

### Triagem de Atividade Proteolítica em Patê de Tilápia Enlatado

*Marília Penteado Stephan<sup>1</sup>*

*Angela Aparecida Lemos Furtado<sup>2</sup>*

*Alda Letícia Resende<sup>3</sup>*

*Sabrina Neves Santos<sup>4</sup>*

#### Introdução

As carnes são compostas de quatro tipos básicos de tecido: muscular, epitelial, nervoso e conjuntivo. O músculo é o principal componente da carne, sendo este composto de três classes de proteínas: sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas. As proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em soluções de baixa força iônica e as miofibrilares se caracterizam por serem solúveis em soluções de alta força iônica (SGARBIERI, 1996). Os alimentos protéicos de origem animal, especialmente o pescado, caracterizam-se por apresentarem na sua constituição as proteínas como acima descritas, portanto, com solubilização semelhante à obtida para carne de galinha (STEPHAN; NASCIMENTO, 2005). Os pescados são também altamente procurados para consumo devido ao seu alto valor nutricional. O desenvolvimento de produtos a partir desta matéria-prima "in natura" irá também atender aos consumidores mais exigentes, que têm interesse por alimentos com valor tecnológico agregado, tais como produtos à base da parte nobre do pescado, filé, ou dos subprodutos da sua industrialização, que constituem uma alternativa promissora. A carne mecanicamente separada (CMS) de pescado é exemplo desta

alternativa, pois representa a utilização do subproduto da indústria de filetagem. A confecção de patê com estes resíduos é uma alternativa que vem se estabelecendo atualmente. A tilápia é a segunda espécie de maior importância na piscicultura mundial, sendo superada apenas, em volume de produção, pelas carpas. É considerada também de grande importância na aqüicultura mundial, é indicada para consumo intenso e apresenta uma estimativa de produção mundial de 1.500.000 toneladas para 2010 (OSTRENSKY; BORGHETTI; PEDINI, 2000). O Brasil ocupa a sétima posição na produção mundial de tilápias. Diante destes fatos, se faz necessário o desenvolvimento tecnológico que gere alternativa de comercialização deste subproduto, com consequente garantia da qualidade do produto a ser consumido. Portanto, métodos analíticos que garantam esta qualidade devem ser ajustados e/ou desenvolvidos.

A quantificação da atividade proteolítica é uma técnica que tem sido muito aplicada como estratégia de garantia da qualidade de produtos alimentícios de um modo geral. A elevada ocorrência de atividade proteolítica em carne de pescado é uma realidade e tem sido utilizada como parâmetro de avaliação da

<sup>1</sup>Farmacêutica-Bioquímica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [stephan@ctaa.embrapa.br](mailto:stephan@ctaa.embrapa.br)

<sup>2</sup>Engenheira Química, D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [afurtado@ctaa.embrapa.br](mailto:afurtado@ctaa.embrapa.br)

<sup>3</sup>Zootecnista, D.Sc em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Professora Auxiliar da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, [aldaleticia@yahoo.com.br](mailto:aldaleticia@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, [brininha\\_neves@hotmail.com](mailto:brininha_neves@hotmail.com).

qualidade do produto apresentado na forma “in natura”, especialmente no que concerne a textura destes produtos em (CHANG-LEE et al., 1989). Outro exemplo é o trabalho de Córdova Murueta, Navarrete del Toro e García Carreño (2007), que avaliaram o potencial de enzimas digestivas na hidrólise de proteínas de carne de pescados oriundos de processo de secagem, por liofilização ou em forno, a 55°C e 115°C, respectivamente. A aplicação destas técnicas, somada à estratégia utilizada por Le, Datta e Deeth (2006), utilizando precipitação com ácido tricloroacético (TCA) para estudos de peptídios e aminoácidos livres, permite que se proponha um método para avaliar carne de tilápia submetida ao tratamento térmico. Estes mesmos autores descreveram que há possibilidade de utilização deste método de análise em peptídios e aminoácidos, oriundos da proteólise da caseína usando ácido tricloroacético (TCA), como agente precipitante das proteínas, com posterior análise dos aminoácidos e peptídios presentes no filtrado. Entretanto, a necessidade de utilização de cromatografia líquida torna o método demorado e oneroso.

A existência de métodos espectrofotométricos para a quantificação de proteínas em alimentos é uma realidade e tem sido utilizada tanto para absorção no infravermelho como no ultravioleta (CHURCH et al., 1983). O presente trabalho demonstra que pode haver a substituição da etapa de utilização de um sistema de cromatografia líquida pelo uso de um espectrofotômetro, utilizando-se, para isto, a técnica de espectrofotometria de absorção no ultravioleta, que se baseia na propriedade dos aminoácidos aromáticos absorverem a luz na região do ultravioleta (280nm). Este método já foi implantado para quantificação de hidrólise de proteínas em leite (STEPHAN; FREITAS, 2007).

### Quantificação de Tirosina

A tirosina foi utilizada como aminoácido padrão, de acordo com o protocolo de Chang-Lee et al. (1989). A 2mL de extrato de tilápia, obtido através de extração em blender utilizando-se tampão fosfato (20mM) contendo KCL (0,45M), foram adicionados 2mL de ácido tricloroacético 20% (TCA); a solução obtida foi colocada em geladeira durante 24 horas. Após este período, foi feita uma filtração em papel de filtro e a absorbância dos filtrados, obtidos após a precipitação com TCA, foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm. Os padrões de tirosina foram preparados utilizando-se tirosina a partir da concentração de 320mM. Aliquotas de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0mL foram utilizadas e o volume levado a 5,0mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% e fosfato de potássio (10mM)/KCl (0,225M). As soluções padrões geradas ficaram com as seguintes concentrações (em mM): 32, 64, 128, 192 e 256. Na

Figura 1, é apresentada a curva padrão gerada com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

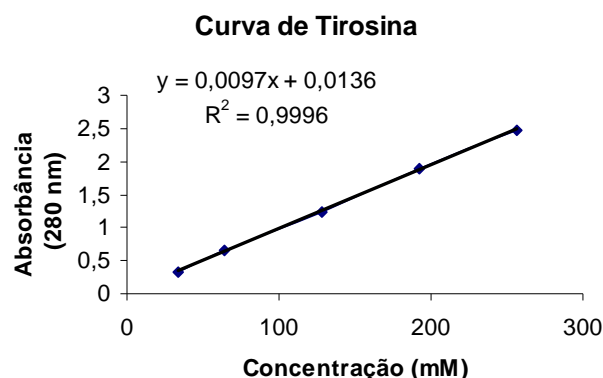


Figura 1: Curva padrão de tirosina

### Quantificação de Níveis de Tirosina Livre em Patê de Tilápia

Nesta parte do estudo, o objetivo foi mostrar o ajuste metodológico para avaliação de atividade proteolítica em extrato de patê de tilápia, através da quantificação de tirosina livre. A importância deste trabalho está relacionada com a obtenção de um método analítico rápido e preciso para acompanhamento da qualidade de patê durante a vida de prateleira. Como estratégia, utilizou-se o patê recém processado termicamente, visando obter-se a caracterização de uma amostra considerada como padrão de referência. Posteriormente, foram analisadas as amostras de 30 e 60 dias de vida de prateleira. Primeiramente, foram obtidos extratos solúveis através da homogeneização de 10g de patê com 30 mL de tampão fosfato (20mM)/KCl (0,45M), pH 7,5, durante dois minutos. Este extrato bruto, obtido após a homogeneização, foi para o banho de ultrassom durante 30 minutos e, depois, foi colocado em refrigerador durante 2 horas. Após centrifugação (4000 rpm, 15 minutos), o sobrenadante foi filtrado em tecido de algodão. A cada 5mL do filtrado obtido foram adicionados 5mL de TCA (20%), visando a precipitação as proteínas presentes nos extratos. Foram utilizadas 2 amostras de cada tempo de prateleira (To, T1 e T2). Após 2 dias em refrigerador o precipitado protéico foi separado da fração contendo peptídeo e aminoácido através de centrifugação (4000 rpm, 15 minutos) e posterior filtração rápida.

A presença de peptídios e aminoácidos foi quantificada através de monitorização de tirosina livre. Em todas as amostras foi obtido filtrado límpido contendo concentrações de tirosina que variaram de um mínimo de 193,0 mM (To) a um máximo de 272,0 mM To (Tabela 1). A diferença dos valores de To para as amostras 1 e 2 pode ser decorrente de alguma

autohidrólise que pode ter ocorrido no pescado durante o preparo das amostras para serem enlatadas. A existência de autohidrólise em outros pescados já foi relatada por Córdova Murueta, Navarrete del Toro e García Carreño (2007). Pelo fato de não haver aumento de tirosina livre nos dois tempos de vida de prateleira em relação ao To, estes resultados servirão como padrão de identidade de um patê enlatado com qualidade ideal para consumo e como amostra de referência para estudo comparativo com outros produtos a serem estudados. A facilidade de utilização de um espectrofômetro mostra a praticidade e rapidez do método.

**Tabela 1.** Análise comparativa dos teores de tirosina livre em extratos de patê de tilápia obtidos em diferentes períodos de vida de prateleira

Patê de Tilápia	To	T1	T2
Amostra 1	208,4	193,0	204,6
Amostra 2	272,0	193,2	204,6

\* Valores de tirosina expressos em mM

## Considerações Finais

A importância deste trabalho está relacionada com a possibilidade de se ajustar um método analítico rápido e preciso para a identificação da ocorrência presença de atividade proteolítica durante a vida de prateleira de patê de tilápia. A facilidade de acoplar a precipitação das proteínas com TCA, junto com a filtração e a leitura em espectrofotômetro a 280 nm, mostrou a praticidade e rapidez do método no que concerne a garantia da ausência de atividade proteolítica, servindo como um parâmetro adicional para a garantia de qualidade do patê enlatado.

## Referências Bibliográficas

CHANG-LEE, M. V.; PACHECO-AGUILAR, R.; CRAWFORD, D. L.; LAMPILA, L. E. Proteolytic activity of surimi from pacific whiting (*Merluccius productus*) and

heat-set gel texture. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 5, p. 1116-1119, sept. 1989.

CHURCH, F. C.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D. H.; CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p.1219-1227, jun. 1983.

CÓRDOVA MURUETA, J. H.; NAVARRETE DEL TORO, M. de los A.; GARCÍA CARREÑO, F. Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 705-711, 2007.

LE, T. X.; DATTA, N.; DEETH, H. C. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 823-830, aug. 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; PEDINI, M. Situação atual da aqüicultura brasileira e mundial. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília, DF: MCT: CNPq, 2000. cap.12, p. 353-381.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

STEPHAN, M. P.; FREITAS, S. C. de. **Ajuste metodológico para triagem de atividade proteásica em leite desnatado e integral**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2007. 5 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 119).

STEPHAN, M. P.; NASCIMENTO, M. da G. F. do. **Obtenção de padrão de identidade de peito de galinha através de eletroforese SDS-PAGE**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005. 3 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 84).

### Comunicado Técnico, 146

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria de Alimentos**  
**Endereço:** Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba  
 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ  
**Fone:** (0XX21) 3622-9600  
**Fax:** (0XX21) 2410-9713  
**Home Page:** <http://www.ctaa.embrapa.br>  
**E-mail:** [sac@ctaa.embrapa.br](mailto:sac@ctaa.embrapa.br)

1ª edição  
 1ª impressão (2009): tiragem (50 exemplares)

### Comitê de publicações

**Presidente:** Virginia Martins da Matta  
**Membros:** Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de O. Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes.  
**Secretária:** Michele Belas Coutinho  
**Supervisão editorial:** Comitê de Publicações  
**Revisão de texto:** Edmar das Mercês Penha  
**Normatização bibliográfica:** Luciana S. de Araújo  
**Editoração eletrônica:** André Luis do Nascimento Gomes, Marcos Moulin e Riane Rodrigues Tovar

### Expediente