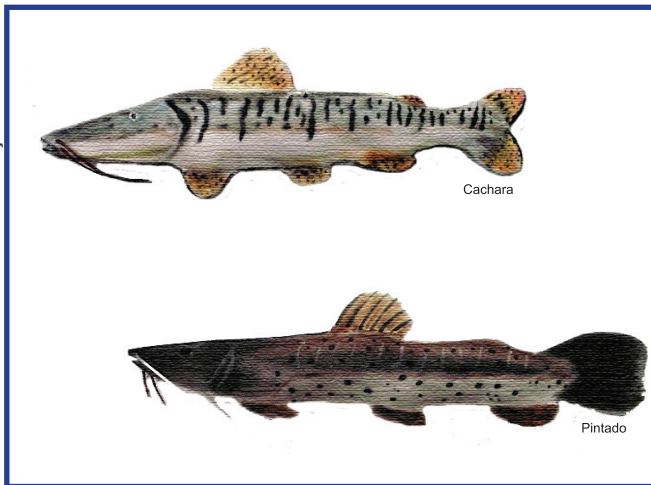


Ilustração: Chris Maciel



Estudo comparativo do padrão de identidade e da atividade proteolítica do pescado oriundo de híbridos de cachara e pintado

Marília Penteado Stephan¹
Tatiana de Lima Azevedo²
Cátia Maria de Oliveira Lobo³
Danielle de Oliveira Cardoso⁴
Renata Torrezan⁵
Angela Aparecida Lemos Furtado⁶

Introdução

O pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) são peixes de água doce que apresentam carne saborosa, com baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares, tornando-os adequados aos mais variados preparos e processos (TAVARES, 1997). O híbrido do cruzamento entre esses dois peixes vem sendo comercializado devido ao alto nível de produção e fácil manuseio, em relação aos peixes originários de linhagem pura (CREPALDI et al., 2006).

O processamento do peixe em forma de filé tem possibilitado a comercialização do pescado de forma mais higiênica com aumento de vida útil e incremento de sua qualidade. Assim, agregando valor ao material *in natura* e obtendo-se um produto diferenciado e competitivo oferecendo novas opções ao consumidor.

O resíduo do processo de filetagem do peixe gera a carne mecanicamente separada (CMS), também chamada de polpa. Partindo dessas duas matérias-primas, semi-elaboradas, pode-se preparar formulações de alto valor nutricional e grande palatabilidade (RAGHIANTE, 2010).

De modo geral, o pescado é consumido principalmente como fonte de proteínas, estas podem ser divididas em três grupos, baseando-se em sua solubilidade. Cerca de 10 a 20% das proteínas presentes no músculo do peixe são proteínas sarcoplasmáticas (solúveis em água) encontradas principalmente no plasma celular. Aproximadamente 70 a 80% são proteínas estruturais e recebem a denominação de miofibrilares, que se caracterizam por sua solubilidade em soluções salinas e por serem formadoras das miofibrilas (actina e miosina). Cerca de 2 a 3% das proteínas estruturais são insolúveis em soluções salinas e formam o tecido conectivo (colágeno), sendo designadas como estromáticas (KUHN; SOARES, 2002).

A atividade proteolítica em pescado tem sido descrita por diversos autores pela facilidade de degradação do tecido muscular dos mesmos durante seu armazenamento (CHANG-LEE et al., 1989; JIANG et al., 1990; PÉREZ-BORLA et al., 2002). Entretanto, as técnicas comumente utilizadas são demoradas e geram um resultado questionável devido à utilização do substrato proteico oriundo de outra matéria-prima, como no caso da hemoglobina (CHANG-LEE et al., 1989).

¹ Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, stephan@ctaa.embrapa.br

² Licenciada em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiana@ctaa.embrapa.br

³ Médica Veterinária, Doutoranda da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, catiavet@hotmail.com

⁴ Engenheira de Alimentos, estudante, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, danielle.oc21@gmail.com

⁵ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, torrezan@ctaa.embrapa.br

⁶ Engenheira Química, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, afurtado@ctaa.embrapa.br

Outra problemática está relacionada ao método utilizado para quantificar os teores de proteínas hidrolisadas (PÉREZ-BORLA et al., 2002). O método colorimétrico de Lowry et al. (1951) utilizado por Pérez-Borla et al. (2002) é também questionável devido a pouca sensibilidade deste para cadeias polipeptídicas de baixa massa molecular, ao contrário, a leitura a 280nm tem alta sensibilidade até mesmo para aminoácidos aromáticos livres.

A identificação dos peixes na ausência de suas características externas, quando somente polpas ou filés estão disponíveis, torna-se difícil sensorialmente. Neste caso, a técnica de eletroforese além de caracterizar o pescado quanto a sua integridade proteica, permite também realizar sua identificação através do perfil de massa molecular.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o padrão de identidade proteica do filé e da CMS de peixe híbrido do pantanal, bem como o desenvolvimento de metodologia de análise da atividade proteolítica, visando sua aplicação no controle de qualidade destes produtos *in natura* e processados.

Preparo do Extrato Proteico de Filé e Polpa (CMS) para Análise por Eletroforese

Como matéria-prima foi utilizado o filé e a CMS de peixe híbrido de cachara e pintado, proveniente do pantanal, fornecidos pela empresa Mas & Terra de Mato Grosso do Sul. Para a extração das proteínas do filé e da CMS foram realizadas duas extrações consecutivas utilizando 10g de amostra em 30mL de tampão-fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4 20mM pH7,5) homogeneizadas em blender por 2min e centrifugadas a 4000rpm por 15min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em tecido de algodão sendo as frações proteicas identificadas como E1-sarcoplasmática e E2-sarcoplasmática, de acordo com a ordem das extrações. Homogeneizou-se o precipitado resultante da segunda extração com 30mL de tampão fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4 20mM + KCl 0,45M pH7,5) em blender por 2min, centrifugou-se a 4000rpm por 15min e 4°C. Para melhor efeito da solubilização foi realizada a diluição de 1:5. O sobrenadante foi filtrado em tecido de algodão, sendo a fração proteica identificada como E3-miofibrilar (CHANG-LEE et al., 1990). O perfil proteico da fração insolúvel (estromática) não foi caracterizado pela impossibilidade de colocá-lo em solução, condição requerida para análise por eletroforese.

Padrão de Identidade Obtido por Eletroforese SDS-PAGE

Para este estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da marca Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 15% e no gel de aplicação na concentração de 4%. A corrida foi realizada durante 7h sob uma tensão de 100V.

Os marcadores de alto peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): miosina 202,44; β -galactodisidase 116,58; albumina de soro bovina 98,08 e ovalbumina 47,11. Os marcadores de baixo peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): fosforilase B 105,20; albumina de soro bovino 84,17; ovalbumina 50,44; anidrase carbônica 36,81; inibidor de tripsina de soja 29,06 e lisozima 20,49. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor "coomassie blue R250", durante uma noite, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/água destilada (40: 10: 50) por 3h. As amostras foram analisadas em duplicata.

Metodologia para Estudo da Atividade Proteolítica de Filé e Polpa (CMS)

5g de amostra (filé/CMS) foram homogeneizadas em 30mL de solução tampão de extração (KCl 0,6M+NaHCO₃ 0,003M pH7,0) em blender por 2min. A amostra foi filtrada em filtro de algodão. Após a filtração, foram retirados 10mL do extrato bruto obtido e adicionado 10mL de solução tampão (citrato 0,2M + fosfato 0,2M) em dois diferentes pH 3,4 e 6,2. Para o pH 8,5 foi utilizada a solução-tampão de tris-HCl 0,2M. Em seguida, as amostras foram incubadas em estufa durante 20h a 37°C. A reação foi finalizada através da adição de 6mL de TCA 10% para 6mL de amostra dos três diferentes níveis de pH para os tempos T0 e T20. As amostras foram deixadas na geladeira durante uma noite, então centrifugadas a 12000rpm por 5min a temperatura ambiente (20°C) e filtradas em papel de filtro para posterior leitura (PÉREZ-BORLA et al., 2002). A leitura foi feita em espectrofotômetro na faixa do ultravioleta no comprimento de onda de 280nm. Utilizou-se como padrão a tirosina (332mM) e efetuou-se as diluições de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL da solução em 5mL de água destilada para construção da curva padrão (CHANG-LEE et al., 1989), as análises foram realizadas em duplicata.

Avaliação do Padrão de Identidade

Os bandeamentos presentes no perfil eletroforético para os extratos de proteínas sarcoplasmáticas (E1 e E2) derivados do filé e da polpa foram semelhantes, como esperado (Figura 1). Observou-se uma grande quantidade de bandas com massas moleculares variando na faixa de 25 e 187kDa. As bandas observadas na fração sarcoplasmática E2 apresentaram menor intensidade que as bandas presentes na fração sarcoplasmática E1, tanto para o filé como para a polpa como esperado, já que E2 representa a repetição da extração realizada em E1, mostrando a grande concentração de proteínas sarcoplasmáticas ainda presentes após a primeira extração. Verificou-se um bandejamento triplo (massa 26, 28 e 30kDa) nas extrações E1 e E2 (sarcoplasmáticas), mas ausentes na extração E3 (miofibrilar), o que confirma serem estas proteínas sarcoplasmáticas (Figura 1).

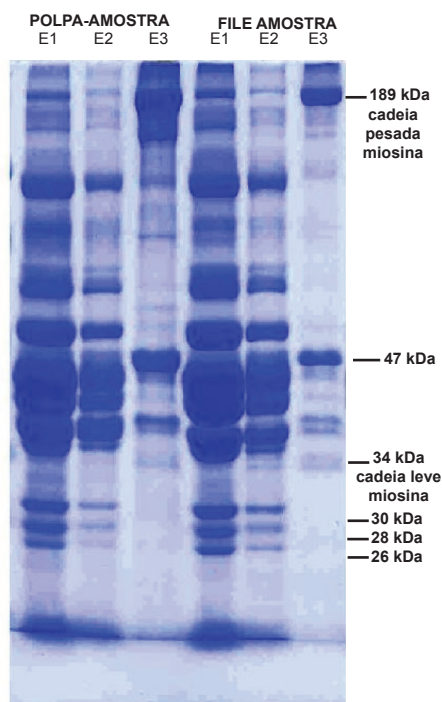


Figura 1: Perfil eletroforético das proteínas presentes nas amostras de polpa e filé de peixe híbrido do pantanal, sendo E1 e E2 as extrações das frações sarcoplasmáticas e E3 a extração da fração miofibrilar.

Quanto a fração miofibrilar (E3), pode-se observar similaridades para ambas as amostras observando-se um bandejamento típico da cadeia pesada de miosina (189kDa) e da actina (47kDa). A polpa apresentou maior intensidade de bandas no extrato miofibrilar em relação ao filé, apesar da similaridade de bandejamento.

Estes fatores se mostram positivos por indicarem similaridade nutricional entre a polpa e o filé de peixe

híbrido do pantanal. Resultados similares foram obtidos para filé e polpa de tilápia (STEPHAN et al., 2008).

Avaliação da Atividade Proteolítica do Filé e CMS

Na Figura 2 pode-se observar a atividade proteolítica nas amostras de polpa e filé de peixe híbrido do pantanal. A quantificação foi realizada pelo método de detecção de tirosina em ultravioleta (CHANG-LEE et al., 1990) e o preparo de amostra foi descrito por Pérez-Borla et al. (2002).

Analisando o gráfico a baixo (Figura 2) observou-se que em pH 6,2 (levemente ácido), mais próximo da neutralidade e consequentemente melhor para a atividade biológica, obteve-se a maior atividade proteolítica. A melhor condição de atividade proteolítica foi igual nos dois casos. A polpa apresentou atividade 4 vezes maior que a observada para o filé. Isto indica o maior potencial de degradação da CMS em relação ao filé. Este resultado é esperado já que a superfície de exposição da CMS ao meio é maior. Futuros ensaios serão realizados em temperaturas próximas a de processamento visando sua possível aplicação industrial.

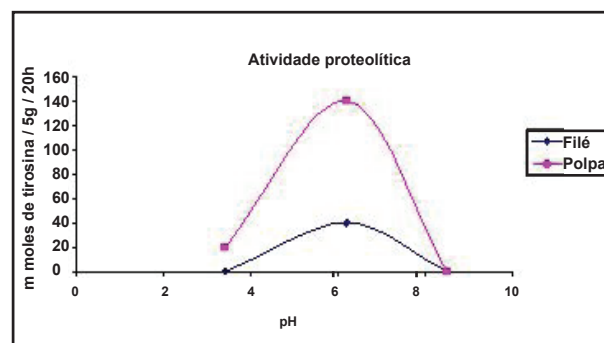


Figura 2: Efeito do pH na atividade proteolítica em filé e polpa (CMS) de peixe híbrido do Pantanal.

A modificação realizada no método de quantificação de atividade proteolítica tornou-o mais rápido por usar como substrato proteico as proteínas do tecido muscular do próprio pescado ao invés de usar hemoglobina como substrato, como realizado por Chang-Lee et al. (1989). Pode-se verificar através dos resultados presentes na Figura 2 o aumento da atividade proteolítica, decorrente da auto-hidrólise das proteínas. Logo, utilizou-se um estudo de atividade autolítica, ou seja, as enzimas presentes na própria amostra (fração sarcoplasmática) são as que hidrolisaram as proteínas constituintes do tecido muscular do pescado. Outra modificação realizada pelo método foi a quantificação da hidrólise através da leitura em ultravioleta (280nm), tornando-o mais rápido.

Conclusão

O perfil eletroforético da polpa de peixe híbrido do pantanal e de filé apresentaram características semelhantes indicando sua similaridade nutricional. Estes resultados revelaram o potencial de utilização desta matéria-prima como alternativa alimentar ao filé, podendo ser empregada industrialmente na produção de alimentos, agregando maior valor econômico a este co-produto da filetagem de pescado. Entretanto, o estudo da atividade proteolítica mostrou maior susceptibilidade de degradação da polpa em relação ao filé, indicando a necessidade de maiores cuidados durante a manipulação, armazenamento e processamento desta matéria-prima.

Referências

- CHANG-LEE, M. V.; LAMPILA, L. E.; CRAWFORD, D. L. Yield and composition of surimi from pacific whiting (*Merluccius productus*) and the effect of various protein additives on gel strength. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 83-86, Jan. 1990.
- 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.
- CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. de A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C. de; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. de A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAIS, V. E. de. O surubim na aquacultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 150-158, jul./dez. 2006.
- JIANG, S.-T.; TSAO, C.-Y.; WANG, Y.-T.; CHEN, C.-S. Purification and characterization of proteases from milkfish muscle (*Chanos chanos*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1458-1463, Jul. 1990.
- KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases e inibidores no processo de surimi. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 5-11, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, Aug. 1970.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- PÉREZ-BORLA, O.; ROURA, S. I.; MONTECCHIA, C. L.; ROLDÁN, H.; CRUPKIN, M. Proteolytic activity of muscle in pre- and post-spawning hake (*Merluccius hubbsi* Marini) after frozen storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 325-330, Jun. 2002.
- RAGHIANTE, F. **Processamento e aproveitamento integral do pescado**. 2010. Disponível em: <http://www.iftm.edu.br/pesca/materialDidatico/cursos/Apostila_Aproveitamento%20Integral%20do%20Pescado.pdf>. Acesso em: 20 maio 2011.
- STEPHAN, M. P.; FURTADO, A.; ROSS, A. V.; RESENDE, A. L. S. S. **Desenvolvimento de método de extração protéica para estudo de padrão de identidade de filé e polpa de tilápia**. In: JORNADA INTERNACIONAL DE PROTEÍNAS E COLÓIDES ALIMENTARES, 5., 2008, Campinas. [Resumos]. Campinas: ITAL/CCQA, 2008. p. 41.
- TAVARES, M. P. O surubim. In: MIRANDA, M. O. T. (Ed.). **Surubim**. Belo Horizonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, 1997. p. 9-25.

Comunicado Técnico, 181

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) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2011): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas
Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo
Editoração eletrônica: Marcos Moulin, André Luis do Nascimento Gomes e Chris Maciel.
Revisão de texto: Janine Passos Lima da Silva