!

Ao Eliandro, Clélia, Orlando, Guilherme, Filipe e Pedro por me ajudarem sempre e por todas as alegrias que vivemos;

A Fabrízia pela amizade, a companheira de viagem e por toda a ajuda desde o início desta jornada...muito obrigada pela ajuda na prova do Caunesp!

A Grazielle, Gelcirene e Débora pelos almoços e boas risadas compartilhadas.

Aos funcionários do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA, principalmente ao João e ao Francisco pelas conversas e pelo auxílio durante as análises;

As amigas de sempre que cooperaram para que os momentos de risada fossem de grande valia;

Ao Laboratório Experimental de Clínica Médica – FMB/Unesp pelo auxílio nas análises do hidrolisados do resíduo aquoso;

Ao Laboratório de Enzimologia da FCF/Unesp Araraquara e ao Prof^o Dr^o Rubens pelo auxílio nas análises de hidrólise e eletroforese do resíduo aquoso;

Agradecimento Especial

A Profª Drª Léa Sílvia Sant´Ana pela amizade, apoio, pelo exemplo de ética, profissionalismo e respeito. Obrigada pelas conversas, pelos momentos de descontração e também pelos puxões de orelha, pois foram fundamentais para chegar até este momento...e principalmente muito obrigada pela oportunidade e me fazer acreditar que eu poderia ter esta segunda chance.

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Pesquisa (Cnpq) pela bolsa de mestrado concedida (Processo 131137/2010-7)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (Processo 2010/09489-4).

Resumo

Valor Agregado aos resíduos do processamento de tilápia: aspectos tecnológicos, químicos e microestruturais.

Eliriane Jamas; Prof^a Dr^a Léa Sílvia Sant´Ana

Unesp – CAUNESP

A aqüicultura apresenta crescimento em todo mundo, sendo a criação intensiva de tilápia uma atividade em expansão. No processo de filetagem da tilápia é gerada grande quantidade de subprodutos, sendo que a produção de surimi surge como alternativa de aproveitamento destes resíduos. A tecnologia do surimi permite agregar valor funcional, nutricional e comercial para elaboração de produtos reestruturados. O presente trabalho teve como objetivo contribuir com a sustentabilidade da indústria de filetagem de tilápia pela produção de um alimento para consumo humano (Hambúrguer), bem como pela utilização de resíduos do processamento (água de lavagem). Os resultados obtidos indicaram que foi possível elaborar produto reestruturado (hambúrguer), com teor de umidade desejável utilizando processamento manual para a obtenção do mesmo. A composição centesimal obtida para os hambúrgueres ficou dentro dos valores determinados para outras espécies, podendo ser considerado produtos de boa qualidade nutricional. As micrografias dos hambúrgueres apresentaram orifícios de ar característicos de produtos reestruturados, e algumas fibras musculares isoladas. O estudo comprovou que a lavagem e a adição de amido de mandioca ao músculo da tilápia transformam a proteína original em um tecido flexível e modelável, proporcionando a utilização do surimi na elaboração de diversos tipos de produtos. O resíduo do processamento (água de lavagem do surimi) possui proteínas que ao serem hidrolisadas podem ser utilizadas na alimentação. Estudos futuros são necessários para a utilização dos hidrolisados para o uso industrial.

Palavras chave: CMS, amido de mandioca, hambúrguer de peixe, hidrolisado protéico, microscopia eletrônica de varredura, eletroforese

Abstract

Value-added waste processing tilapia: technological aspects, microstructural and chemical.

Eliriane Jamas; Léa Sílvia Sant´Ana PhD

Unesp- CAUNESP

Aquaculture has been growing worldwide, and the intensive farming of tilapia an expanding activity. In the process of filleting tilapia is generated large quantity of by-products, and the production of surimi appears as an alternative use of these residues. The technology allows surimi add value is bringing added value functional, nutritional and commercial development of restrutred products. This study aimed to contribute to the sustainability of tilapia filleting industry for the production of a foodstuff (Hamburger), and the use of processing waste (wash water). The results of this study indicated that it was possible to develop restrutred products (hamburger) with desirable moisture content using manual processing to achieve the same. The chemical composition obtained for the burgers is within the range determined for other species, can be considered products of good nutritional quality. The micrographs of the burgers had air holes characteristic of restrutred products, and some isolated muscle fibers. The study found that washing and addition of cassava starch to the muscle of tilapia transform the original protein in a tissue flexible, allowing the use of surimi in the preparation of different types of products. The waste processing (surimi wash water) has to be hydrolyzed proteins that can be used in foodstuffs. Further studies are needed to use hydrolysates for industrial use.

Keywords: MSM, cassava starch, fishburguer, hydrolyzed protein, scanning electron microscopy, electrophoresis.

Lista de Figuras

Figura 1. Balanço de massa para obtenção do surimi.....	25
Figura 2. Balanço protéico para obtenção do surimi.....	26
Figura 3. Teores de umidade (%), proteína (%) e cinzas (%) para surimi, hambúrguer de surimi de tilápia (HSA) e hambúrguer de surimi de tilápia com amido (HA).....	27
Figura 4. Taxa de oxidação lipídica do surimi, hambúrguer sem amido (HSA) e Hambúrguer com amido (HA), expressa em SRATB ($\mu\text{g MDA/g}$).....	30
Figura 5. Valores de atividade de água (A_w) para surimi, hambúrguer de surimi de Tilápia sem amido (HSA) e hambúrguer de tilápia com amido (HA).....	31
Figura 6. Surimi de tilápia.....	33
Figura 7. Hambúrguer de surimi de tilápia sem amido.....	35
Figura 8. Hambúrguer de surimi de tilápia com amido.....	36
Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%).....	38
Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%).....	39

Lista de tabelas

Tabela 1. Perfil de aminoácidos de surimi de CMS de tilápia, do hambúrguer sem amido (HSA) e hambúrguer com amido (HA) (g/100g).....	29
Tabela 2. Produção de aminoácidos resultantes da cinética da hidrólise do resíduo aquoso por Alcalase.....	37

Lista de Abreviaturas

Aw: atividade de água

CMS: carne mecanicamente separada

FC: fator de correção

HA: hambúrguer com amido

HSA: hambúrguer sem amido

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MDA: malonaldeído

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SRATB: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBA: ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

1. Introdução

O recém-criado Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) do governo brasileiro pretende aumentar o consumo de pescado dos 7 Kg por habitante/ano para 9 kg por habitante ano, e para alcançar esta meta prevê um aumento de 50% da produção proveniente da aquicultura (MPA, 2011).

Estratégias são buscadas a fim de aumentar o consumo de pescado, bem como de agregar valor aos produtos fortalecendo a cadeia produtiva. Formas alternativas de processamento da carne do pescado, além das usuais: pescado fresco, congelado, seco ou enlatado, tais como novas formulações, alimentos pré-preparados e produtos práticos devem ser oferecidos. A maior utilização dos subprodutos de peixe, na forma de silagem, farinha de peixe e carne mecanicamente separada – CMS, é também desejável (RUSTAD, STORRØ E SLIZYTE, 2011), pois o processamento adequado dos resíduos do pescado irá viabilizar economicamente a indústria bem como minimizar o impacto ambiental resultando na adoção de práticas sustentáveis (MARTÍN-SÁNCHEZ et al, 2009).

O processamento de peixes de aquicultura é um fator importante para auxiliar no elo entre a produção primária e o consumidor final (SARY et al, 2009). Com rendimento de filé de aproximadamente 30%, o processamento da tilápia gera uma grande quantidade de subprodutos. A extração de CMS é um processo atraente pela possibilidade de maior rendimento de carne em relação à obtida pelos métodos tradicionais de filetagem (BOOMAN et al, 2010).

A CMS é a base para a produção do surimi. Este é obtido após sucessivas lavagens da CMS com água fria e adição de crioprotetores (PARK E YANG, 1998; MACKIE, 1992; LEE, 1984). Através do surimi podem-se elaborar empanados, hambúrgueres e outros produtos, promovendo desenvolvimento rentável de produtos para consumo com valor agregado e com utilização mais responsável dos recursos naturais (GEHRING et al, 2011).

Amidos são amplamente utilizados em uma grande variedade de produtos pela indústria alimentícia, pois proporcionam mudanças desejáveis na textura e propriedades gelatinizantes dos alimentos (MISHRA E RAI, 2006). Em produtos à base de surimi, melhoram suas propriedades físicas e químicas, por causa de sua habilidade em modificar sua textura, manter estabilidade durante a refrigeração e

por diminuir custos de produção (PARK, 2005; KIM E LEE, 1987; HUNT, GETTY E PARK, 2009). Porém para avaliar as mudanças que ocorrem pela adição de amido nas propriedades físicas e químicas do surimi são necessárias análises específicas. O estudo das propriedades morfológicas dos alimentos proporciona melhor entendimento a respeito do comportamento de seus componentes: a modificação da estrutura protéica do músculo, os efeitos da incorporação de aditivos e a interação entre proteína, lipídeos e amido (FOGAÇA, 2009).

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo contribuir com a sustentabilidade da indústria de filetagem de tilápia com produção de um alimento para consumo humano (Hambúrguer), bem como utilização de resíduos do processamento (água de lavagem).

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Utilização do Pescado

A produção mundial de tilápia em aquicultura, em 2009, foi de 132.957 toneladas sendo que a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi responsável por 96.286 toneladas da produção (FAO, 2011). Na produção aquícola brasileira a produção de tilápia é um dos destaques. Sua criação cresceu 3,8 vezes em dez anos, de 1999 a 2009 (FAO, 2011).

A tilápia é considerada uma espécie com potencial para a produção de surimi (TOKUR et al, 2004), pois possui uma carne branca e textura delicada (MARTÍN-SÁNCHEZ et al, 2009). A espécie apresenta requisitos típicos preferidos pelo mercado consumidor, tais como carne de sabor delicado, de fácil filetagem, ausência de espinhas em Y (SOUZA, 2002), o que coloca a tilápia como o segundo grupo de peixes de maior importância na aquicultura mundial, somente atrás das carpas (NAYLOR et al, 2000; FAO, 2011).

A filetagem mecânica de 46 kg de tilápia produz cerca de 14kg de filés e 32kg de subprodutos, resultando em grandes perdas em óleo e carne de peixe (JACZYNSKI, 2005). Nas últimas duas décadas, paralelamente ao crescimento

mundial da aquicultura houve um grande aumento da quantidade de subprodutos gerados a partir do processamento de peixe (JACZYNSKI, 2005).

Existe uma confusão nos uso dos termos descarte, resíduos, subprodutos (RUSTAD, 2003). Descarte é normalmente utilizado para a fauna acompanhante de produtos da pesca de valor comercial (BLANCO et al., 2007). Alguns autores definem resíduos como produtos que não podem ser usados para alimentação humana, devendo ser utilizados em compostagem, queimados ou destruídos, enquanto subprodutos são definidos como partes não comercializadas de pescado, mas que podem ser processados após tratamentos específicos (RUSTAD, 2003; RUSTAD, STORRØ E SLIZYTE, 2011). Neste trabalho utilizar-se-á o termo subprodutos.

A sustentabilidade do setor pesqueiro será alcançada com o maior aproveitamento das matérias-primas, a utilização de espécies subutilizadas, avaliação das ações, preservação do meio ambiente e recursos naturais, minimização da poluição e redução do consumo de água. Dessa forma pode-se melhorar a economia do processo e dar resposta as crescentes preocupações com responsabilidade ambiental e social (MARTIN-SÁNCHEZ et al, 2009).

Estudos que utilizem estes subprodutos, obtendo-se produtos de valor agregado e praticidade de comercialização, são essenciais para o fortalecimento da cadeia produtora do pescado nacional. Uma possibilidade para aumentar o rendimento é através da produção de surimi.

3.2. Surimi

No *Codex alimentarius*, o surimi é definido como produto de proteína 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, 2010). A utilização de matérias-primas anteriormente não aproveitadas e o processamento dos subprodutos podem reduzir a pressão sobre os estoques de peixes, bem como diminuir os impactos ambientais negativos associados ao processamento do pescado. Há também grande potencial para a elaboração de produtos de alimentação humana a partir de matérias-primas até então não utilizadas. O aproveitamento de subprodutos com recuperação de

CMS, após o processamento de filetagem, pode aumentar o rendimento da porção comestível e posteriormente ser utilizada na elaboração de outros produtos alimentício (CHOMNAWANG et al., 2007).

Diversas espécies podem ser utilizadas na elaboração do surimi a base de pescado, no entanto, alguns peixes mais gordurosos podem dificultar a eliminação de substâncias indesejáveis durante os ciclos de lavagem do músculo (YONGSAWATDIGUL, PARK E VIRULHAKUL, 2000).

Para produção de surimi há uma etapa de lavagem, a qual é de extrema importância, pois nela ocorre tanto a remoção das proteínas hidrossolúveis, principalmente proteínas sarcoplasmáticas, lipídeos, sangue e outros materiais hidrossolúveis, bem como a concentração de proteínas miofibrilares, responsáveis pelas características do gel formado (RAWDUEN et al, 2009; PARK E LIN, 2005; PARK, LIN E YONGSAWATDIGUL, 1997).

A esta pasta de surimi são adicionados crioprotetores (tripolifosfato, glicerol e sacarose) necessários para a manutenção das características de gelificação, importantes na elaboração de produtos análogos a carne de caranguejo e vários outros produtos derivados do surimi, como *kamaboko* (cozido a vapor), *tempura* (frito), *chikuwa* (assado), patê, *fishburger*, bolinhos, *nuggets* e salsicha (PARK E MORRISSEY, 2005; LEE, 1986; SATO E POLLAK, 2001; JIANG et al, 2001; SANCHES-ALONSO, SOLAS E BORDERIAS, 2007; BLANCO et al, 2007; JIN et al, 2007).

As características reológicas dos produtos elaborados a base de surimi são melhoradas pelo uso de amido.

3.3. Amido

O amido é um macropolímero de glicose sintetizado por plantas e provém cerca de 70 – 80% das calorias consumidas pelos homens. Sua estrutura é complexa, composta por duas porções principais: a amilose e a amilopectina, sendo assim quimicamente e fisicamente heterogêneo (DUTRA E MARCHINI, 2000; BEMILLER E WHISTLER, 1996; YANG E PARK, 1998).

A amilose, é uma molécula menor, é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando uma cadeia linear (10^5 a 10^6 daltons). Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6, formando uma estrutura ramificada, contendo até 5% de ramificações α -1,6, com alto peso molecular (10^7 a 10^8 daltons) (TESTER et al, 2004). As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (MAHANN E ESCOTT- STUMP, 2002; TESTER et al., 2004).

Amidos são amplamente utilizados em uma grande variedade de produtos pela indústria alimentícia, pois proporcionam mudanças desejáveis na textura e propriedades gelatinizantes dos alimentos (MISHRA E RAI, 2006). Em produtos à base de surimi os amidos reduzem os custos de produção e substituem parcialmente as proteínas do peixe, mantendo as características desejadas do gel (HUNT, GETTY E PARK, 2009; KIM E LEE, 1987; LI E YEH, 2002).

O amido, devido à sua origem botânica e a quantidade de amilopectina, pode afetar a textura do surimi em suas propriedades reológicas: retrogradação e gelatinização, sendo que o amido gelatinizado pode aumentar a força do gel e a firmeza do produto. (HSU E CHIANG, 2002; LEE, 1986; LI E YEH, 2002; KIM E LEE, 1987).

As diferentes fontes de amido têm comportamentos diferentes quanto à textura do gel do surimi. Dos amidos comerciais, a fécula de batata aumenta mais a força do gel que o amido de milho, devido a sua propriedade de absorver uma grande quantidade de água, e de sua melhor rigidez, coesividade e firmeza (YANG E PARK, 1998; LEE, 1986). O amido de mandioca é o segundo com maior capacidade de absorção de água, o que pode ser útil para melhorar as características sensoriais e para manter a estabilidade nos processos de refrigeração (PARK, 2005). O tubérculo apresenta 17% de amilose (PARK, 2005) o que proporciona a formação de um gel transparente, o que pode ser útil na elaboração de produtos com pescado, não influenciando a escolha do consumidor.

O uso de fécula de mandioca em produtos com proteína animal apresenta-se promissor, pois a gelatinização do amido deste tubérculo se inicia na mesma temperatura em que começa a cocção dos produtos cárneos (PSZCZOLA, 1999).

A mandioca é um das principais fontes de amido de países de clima tropical. A planta é nativa da floresta amazônica brasileira e adaptou-se bem aos continentes africano e asiático, os quais são os maiores produtores atualmente (MAIEVES et al, 2011). Além de ser consumido em diferentes preparações culinárias, é importante devido à simplicidade do processo de extração dos grânulos de amido, e com pequena interação com proteínas, lipídios e outros componentes dos tecidos vegetais que exigem processos industriais mais elaborados para purificar os grânulos (MARCON et al., 2007 *apud* MAIEVES et al, 2011). O amido de mandioca apresenta uma variedade de propriedades, como temperatura de gelatinização baixa, clareza e gosto agradável, o que torna desejável para ambas as aplicações alimentares e industriais (MAIEVES et al, 2011).

Os grãos de amido são relativamente densos e insolúveis, sendo hidratados somente em água fria. Os grãos se dispersam na água, devido à dissolução dos polissacarídeos resultando no aumento da solubilidade, produzindo uma mistura de baixa viscosidade, que podem ser facilmente misturados e inchados, mesmo com concentrações acima de 35% (BEMILLER E WHISTLER, 1996). As propriedades físico-químicas do amido são afetadas principalmente pelo tamanho do grânulo, bem como pela proporção de amilose/amilopectina, peso molecular e estrutura molecular (LINDEBOOM et al., 2004)

Para avaliar as mudanças que ocorrem pela adição de amido nas propriedades físicas e químicas do surimi são necessárias análises específicas. O estudo da estrutura de um alimento pode ser realizado com técnicas de microscopia, uma vez que existe uma relação entre suas propriedades físico-químicas e suas correspondentes estruturas microscópicas (LARREA et al., 2007).

3.4. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Várias técnicas são usadas para caracterizar a estrutura de alimentos, entretanto, algumas destas são usadas para obter dados específicos e quantitativos da estrutura interna de alimentos particulados, tais como: a análise por imagem e

técnicas físico-químicas que são clássicas da tecnologia de partícula (SHOONMAN et al. 2001).

A avaliação das características microestruturais durante o pré-aquecimento do surimi fornece informações sobre o desenvolvimento estrutural da formação do gel das proteínas (HOSSAIN, MORIOKA E SHIKHA, 2011).

A análise da morfologia dos alimentos é importante para avaliar os efeitos do processamento e da adição de aditivos, sobre a estrutura microscópica dos seus nutrientes. Estas estruturas poderão até definir os parâmetros de qualidade que determinam a aceitação dos produtos pelos consumidores (BUCHHEIN, 1998).

Além do uso de aditivos, como o amido, a própria estrutura muscular do pescado se modifica substancialmente durante o processo de elaboração do surimi. Somente estudos microscópicos podem avaliar a intensidade dessas modificações, alterando processos e produtos na melhoria dos atributos de qualidade do gel de surimi. Vários pesquisadores têm avaliado as modificações na formação do gel de surimi com a utilização de análise de microestrutura (LIU et al, 2010; RAWDKUEN et al, 2009; ROMERO et al, 2009; SÁNCHEZ-ALONSO, SOLAS E BORDERIAS, 2007). A utilização de imagem microestrutural proporciona estudos que levarão ao entendimento das mudanças físico-químicas dos alimentos (AGUILERA, 2005).

3.5. Análise de proteínas

Há vários métodos para quantificar a proteína em um alimento. Uma mesma proteína apresentará resultados diferentes se quantificada por métodos diversos, pois estes apresentam princípios diferentes uns dos outros (BONJOCH E TAMAYO, 2003). Não há um método absoluto para estas análises, pois há vantagens e desvantagens em todos eles. Os métodos mais utilizados para a determinação de proteínas em alimentos são de Kjeldahl, Lowry e Bradford.

O método Kjeldahl, desde a sua criação, tem sido o mais aceito método para determinação de proteína total em rações e alimentos (MOORE et al, 2010). O procedimento de determinação indireta de proteínas é baseado na determinação de nitrogênio, devido à composição elementar de diferentes proteínas serem similares, independente da natureza e origem (GASPAR, 1984).

O método de Lowry é mais rápido, sensível e específico comparado ao Kjeldahl (MARTONE et al, 1980), enquanto o método de Bradford utiliza apenas um reagente, envolve menos etapas de mistura, não necessita de aquecimento, e dá uma resposta mais estável do que outros métodos colorimétricos (BONJOCH E TAMAYO, 2003).

É importante que o método para analisar proteínas do alimento seja robusto, isto é, deve ser possível usar o método em diferentes tipos de matéria-prima e alimentos processados, e que outros componentes do alimento, como lipídios e pigmentos não devem interferir com a análise. O método deve também necessitar mínimo pré-tratamento da amostra para diminuir o erro analítico e reduzir custos (RUSTAD, 2010).

No método de Kjeldahl a proteína total contida nas amostras é denominada “proteína bruta”, pois é obtida pela multiplicação do nitrogênio por 6,25, um fator correspondente a média de nitrogênio protéico de 16% (JAMES, 1995). Porém vários alimentos não possuem 16% de nitrogênio proteico, assim a análise de Kjeldahl pode subestimar ou superestimar os valores reais de proteínas (SOSULSKI E IMAFIDON, 1990). Alimentos com fator de conversão de nitrogênio real menor que 6,25 perdem em qualidade protéica e acabam por aumentar em quantidade (MARIOTTI, TOMÉ E MIRANDI, 2008).

Sosulski e Imafidon (1990) sugerem que para peixes seja utilizado o valor de 5,82 como fator de conversão, enquanto que Mariotti, Tomé e Mirandi (2008) sugerem valores entre 5,38 a 5,74.

Além disso, o método de Kjeldahl requer longo intervalo de tempo por análise e a presença de nitrogênio não protéico na amostra pode provocar um erro positivo nas determinações (GÁSPAR, 1984). Quando o teor de proteína é calculado com base na determinação do teor de nitrogênio, nitrogênio de compostos como aminoácidos livres, nucleotídeos, aminas e uréia também vão contribuir para o teor de proteínas (RUSTAD, 2010). Para suprimir interferências do nitrogênio não protéico, a proteína deve ser precipitada, separada do sobrenadante e digerida com ácido sulfúrico para posterior quantificação. Varias possibilidades estão disponíveis para aceleração e término da decomposição, tal como aumento da temperatura, adição de oxidantes, adição de redutores e uso de catalisadores

(GÁSPAR, 1984). Entretanto, o método é amplamente usado por suas vantagens como alta precisão e boa reprodutividade.

O método de Lowry baseia-se no princípio de que as proteínas são reduzidas quando reagem com a mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima de 750 nm (ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998). Dentre as vantagens do método de Lowry estão sua alta sensibilidade, pois o método avalia somente peptídeos, simplicidade e a possibilidade de se analisar um grande número de amostras simultaneamente (RUSTAD, 2010; MARTONE et al, 1980; OWUSU-APENTEN, 2002a). Este método tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, tais como: algas marinhas (BARBARINO E LOURENÇO, 2005), farinha de peixe (MARTONE et al, 1980), leite humano, cerveja, farinha de cereais, tomate, batata (OWUSU-APENTEN, 2002) e patinhas de carangueijo (elaborados a partir de surimi de *Alaska pollock* e *Pacific whiting*) (REED E PARK, 2008).

Os interferentes do método são agentes quelantes ou redutores. Os quelantes diminuem a formação de cor por seqüestrarem o Cu^{+2} e os agentes redutores reagem com o reagente Folin formando uma cor extra (OWUSU-APENTEN, 2002). Detergentes, fenóis, fenolases e glucosaminas também interferem no método através de um aumento da absorbância (superestimando os valores) (BARBARINO E LOURENÇO, 2005). O método de Lowry também apresenta como desvantagens os longo tempo necessário para a análise (RUSTAD, 2010) como também a necessidade de uma curva padrão (MARTONE et al, 1980).

O método Bradford baseia-se na técnica para a determinação de proteínas totais utilizando o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250 (PANDEY E BUDHATHOKI, 2007). O método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (BRADFORD, 1976).

Estudos sugerem que a forma aniônica “Coomassie brilliant blue” BG-250 forma complexos com as proteínas. Neste caso, ocorrem atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Tal complexo possui uma coloração azul. A intensidade desta coloração dependerá da concentração de proteínas da amostra e será mais intensa se a concentração for alta (OWUSU-APENTEN, 2002a).

O método apresenta vantagens como utilizar apenas um único reagente, apresentar reação rápida (apenas 5 minutos), alta estabilidade do complexo proteína-corante; alta reprodutibilidade, determinar somente nitrogênio protéico e com poucos interferentes (BONJOCH E TAMAYO, 2003; KAMIZAKE et al, 2003). Ao contrário do método de Lowry et al (1951) íons metálicos (NH_4^+ , Na^+ e K^+), fenol e carboidratos (sacarose) não interferem neste ensaio (PANDEY E BUDHATHOKI, 2007). A análise de Bradford tem sido utilizada para a determinação de proteínas totais em diversos meios como leite humano (OWUSU-APENTEN, 2002b), cogumelos (PANDEY E BUDHATHOKI, 2007), leite de vaca (KAMIZAKE et al, 2003), farinha de peixe (RICQUE-MARIE et al, 1998) e em bagre (*Clarias batrachus*) (RANI et al, 2011). Contudo o método de Bradford apresenta algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixo peso molecular das mesmas e fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência, sendo recomendável a padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido (ZAIA, ZAIA E LICHTIG, 1998).

4. Materiais e Métodos

4.1. Matéria-prima

Foram utilizados subprodutos da filetagem de tilápia nilótica, obtidos do Frigorífico Fish Fácil, no município de Garça, SP. A carne foi retirada das carcaças de peixes produzidos e abatidos no local, pertencentes a um mesmo lote de produção. Os peixes, depurados por 24 horas, foram abatidos por choque térmico (com uso de água e gelo, na proporção de 1:1), eviscerados e descabeçados para retirada dos filés. Após filetadas, as carcaças dos peixes passaram por uma máquina

despolpadora, para retirada do músculo aderido aos ossos, obtendo-se um produto denominado carne mecanicamente separada (CMS). A CMS foi estabilizada (recebendo adição de polifosfato de sódio), embalada, congelada em câmara de congelamento a - 25°C, e posteriormente mantida em freezer a - 18°C. As amostras foram transportadas de Garça até Botucatu (aproximadamente 200 km) em caixas térmicas, permanecendo congeladas. Ao chegar ao laboratório, foram mantidas congeladas (-18°C).

4.1.1. Processamento do surimi

O surimi foi obtido por processamento manual. Foram utilizados 47 kg de CMS separados em embalagens de aproximadamente 1 kg. As amostras congeladas foram mantidas sob refrigeração a 5°C durante 24 horas, antes de serem manuseadas. Depois de descongeladas, foram submetidas a dois ciclos de lavagens sucessivas com água destilada fria, sendo o volume de água utilizado quatro vezes o peso da amostra. A temperatura da água durante a lavagem foi mantida em torno dos 5°C, com o uso de gelo moído.

Após cada lavagem, cuja duração foi em média um minuto, a CMS foi prensada manualmente em tecido de algodão. Ao final do processamento, foram adicionados crioprotetores: 2% de cloreto de sódio e 1% de sacarose. As amostras de surimi foram mantidas congeladas para posterior análises e elaboração dos hambúrgueres.

4.1.2 *Formulação do hambúrguer*

Para a elaboração dos hambúrgueres foram utilizados 20 kg de surimi, os quais foram divididos em duas partes: hambúrguer com amido (HA) e hambúrguer sem amido (HSA).

O hambúrguer sem amido foi formulado com as seguintes concentrações: surimi (96%); alho desidratado e cebola desidratada (2%) e sal (2%) enquanto que o hambúrguer com amido apresentou a seguinte formulação: Surimi (86%); amido de mandioca (10%); sal (2%); cebola e alho desidratados (2%). Depois de homogeneizadas as misturas foram enformadas em tubos PVC (revestidos com

bolsa de polietileno) e congelados a -18°C por 24 horas, sendo fatiadas com serra fita. Os hambúrgueres foram embalados individualmente e congelados crus para as análises.

4.1.3 Água de lavagem

As águas de lavagem das duas etapas foram coletadas em sacos plásticos e congeladas a -18°C até a utilização. As amostras do primeiro ciclo de lavagem foram levadas congeladas para o Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Araraquara para os testes enzimáticos. O resíduo aquoso foi centrifugado em Centrífuga analítica (Fanem Excelsa Baby II Modelo 206-R), por 3 minutos com rotação de 2665rpm, e filtradas em funil de Büchner equipado com filtro de papel.

4.2. Balanço de massa e de proteínas

4.2.1 Balanço de massa

O balanço de massa baseia-se no princípio de conservação de massa e para seu cálculo foram utilizadas as equações:

$$\text{Peso total CMS} = \sum_{\text{cms}} (n=48)$$

$$\text{Peso total surim} = \sum_{\text{surimi}} (n=48)$$

Peso total de água = 375,2 Kg (Medida em litros, como a densidade da água 1Kg/litro 1litro=1 Kg)

$$\text{Peso total de água de lavagem} = \text{peso total da água} + (\sum_{\text{cms}} - \sum_{\text{surimi}})$$

4.2.2. Balanço de massa de proteínas

$$\text{Peso total Proteína}_{\text{CMS}} = (\sum_{\text{cms}} \text{ \% proteína})/100$$

$$\text{Peso total Proteína}_{\text{surimi}} = (\sum_{\text{surimi}} \text{ \% proteína})/100$$

$$\text{Peso total de proteína na água} = 0$$

Peso total de proteína na água de lavagem= $(375,2 \cdot 0,5)/100$, sendo 0,5 g/100g o valor estimado de proteína na água de lavagem, com base no teor de umidade da água de lavagem.

4.3 Análises químicas

4.3.1. Composição química

A composição química do surimi, HSA e HA foi determinada a partir da análise de dez amostras de cada tratamento.

A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 24 horas (AOAC, 2005); e os lipídeos por extração com clorofórmio metanol, segundo método de Folch et al (1957).

A proteína bruta foi determinada pela análise de Kjeldahl (AOAC, 2005) - utilizando-se com fator de conversão de nitrogênio o valor de 6,25.

Para determinar o teor de proteínas no resíduo aquoso centrifugado e filtrado foi utilizado o método de Lowry et al (1951). A absorvidade estimada do albumina bovina sérica foi de 3,42 (mol.mL⁻¹).

A análise de cinzas foi realizada por incineração em mufla, em 550 ± 10°C (AOAC, 2005), pelo período aproximado de 4 horas, até a calcinação completa das amostras, isto é, cinzas brancas.

4.3.2. Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos totais foi realizada segundo os métodos de White, Hart e Fry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989). O aminoácido triptofano foi determinado de acordo com Spies (1967). A soma de todos os aminoácidos forneceu também o valor de proteínas. Estas análises foram realizadas nos hambúrgueres e surimi.

4.3.3. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A oxidação lipídica foi avaliada pela formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) de acordo com o método proposto por Vyncke (1970).

4.3.4. Atividade de água

A atividade de água foi medida por analisador de atividade de água, Aqualab 3T, da Decagon Devices (USA).

4.3.5. Análises morfológicas

As amostras de surimi, HSA e HÁ foram grelhadas a 100°C por 4 minutos. A análise morfológica, em microscopia eletrônica de varredura, foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu. Para a análise as amostras foram fixadas em glutaraldeído tamponado em 2,5% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 0,5% por 30 minutos, desidratadas em etanol e secas em ponto crítico com CO₂. As amostras foram metalizadas com íons de ouro e elétron-micrografadas no aparelho Quanta 200 - FEI COMPANY.

4.4. Produção de hidrolisado protéico com água de lavagem

Para a produção dos hidrolisados da água de lavagem foram testadas três condições. Na 1ª condição testada utilizou-se 10 mL de água de lavagem e 10 µL de enzima Alcalase, a 2ª condição utilizou 10 mL de água de lavagem centrifugada e filtrada e 10 µL de enzima Alcalase e a 3ª condição testada utilizou 10 mL de água de lavagem centrifugada e filtrada com pH modificado para 8,5 e 10 µL de enzima Alcalase. Os erlenmeyers com os testes de hidrolisado foram levado ao banho-maria, a 50°C, por 120min. Ao término da cinética foram retiradas amostras para a eletroforese SDS-PAGE.

4.4.1. Análise de peptídeos e aminoácidos do hidrolisado

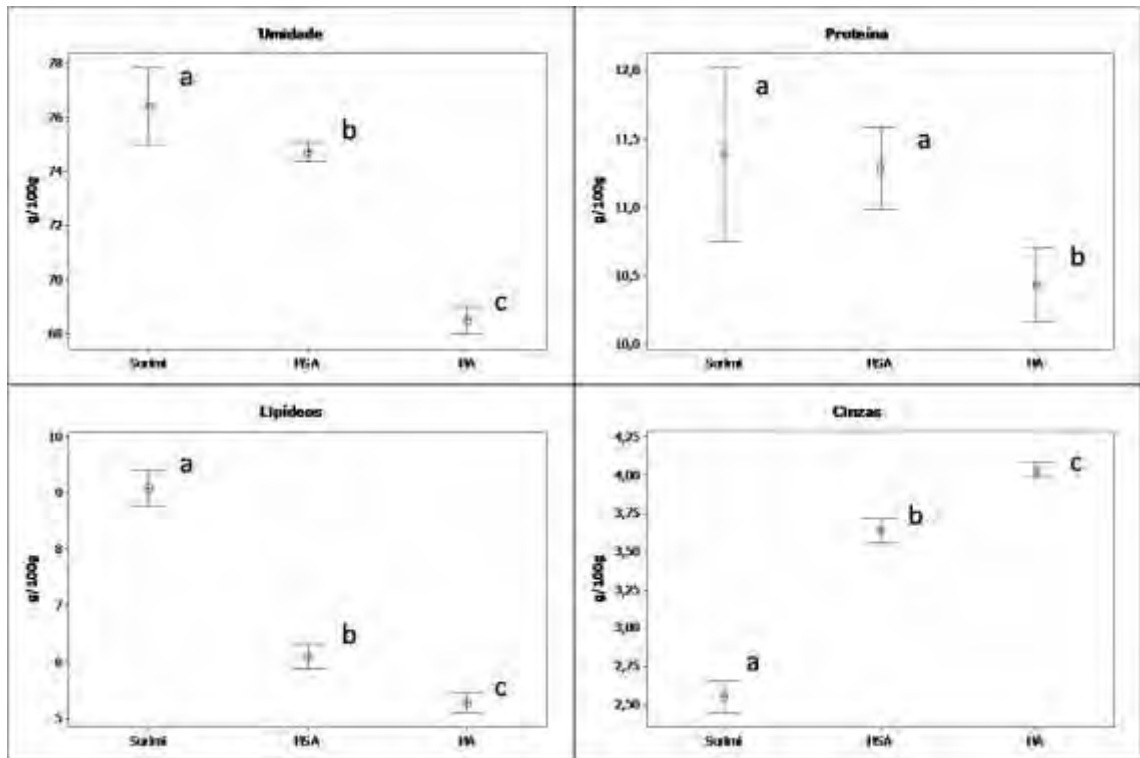
O método de McDonald e Chen (1965) foi utilizado para estimar o produto de reação liberado pelas enzimas. As alíquotas tomadas de tempos 0, 30, 60 e 120 minutos de reação foram analisados. As leituras de absorbância foram feitas em λ 700 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando aminoácido tirosina da Riedel-de-Haën como padrão. A absorvidade estimada foi de 0,48 (mol.mL⁻¹).

4.4.2. Eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE

A determinação dos perfis eletroforéticos do resíduo centrifugado e filtrado, do hidrolisado do resíduo centrifugado e filtrado e do hidrolisado do extrato centrifugado, filtrado com pH 8,5 foram realizados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (LAEMMI, 1970). Alíquotas de 200 μ L foram retiradas do ensaio enzimático, após 120min de reação, e da amostra não hidrolisada. As três amostras foram diluídas em tampão redutor (Tris-glicina 0,5M, pH 6,8, SDS 10%, β -Mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas durante um minuto a 100°C. As eletroforeses SDS-poliacrilamida (12% e 7% w/v) foram realizadas com base no método Laemmli (1970). Amostras de 5 e 10 μ L da solução do resíduo centrifugado e filtrado e 20 μ L de cada hidrolisado foram aplicadas nos géis e o tempo de corrida foi de 2 horas a 40 mA. Para o padrão de massa molar (Amershan Biociências GE) foram adicionados 10 μ L. Após a corrida, os géis foram mantidos em solução de Coomassie R-250 0,2%, durante 3 horas, e descorados em solução de metanol 30% e ácido acético 10%. Após ser descorado, o gel de 12% de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata de acordo com método proposto por Oakley et al (1980).

O peso molecular das bandas foi determinado por comparação com peso molecular entre 14,4 kDa (α -lactoalbumina) e 97 kDa (fosforilase b).

os crioprotetores, pois a umidade desejada antes da mistura é de 80 a 82% (PARK E LIN, 2007). Na classificação da qualidade do surimi, o teor de umidade final é um fator importante, e os percentuais recomendados variam de 72 a 77% (PARK E LIN, 2005). Os resultados de umidade (76,4%) indicam que o processo de retirada manual da água de lavagem foi eficiente para manter a qualidade do surimi.



Médias±DP seguidas de letras diferentes demonstram diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05). (n=10)

Figura 3 – Teores de umidade (%), proteína (%), lipídeos (%) e cinzas (%) para surimi, hambúrguer de surimi de tilápia sem amido (HSA) e hambúrguer de surimi de tilápia com amido (HA).

O menor teor de umidade no HA pode se explicado pela adição da fécula de mandioca. A adição de amido ao surimi causa o inchaço nos grânulos de amido incorporados no gel de proteínas, a matriz proteica é comprimida, levando a diminuição da umidade e tornando o gel mais firme (KIM E LEE, 1987).

O teor de proteínas contido no surimi e no HSA é significativamente diferente do HA (Figura 3). A diferença entre os resultados pode ser explicada pela presença

de 10% de amido de mandioca no HA, o que diminuiu o teor protéico do mesmo. Em estudos realizados com surimi de tilápia os teores de proteína variaram de 11,9% a 14,81% (VAZ, 2005; FOGAÇA, 2009).

O teor de lipídeos do surimi foi elevado ($9,08 \pm 0,44\%$). Este resultado se deve a matéria-prima utilizada, pois a CMS pode ter grande variação na concentração de lipídeos em função da matéria-prima utilizada. Segundo Fogaça (2009), a grande quantidade de gordura encontrada na região ventral do filé de tilápia, chamada de “apara da filetagem”, pode elevar a quantidade de lipídeo presente na matéria-prima. Por outro lado a CMS utilizada como matéria prima pode conter maior quantidade de músculo vermelho, que acumula maior quantidade de lipídeos (FIGUEIREDO, 2009). Os hambúrgueres também apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). A presença do amido de mandioca aumentou o teor de carboidratos na formulação e por consequência reduziu o de lipídeos.

Os resultados de cinzas para o surimi, HSA e HA foram estatisticamente diferentes (Figura 3). Estes valores podem ser explicados pela própria formulação do surimi e dos hambúrgueres. O menor valor foi obtido para o surimi (2,55%), onde houve apenas a adição de cloreto de sódio (2%) e sacarose (1%), seguido do HSA, com 3,63% de cinzas. Neste hambúrguer foi adicionado além do surimi, outros 2% de cloreto de sódio e condimentos. O HA apresentou maior teor de cinzas (4,03%), neste hambúrguer além dos componentes do HA foram adicionados 10% de amido de mandioca. Assim, durante o processo de incineração, houve o aumento do teor de minerais pela calcinação dos produtos adicionados e do amido.

6.3.1. Perfil aminoacídico do surimi e dos hambúrgueres

Os resultados dos aminoácidos totais do surimi, do HSA e do HA (Tabela 1) foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$), porém para o hambúrguer com amido foi encontrado menor valor de aminoácidos, resultado que concorda com a análise de proteínas (Figura 3).

Tabela 1 – Perfil de aminoácidos do surimi de CMS de tilápia, do hambúrguer sem amido (HSA) e hambúrguer com amido (HA) (g/100g).

Determinação de aminoácidos totais	Surimi ¹	HSA ²	HA ³
Histidina	0,22±0,03 ^a	0,23±0,00 ^a	0,21±0,00 ^a
Isoleucina	0,53±0,00 ^a	0,50±0,03 ^a	0,44±0,01 ^b
Leucina	0,82±0,03 ^a	0,77±0,01 ^a	0,7±0,02 ^b
Fenilalanina	0,43±0,00 ^a	0,41±0,02 ^a	0,38±0,01 ^b
Lisina	0,91±0,00 ^a	0,88±0,06 ^a	0,79±0,03 ^b
Triptofano	0,23±0,00 ^a	0,27±0,02 ^b	0,22±0,01 ^a
Valina	0,59±0,01 ^a	0,55±0,03 ^a	0,50±0,00 ^b
Metionina	0,29±0,08 ^a	0,33±0,00 ^a	0,33±0,02 ^a
Treonina	0,56±0,12 ^a	0,58±0,10 ^a	0,54±0,08 ^a
Alanina	0,73±0,01 ^a	0,66±0,07 ^a	0,64±0,02 ^a
Prolina	0,52±0,02 ^a	0,49±0,05 ^a	0,47±0,04 ^a
Tirosina	0,42±0,00 ^a	0,41±0,05 ^a	0,37±0,03 ^a
Cistina	0,35±0,04 ^a	0,29±0,04 ^a	0,25±0,04 ^a
Ácido aspártico	1,18±0,09 ^a	0,99±0,28 ^a	0,96±0,07 ^a
Ácido glutâmico	2,15±0,04 ^a	1,90±0,41 ^a	1,96±0,12 ^a
Serina	0,47±0,03 ^a	0,47±0,06 ^a	0,45±0,03 ^a
Glicina	0,73±0,03 ^a	0,67±0,07 ^a	0,65±0,06 ^a
AAE/AANE	0,62	0,67	0,62
AAT	12,03±0,21 ^a	11,34±1,35 ^a	10,72±0,60 ^a

¹ Surimi n=3; ² HSA n=3; ³ HA n=3; letras minúsculas diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Verifica-se que HA diferiu significativamente das duas outras amostras para alguns aminoácidos essenciais (valina, isoleucina, leucina, lisina e fenilalanina), o que pode ser atribuído à formulação do hambúrguer. Para o HA houve a adição de 10% do amido de mandioca que contribui com a diminuição do teor de aminoácidos.

A somatória dos aminoácidos totais nos produtos surimi, HSA e HA foram próximos aos valores obtidos na análise de proteínas pelo método de Kjeldahl,

sugerindo que o fator de conversão utilizado (6,25) não subestimou o valor real de proteínas.

O valor nutritivo de um alimento ou de uma dieta deve ser analisado sob os aspectos quantitativo e qualitativo, e para satisfazer às necessidades do ser humano é necessário que os nutrientes estejam em quantidades adequadas (SGARBIERI, 1987). Na tabela 4 estão apresentados os valores do escore químico do surimi, HSA e HA comparados ao padrão FAO para crianças de 2 a 5 anos. Os resultados obtidos mostraram que os perfis aminoacídicos foram inferiores ao recomendado pela FAO. No entanto, nenhum aminoácido essencial está ausente no surimi, HSA e HA comprovando a boa qualidade nutricional dos produtos avaliados.

6.3.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Os valores de SRATB (Figura 4) são utilizados como indicadores do grau de oxidação lipídica, sendo quantificados em miligramas de malonaldeído (MDA), que é a principal substância formada durante a oxidação e que reage com o ácido tiobarbitúrico. A taxa de oxidação lipídica é um fator importante para ser analisado em pescado e seus subprodutos, pois em surimi há maior exposição do tecido muscular ao oxigênio permitindo maior oxidação e cujos produtos são responsáveis pela diminuição da qualidade (JIN et al, 2007; TOKUR et al, 2004).

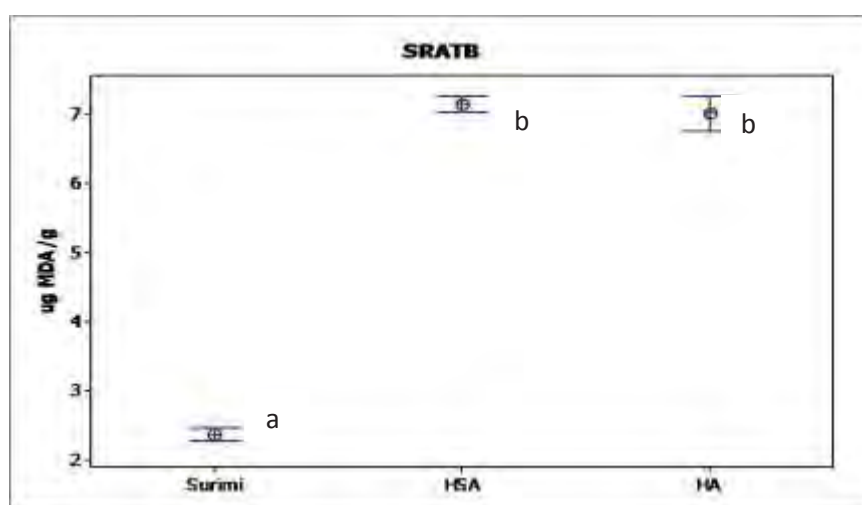


Figura 4– Taxa de oxidação lipídica do surimi, hambúrguer sem amido (HSA) e hambúrguer com amido (HA), expressa em SRATB (μg MDA/g).(n=6)

A fabricação de surimi permite a remoção da maior parte dos produtos primários e secundários (pigmentos, sangue, lipídios e compostos heme) da oxidação lipídica (EYMARD et al., 2005) justificando o menor valor obtido pelo surimi para a taxa de oxidação lipídica, 2,37 μ g MDA/g. A figura 4 mostra que não houve diferenças estatísticas entre a amostra de HA (6,97 μ g MDA/g) e de HSA (7,14 μ g MDA/g). Estes resultados foram superiores ao encontrado no surimi, possivelmente devido a elaboração dos hambúrgueres, pois a matéria-prima passou por congelamento e posterior descongelamento, seguido da adição de outros ingredientes (condimentos, cloreto de sódio e fécula de mandioca). O alto conteúdo de lipídeos tem implicações durante estocagem, processamento estabilidade e na qualidade nutricional do produto (HULTIN et al, 2005). Santos et al (2007) observaram a necessidade de adotar medidas que permitam reduzir a oxidação durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos para proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade.

6.3.3. Atividade de Água

A atividade de água (A_w) no surimi manteve-se elevada (0,991), apresentando valores próximos aos do surimi de carapau (0,989), de merluza (0,987) (ALVAREZ-PARRILLA, PUIG E LLUCH, 1997) e de tilápia (0,985-0,989) (FOGAÇA, 2009).

A adição de sais, de açúcar e de outras substâncias provoca a redução do valor de A_w de um alimento. Água ligada a macromoléculas por forças físicas não está livre para agir como solvente ou para participar de reações químicas (FRANCO, 2003). Observa-se, na Figura 5, o efeito do sal na diminuição da atividade de água dos hambúrgueres, e estes resultados estão relacionados com a diminuição de água livre pela adição de cloreto de sódio, durante o preparo, e pela formação de uma rede entre as proteínas miofibrilares por pontes de hidrogênio (ALVAREZ-PARRILLA PUIG E LLUCH, 1997).

Cabe ressaltar que os valores de atividade de água são elevados, sendo estes produtos suscetíveis à deterioração decorrente da atividade metabólica de microrganismos que necessitam de um limite mínimo da atividade de água, variando de 0,8 a 0,9. (MARENGONI et al, 2009).

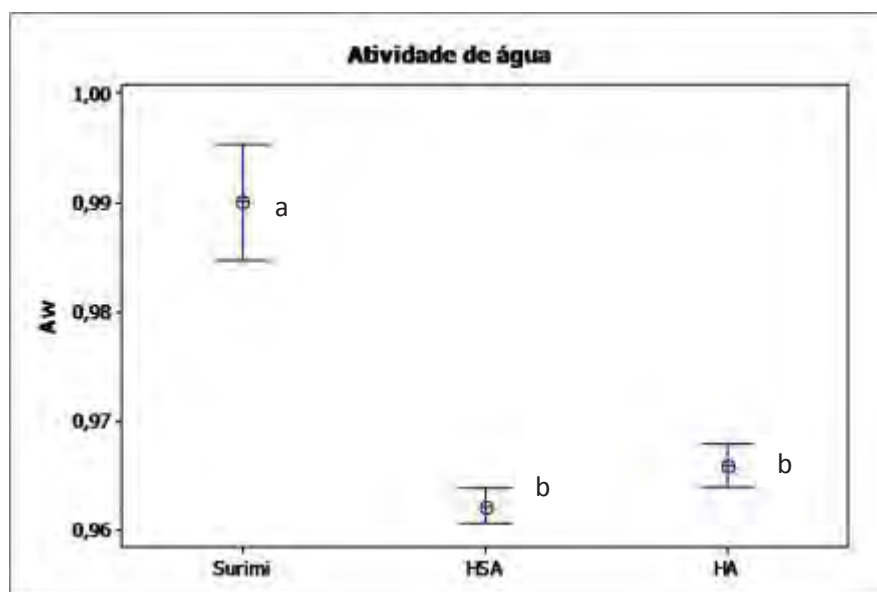


Figura 5 – Valores de atividade de água (Aw) para surimi, hambúrguer de surimi de tilápia sem amido (HSA) e hambúrguer de surimi de tilápia com amido (HA) (n=10)

6.4. Microestruturas do surimi e dos hambúrgueres

As eletromicrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) correspondem às formulações: 1) surimi (Figura 6); 2) HSA (Figura 7); 3) HA (Figura 8).

As formulações apresentaram diferenças estruturais entre si e de modo geral a textura do produto com amido apresenta uma rede de malhas irregulares enquanto que o gel do surimi e do hambúrguer sem amido apresentaram-se mais compactos e densos, e com uma rede interligada de fios de proteínas. O gel possui fios interligados formando uma rede tridimensional de proteínas (RAWDKUEN E BENJAKUL, 2008). Essa camada de fibras mais homogêneas, apesar de ser característica de gel induzido termicamente (AGUILERA E STANLEY, 1999), não proporciona estabilidade ao produto (FOGAÇA, 2009)

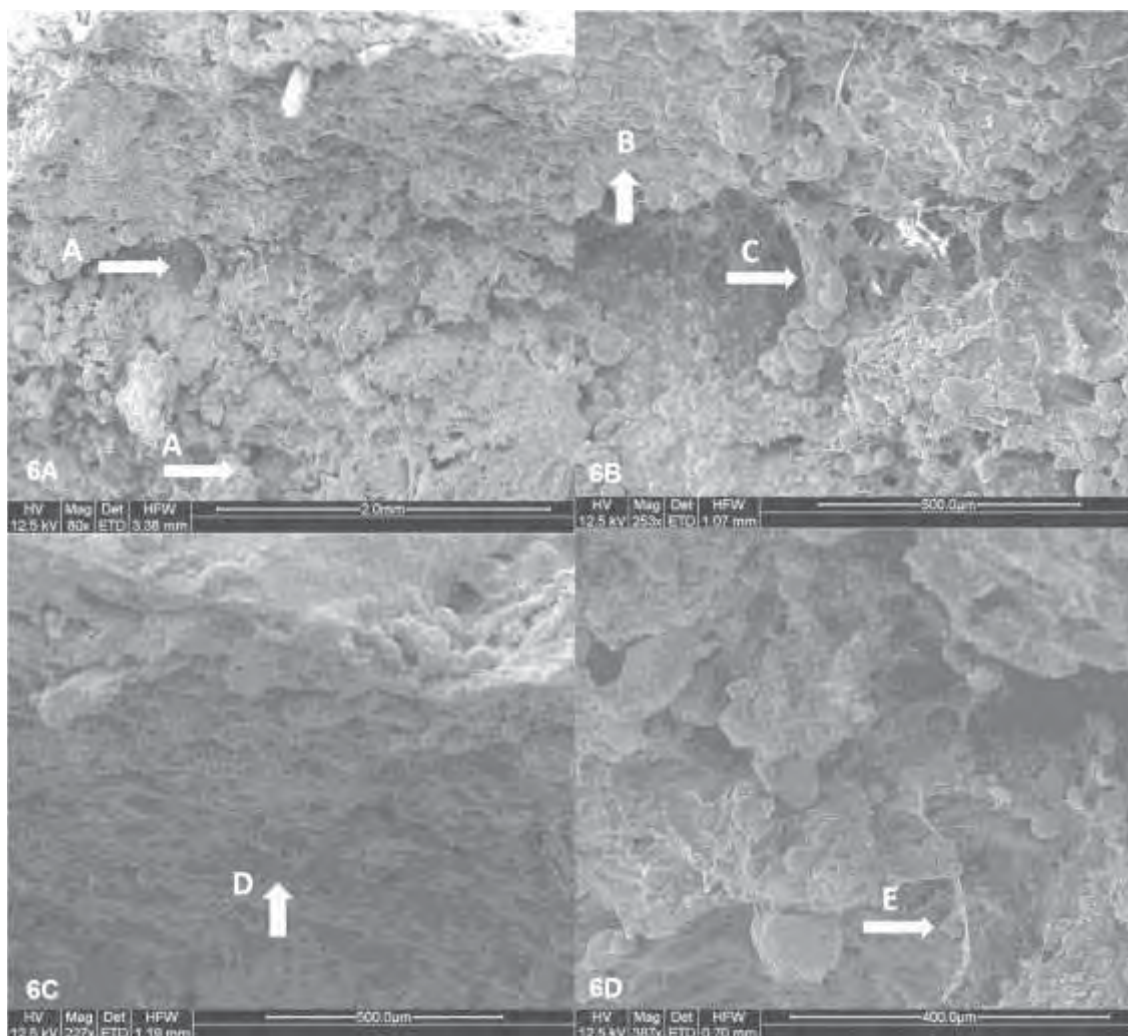


Figura 6– Surimi de tilápia. Imagem 6A - Regiões com orifícios de ar entre a estrutura do surimi (A). 6B – Detalhe dos glóbulos de gordura aprisionados na matriz proteica (B) e fibra proteica envolta em glóbulos de gordura (C). 6C – Matriz proteica do surimi (D). 6D – Detalhe do resíduo de tecido conjuntivo remanescente (E).

O gel de surimi apresentou uma estrutura densa e marcada pela presença de orifícios (Imagem 6A - detalhe A) em sua matriz protéica, o que segundo Couso et al (1998) é característica de produtos com maior teor de umidade. Nota-se que na imagem 6B (detalhe B) há muitas gotículas de gordura, confirmando os resultados verificados anteriormente nas análises químicas (Figura 3), o que sugere que a CMS utilizada como matéria prima continha maior quantidade de músculo vermelho. Nas imagens 6B e 6D verifica-se a presença de fibra protéica (C) e de tecido conjuntivo (E) indicando que os dois ciclos de lavagem não descaracterizaram o produto, mantendo seu valor nutricional.

A imagem 6C (detalhe em D) do surimi assemelha-se ao resultado obtido por Phu, Morioka e Itoh (2010) ao descreverem a estrutura do surimi de corvina (croaker) como um gel fino e menos regular. A formação dessa rede de proteínas miofibrilares é responsável pela maior capacidade de retenção de água e pelas propriedades funcionais do surimi (HERNANDO et al, 2010).

As imagens 7A e 7B (Figura 7) mostram a presença de um resíduo de tecido conjuntivo (detalhe E) bem com as porções do produto com orifícios de ar (detalhe F). Estes orifícios foram também reportados por Hossain, Morioka e Shikhal (2011) em surimi de polaca (*Theragra chalcogramma*), e estes autores sugeriram que o aquecimento a 70-80°C pode provocar o rompimento da fina rede de proteínas, devido ao excesso de interações proteína-proteína.

A textura pode ser afetada pela maior retenção de água durante o processamento e a dilatação do ar ocluído durante o processo de cocção (FOGAÇA, 2009; TABILO-MUNIZAGA E BARBOSA-CÁNOVAS, 2005). Este fato pode ser observado na Figura 7, onde a superfície apresenta uma estrutura reticular protéica, podendo-se distinguir regiões de alta (Imagem 7C - G) e baixa (Imagem 7C - H) densidade protéica. Outro fator que pode afetar a textura do produto é a presença de lipídeos, já que estes apresentam glóbulos maiores e poder extravasar a matriz proteica. Na imagem 7D é possível verificar a presença das fibras protéicas (I), o que indica que a lavagem realizada para a obtenção do surimi não foi suficiente para descaracterizar totalmente a estrutura do músculo, e que mesmo após tratamento térmico para indução da formação do gel de surimi, não houve desnaturação de toda proteína miofibrilar do surimi. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Fogaça (2009).

O gel com amido foi semelhante ao encontrado por Rawdkwen e Benjakul (2008) ao adicionar concentrado de soro de leite em surimi de peixe lagarto (*Synodus synodus*). A microestrutura do gel peixe lagarto consistiu em um grande número de poros e géis formados por uma associação ordenada de moléculas de proteína, estes poros também são verificados na Figura 6 (imagem 8A - J). As ligações cruzadas reforçam as pontes de hidrogênio nos grânulos de amido. Estas ligações cruzadas entre o amido e as proteínas resiste a alta temperatura, baixo pH e alto cisalhamento e melhora a propriedades de viscosidade e textura do amido (NABESHIMA E GROSSMAN, 2001).

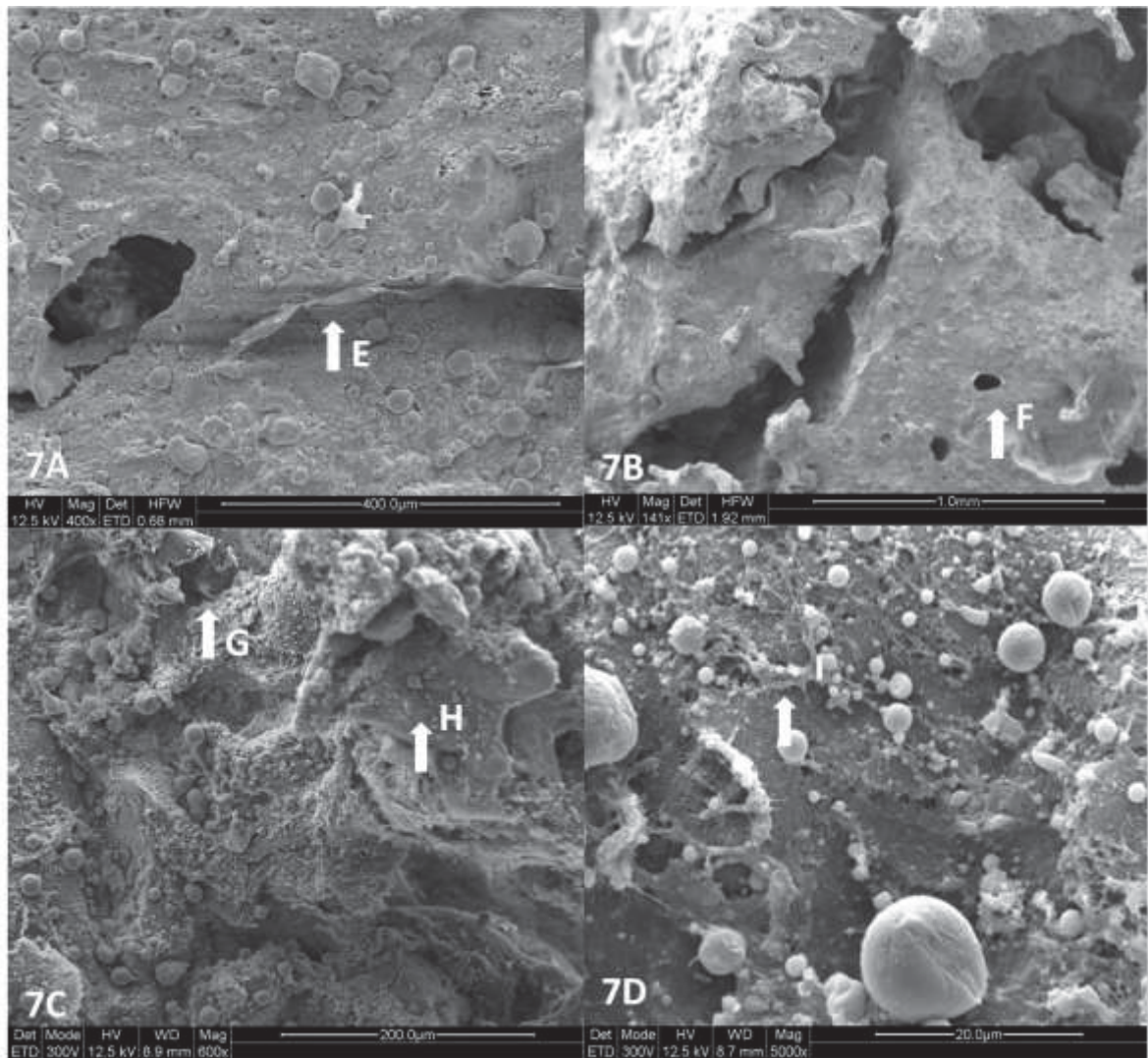


Figura 7 – Hambúrguer de surimi de tilápia sem amido. Imagem 7A - Região com presença de tecido conjuntivo (E). 7B – Região mais densa e opaca, com orifícios de ar (F); 7C – Detalhe da região com alta densidade proteica (G) e baixa densidade (H); 7D – Detalhe das fibras de proteína (I).

As imagens 8B e 8C (Figura 8) demonstram a presença da fibra de proteína, além de regiões em que o ar ficou ocluído durante a cocção. Em estudos de emulsão processada com músculo de tilápia, Moreira et al (2006) encontraram superfície com orifícios de ar e porções de músculo, com distribuição irregular, contendo geralmente, duas a três fibras musculares, conservando o padrão de músculo esquelético - o mesmo perfil verificado nas imagens 8B e 8C (Figura 8).

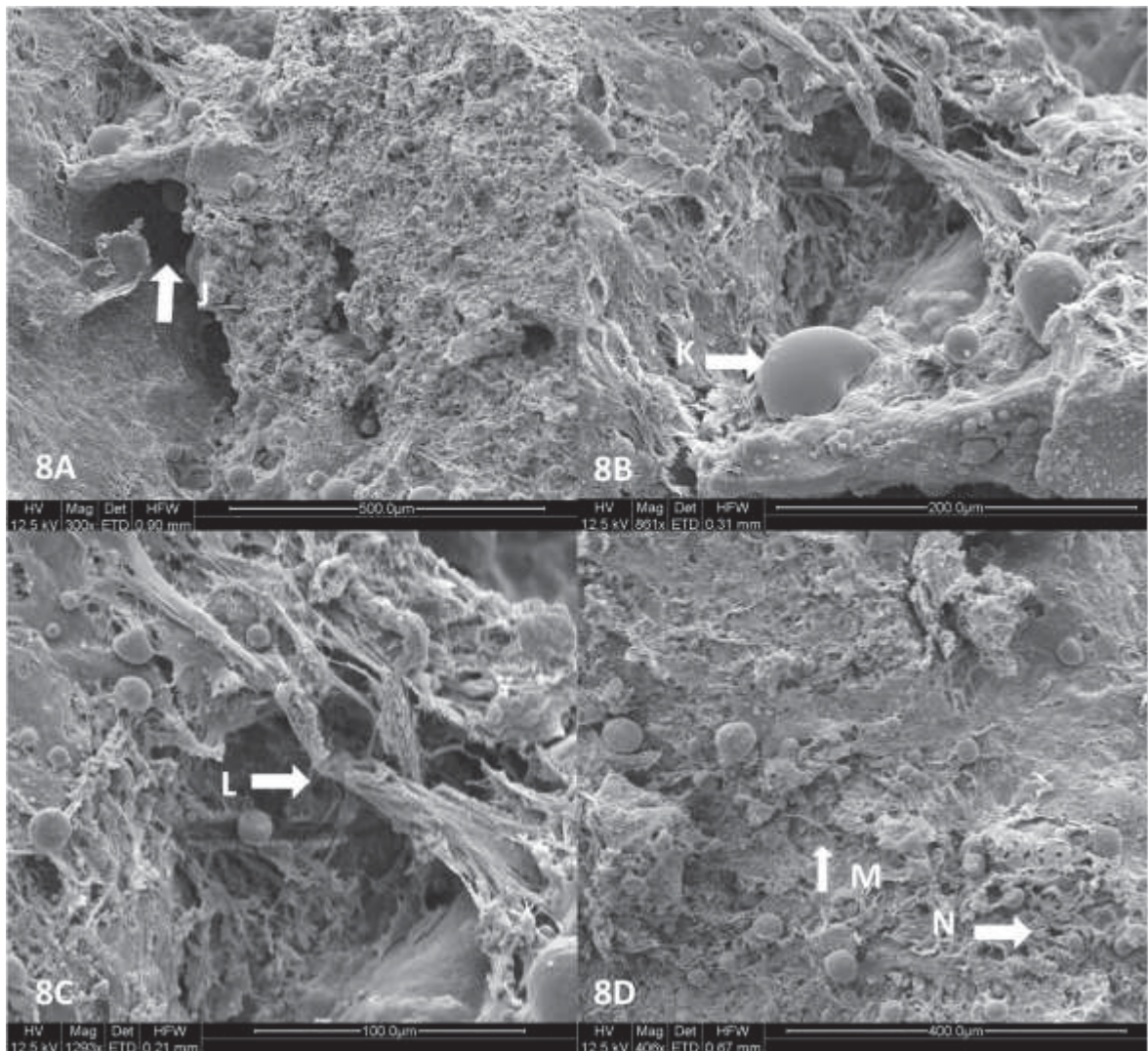


Figura 8– Hambúrguer de surimi de tilápia com amido. Imagem 8A - Região com orifício de ar entre a estrutura do hambúrguer (J). 8B – Grânulo amorfo de amido (K). 8C – Detalhe da fibra protéica rompida (L). 8D – Detalhe das fibras de proteína (M) e dos glóbulos de gordura aprisionados pela estrutura do amido (N).

A morfologia do HA foi favorecida pela presença dos glóbulos de gordura e rede de amidos envolvidos pela matriz protéica.

6.5. Hidrolisado proteico

As proteínas sarcoplasmáticas podem ser recuperadas dos subprodutos de tilápia pela elaboração de hidrolisados proteicos. A utilização de proteínas sarcoplasmáticas permite usar eficientemente a matéria-prima e reduzir o fluxo de resíduos (YONGSAWATDIGUL E PIYADHAMMAVIBOON, 2007).

A recuperação destas proteínas pode ser feito com a hidrólise das proteínas da água de lavagem. Inicialmente foi realizado a análise proteica no resíduo aquoso pelo método de Lowry et al (1951), o qual foi de 9,8 g/L.

A hidrólise enzimática foi realizada sob as mesmas condições para o resíduo aquoso, resíduo aquoso centrifugado e filtrado e resíduo aquoso centrifugado, filtrado e com pH modificado para 8,5. Ao término da cinética, verificou-se a concentração de aminoácidos formados. Conforme demonstrado na Tabela 2 às unidades totais de aminoácidos não aumentaram em todas as condições testadas quando comparados aos resultados obtidos para os tempos de 0 a 120 minutos de reação. Sob as condições 1 e 2 o produto de hidrólise teve um aumento de aproximadamente 2,8 e 27 vezes, respectivamente e 3,4 vezes quando submetido à condição 3, comparando-se os valores entre o tempo inicial e final da cinética.

Tabela 2. Produção de aminoácidos resultantes da cinética da hidrólise do resíduo aquoso por Alcalase.

Ensaio	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo
	0 min	30 min	60 min	120 min
Condição 1	0,042 mg/mL	0,104 mg/mL	0,079 mg/mL	0,121 mg/mL
Condição 2	0,004 mg/mL	0,096 mg/mL	0,096 mg/mL	0,108 mg/mL
Condição 3	0,017 mg/mL	0,117 mg/mL	0,088 mg/mL	0,058 mg/mL

Condição 1: reação feita a 50° C com resíduo aquoso e alcalase; Condição 2: reação feita a 50°C com resíduo aquoso centrifugado e filtrado com alcalase; Condição 3: reação feita a 50°C com resíduo aquoso centrifugado e filtrado com alcalase e pH: 8,5.

Estes valores demonstram que há variação na taxa de hidrólise das proteínas do resíduo aquoso durante o experimento. A melhor eficiência catalítica foi alcançada quando as reações foram realizadas a 50°C na condição 2. No entanto, nota-se

que houve diminuição dos produtos formados e não houve aumento exponencial na formação de aminoácidos durante o ensaio, sugerindo que houve uma hidrólise parcial.

Após a cinética enzimática foi realizada a eletroforese SDS-PAGE do resíduo aquoso. A análise das bandas eletroforéticas permitiu verificar que houve hidrólise das proteínas sarcoplasmáticas, um dos objetivos do presente trabalho, porém, de forma parcial.

O perfil eletroforético do resíduo aquoso revelou múltiplas bandas com diferentes pesos moleculares. A intensidade e a concentração das bandas variaram entre o resíduo aquoso com e sem hidrólise, houve diferenças também entre os métodos aplicados: eletroforese com coloração em prata (Figura 9) e com coloração com Coomassie Blue (Figura 10). A eletroforese com coloração em prata (Figura 9) revelou algumas bandas de proteínas que não desapareceram completamente. Assim, pode-se dizer que a hidrólise não foi completa, sob estas condições, corroborando com os resultados obtidos com a análise de aminoácidos do hidrolisado.



Figura 9 – Eletroforese em gel de poliácridamida (7%). P= padrão; A= resíduo aquoso (5µL) – condição 1; B= resíduo aquoso (10 µL) - condição 1; C= hidrolisado de resíduo aquoso – condição 2; D= hidrolisado de resíduo aquoso – condição 3 (pH: 8,5)

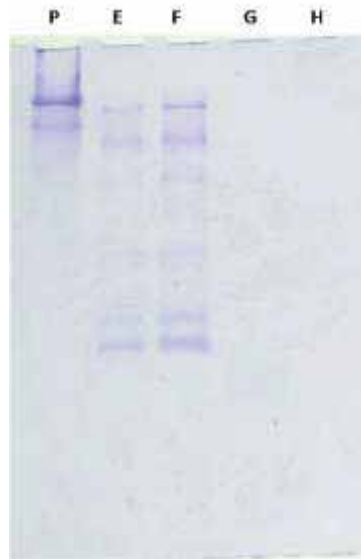


Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%). P= padrão; E= resíduo aquoso (5 μ L) – condição 1; F= resíduo aquoso (10 μ L) – condição 2; G= hidrolisado de resíduo aquoso – condição 3; H= hidrolisado de resíduo aquoso (pH: 8,5) – condição 4.

O gel realizado com 12% de poliacrilamida, por apresentar os seus poros maiores, permitiu que as proteínas das colunas A, B e C (Figura 9) de maior peso molecular entrassem no gel e pudessem ser separadas em suas bandas. A banda próxima a 30 kDa (linha C e G – Figuras 9 e 10, respectivamente) sugere ser a cadeia leve da miosina (MOOSAVI-NASAB et al, 2005). Quando os métodos de coloração foram comparados, pôde-se verificar que algumas bandas ficaram bem mais evidentes na Figura 9, como é o caso do grupo de proteína entre 30 a 45 kDa da amostra de hidrolisado de resíduo aquoso (linha C). Esta diferença entre os métodos de coloração era esperada devido à maior sensibilidade da coloração com nitrato de prata que é capaz de detectar de 0.1 a 1.0 ng de proteína, enquanto a sensibilidade do Coomassie Brilliant Blue é de 100 ng de proteínas (PATTON, 2002).

Os dois géis apresentaram para os hidrolisados, com e sem modificação de pH, bandas protéicas abaixo de 14,4 kDa – última banda do padrão de proteínas; sugerindo uma hidrólise parcial, pois restaram bandas de maior peso molecular, principalmente para o hidrolisado sem alteração de pH. As eletroforeses mostram

que se formaram dipeptídeos e poucos aminoácidos no final das linhas C e D (Figura 9) e G e H (Figura 10).

Estes resultados demonstram que as proteínas do resíduo da água de lavagem obtido do processamento de surimi quando hidrolisadas, podem ser utilizadas para alimentação. Estudos suplementares como, por exemplo, a coacervação dos produtos de hidrólise com carboximetilcelulose permitiriam o uso industrial destes hidrolisados.

7. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que foi possível elaborar produto reestruturado (hambúrguer), com teor de umidade desejável utilizando processamento manual para a obtenção do mesmo. A composição centesimal obtida para os hambúrgueres está dentro dos valores determinados para outras espécies, podendo ser considerado produto de boa qualidade nutricional.

As micrografias dos hambúrgueres apresentaram orifícios de ar característicos de produtos reestruturados, e algumas fibras musculares isoladas. O estudo comprovou que a lavagem e a adição de amido de mandioca ao músculo da tilápia transformam a proteína original em um tecido flexível e modelável, proporcionando a utilização do surimi na elaboração de diversos tipos de produtos.

O resíduo do processamento (água de lavagem do surimi) possui proteínas que ao serem hidrolisadas podem ser utilizadas na alimentação. Estudos futuros são necessários para a utilização dos hidrolisados para o uso industrial.

8. Referências

AGUILERA, J. M. Why food microstructure? **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 67, n. 1-2, p. 3-11, 2005.

AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. Gels. In: AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. **Microstructural principles of food processing and engineering**. 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999. p. 232-239.

ALVAREZ-PARRILLA, E.; PUIG, A.; LLUCH, M. A. Preparation and chemical and microstructural characterization of surimi from hake (*Merluccius merluccius*) and

horse mackerel (*Trachurus trachurus*). **Food Science and Technology Internacional**, London, v. 3, n. 1, p. 49-60, 1997.

AMERICAN ORGANIZATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. 18. ed. Arlington: AOAC, 2005.

BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.17, n. 5, p. 447-460, 2005.

BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996, p.157-224.

BLANCO, M. et al. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 29-36, 2007.

BONJOCH, N. P.; TAMAYO, P. R. Protein content quantification by Bradford method. In: ROGER, M. J. R. **Handbook of plant ecophysiology techniques**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 283-295.

BOOMAN, A. et al. Design and testing of a fish bone separator machine. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 474-479, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Maryland Heights, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCHHEIM, W. Foodstuffs. In: ROBARDS, A. W.; WILSON, A. J. **Procedures in electron microscopy**. London: John Wiley, 1998, p. 45-68.

CHOMNAWANG, C. et al. Chemical and biochemical changes of hybrid catfish fillet stored 4°C and its gel properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 420-427, 2007.

COUSO, I. et al. Morphology of starch in surimi gels. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, Heidelberg, v. 206, n.1, p. 38-43, 1998.

DUTRA, J. E.; MARCHINI, J. S. Carboidratos. In: DUTRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 76-78.

EYMARD, S. et al. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 85, n. 10, p. 1750-1756, 2005.

FIGUEREDO, P. N. V. **Perfil Lipídico de cinco espécies de peixes capturados na região do Oiapoque – Amapá**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

FOGAÇA, F. H. S. **Caracterização do surimi de tilápia do Nilo: morfologia e propriedades físicas, químicas e microbiológicas**. 2008. 75 f. Tese (Doutorado em

Aquicultura)-Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010.
Disponível em:
<http://www.codexalimentarius.net/download/Standards/10273/CXP_052s.pdf>.
Acesso em: 05 jun. 2010.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011.
Disponível em:
<http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/FI/5.5.23/figis/webapps/figis/temp/hqp_4090.xml&outtype=html> Acesso em: 08 out. 2011.

FRANCO, B. D. M. Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 5. ed., São Paulo: Atheneu, 2003. p.13-16.

GÁSPAR, L. General laboratory methods. In: ISTVÁN, K. **Methods of protein analysis**. New Jersey: John Wiley & Sons, 1984. p. 58-60.

GEHRING, C.K. et al. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 124, n. 2, p. 422-431, 2011.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HERNANDO, I. et al. Microstructure. In: NOLLET, L.M.L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of seafood and seafood products analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 139-152.

HOSSAIN, M. I.; MORIOKA, K.; SHIKHA, F. H. Effect of preheating temperature on the microstructure of walleye pollack surimi gels under the inhibition of the polymerization and degradation of myosin heavy chain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 91, n. 2, p. 247-252, 2011.

HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Effects of water, oil, starch, calcium carbonate and titanium dioxide on the colour and texture of threadfin and hairtail surimi gels. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 387-393, 2002.

HULTIN, H. O. et al. Process for recovery of functional proteins by pH shifts. In: PARK, J. W. **Surimi and surimi seafood**. 2. ed. Boca Raton: Taylor and Francis. 2005. p.107-139.

- HUNT, A.; GETTY, K. J. K.; PARK, J. W. Roles of starch in surimi seafood: a review. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 299-312, 2009.
- JACZYNSKI, J. Proteins, lipid recovered from fish-processing by-products. **Global Aquaculture Advocate**, St. Louis, v. 8, n. 2, p. 34-36, 2005.
- JAMES, C. S. **Analytical chemistry of foods**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 41-42.
- JIANG, S. T. et al. Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 65, n. 4, p. 694-699, 2000.
- JIN, S. K. et al. The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. **Poultry Science**, Savoy, v. 86, n. 12, p. 2676-2684, 2007.
- KAMIZAKE, N. K. K. et al. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 16, n. 4, p. 507-516, 2003.
- KIM, J. M.; LEE, C. M. Effect of starch of textural properties of surimi gel. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 52, n. 3, p. 722, 1987.
- KIRSCHNIK, P. G.; MACEDO-VIEGAS, E. M. Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a -18 °C. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n.1, p. 200-206, jan./mar. 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LARREA, V. et al. Microstructural changes in Teruel dry-cured ham during processing. **Meat Science**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 574-582, 2007.
- LEE, C. M. Surimi process technology. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 11, p. 69-80, 1984.
- LEE, C. M. Surimi manufacturing and fabrication of surimi-based products. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 118-124, 1986.
- LEE, H. G.; LANIER, T. C.; HAMANN, D. D. Covalent cross-linking effects on thermo-rheological profiles of fish protein gels. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 62, n. 1, p. 25-28, 1997.
- LI, J-Y.; YEH, A. Functions of starch in formation of starch-meat composite during heating. **Journal of Texture Studies**, Hoboken, v. 33, n. 4, p. 341-366, 2002.
- LINDEBOOM, N. et al. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

- LIU, R. et al. Effect of pH on the gel and secondary structure of fish myosin. **Food Chemistry**, London, v. 121, n. 1, p. 196-202, 2010.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACKIE, I. M. Surimi from fish. In: JOHNSTON, D. E.; KNIGHT, M. K.; LEDWARD, D. A. **The chemistry muscle-based foods**. Cambridge: Royal Chemistry Society, 1992. p. 207-221.
- MAHANN, L. K.; ESCOTT- STUMP, S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: MAHANN, L. K.; ESCOTT- STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Rocca, 2002. p. 36.
- MAIEVES, H. A. et al. Selection of cultivars for minimization of waste and of water consumption in cassava starch production. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 224-228, 2011.
- MARENGONI, N. G. et al. Caracterização microbiológica, sensorial e centesimal de *fishburgers* de carne de tilápia mecanicamente separada. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 168-176, jan./mar. 2009.
- MARIOTTI, F.; TOMÉ, D.; MIRAND, P. P. Converting nitrogen into protein-beyond 6.25 and Jones' factors. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 48, n. 2, p. 177-184, 2008.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, A. M. et al. Alternatives for efficient and sustainable production of surimi: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 8, n. 4, p. 359-374, 2009.
- MARTONE, C. B. et al. Determination of protein in fish meal. **Journal of Science and Food Agriculture**, West Sussex, v. 31, n. 8, p. 782-784, 1980.
- MCDONALD, C. E.; CHEN, L. L. The lowry of the folin reagent for determination protease activity. **Analytical Biochemistry: methods in the biological sciences**, Maryland Heights, v. 10, n. 1, p. 175-177, 1965.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. O potencial brasileiro para a aquicultura. 2010. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/#aquicultura/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 08 out. 2011.
- MISHRA, S.; RAI, T. Morphology and functional of corns, potato and tapioca starches. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 557-566, 2006.
- MOORE, J.C. et al. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010.
- MOOSAVI-NASAB, M. et al. Protein structural changes during preparation and storage of surimi. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 70, n. 7, p. c448-c453, Set. 2005.

- MOREIRA, R. T. et al. Caracterização microestrutural de embutido emulsionado de tilápia (*Oreochromis niloticus* L.). **Brazilian Journal of Food technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 217-221, jul./set. 2006.
- NABESHIMA, E. H.; GROSSMANN, M. V. E. Functional properties of pregelatinized and cross-linked cassava starch obtained by extrusion with sodium trimetaphosphate. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 347-353, 2001.
- NAYLOR, R. L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, London, v. 405, n. 6790, p. 1017-1024, 2000.
- OAKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R.; MORRIS, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, Maryland Heights, v.105, n. 2, p. 361-363, 1980.
- OWUSU-APENTEN, R.K. A. The lowry method. In: OWUSU-APENTEN, R. K. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Mackel Decker, 2002. p. 62-87.
- OWUSU-APENTEN, R. K. B. The bradford method: principles. In: _____. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Mackel Decker, 2002a. p.169-194.
- OWUSU-APENTEN, R. K. C. Bradford assay: applications. In: _____. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. New York: Mackel Decker, 2002b. p.195-220.
- PANDEY, N.; BUDHATHOKI, U. Protein determination through Bradford's method of Nepalese mushroom. **Scientific World**, West Sussex, v. 5, n. 5, p. 85-88, Jun. 2007.
- PARK, J. W. Ingredient technology for surimi and surimi seafood. In: PARK, J.W. **Surimi and Surimi Seafood**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 649-707.
- PARK, J. W.; YANG, H. Effects of starch properties and thermal-processing conditions on surimi-starch gels. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 31, n. 4, p. 344-353, 1998.
- PARK, J. W.; LIN, T. M. Surimi: manufacturing and evaluation. In: PARK, J.E. **Surimi and surimi seafood**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 33-105.
- PARK, J. W.; MORRISSEY, M. T. Manufacturing of surimi from light muscle fish. In: PARK, J. W. **Surimi and surimi seafood**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2000, p. 23-37.
- PARK, J. W.; LIN, T. M.; YONGSAWATDIGUL, J. New developments in manufacturing of surimi and surimi seafood. **Food Review International**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 577-610, 1997.

- PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 771, n. 1-2, p. 3-31, 2002.
- PHU, N. V.; MORIOKA, K.; ITOH, Y. Microstructure of white croaker surimi protein gels set at low temperature under the inhibition of the polymerization and degradation of protein. **Journal of Biological Sciences**, Maharashtra, v. 10, n. 6, p. 499-506, 2010.
- PSZCZOLA, D. E. Starches and gums move beyond fat replacement. **Food Tecnology**, Oxford, v. 53, n. 8, p. 74-80, 1999.
- RANI, M. et al. Quantitative variation of protein in the tissues of a fresh water fish *Clarias batrachus* exposed to mercury and chromium. **International Journal of Current Research**, Rio Claro, v. 33, n. 3, p. 230-236, 2011.
- RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Whey protein concentrate: autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish. **Food Chemistry**, London, v.106, n. 3, p. 1077-1084, 2008.
- RAWDKUEN, S. et al. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. **Food Chemistry**, London, v.112, n. 1, p. 112-119, 2009.
- REED, Z. H.; PARK, J. W. Qualification and quantification of fish protein in prepared surimi crabstick. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 73, n. 5, p. C329-334, 2008.
- RICQUE-MARIE, D. et al. Raw material freshness, a quality criterion for fish meal fed to shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 95-109, jun. 1998.
- ROMERO, A. et al. Linear viscosity and microstructure of heat-induced crayfish protein isolate gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 964-972, 2009.
- RUSTAD, T. Utilization of marine by-products. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, Ourense, v. 2, n. 4, p. 1-9, 2003.
- RUSTAD, T. Peptides and proteins. In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of Seafood and seafood products analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 11-19.
- RUSTAD, T.; STORRØ, I.; SLIZYTE, R. Possibilities for the utilization of marine by-products. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 2001-2014, 2011.
- SANCHEZ-ALONSO, I.; SOLAS, M. T.; BORDERIAS, A. J. Technological implications of addition of wheat dietary fibre to giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi gels. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 404-411, 2007.
- SANTOS, L. D. et al. Avaliação sensorial e rendimentos de filés defumados de tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757) na presença de alecrim

(*Rosmarinus officinalis*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 406-412, mar./abr. 2007.

SARY, C. et al. Influência da lavagem da carne mecanicamente separada de tilápia sobre a composição e aceitação de seus produtos. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 423-432, out/dez. 2009.

SATO, T.; POLLAK, A. **Surimi y alimentos derivados**. Montevideu: Instituto de Investigaciones Pesqueras Prof. Dr. V. H. Bertullo, 2001. 23 p.

SCHOONMAN, A. et al. The microstructure of foamed maltodextrin/sodium caseinate powders: a comparative study by microscopy and physical techniques. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 10, p. 913-929, 2001.

SGARBIERI, V. C. Metabolismo celular e importância nutricional das proteínas. In: _____. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: UNICAMP, 1987. p.122-134.

SOSULSKI, F. W.; IMAFIDON, G. I. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 38, n. 6, p. 1351-1356, 1990.

SOUZA, M. L. R. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de filé e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p.1076-1084, 2002.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemists**, Arlington, v. 39, n. 10, p. 1412-1415, 1967.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Pressurized and heattreated surimi gels as affected by potato starch and egg white: microestructure and water-holding capacity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Berlin, v. 38, n. 1, p. 47-57, 2005.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, n. 2, p.151-165, 2004.

TOKUR, B. et al. Changes in the quality of fishburger produced from tilapia (*Oreochromis niloticus*) during frozen storage (18°C). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 4, p. 420-423, 2004.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de lingüiça fresca “tipo toscana” de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VYNCKE, W. Direct determination of the TBA value in the trichloroacetic acid extract of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**, Weinheim, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters Pico-Tag System for the aminoacids analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, London, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

YANG, H.; PARK, J. W. Effects of starch properties and thermal-processing conditions on surimi-starch gels. **LWT- Food Science & Technology**, London, v. 31, n. 4, p. 344-353, 1998.

YONGSAWATDIGUL, L.; PARK, J. W.; VIRULHAKUL, P. Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 65, n. 1, p. 129-133, 2000.

YONGSAWATDIGUL, J.; PIYADHAMMAVIBOON, P. Gel-enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. **Journal of the Science of Food Agriculture**, West Sussex, v. 87, n. 15, p. 2810-2816, 2007.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTING, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.