



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



**FORMAÇÃO DE NITRATO E NITRITO E DEGRADAÇÃO  
PROTÉICA POR PROCESSAMENTO TÉRMICO DE  
SARDINHA (*TRIPORTHEUS ANGULATUS*) ATRAVÉS DE  
CARVÃO VEGETAL**

**DANIEL WOLINGER MARCONDES**

**MANAUS**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



**DANIEL WOLINGER MARCONDES**

**FORMAÇÃO DE NITRATO E NITRITO E DEGRADAÇÃO  
PROTÉICA POR PROCESSAMENTO TÉRMICO DE  
SARDINHA (*TRIPORTHEUS ANGULATUS*) ATRAVÉS DE  
CARVÃO VEGETAL**

Plano de Dissertação apresentado para Qualificação  
ao Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos  
da Universidade Federal do Amazonas, na área de  
concentração de toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Tossini Moroni

**MANAUS**

**2010**

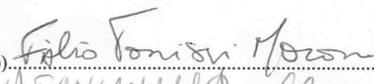


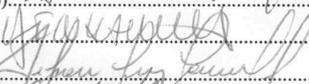
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

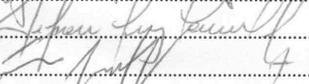
---

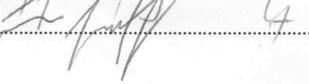
Ata da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado do aluno **Daniel Wolinger Marcondes**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, área de concentração em Ciência de Alimentos, realizada no dia nove de dezembro de dois mil e dez.

Aos nove dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dez, às catorze horas e trinta minutos, no auditório do Centro de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Daniel Wolinger Marcondes realizou a defesa pública de sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“FORMAÇÃO DE NITRATOS E NITRITOS E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE SARDINHA (*Triportheus angulatus*) TERMICAMENTE PROCESSADAS COM CARVÃO VEGETAL”**. Compuseram a banca examinadora os seguintes Professores Doutores: Fábio Tonissi Moroni (Orientador – Universidade Federal do Amazonas), Antonio José Inhamuns da Silva (Universidade Federal do Amazonas), Nilson Luiz de Aguiar Carvalho (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e Rogério Souza de Jesus (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). A apresentação foi seguida de arguição do candidato. Tendo respondido satisfatoriamente às questões formuladas pela comissão examinadora, a Dissertação foi considerada **“APROVADA”**, sendo-lhe concedido o título de MESTRE em Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos. Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM, aos nove dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dez.

Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni (ORIENTADOR-UFAM)..... 

Prof. Dr. Antonio José Inhamuns da Silva (UFAM)..... 

Prof. Dr. Nilson Luiz de Aguiar Carvalho (INPA)..... 

Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus (INPA)..... 

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a força única, indissolúvel, imutável e soberanamente boa e justa,  
Deus.

Segundo, à família, que mesmo distante, nos dois planos, sempre esteve ao lado.

Aos amigos de classe que juntos proporcionaram apoio e companheirismo.

Ao pessoal do LACEN AM, da diretoria aos técnicos pelo apoio irrestrito.

Ao pessoal do INPA e UFAM sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

Aos professores na sala de aula e da banca.

E em especial à professora Ila pelo apoio, prontidão e dedicação e ao professor Moroni sempre arranjando tempo onde não existia.

O que pensar de homens que exigem para si glória por algo que pensam ter descoberto.  
Não há descoberta em algo que sempre existiu, porque em Deus tudo sempre esteve.  
Verdade em si, Ele permite enxergar para que nobremente ajudes com sabedoria ao  
próximo.  
Porque o que é de Deus é de todos.

## RESUMO

A pesca é uma importante atividade extrativista na Amazônia, sendo fonte nutricional de renda e lazer de grande parte da população. Sua constituição orgânica, assim como de outras matrizes alimentares, sob determinadas condições de preparo sofre alterações físicas e químicas.

Pesquisas indicam que reações entre compostos nitrosantes (nitratos e nitritos) e nitronisáveis (proteínas, aminoácidos entre outros) originem substâncias secundárias, como os compostos nitrosos.

O objetivo deste trabalho foi quantificar a formação de nitratos e nitritos (compostos nitrosantes), importantes precursores de compostos nitrosos, a partir da degradação protéica miofibrilar por aplicação de calor através de assamento de amostras de sardinha (*Triportheus angulatus*) durante 30 e 60 minutos com carvão vegetal.

Para determinar a perda protéica, foi quantificado o MFI pela metodologia da turbidez. Por apresentar uma capacidade de separação mais eficiente de proteínas e de outros compostos, além de ser uma metodologia de simples execução, relativamente rápida, podendo ser aplicada em varias amostras, também foi utilizado SDS- PAGE descontinua monodimensional para demonstrar perda protéica.

O zimograma das miofibrilas evidenciou degradação em estruturas com peso molecular entre 10 e 20 KDa. A dosagem de proteínas mostrou diminuição da quantidade de proteínas nas amostras assadas por 30 e 60 minutos de aproximadamente 12,5%, e a determinação do MFI foi de 42,93. A média de nitritos nas amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos foi de 0,0001% (m/m), 0,0063% (m/m) e 0,0030% (m/m) respectivamente. A média de nitratos encontrados nas amostras *in natura*, assadas 30 e 60 foi de 0,0020% (m/m), 0,00001% (m/m) e 0,00001%(m/m) respectivamente, ambos abaixo dos 0,02% de nitrito e 0,1% de nitrato definidos como limite máximo pela legislação. A sua baixa quantificação tanto *in natura*, quanto em assado por 30 e 60 minutos permite concluir a existência de uma relação entre a degradação protéica evidenciada pela alteração do zimograma miofibrilar, da quantificação do MFI e das proteínas totais.

Palavras chave: SDS-PAGE, nitrato, nitrito, peixe, miofibrila, MFI

## ABSTRACT

Fishing is an important extractive activity in the Amazon, and offering nutritional source income, leisure and food base of a large proportion of its population. His organic constitution, as well as other food matrices, under certain preparation conditions, such as baking, suffers physical and chemical changes, which may give rise to secondary products. The aim of this study was to analyze the formation of nitrates and nitrites (nitrosating compounds), which are important precursors of nitrous compounds from protein myofibrillar degradation caused by application of heat in samples of sardine (*Triportheus angulatus*) for 30 to 60 minutes. Being a methodology quick, simple and show a sensitive mechanism able to separate the components of the sample, we used the one-dimensional discontinuous SDS-PAGE under the following conditions: 120 minutes, 100 V and 25 mA. With the same samples were quantified the total proteins by the biuret method, determined by the methodology of the MFI measured turbidity and nitrates and nitrites by spectrophotometry. Research suggests that the reaction of nitrosating compounds (nitrates and nitrites) and nitronisáveis (proteins, amino acids and others) originate secondary substances, nitrous compounds. The zymogram revealed degradation of myofibrils in structures with molecular weight between 10 and 20 KDa. Protein content showed a decrease in the amount of protein in the samples roasted for 30 and 60 minutes from about 12.5%, and the determination of MFI was 42.93. The average nitrite in fresh samples, baked 60 minutes and 30 was 0.0001% (m / m), 0.0063% (w / w) and 0.0030% (w / w) respectively. The average nitrate found in fresh samples, baked 30 and 60 was 0.0020% (m / m), 0.00001% (m / m) and 0.00001% (m / m) respectively, both below 0.02% to 0.1% nitrite and nitrate as an upper limit set by law. Their absence or insignificant formation allows us to conclude that there is no relationship between protein degradation as evidenced by the change of myofibrillar zymogram, the MFI and the decrease of total proteins with a possible formation of secondary substances from nitrates and nitrites.

Keywords: SDS-PAGE, nitrate, nitrite, fish myofibril

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	x
Lista de quadros e tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xii
1. Introdução.....	13
2. Fundamentação teórica.....	16
2.1 Descrição da espécie.....	16
2.2 Estrutura muscular.....	16
2.3 Consumo do pescado por assamento.....	20
3. Objetivos.....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
Capítulo 1. Quantificação espectrométrica de nitratos e nitritos em sardinha ( <i>Triportheus angulatus</i> ) in natura e assada com carvão vegetal .....	23
1. Fundamentação teórica.....	25
1.1 Nitratos e nitritos em alimentos.....	25
1.2 Distribuição de nitratos e nitritos.....	28
1.3 Aspectos toxicológicos de nitratos e nitritos.....	29
1.4 Origem de compostos N-nitrosos a partir de nitrato e nitrito.....	33
1.5 Legislação para nitratos e nitritos.....	34
1.6 Quantificação de nitratos e nitritos.....	35
2. Materiais e métodos.....	37
2.1 Amostras.....	37
2.1.2 Preparo das amostras para quantificação de nitratos e nitritos.....	37
2.2 Quantificação de nitrito.....	38
2.2.1 Obtenção da curva de calibração para quantificação de nitrito.....	40
2.2.2 Técnica para quantificação de nitrito.....	40
2.3 Quantificação do nitrato.....	40
2.3.1 Obtenção da curva de calibração para quantificação de nitrato.....	40
2.3.2 Técnica para quantificação de nitrato.....	42
2.4 Tratamento estatístico.....	44
3. Resultados e discussão .....	45
4. Conclusões.....	48
5. Referencias Bibliográficas.....	49
Capítulo 2. Degradação miofibrilar avaliada por MFI e SDS-PAGE de sardinha ( <i>Triportheus angulatus</i> ) assada com carvão vegetal.....	56
1. Fundamentação teórica.....	58
1.1 Eletroforese.....	58
1.2 SDS-PAGE.....	59

1.3	Determinação da degradação miofibrilar (MFI).....	60
2.	Materiais e métodos.....	61
2.1	Amostras.....	61
2.2	Preparo das amostras.....	61
2.3	Determinação do MFI.....	62
2.4	Extração das miofibrilas para SDS-PAGE.....	63
2.5	Dosagem das proteínas totais para SDS-PAGE.....	64
2.6	Desnaturação das proteínas para SDS-PAGE.....	64
2.7	Preparo do gel de poliacrilamida e da cuba para SDS-PAGE.....	65
2.8	Aplicação das amostras e fracionamento eletroforético das amostras.....	66
3.	Resultados e discussão.....	68
3.1	Tratamento estatístico.....	68
3.2	Dosagem protéica.....	68
3.3	Índice de fragmentação miofibrilar (MFI).....	70
3.4	Zimograma das amostras.....	73
4.	Conclusões.....	74
5.	Referencias bibliográficas.....	75
6.	Anexo.....	78

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

<b>Figura 1</b>	Sardinha ( <i>Triportheus angulatus</i> (SIPX & AGASSIZ, 1829)).....	17
<b>Figura 2</b>	Micrografia eletrônica de uma fibra muscular estriada.....	18
<b>Figura 3</b>	Esquema de organização da tropomiosina.....	18
<b>Figura 4</b>	Fotografia eletrônica do corte transversal de uma miofibrila.....	19
<b>Figura 5</b>	Fotografia eletrônica das pontes de ligação entre miosina e actina.....	19
<b>Figura 6</b>	Mecanismos tóxicos mediados por compostos N-nitrosos, nitratos e nitritos.....	30
<b>Figura 7</b>	Gráfico da Curva de calibração de nitritos.....	39
<b>Figura 8</b>	Gráfico da Curva de calibração de nitratos.....	42
<b>Figura 9</b>	Gráfico da média da quantificação de nitratos e nitritos <i>in natura</i> , assadas 30 e 60 minutos.....	47
<b>Figura 10</b>	Equipamento de SDS-PAGE utilizado.....	66
<b>Figura 11</b>	Aparelho para obtenção da imagem do zimograma.....	67
<b>Figura 12</b>	Quantidade de proteínas (%) presente nas amostras <i>in natura</i> e assadas 30 e 60 minutos.....	70
<b>Figura 13</b>	Quantificação, desvio padrão do MFI em relação ao tempo de exposição ao calor.....	71
<b>Figura 14</b>	Relação entre MFI e quantificação das proteínas totais.....	72
<b>Figura 15</b>	Análise das proteínas miofibrilares por SDS-PAGE (zimograma).....	74

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Características físico-químicas de músculos de peixes.....	20
Tabela 1	Valores de absorvância obtidos a partir das soluções padrão de nitrito para confecção da curva de calibração.....	39
Tabela 2	Valores de absorvância obtidos a partir das soluções padrão de nitrato para confecção da curva de calibração.....	42
Tabela 3	Quantificação e desvio padrão de nitratos e nitritos de amostras <i>in natura</i> , assadas 30 e 60 minutos.....	46
Tabela 4	Tratamento estatístico Kruskal-Wallis da quantificação de nitratos e nitritos em amostras <i>in natura</i> e assadas 30 e 60 minutos.....	47
Tabela 5	Quantificação de proteínas na amostra <i>in natura</i> , assadas 30 e 60 minutos para realização da eletroforese.....	69
Tabela 6	Tratamento estatístico segundo Kruskal-Wallis da quantificação de proteínas totais para realização da eletroforese em amostras <i>in natura</i> e assadas 30 e 60 minutos.....	70
Tabela 7	MFI em amostras <i>in natura</i> , assadas 30e 60 minutos.....	71
Tabela 8	Tratamento estatístico segundo Kruskal-Wallis do MIF em amostras <i>in natura</i> e assadas 30 e 60 minutos.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	grau(s) centígrado(s)
A	Ampere
APS	Persulfato de Amônio, do inglês, Amonium Persulfate
FAO	do inglês, Food and Agriculture Organization
g/mL	grama por mililitro
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kg	quilograma(s)
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MFI	Índice de fragmentação miofibrilar do inglês, Myofibril Fragmentation Index
mg	miligrama(s)
mA	miliAmpère (s)
mg/kg	miligrama(s) por quilo
mg/L	miligrama(s) por litro
mg/m <sup>3</sup>	miligrama(s) por metro cúbico
mmHg	milímetro(s) de mercúrio
µg	micrograma(s)
µg/kg	micrograma(s) por quilograma
NDMA	N-nitrosodimetilamina
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ión nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ión nitrato
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfanil
PAGE	Eletroforese com gel de poliacrilamida, do inglês, PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
ppb	parte(s) por bilhão
ppm	parte(s) por milhão
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate
R.I.I.S.P.O.A	Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal
TEMED	(N,N,N',N') – tetrametiletilenodiamina
V	Volt
W	Watt
WHO	World Health Organization

# 1. INTRODUÇÃO

A pesca é uma importante atividade extrativista de grande parte da população amazônica, gerando renda, lazer e base alimentar, juntamente com frutas, caça e lavoura de subsistência.

A Harvard School of Public Health, financiada pelo National Institute of Health dos EUA, desenvolveu um estudo aprofundado sobre o consumo de peixe por adultos e crianças e demonstrou que os benefícios de comer uma quantidade modesta de peixe, aproximadamente 340 g por semana, corresponde a uma redução de 36% no risco de morte por doenças coronárias (COSTA, 2009).

De acordo com critérios econômicos, geográficos e o grau de profissionalização dos indivíduos nela envolvidos, a pesca pode ser classificada em comercial desenvolvida por pescadores profissionais, industrial (70% da produção total pesqueira no Amazonas) e ornamentação desenvolvida por pescadores artesanais (CARDOSO, 2004; SANTOS, 2005a).

Ainda segundo Santos (2005), outro tipo de pesca é a de subsistência desenvolvida por ribeirinhos caracterizada pelo volume condicionado para seu próprio consumo e/ou para ocasional comercialização, com pouca qualidade devido a deficiências no transporte e conservação.

Para uma parcela importante da população da região Norte do Brasil, o pescado é a principal fonte de proteínas (BELITZ, 1997) apresentando elevado valor biológico pela disponibilidade de vários nutrientes como aminoácidos onde se destacam a lisina e leucina além de compostos nitrogenados não-protéicos (9 a 18%) e por sua fácil digestibilidade (PEREDA, 2005).

Fatores ambientais como a abundância em quantidade e variedade de peixes, culturais como ausência de uma cultura agrícola efetiva, e segundo Forsberg (2004), diminuição da produção pesqueira em outras regiões, fazem do Norte uma das maiores produtoras e consumidoras do Brasil.

Santos (2006), reporta que a produção anual pesqueira nas águas interiores da Amazônia brasileira em torno de 200.000 toneladas. O quantitativo do Estado do Amazonas está em oitavo lugar no Brasil, mas primeiro em pesca continental (FORSBERG, 2004). Manaus situa-se como um dos maiores centros consumidores do Norte do país com um desembarque que varia entre 22.000 e 35.000 toneladas anuais.

Teoricamente, segundo a média deste desembarque (28.500 toneladas ao ano) e o censo do IBGE realizado em 2007 (BRASIL, 2007), que indica 1.600.000 habitantes na cidade de Manaus, o consumo *per capita* anual estimado é de aproximadamente 18 quilos de pescado.

Os peixes com maior participação nas feiras de Manaus são o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e os jaraquis (*Semaprochilodus insignis* e *Semaprochilodus taeniurus*) correspondendo juntos a 47% do comercializado. Essas duas espécies, juntamente com curimatã (*Prochilodus nigricans*), matrinxã (*Brycon amazonicus*) e tucunaré (*Cichla monoculus*; *Cichla orinocensis*; *Cichla temensis*) perfazem cerca de 75%. Somando-se os pacus (*Metynnis lippincottianus*, *Myleus rubripinnis*, *Myleus schomburgki*, *Myleus torquatus*, *Mylossoma aureum*, *Mylossoma duriventre*), as sardinhas (*Triporthus elongatus*, *Triporthus angulatus*), as pescadas (*Plagioscion auratus*, *Plagioscion squamosissimus*), a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e o caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*).

A soma total destas espécies perfaz uma comercialização no mercado consumidor de Manaus em torno de 90% (SANTOS, 2006).

Pesquisas estimam em três mil o número de espécies em toda a região amazônica, embora dezenas de espécies novas sejam descritas a cada ano e outras tantas sejam colocadas em sinonímia. De maneira sumária as categorias taxonômicas são: Characiformes (peixes de escama); siluriformes conhecidos também como bagres ou peixes-lisos e perciformes, peixes sedentários, típicos de lagos e caracterizados por espinhos nas nadadeiras (SANTOS, 2005a).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Descrição da espécie em estudo

A sardinha, *Triportheus angulatus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) é denominada também de sardinha papuda, sapamama no Peru e sardina na Bolívia e Colômbia (SANTOS, 2006a).

A crescente pressão da pesca sobre determinados grupos de espécies, os chamados “nobres” tem provocado a redução nos seus estoques. Devido a isto, o interesse comercial sobre espécies de menor porte e valor comercial tem aumentado substancialmente em diversas partes da Amazônia, refletindo a procura de novas alternativas de pescada (DORIA, 2008).

Ainda segundo Doria (2008), ao longo da década de 90 as sardinhas (*Triportheus albus*, *Triportheus angulatus*, e *Triportheus auritus*) representavam 2,5% do desembarque total dos principais portos fluviais desde Iquitos no Peru, até Belém no estado brasileiro do Pará. Apenas em Manaus, entre 1994 e 1996, estiveram entre as seis espécies mais comercializadas, totalizando mais de 4% de toda a produção consumida no município.

Fenotipicamente é caracterizada pelo pequeno porte (até 20 cm), corpo curto e alto com grande expansão quilhada em forma de “papo” na região peitoral, nadadeira caudal com raios centrais escuros e prolongados em forma de filamento, cujo tamanho corresponde aproximadamente a 1/3 da nadadeira; coloração cinza-metálico, mais escura no dorso ocasionalmente aparecendo pontos de pigmentos sobre as fileiras de escamas ao longo dos flancos, formando listras curvas incipientes (SANTOS, 2006).

Possui hábito onívoro, consumindo basicamente frutos, algas, sementes, insetos e outros invertebrados. Forma cardumes e empreende migrações para fins reprodutivos geralmente entre setembro e outubro, principalmente no rio Madeira, sendo trófica na seca e reprodutiva na enchente, desovando em águas brancas e vivendo comumente em áreas de várzea (SANTOS, 2006; DORIA, 2008).

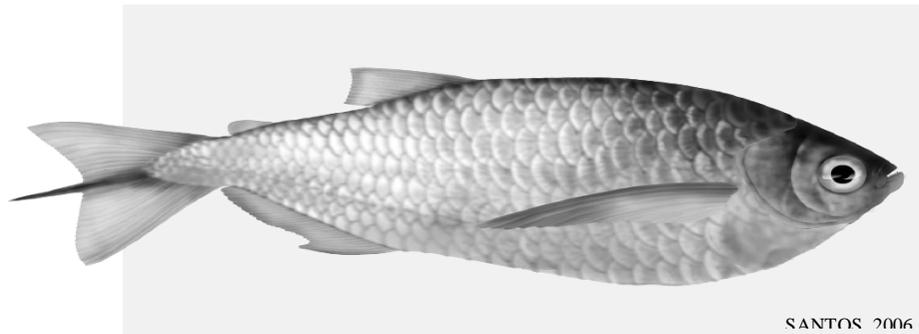


Figura 1. Sardinha *Triportheus angulatus* (SPIX & AGASSIZ, 1829).

## 2.2 Estrutura muscular

A musculatura é composta por centenas de diferentes tipos de proteínas. As miofibras, as mais abundantes, são compostas por filamentos grossos (miosina, C-proteína, H-proteína), filamentos finos (actina, troponina, tropomodulina, nebulina e tropomiosina), filamentos intermediários (desmina, paranemina, sinemina) entre outros (ROBSON, 1997). Os filamentos grossos e finos formam respectivamente as bandas escuras e claras alternadas, apresentando padrões característicos de cruzamento de miosina e actina (bandas A - escura e I - clara) (Figura 2) alinhadas ao longo do comprimento, dando uma aparência estriada na microscopia ótica com uma faixa central mais escura, a linha Z (GUIMARÃES, 1995).

Essa organização é mantida por diversas proteínas, como a desmina, que liga as miofibrilas umas às outras (MICHELE, 2003) e a tropomiosina (figura 3), uma proteína fibrosa que une os filamentos de actina apresentando-se como um complexo de três polipeptídeos: a troponina C (unindo-se com o cálcio), troponina I (inibitório) e a troponina T (unindo-se com a tropomiosina) (CARROL, 1999).

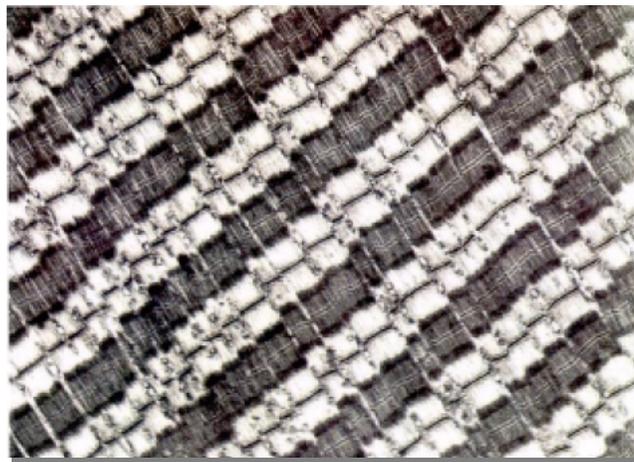
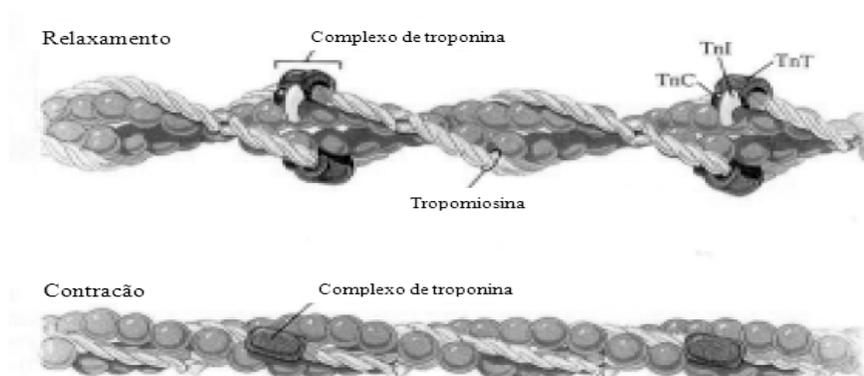
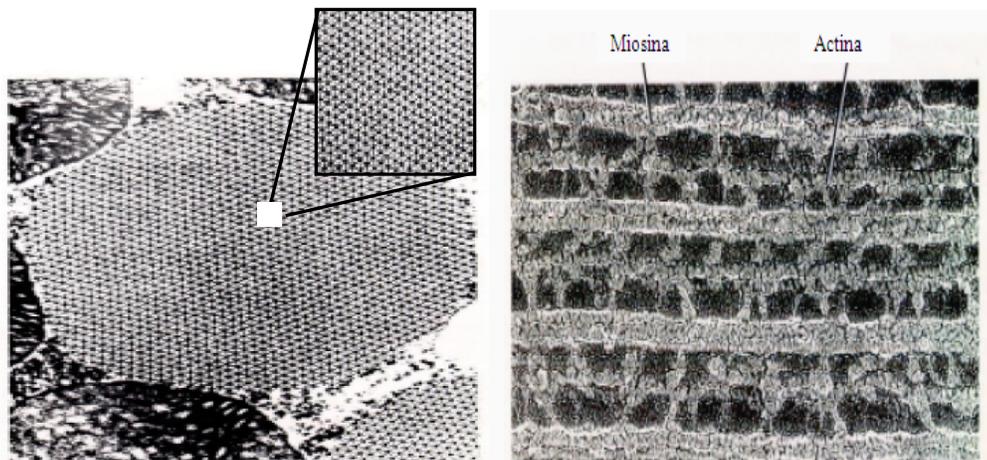


Figura 2. Micrografia eletrônica de uma fibra muscular estriada. As miofibrilas se estendem diagonalmente do canto superior esquerdo ao inferior direito (Guimarães, 1995).



As miofibrilas (figura 4) representam mais da metade das proteínas existentes na musculatura de peixes (60 a 80%) sendo distribuídas entre miosina, actina, troponina, tropomiosina, proteínas sarcoplasmáticas (20 a 25%) com importante hidrossolubilidade e atividade enzimática e proteínas estomáticas (2 a 4%) (PEREDA, 2005; CHEFTEL, 1989). Embora não sejam significativas, as características físico-químicas dos músculos (quadro 1) variam conforme a idade, alimentação, sexo e raça do animal (BRASIL, 1999).



Figuras 4 e 5. Fotografias eletrônicas. À esquerda, corte transversal de uma miofibrila. No detalhe, o arranjo hexagonal dos filamentos finos e grossos. À direita, pontes de ligação entre miosina e actina (Adaptado de Guimarães, 1995).

Nos tecidos conectivos, o conteúdo de proteínas representa entre 3 a 10% do total presente. Nos peixes, não há sistema tendinoso responsável pela conexão dos músculos ao esqueleto. A musculatura esquelética é envelopada, ancorada diretamente ao esqueleto e à pele, caracterizando-se pela organização das proteínas contráteis em unidades repetidas organizadas em série chamadas de sarcômeros. Sua matriz extracelular ou o tecido conectivo são funcionalmente e estruturalmente complexos, sendo o colágeno o principal constituinte (LADRAT-DELBARRE, 2006).

Quadro 1

Características físico-químicas de músculos de peixes (adaptado de CHEFTEL, 1989).

Item	Características
Tecido conjuntivo	No pescado é menor. As proteínas do estroma representam 3 a 10% das proteínas totais.
Temperatura de gelatinização	O colágeno do pescado é 10°C inferior em relação à carne vermelha.
Fibra muscular	No pescado é curta e organizadas em lâminas (miótomo).
Miosina	É difícil de separar da actina. É mais sensível à desnaturação térmica e a proteólise.
Rigidez cadavérica	Aproximadamente 5 horas a 0°C
Maturação	Aproximadamente 30 horas a 0°C
pH <i>post mortem</i>	De 7 a 6,5 - 6,2
Constituição	Entre 50 e 80% de água
	Entre 15 a 22% de proteínas
	Entre 1 a 15% de lipídios
	Aproximadamente 1% de sais minerais

### 2.3 Consumo do pescado por assamento

O assamento, assim como a fritura e cozimento, tem como objetivos principais alterar as propriedades sensoriais dos alimentos, melhorando a palatabilidade e aumentando a gama de sabores, aromas e texturas, constituindo-se as principais formas de preparo para o consumo de pescado.

Fisicamente, assar envolve ao mesmo tempo a transferência de massa através da saída de umidade e pela entrada de calor na amostra, em grande parte na forma de condução e por vezes convecção.

O tamanho dos alimentos e a baixa condutividade térmica dos alimentos causam variação nas taxas de transferência de calor. Quando colocado sob uma fonte de calor, a baixa umidade do ar gera um gradiente de pressão de vapor, evaporando a umidade na superfície do alimento, criando um movimento da umidade do interior para a superfície, mesmo com formação de uma crosta aparentemente seca (FELLOWS, 2006).

Ainda segundo Fellows (2006), a gordura derretida se dispersa como óleo pelo alimento ou escorre para fora; o colágeno é solubilizado sob a superfície gelatinando-se; as proteínas decompõem-se e coagulam através da pirólise parcial perdendo sua capacidade de retenção de água; as enzimas também são desnaturadas. Quando não em excesso, o endurecimento da superfície passa a reter a umidade e gordura, protegendo os nutrientes e o sabor. Influenciam estas alterações também a espécie, temperatura aplicada e duração do aquecimento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Caracterizar a formação de nitratos e nitritos e a degradação miofibrilar em sardinha (*Triportheus angulatus*) decorrente do assamento com carvão vegetal.

#### **3.2 Específicos**

Quantificar nitrato e nitrito (compostos nitrosantes), importantes precursores de compostos nitrosos da sardinha (*Triportheus angulatus*) *in natura* e após o processamento térmico por assamento com carvão vegetal.

Caracterizar e comparar o perfil miofibrilar por SDS-PAGE da sardinha (*Triportheus angulatus*) *in natura* e após o processamento térmico por assamento com carvão vegetal.

Quantificar o índice de fragmentação miofibrilar da sardinha (*Triportheus angulatus*) *in natura* e após seu processamento térmico por assamento com carvão vegetal.

## CAPÍTULO 1

### Quantificação espectrofotométrica de nitratos e nitritos em sardinha (*Triportheus angulatus*) *in natura* e assada com carvão vegetal

#### RESUMO

Os nitratos e nitritos em alimentos possuem duas possíveis origens: ocorrência intencional e não intencional. Quando intencionalmente adicionados seus objetivos são a ação antibacteriana dose-dependente, fixação e/ou intensificação de coloração avermelhada e conferir sabor “curado”. A ocorrência não intencional condiciona-se a sua pré-existência no ambiente, existência de fatores que favoreçam sua formação no organismo ou ainda decorrente de ação química ou física. Resultados de estudos epidemiológicos para estabelecer a relação entre a ingestão e a presença de nitrato e nitrito no organismo, sintomas clínicos e patologias envolvidas são conflitantes e contraditórios. Este estudo torna-se relevante pelo fato de nitratos e nitritos serem importantes precursores de compostos nitrogenados, como as nitrosaminas. Neste trabalho foram analisadas 20 amostras de sardinha (*Triportheus angulatus*) *in natura* e assadas com carvão vegetal 30 e 60 minutos com temperatura controlada. A quantificação ocorreu pela formação de cor através da reação de diazotação, posterior acoplamento do sal de diazônio formado com NED e leitura espectrométrica. Foi constatado que há presença nas amostras *in natura* e formação nas amostras assadas.

A quantidade de nitratos e nitritos verificada situou-se abaixo do disposto pela legislação brasileira, apesar de não específica para pescados (máximo de 0,1% para nitratos e 0,02% para nitritos em produtos cárneos). A média de nitritos encontrados nas amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos foi de 0,0001% (m/m), 0,0063% (m/m) e 0,0030% (m/m) respectivamente. A média de nitratos encontrados nas amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos foi de 0,0020% (m/m), 0,00001% (m/m) e 0,00001% (m/m) respectivamente.

Foi demonstrado que a amostra *in natura* e o método de preparo por assamento confere segurança para o seu consumo em relação à presença de nitratos e nitritos.

Palavras-chave: Nitrato, nitrito, espectrofotometria, sardinha, *Triportheus angulatus*.

## ABSTRACT

Quantification nitrates espectrofotometric and nitrites in sardine (*Triportheus angulatus*) in natura and roasted with vegetable coal 30

The nitrates and nitrites in foods have two possible origins: intentional and unintentional occurrence. When your goals are intentionally added to antibacterial dose-dependent, fixing and /or intensification of reddish color and flavor to it cured. The occurrence no intentional of your pre existence is conditioned in the atmosphere, existence of factors that favor your formation in the organism or still due to action chemical or physical. Results of epidemiological studies to establish the relationship between intake and the presence of nitrate and nitrite in the body, clinical symptoms and pathologies involved are conflicting and contradictory. This study is relevant because they nitrates and nitrites are important precursors of nitrogen compounds such as nitrosamines. This study analyzed 20 samples of sardine (*Triportheus angulatus*) and baked with fresh charcoal 30 and 60 minutes with temperature controlled. Quantification occurred by the color formation by reaction of diazotization, coupling further diazonium salt formed with NED and spectrometric reading. It was noted that there is presence in the fresh samples and samples baked in training. The amount of nitrates and nitrites found was below the requirements under Brazilian law, although not specific to fish (up 0.1% for nitrate and 0.02% for nitrite in meat products). The average nitrite found in fresh samples, baked 60 minutes and 30 was 0.0001% (m / m), 0.0063% (w / w) and 0.0030% (w / w) respectively. The average nitrate found in fresh samples, baked 60 minutes and 30 was 0.0020% (m / m), 0.00001% (m / m) and 0.00001% (m / m) respectively. The methods of preparation of the samples, therefore, afford security for their consumption in relation to the presence of nitrates and nitrites in fresh fish and roasts.

Keywords: nitrate, nitrite, spectrophotometry, sardines, *Triportheus angulatus*.

# 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Nitratos e nitritos em alimentos

Os nitratos e nitritos em alimentos têm duas origens: intencionalmente adicionados ou ocorrência/formação não intencional. Quando intencionalmente adicionados, visam três importantes papéis nos alimentos. Primeiro, exercem ação antibacteriana dose-dependente especialmente em produtos cárneos não estéreis (BELITZ, 1997), inibindo principalmente o *Clostridium botulinum* (SHIBAMOTO, 1996) e microrganismos formadores de esporos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, entre outros, além de impedir a oxidação lipídica (rancidez) e conseqüentemente a putrefação dos alimentos e distúrbios de saúde relacionados à sua ingestão (NAS, 1981).

Segundo, fixa e/ou intensifica a coloração avermelhada nos produtos cárneos devido aos pigmentos nitrosilmioglobina e nitrosilhemoglobina os quais são formados pela redução do nitrito a óxido nítrico o qual se combina com a metamioglobina originando a nitrosometamioglobina, que pode reduzir-se a nitrosomioglobina (SHIBAMOTO, 1996; REYES, 2009b; ROÇA, 2000).

O terceiro papel dos nitritos é fornecer o que pode ser descrito como um sabor “curado”, perceptível, por exemplo, no bacon, em quantidade que gira em torno de 50mg. kg<sup>-1</sup> (BELITZ, 1997).

Mesmo sendo menos usado que o nitrito, o nitrato é a sua principal fonte, responsável por seu surgimento e na manutenção de níveis eficazes para a conservação dos alimentos (NAS, 1981). Entretanto, em quantidades excessivas tendem a formar

compostos N-nitrosos, comprovadamente nocivos. Neste contexto, tanto os nitratos como nitritos tornam-se fatores antinutricionais (WALKER, 1990; FENNEMA, 1993).

O comitê FAO/WHO de peritos em aditivos alimentares em sua 59<sup>a</sup> reunião define uma ingestão diária segura de aditivos para nitrito na forma de íon limitada entre 0 e 0,07 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo e na sua 44<sup>a</sup> reunião entre 0 a 3,7 mg.kg<sup>-1</sup> de nitrato na forma de íon (ANDRADE, 2004).

Considerando-se uma dieta normal, a quantidade de nitrato ingerido situa-se em torno de 100 mg ao dia, sendo que os principais representantes, principalmente pelo uso de fertilizantes, são as hortaliças (até 200 mg ao dia) e raízes podendo representar entre 72 e 94% além de cereais e carnes curadas (que podem representar 90% do consumo diário) (SHIBAMOTO, 1996; BENINI, 2002). Portanto, os vegetarianos consomem maior quantidade de nitrato em relação a outras dietas.

Apesar disso, os vegetarianos têm 20 a 40% menos incidência de câncer gástrico do que os não vegetarianos porque além de nitratos e nitritos, os vegetais possuem importante concentração de inibidores, como a vitamina C e vitamina E (FAQUN, 2004).

Fatores ambientais também influenciam de forma decisiva o conteúdo de nitrato e nitrito oriundo de animais e vegetais. Em plantas, a espécie, variedade, parte da planta, estágio de maturação, estiagem, temperatura ambiente, horário de coleta, luminosidade (FANQUIN, 2004), deficiência ou não de nutrientes além do uso de fertilizantes são importantes fatores que obrigatoriamente devem ser observados (REYES, 2009b).

A quantidade de nitratos e nitritos em animais pode ser influenciada pela sua presença no meio ambiente, porém, em animais aquáticos parece não ser um sério problema já que possui um importante papel sobre a osmorregulação e transporte do

oxigênio (GRAEFF, 2006). Nos peixes a principal entrada no organismo é via branquial (DURBOROW, 1997).

Níveis de nitratos e nitritos em amostras de leite *in natura*, produzido por vacas submetidas aos sistemas de manejo convencional e orgânico e não mostraram diferenças significativas nas amostras em função do sistema de produção avaliado, época de coleta, turno de ordenha ou local de origem (SANTOS, 2005b).

Devido aos prós e contras, são grandes as discussões a respeito do uso e da presença de nitratos e nitritos nos alimentos. Os efeitos benéficos, como a inibição do crescimento de bactérias, principalmente as patogênicas nos alimentos e o aprimoramento de suas características organolépticas são argumentos a favor do seu uso.

Nenhuma outra substância possui capacidade igual ou superior no desenvolvimento de cor e ação antimicrobiana (ROÇA, 2000).

Além disso, há evidências de que o nitrato dietético apresenta destacado papel benéfico, protegendo a área gastrointestinal contra microrganismos patogênicos. Estudos mostram que a adição de nitrito ao ácido estomacal inibe microrganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori* (LUZ, 2008).

Em alimentos com excesso de nitratos e nitritos, vários meios podem ser utilizados na redução ou eliminação: combinar os produtos da mistura imediatamente antes do seu uso (SHIBAMOTO, 1996) e aumentar o tempo da cura com nitrito de sódio (REYES, 2009b), utilizar métodos de cozimento como o branqueamento (NAS, 1981), uso direto de água quente onde o íon nitrato se difunde devido à sua hidrossolubilidade (INCA, 2009; WHO, 1978; ANDRADE, 2004) e acidificação de carne na sua conservação (FAQUIN, 2004) são os mais usuais.

A adição de inibidores que evitem a formação de compostos N-nitrosos como ácido ascórbico, alfa tocoferol, eritorbato de sódio ou o uso de processos combinados também são indicados (BARUFFALDI, 1998; WHO, 1978).

É importante citar que em alimentos com adição intencional, a retirada ou neutralização total dos nitratos e/ou nitritos não é indicada, já que a sua ausência pode se tornar um risco de saúde pública devido à possibilidade de intoxicações alimentares ocasionadas por microrganismos (BELITZ, 1997).

## **1.2. Distribuição dos nitratos e nitritos no meio ambiente**

No meio ambiente os íons nitrato e nitrito fazem parte do ciclo do nitrogênio. A partir do início do século XX, quando os compostos nitrogenados, que na sua grande maioria tendem converterem-se a nitrato (ANDRADE, 2004) começaram a ser extensivamente utilizados como fertilizantes na agricultura (25 a 85% do total sob forma de nitrato de potássio e nitrato de amônio) (EPA, 1980). Por conseqüência, sua presença aumentou drasticamente em águas superficiais e solos, chegando a exceder em 10% a desnitrificação (WHO, 1978). Nem mesmo a fotossensibilidade à radiação gama diminui sua presença (NAS, 1981).

Águas residuárias, subprodutos industriais, decomposição animal e vegetal, além da agropecuária também contribuem de forma intensa. Em poços superficiais a quantidade de nitratos pode alcançar  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Normalmente águas de superfície não apresentam quantidades elevadas de nitratos e nitritos (BRANCO, 1977). Água para consumo humano é a menor fonte de nitratos, mas normalmente é a maior contribuinte

(WHO, 1978). No Brasil, o limite para nitratos e nitritos em águas para consumo humano é de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (BRASIL, 2011).

A decomposição no meio ambiente de aminoácidos e proteínas de tecidos animais ou vegetais origina entre outras substâncias, as aminas, nitratos e nitritos. Este mesmo nitrato auxilia nas condições de estabilização aeróbia de matéria orgânica nitrogenada. A absorção destes nitratos e nitritos através da água utilizada varia de espécie para espécie (SAMPAIO, 2006; ANDRADE, 2004).

Alimentos armazenados em temperatura ambiente elevada (acima de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) facilitam a redução de nitratos a nitritos. Esta reação pode ter a velocidade duplicada a cada aumento de  $10^\circ\text{C}$  (MANTOVANI, 2005; DUTRA, 2007).

Fermentação e contaminação por microrganismos como os fungos, particularmente o *Fusarium moniliforme* também são decisivos no surgimento de compostos (MATSUI, 1944).

Os nitritos frequentemente são encontrados somente em níveis de traços em cereais, vegetais fermentados ou em conservas e carnes, especialmente as curadas (KLUBES, 1971) e peixe defumado e salgado (GLORIA, 2007). O cloreto de sódio, muito utilizado como meio de conservação do pescado e outras carnes como a de gado e caça, atua principalmente em nível gástrico como fator lesionador (REYES, 2009c), facilitando a ação tóxica de compostos N-nitrosos.

### **1.3 Aspectos toxicológicos de nitratos e nitritos**

Estudos epidemiológicos para estabelecer a relação entre a dose ingerida de nitrato e/ou nitrito, sintomas clínicos e patologias envolvidas são conflitantes e

contraditórios (LEVALLOIS, 2000; ANDRADE, 2004), já que fatores se sobrepõem uns aos outros, inclusive pela presença de catalisadores e/ou inibidores (BELITZ, 1997; TRICKER, 1991).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), nitratos e nitritos podem ser classificados no grupo 2A como provavelmente carcinogênicos para muitos animais e alguma similaridade no organismo humano e de alguns roedores ou no grupo 2B com evidência carcinogênica comprovada em algumas espécies animais, independente do órgão-alvo. Em humanos, somente a N-nitrosornicotina (tabaco específica) tem sua ação cancerígena comprovada (DUTRA, 2007; WHO, 1978).

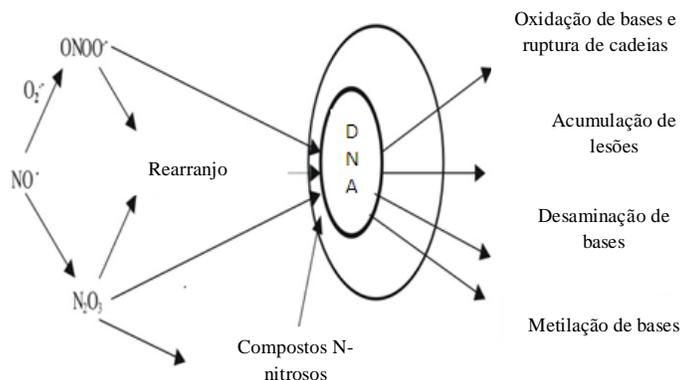


Figura 6. Mecanismos tóxicos mediados por compostos N-nitrosos (adaptado de ARCE, 2004).

A primeira observação do efeito tóxico devido à ingestão de uma quantidade excessiva de nitrato em alimentos foi realizada em 1895 por Mayo, que descreveu três episódios de intoxicação fatal em gado. Constatou-se a presença de nitrato de potássio no gado em grande quantidade após o consumo de ração à base de milho proveniente da adubação do solo onde o milho cresceu (REYES, 2009a).

Em humanos, os primeiros estudos de exposição de nitratos ocorreram em 1945 por Comly e mais tarde por Robertson & Riddell em 1949, onde níveis de metahemoglobinemia associadas a sinais de toxicidade por nitrato foram observados em crianças que consumiram água com alta concentração de nitratos (FEWTRELL, 2004).

No organismo, o nitrato e nitrito participam de um intercâmbio dinâmico - o ciclo de nitrogênio humano - que envolve a ingestão, síntese endógena e excreção. Quando ingeridos, os nitratos são rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal superior e eliminados na urina dentro de cinco horas (REIS, 2006) ou metabolizados pela microflora dos tratos gastrointestinal e urinário e reduzidos a nitrito dentro de condições específicas de pH e temperatura. Este mesmo nitrito pode ser oxidado a nitrato e recomeçar o ciclo (AGUDO, 2002).

Em estudos epidemiológicos, a diferenciação da produção endógena da que ocorre a partir da ingestão é importante para a determinação de fatores que possam contribuir para o aumento do risco de doenças que não estejam relacionados à dieta (ROÇA, 2000).

A ingestão freqüente de nitratos aumenta consideravelmente as chances da formação de compostos N-nitrosos através da redução a nitritos, ao contrário de grandes e exparsadas doses únicas (MANTOVANI, 2005; WHO, 1978). A consideração desse fato é importante, pois as disparidades dos resultados encontrados nestas associações podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela dificuldade de controle das concentrações endógenas derivadas de quantidades ingeridas e fontes diferentes da dieta (BRITTO, 1997).

O nitrito ingerido é absorvido no intestino delgado, circula através do sangue e é excretado através da urina (65 a 70%) ou das fezes (3 a 10%). Cerca de 25% do nitrato exógeno é captado ativamente pelos ductos salivares através da circulação. Na cavidade

oral, mais de 20% do nitrato captado é convertido em nitrito por bactérias redutoras (SAMPAIO, 2006). Dependendo da dieta, a saliva pode contribuir como fonte de nitrito com valores entre 1 e 6 mg.L<sup>-1</sup> ao dia (REYES, 2009b; CORREA, 1975; EPA, 1980).

A toxicidade de nitratos e nitritos está relacionada também a outros vários fatores, entre os quais estilo de vida, exposição ambiental, idade, grau de nutrição e estado de saúde, dieta e à quantidade e frequência ingerida de matrizes alimentares que possuem estes compostos. Geralmente, compostos N-nitrosos podem ter ação nociva direta, não necessitando de ativação enzimática ou intermediários eletrofílicos como as nitrosamidas, ao contrário das nitrosaminas (REYES, 2009c).

Quadros de saúde caracterizados pela baixa acidez estomacal e subnutrição, ambos os casos, comuns em crianças (REYES, 2009c; ANDRADE, 2004), permitem o aumento de microrganismos que produzem enzimas (nitroredutases) capazes de reduzir nitratos a nitritos (WHO, 1978).

Na metahemoglobina ou doença do “sangue azul”, o nitrato, especialmente ingerido a partir dos alimentos, é reduzido a nitrito (NO<sup>-2</sup>) no trato digestivo e em seguida a óxido nítrico, que ao chegar à corrente sanguínea oxida o ferro hemoglobínico (Fe<sup>+2</sup> → Fe<sup>+3</sup>), tornando a hemoglobina incapaz de transportar oxigênio para efetuar a respiração celular (FAQUIN, 2004; REIS, 2006).

Segundo Reyes (2009), estudos realizados em roedores indicaram que a ingestão de 300 a 330 mg de nitrato de sódio por kg de peso corpóreo resultou em morte após 30 minutos, somatizada anteriormente por metehemoglobina em 75 a 90% das hemácias, falta de coordenação motora, prostração e coma.

#### **1.4 Origem de compostos N-nitrosos a partir de nitrato e nitrito**

A constituição orgânica das matrizes alimentares sob ação de processos químicos ou físicos sofre alterações, modificando propriedades organolépticas, constitucionais (perda de água e vitaminas) e estruturais.

Vários tipos de estruturas presentes em alimentos (especialmente ricos em proteínas como carnes), cosméticos, fumos (REYES, 2009b) contendo nitrogênio (aminas, uréias, aminoácidos) podem ser nitrosados e formar compostos N-nitrosos, a partir de reações com substâncias nitrosantes (derivados de sais de nitrato e nitrito ou óxido nítrico) em condições específicas de pH, temperatura e condicionadas à presença de substâncias inibidoras (vitaminas C) ou catalisadoras (tiocianato, formaldeído). São exemplos dentre as dezenas de compostos N-nitrosos, as nitrosaminas, nitrosamidas e nitrosouréias (GLÓRIA, 2007).

Compostos N-nitrosos são formados a partir da reação química específica entre aminas secundárias, terciárias ou quartenárias e nitritos na forma iônica (isolado não possui ação tóxica) em condições ácidas específicas, ou ainda, aminas aromáticas em pH neutro (DUTRA, 2007).

A partir das aminas secundárias e nitritos, microrganismos também podem dar origem a compostos nitrosos. Pela sua grande capacidade de reação e influenciadas por variações de temperatura, presença de oxigênio e reações paralelas entre óxidos (especialmente nitroso), nitratos e nitritos formam uma grande gama de formas químicas (KLUBES, 1971).

Estas formas em sua grande maioria não bioacumulativas e instáveis, porém toxicologicamente dose-dependente, necessitam de tempo de exposição, ativação metabólica para exercerem ação mutagênica e carcinogênica (DUTRA, 2007).

O processamento térmico de alimentos protéicos a altas temperaturas fazem com que os aminoácidos, creatinina (comum nos tecidos musculares), glucose e dipeptídeos origem aminas, especialmente as heterocíclicas (SILVEIRA, 2001).

### **1.5 Legislação para nitratos e nitritos**

A tolerância do limite para nitrato como aditivo alimentar depende do produto e da legislação vigente em cada país.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos desde 1925 iniciou a regulamentação da utilização de sais de nitrato e nitrito no processo de cura de carnes.

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (R.I.I.S.P.O.A.) do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1952), o artigo 372 e 365 dispõem: “O emprego dos nitratos e nitritos, de sódio ou de potássio, ou qualquer combinação entre eles, só pode ser feito em quantidades tais que, no produto para o consumo, o teor em nitrito não ultrapasse a 200 ppm (0,02%) e 0,1% de nitrato” respectivamente.

Ainda no R.I.I.S.P.O.A, o artigo 373 dispõe: “Os nitritos de sódio ou de potássio só podem ser empregados, isoladamente ou em combinação, nas seguintes proporções máximas: entre 1 e 240 g para cada 100 litros de salmoura (0,24%) ; entre 2 e 60 g para cada 100 kg de carne na cura a seco de mistura com o sal (0,06%) e entre 3 e 15 g para cada 100 kg de carne picada ou triturada de mistura com o sal (0,015% no método direto)”.

A portaria nº1004 de 11.12.1998 do Ministério da Saúde estabelece para produtos cárneos limites entre 0,015 g.100g de nitrito e 0,03 g.100g de nitrato no produto final (BRASIL, 1999b). Não existe legislação específica para carne de peixe.

Em águas para consumo humano, a quantidade permitida é de 10 mg.L<sup>-1</sup> para nitratos e 3 mg.L<sup>-1</sup> segundo a Portaria 2814 de 11.12.2011 do ministério da saúde (BRASIL, 2011).

Na Alemanha e África do Sul a concentração máxima de nitratos em águas de consumo humano é limitado em 4,4 e 5,6 mg.L<sup>-1</sup>. Na Itália, o limite para nitratos é de 4,5 mg.L<sup>-1</sup>, visto que há indícios de problemas de saúde a partir destes níveis (ANDRADE, 2004).

## **1.6 Quantificação de nitratos e nitritos**

Muitas metodologias analíticas tem sido propostas para determinação de íons nitrato e nitrito, entre as quais a associação de procedimentos cromatográficos, espectrofotométricos e potenciométricos. Os métodos espectrofotométricos são freqüentemente empregados, pelos baixos limites de detecção, pela rapidez, simplicidade e versatilidade de reagentes cromogênicos.

Os métodos analíticos consistem em uma seqüência iniciada com o isolamento dos analitos de outros compostos da amostra seguida de sua concentração através de extração líquido-líquido ou fase-sólida (REYES, 2009 b).

O isolamento do nitrato e nitrito da matriz tem sido freqüentemente realizada em meio aquoso devido à maioria dos sais de nitrato e nitrito serem solúveis em água. Dependendo da matriz, após a obtenção do extrato há necessidade de realizar um

processo de clarificação, que é fundamental, uma vez que para alguns métodos analíticos, como a espectrometria, são necessários extratos límpidos (ANDRADE, 2004).

Dentre os procedimentos mais conhecidos destaca-se o de Griess, desenvolvido em 1879 que se apresenta como uma técnica simples. A principal desvantagem deste método é a necessidade do emprego de coluna de cádmio envelopado em cobre e de uma solução de cloreto de cádmio. A coluna de redução precisa ser regenerada após a passagem de algumas amostras e desta regeneração resultam cádmio e cobre, resíduos tóxicos que precisam ser devidamente descartados (BASTOS, 2006).

A análise baseia-se na redução do nitrato a nitrito em meio alcalino pela passagem do extrato em coluna esponjosa contendo cloreto de cádmio para extração dos íons, com posterior quantificação do nitrogênio na forma de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) por colorimetria após reação com sulfanilamida e etilenodiamina. Outra técnica, citada por Ulrich (1948) e modificado por Moraes e Cantarella (2003), promove a redução do nitrato a nitrito com uma mistura contendo zinco em pó (MANTOVANI, 2005).

Mantovani (2005) cita que a comparação entre as metodologias que utilizam como processo de redução do nitrato a nitrito por coluna redutora, destilação e mistura com zinco os resultados apresentaram-se muito próximos e compatíveis.

O método espectrofotométrico, empregado em laboratórios com infra-estrutura simples e com baixo investimento, possui como vantagens não requerer emprego de colunas redutoras e ser sensível a traços dos íons nitrato e nitrito, com um erro máximo de 5% na determinação. Mesmo quando aplicada em matrizes complexas com um grande número de interferentes, comum em amostras orgânicas, apresentam resultados satisfatórios (PESSOA NETO, 2006). Esta é a tendência atual, disponibilizando

procedimentos acessíveis e que gerem menos resíduos tóxicos para descarte (BASTOS, 2006).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Foram utilizadas 20 amostras de sardinha (*Triportheus angulatus*) obtidas na feira do CEASA, Distrito Industrial de Manaus. Antes dos procedimentos, a estas amostras foi aplicada avaliação sensorial baseada na tabela da Torry Research – Station Escocia (anexo 6.1). Foram observadas características físicas das guelras, olhos, pele, odor e textura.

As amostras receberam aprovação (“A”) em todos os itens. Em seguida, foi efetuada a evisceração através de corte no sentido ântero-posterior, ensacados individualmente e refrigerados em caixa térmica para o transporte e congeladas em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  (ELECTROLUX) até o momento do assamento. O congelamento retarda, mas não inibe a formação e reação de nitratos e nitritos (ANDRADE, 2004), não havendo desta forma, perda dos analitos.

#### **2.1.2 Preparo das amostras para quantificação de nitratos e nitritos**

Antes do assamento, com auxílio de uma faca e uma espátula, uma alíquota de aproximadamente 15g da musculatura foi retirada dos exemplares. Em seguida, foram

submetidas ao calor da brasa por 30 minutos, sendo a temperatura externa mantida a 90 °C com auxílio de um termômetro de coluna de mercúrio (INCOTERM) e retirados aproximadamente 15g da musculatura. As amostras continuaram a ser submetidas ao calor por mais 30 minutos e retirados mais 15 g da musculatura. Para manter a temperatura constante, a grelha com as amostras foi elevada ou abaixada. A pesagem da amostra foi realizada com auxílio de uma balança de uso não profissional (PLENNA).

O assamento não foi mantido por mais tempo, pois houve início de ressecamento e queima das amostras o que provocou sua inutilização.

Todas as amostras retiradas foram devidamente envolvidas em plástico PVC e papel alumínio, recebendo a identificação “amostra crua”, “amostra 30 minutos” e “amostra 60 minutos”.

## **2.2 Quantificação do nitrito**

Baseia-se em extração líquido-líquido com o aquecimento da amostra em solução alcalina. A determinação espectrofotométrica foi realizada em um comprimento de onda de 537 nm após diazotação do nitrito e posterior acoplamento do sal de diazônio formado com hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) (INCQS, 1998a).

### 2.2.1 Obtenção da curva de calibração para obtenção de nitrito

Foram transferidas alíquotas de 1, 2, 4, 6 e 8 mL da solução padrão de nitrito de sódio (1mL contém 0,01mg ) para balões volumétricos de 50 mL, igualando em seguida para 20 mL com água deionizada. Em seguida adicionou-se 2,5 mL da solução de sulfanilamida. Após 5 minutos adicionou-se 2,5 mL da solução de NED, e o volume do balão completado com água deionizada, homogeneizado e deixado em repouso por 15 minutos. A cor é estável por 3 horas. A leitura foi feita em comprimento de onda de 537 nm contra um branco preparado, sendo substituída a solução padrão por água deionizada.

Tabela 1

Valores de absorbância obtidos a partir das soluções padrão de nitrito para confecção da curva de calibração.

Volume (mL)	Concentração (µg/ml)	Leitura (Abs.)
1	0,1	0,106
2	0,2	0,215
4	0,4	0,426
6	0,6	0,647
8	0,8	0,863

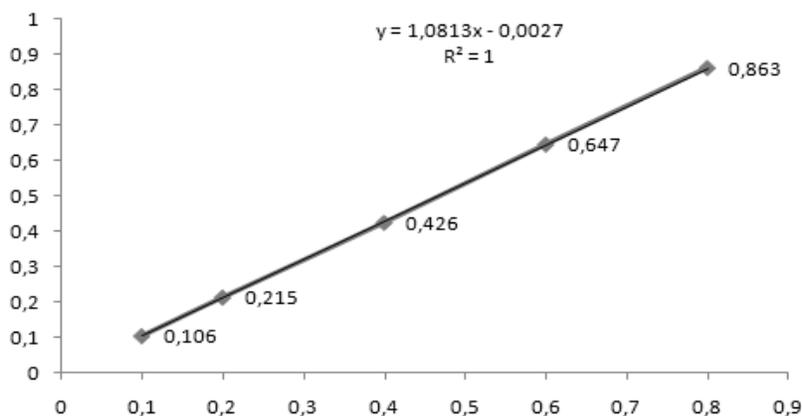


Figura 7. Gráfico da curva de calibração de nitritos, equação e  $R^2$ .

### 2.2.2 Técnica para quantificação de nitrito

10 g da amostra foram homogeneizadas e pesadas com exatidão em tubo de centrífuga de 100 mL e homogeneizada com 50 mL de água deionizada e elevado o pH para 12 com auxílio de hidróxido de sódio 10 N em balão volumétrico e completado o volume. Em seguida foi aquecida em banho Maria a 50°C durante 20 minutos e centrifugado a 8000 RPM por 60 minutos. Através de uma pipeta, transferiu-se 20 mL do sobrenadante para um balão volumétrico de 50 mL e adicionaram-se 10 mL de solução de sulfato de zinco heptahidratado 0,42 M e aquecido por mais 10 minutos em banho-maria. Esfriado em temperatura ambiente, o volume foi completado e procedido filtração através de papel de filtro Whatman 42 seco, previamente lavado. O filtrado obtido foi límpido, não sendo necessário repetir a filtração. Com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL do filtrado límpido foram transferidos para um balão de 50 mL, adicionados 2,5 mL da solução de sulfanilamida e agitado. Após 5 minutos foram adicionados 2,5 mL da solução de NED, agitado, o volume completado com água destilada, homogeneizado e repousado por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 537 nm e os valores aplicados na fórmula  $y = 1.081x - 0,002$ ,  $R^2 = 1$ , obtida através da curva de calibração.

### 2.3 Quantificação do nitrato

Fundamenta-se na redução do nitrato pelo zinco em meio ácido. O nitrito formado é determinado em leitura em um comprimento de onda de 537 nm após diazotação e posterior acoplamento do sal de diazônio formado com hidrocloreto de N-

(1-naftil) etilenodiamina. O valor de absorvância obtido para uma alíquota da amostra é lançado na curva de calibração construída a partir de solução padrão de nitrato, que tenha sido submetido à redução. O teor de nitrato na amostra é determinado convertendo-se a concentração de nitrito existente na amostra antes da redução a nitrato e subtraindo-se este valor da concentração total de nitrato (INCQS, 1998b).

### 2.3.1 Obtenção da curva de calibração para determinação de nitrato

Com o auxílio de uma bureta de 5 mL foram transferidas alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL da solução de trabalho para balões volumétricos de 25 mL e igualados os volumes para 20 mL com água deionizada. Adicionou-se 1 mL da solução de cloreto de amônia, 2 mL da solução tampão, homogeneizado e verificado se o pH encontra-se entre 3,1 e 3,5. Não foi necessário ajustar o pH com a adição de HCl 0,2 M, uma vez que o valor não foi superior a 3,5. Em seguida adicionaram-se 0,2g de zinco em pó e o volume completado com água deionizada, ocasionalmente agitado por 15 minutos. Foi efetuada a filtração da solução através de papel Whatman 42 (seco, previamente lavado). O filtrado obtido foi límpido, não sendo também necessário refiltrar. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram transferidos 20 mL do filtrado para um balão volumétrico de 50 mL e procedido do mesmo modo descrito para nitrito, iniciando pela adição de 2,5 mL de sulfanilamida.

A leitura foi realizada em comprimento de onda de 410 nm e os valores aplicados na fórmula  $y = 0,940x + 0,146$ ,  $R^2 = 0,997$ , obtida através da curva de calibração.

Tabela 2

Valores de absorvância obtidos a partir das soluções padrão de nitrato para confecção da curva de calibração.

<b>Volume (mL)</b>	<b>Concentração (µg/ml)</b>	<b>Leitura (Abs.)</b>
<b>1</b>	0,1	0,227
<b>2</b>	0,2	0,356
<b>3</b>	0,3	(0,371)
<b>4</b>	0,4	(0,767)
<b>5</b>	0,5	(0,724)
<b>7</b>	0,7	0,787
<b>10</b>	1	1,096

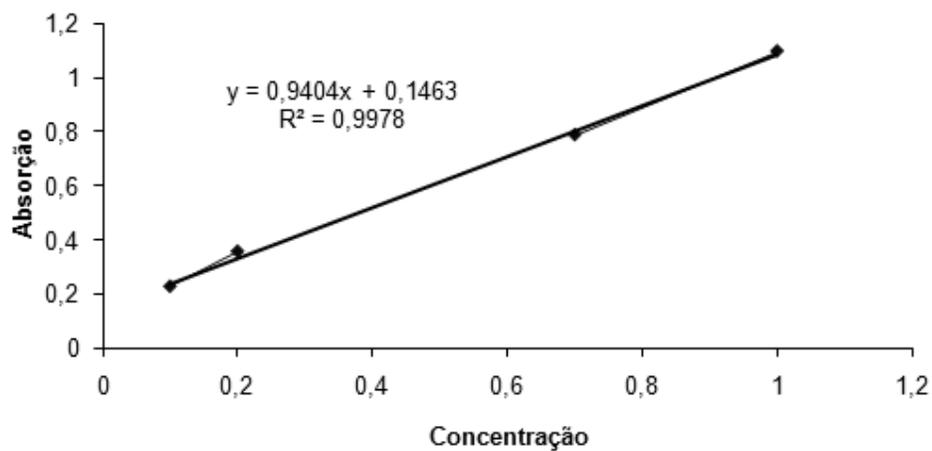


Figura 8. Gráfico da curva de calibração de nitratos.

### 2.3.2 Técnica para quantificação de nitrato

Homogeneizada a amostra e pesada com exatidão 10 g em tubo de centrífuga de 100 mL foi adicionado com auxílio de pipeta volumétrica, 50 mL de água deionizada

e elevado o pH para 12 com auxílio de hidróxido de sódio 10 N. Após aquecimento em banho Maria a 50°C durante 20 minutos, foi efetuada centrifugação a 8000 RPM por 60 minutos. Com auxílio de uma pipeta foi transferido 20 mL do sobrenadante para um balão volumétrico de 50 mL e adicionado 10 mL da solução de sulfato de zinco heptahidratado 0,42 M e aquecido por mais 10 minutos em banho-maria. Esfriado em temperatura ambiente, o volume foi completado e filtrado através do papel de filtro Whatman 42 seco, previamente lavado. O filtrado obtido foi límpido.

Com auxílio de uma pipeta 20 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e adicionado 1 mL da solução de cloreto de amônia, 2 mL da solução tampão, homogeneizado e verificado que o pH encontrava-se entre 3,1 e 3,5, não sendo necessário correção com solução de hidróxido de sódio 0,1M. Em seguida foi adicionado 0,2g de zinco em pó (agente redutor), completado o volume com água deionizada e agitado ocasionalmente por 15 minutos (5 vezes por 10 segundos). A solução foi filtrada através de papel Whatman 42 seco e previamente lavado. O filtrado obtido apresentou aspecto límpido, não sendo necessário re filtragem. Foi transferido com o auxílio de uma pipeta volumétrica 20 mL do filtrado para um balão volumétrico de 50 mL e procedido do mesmo modo descrito para nitrito, iniciando pela adição de 2,5 mL de sulfanilamida. A leitura espectrofotométrica foi aplicada na fórmula obtida através da curva de calibração.

Estes valores em seguida, foram aplicadas as seguintes fórmulas 1, 2 e 3:

Concentração total de nitrato:

$$\text{Teor de nitrato} = (0,3125 \times a) / (8 \times m) \quad (1)$$

Conversão da concentração de nitrito de sódio existente na amostra antes da redução a nitrato de sódio:

$$(\% \text{NaNO}_3 \text{ (m/m)} \times 84,99) / 69 \quad (2)$$

Concentração de nitrato de sódio existente na amostra:

$$(0,3125 \times a) / (8 \times m) - (\% \text{NaNO}_2 \times 84,99 / 69) \quad (3)$$

onde, a: teor de nitrato de sódio em  $\mu\text{g/ml}$  obtido na curva de calibração, m: massa da amostra em gramas e  $\% \text{NaNO}_2$  : concentração de nitrito de sódio em g/100g de amostra.

## 2.4 Tratamento estatístico

Foi utilizada a metodologia KRUSKAL-WALLIS (não paramétrico), através do programa ASSISTAT 7.5 beta (SILVA, 2006).

Os termos paramétrico e não-paramétrico referem-se à média e ao desvio-padrão, que são os parâmetros que definem as populações que apresentam distribuição normal.

O valor numérico calculado pelo teste foi confrontado com valores críticos, que constam em tabelas apropriadas a cada teste. Essas tabelas geralmente associam dois parâmetros, que permitem localizar o valor crítico tabelado: nível de probabilidades usualmente 5 % [ $\alpha = 0,05$ ], ou 1 % [ $\alpha = 0,01$ ].

Valores menores que o tabelado indicam que ele não pode ser considerado diferente do que se obteria se as amostras comparadas fossem iguais. Enfim, estaria

configurado o que se chama de não significância estatística, ou de aceitação da hipótese zero, ou de nulidade ( $H_0$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nitratos e nitritos são importantes precursores na formação de compostos nitrosos, como as nitrosaminas, conhecidas substâncias mutagênicas, teratogênicas e cancerígenas, presentes, além de alimentos, em cosméticos, fertilizantes e águas.

A complexidade e o modo de preparo da matriz para seu consumo, determinam a dificuldade da análise e os resultados de nitratos e nitritos encontrados. Quando submetidos a cozimento em água as amostras apresentam perda dos analitos ao meio devido a sua grande hidrossolubilidade. A fritura também desfavorece, já que a gordura interfere no processo de preparação da amostra, especialmente na obtenção de amostras límpidas, imprescindíveis para análises. O assamento mostra-se, portanto, como o mecanismo de preparo que menos interferentes apresenta, além de ser um dos principais meios de preparo para consumo.

A quantificação de nitratos e nitritos nas amostras *in natura* e assadas por 30 e 60 minutos demonstraram a sua baixa quantidade e formação.

A média de nitratos encontrados nas amostras *in natura*, assadas 30 e 60 foi de 0,00020% (m/m), 0,00001% (m/m) e 0,000005% (m/m) (tabela 3) respectivamente, muito abaixo das dispostas em legislação (0,1% de nitrato).

A média de nitritos encontrados nas amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos foi de 0,0001% (m/m), 0,0063% (m/m) e 0,0030% (m/m) (tabela 3) respectivamente, abaixo das dispostas em legislação (0,02% de nitrito).

Tabela 3

Quantificação e desvio padrão de nitratos e nitritos de amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos.

Tratamento	Amostra <i>in natura</i>		Amostras assadas 30 minutos		Amostras assadas 60 minutos	
	<b>Média</b>	Desvio padrão	<b>Média</b>	Desvio padrão	<b>Média</b>	Desvio padrão
Nitrato (%m/m)	<b>0,00020</b>	0,00017	<b>0,00001</b>	0,0000	<b>0,00001</b>	0,0000
Nitrito (%m/m)	<b>0,00001</b>	0,0000	<b>0,00063</b>	0,00003	<b>0,00030</b>	0,00007

Referente às médias obtidas, com níveis de significância para 1% (p valor <0,01)  $H_0$  foi rejeitado, ou seja, a correlação entre tempo de assagem e os teores de nitrato e nitrito mostrou-se significativa. A correlação entre nitratos e nitritos foi de -0.5352.

Na figura 9 observa-se no gráfico da media de quantificação de nitratos e nitritos, aos 30 e 60 minutos de assamento uma diminuição da quantidade de nitratos, ao contrário do nitrito, que aumenta aos 30 minutos, e apesar de diminuir aos 60 minutos, continua em valor mais elevado do que o nitrato. Podemos atribuir este aumento como derivação da degradação protéica (fonte de nitrogênio) e do nitrato inicialmente presente na amostra *in natura*. À medida que o tempo de exposição ao calor aumenta a quantidade de nitratos decai devido à ação do calor e a diminuição de proteínas como fonte de nitrogênio. O endurecimento da superfície, que possui ação de proteção do interior da amostra também, porém limitado, visto que há decaimento com o aumento do tempo de assamento, auxilia no impedimento de uma perda maior do nitrito formado.

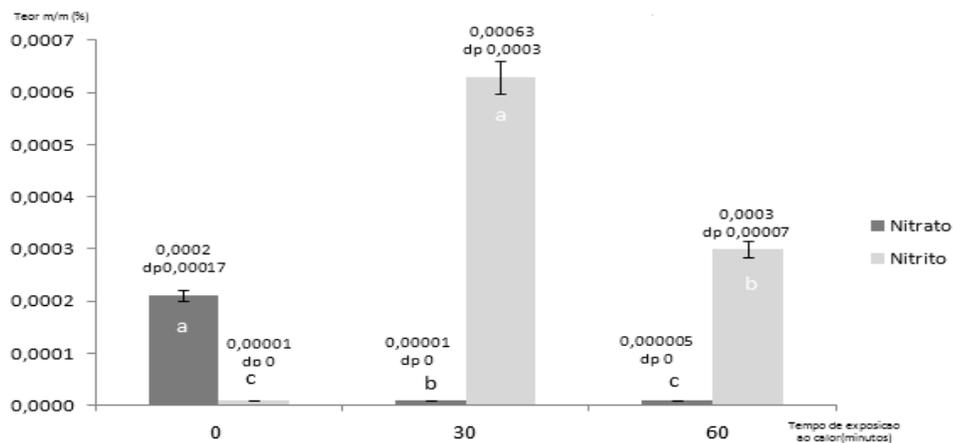


Figura 9. Gráfico da média da quantificação de nitratos e nitritos de amostras *in natura* e assadas 30 e 60 minutos.

A relação entre nitrato e nitrito nas condições pesquisadas apresentou relação linear significativa para todos os tratamentos, com coeficientes de correlação altos (tabela 4).

Tabela 4

Tratamento estatístico segundo Kruskal-Wallis da quantificação de nitratos e nitritos em amostras *in natura* e assadas 30 e 60 minutos.

Tratamento	Amostra <i>in natura</i>		Amostra assada 30 minutos		Amostra assada 60 minutos	
	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito
Repetições	20	20	20	20	20	20
Média	0,00020	0,00001	0,00001	0,00063	0,00001	0,00030
Soma de graus	255.000	55.000	155.000	255.000	55.000	155.000
Classificação	a	c	b	a	c	B
Correlação	0.9537		0.9260		0.8878	

#### 4. CONCLUSÕES

Amostras de peixe submetidas a altas temperaturas favorecem a formação de nitrito, porém, em quantidades muito abaixo da disposta pela legislação. Desta forma, não existe riscos quanto ao consumo da matriz analisada nesta forma de preparo.

Conforme citado, vale lembrar que o risco existe na frequência e não na quantidade em que amostras submetidas a determinados modos de preparo, neste caso o assamento através de carvão vegetal, são consumidos.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R.. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitratos, nitritos e N-nitrosaminas em produtos cárneos. Campinas: UNICAMP. 2004. Tese de Doutorado. Departamento de Química.. Universidade de Campinas. 2004.

AGUDO, A.; GONZALES, C.A. **Potenciales cancerígenos de la dieta y riesgo de câncer.** Revisiones. Medicina Clínica . n.119,v.15. p.:579-89. Barcelona: 2002.

ARCE, D.D.. Óxido nítrico, mutagenesis y câncer. Escuela Latinoamericana de Medicina. **Invest Biomedica.** v.23, n.3. p.184-9. 2004. Disponível em:< [http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol23\\_3\\_04/ibi09304.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol23_3_04/ibi09304.pdf)>. Acesso em:12 mai.2009.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N.. Fundamentos de Tecnologia de Alimentos. v.3. Atheneu. São Paulo: 1998.

BASTOS, A.L; BAISCH, A.L.M.; SOARES, L.A.S.; BURKERTJ.F.M.; FURLONG,E.B. Determinação de nitrato e nitrito em chás de peles de pescados empregados para tratamento de asma brônquica na região sul do Rio Grande do Sul. **Quím. Nova**, v.29 n.5. São Paulo: 2006.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.. **Química de los alimentos.** 2ª. ed..Acribia. Zaragoza: 1997

BENINI, E.R.Y.; Takahashi, H.W.; Neves, C.S.V.J.; Fonseca, I.C.B. Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. **Horticultura Brasileira.** v.20. n.2. Londrina, PR: 2002.

BRANCO, S.M.; ROCHA, A.A.. **Poluição, proteção e usos múltiplos de represas.** CETESB. São Paulo: 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. Dispõe e aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União.** Rio de Janeiro: 1952. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em 12.08.2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. EMBRAPA. **Conhecendo a carne que você consome.** Campo Grande, MS: 1999.

BRASIL, Portaria nº . 2914 de 11 de dezembro de 2011. Dispõe e Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União.** Brasília, DF: 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **População recenseada e estimada, segundo os municípios - Amazonas**. Disponível em:

<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/contagem\\_final/tabela1\\_1\\_3.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/contagem_final/tabela1_1_3.pdf)>. Acesso em 02 mai.2009. Brasília: 2007.

COSTA, M. **Aminas Aromáticas Heterocíclicas em sardinha e salmão grelhados: Influência do processamento culinário**. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade na Especialidade Água e Alimentos. Faculdade de Farmácia. Porto, Portugal: 2009.

CARDOSO, R.S.; BATISTA, V.S.; FARIA JUNIOR, C.H.; MARTINS, W.R.. Aspectos econômicos e operacionais das viagens da frota pesqueira de Manaus, Amazônia Central. **Acta Amazonica**. v. 34, n.2, p.301-07. Manaus: 2004. Disponível em:<<http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=305022>>. Acesso em:12 mai.2009.

CARROL, S.; NICOTERA, P.. Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. **Am Journal Physiology**, v.277, n.6. p.1122-9. 1999.

CHEFTEL,J.C.; CUQ,J.L.; LORIENT,D.. **Proteínas Alimentarias**. Ed. Acribia. Zaragoza, Espanha:. 1989.

CORREA, P.; HAENSZEL, W.; CUELLO, C.; TANNENBAUM, S.; ARCHER, M.. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet**. 12.Jul. p.58-60. 1975. Disponível em: <<http://www.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/49653> > Acesso em 12.mai.2009.

DORIA, C.R.C.; QUEIROZ, L.J. A pesca comercial das sardinhas (*Triportheus* spp.) desembarcadas no mercado pesqueiro de Porto Velho, Rondônia (1990-2004): Produção pesqueira e perfil geral. **Biotemas**, n.21. p. 99-106.2008.

DURBOROW, R.; CROSBY, D.; BRUNSON, M. **Nitrite in fish ponds**. SRAC. n. 462. EUA: 1997.

DUTRA, C.B.; REYES, F.G.R.. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.18, n.1, p.111-20. São Paulo: 2007. Disponível em:< <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/142/150>>. Acesso em: 12mai.2009.

EPA - Environmental Protection Agency. **Ambient Water Quality Criteria for Nitrosamines**. USA: 1980. Disponível em: <<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/library/ambientwqc/nitrosamines80.pdf>> Acesso em 02.mai.2009.

EVANGELISTA, J.. Tecnologia de Alimentos. 2ª Ed. Atheneu. São Paulo, SP: 1987.

FAQUIN, V.. IN: FAQUIN, V.; ANDRADE, A.T. Nutrição mineral e diagnose do estado nutricional de hortaliças. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p. **Acúmulo de nitrato em hortaliças e saúde humana**. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências do Solo. Lavras, MG: Disponível em: <http://www.dcs.ufla.br/hidroponia/acumulo%20de%20no3.PDF>. Acesso em 07.dez.2009.

FELLOWS, P.J.. **Tecnologia do Processamento de alimentos. Princípios e Práticas**. 2ª ed. Artmed.Porto Alegre, RS: 2006.

FENNEMA, W.R.. **Química de los alimentos**. 2.ed. Ed. Acribia. Zaragoza, Espanha: 1993.

FEWTRELL, L..Drinking-Water Nitrate, Metehemoglobinemia, and Global Burden of Disease: A Discussion. **Environ Health Perspect**. v.112c.14. p.1371–74. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247562/>. Acesso em 21.abr.2010.

FORSBERG, M.C.. Ministério do Meio Ambiente. IBAMA. Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea – PROVARZEA. PPG7. Estudo: Setor Pesqueiro: Análise da Situação Atual e Tendência do Desenvolvimento da Indústria da Pesca. Subestudo: **Indústria Pesqueira na Amazônia**. 2004.

GLORIA, M.B.A. **Nitrosaminas em alimentos**. Apresentação Power Point. Disponível em: <http://brasil.ilsa.org/NR/rdonlyres/98929E86-9BBA-4E54-B5FB-8525BA369F04/0/MariaBeatrizG1%C3%B3ria.pdf>. UFMG. Belo Horizonte, Minas Gerais: 2007. Acesso em 14.jul.2009.

GRAEFF, A.; P. E.N.. Variáveis que podem interferir na sobrevivência e desenvolvimento da Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) na região fria do Estado de Santa Catarina. **Comunicación Científica**. p.70-9. Santa Catarina: 2006. Disponível em: (<http://www.civa2006.org>). Acessado em: 10.04.2010.

GUIMARAES, J.L.; ADAEL, E.A.A.. Estrutura e Bioquímica da Carne. Serviço e Informação da Carne. Apostila do Laboratório de Carnes. UNICAMP. São Paulo: 1995.

INCQS. Ministério da Saúde. Manual da Qualidade. Procedimento Operacional Padrão. Determinação quantitativa de nitrito. RJ:1998a.

INCQS. Ministério da Saúde. Manual da Qualidade. Procedimento Operacional Padrão. Determinação quantitativa de nitrato. RJ:1998b.

KLUBES, P.;JONDORF, W.R.. Dimethylnitrosamine formation from sodium nitrite and dimethylamine by bacterial flora of rat intestine. **Res.Corn. Chem. Pathol. Pharmacol**. 1971. Disponível em: < <http://aem.asm.org/cgi/reprint/37/2/279.pdf>>. Acesso em 03.mai.2009.

LADRAT-DELBARRE, C.; CHERET, R.; TAYLOR, R.; NOEL,J.; VERREZ-BAGNIS. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and

disorganization of the myofibrillar structure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.46, n.5. p.409-21. France:2006.

LEVALLOIS, P.; AYOTTE, P.; J. M. S. VAN MAANEN, J.M.S.; DESROSIERS, T.; GINGRAS, S.; DALLINGA, J.W.; VERMEER, I.T.M.; ZEE, J.; Poirier, G.. Excretion of volatile nitrosamines in a rural population in relation to food and drinking water consumption. **Food and Chemical Toxicology**. v.38, n11, p. 1013-19. Canadá: 2000. Disponível em: <  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6T6P-41C2R41-8&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=8952c06766be41979f96ddd06c7fd69d](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6P-41C2R41-8&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8952c06766be41979f96ddd06c7fd69d)>. Acesso em: 15 mai.2009.

LUZ, G.L.; MEDEIROS S.L.P.; MANFRON, P.A.; AMARAL, A.D.; MÜLLER, L.; MIKE GUZMÁN TORRES, M.G.; MENTGES L.. A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. **Ciência Rural**. v.38, n.8. São Paulo: 2008. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000800049&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000800049&script=sci_arttext&tlng=pt)> Acesso em: 12 mai.2009.

MANTOVANI, J.R.; CRUZ, M.C.P.; MANOEL EVARISTO FERREIRA; BARBOSA, J.C.. Comparação de procedimentos de quantificação de nitrato em tecido vegetal. Revista de **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.1, p.53-59. 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pab/v40n1/23242.pdf>>. Acesso em: 12 mai.2009.

MATSUI, H.. On the oxidizing substance which appears in Shiozuke extracts of various vegetables. **Journal of Agriculture Chemical of Society of Japan**. v.16. p. 1167-68. Japão: 1944

MICHELE, D. E.; CAMPBELL, K. P.. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.18, p.15457-60. 2003.

NAS - National Academy of Sciences. Committee on Nitrite and Alternative Curing Agents in Food. **The Health Effects of Nitrate, Nitrite in N-nitrous Compounds**. Assembly of Life Sciences. National Academy Press Washington, D.C.: 1981.

PEREDA, J.A.O.. Tecnologia de Alimentos. Alimentos de Origem Animal. Artmed.v.2 Porto Alegre, RS: 2005.

PESSOA NETO, A.R.; KORN, M.G.. **Os Nutrientes Nitrato e Nitritos como Contaminantes Ambientais e alternativas de determinação**. Candombá – Revista Virtual, v. 2, n. 2, p. 90–7. Salvador: 2006.

REIS, P.B.. **Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto**. Belo Horizonte: UFMG:2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Medicina Veterinária. UFMG. 2006.

REYES, F.G.R.; CAMPOS, N.F.M.. **Nitrosaminas: Presença e formação em agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002826/02826-13.pdf>>. Acesso em 11.mar.2009 (a).

REYES, F.G.R.; Campos, N.F.M.. **Nitrosaminas: formação, aspectos toxicológicos e análise**. Disponível em: <<http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/002826/02826-12.pdf>>. Acesso em: 11mar.2009 (b).

REYES, F.G.R.; Toyohara, D.Q.k.; Toletto, M.C.F.. Nitratos e nitritos em alimentos: ocorrência, absorção e efeitos tóxicos. Campinas, SP. Disponível em: <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/002826/02826-11.pdf>. Acesso em: 11.ago 2009c.

ROBSON,R.M.; HUFF-LONERGAN, E.; PARRISH JUNIOR, F.C.; HO, C.; STROMER, M.H.; HUAITT,T.W.; BELLIN, R.M.; SERNETT,S.W.. *Postmortem Changes in the Myofibrillar and Other Cytoskeletal Proteins in Muscle*. **Annual Reciprocal Meat Conference**. v.50. EUA: 1997.

ROÇA, R.O.. **Cura de carnes**. Disponível em: <<http://dgta.fca.unesp.br/carnes/Artigos%20Tecnicos/Roca11.pdf>>. Acesso em 27 abr.2009. Botucatu, SP: 2000.

SANTOS, G.M.; SANTOS, A.C.M.. **Sustentabilidade da pesca na Amazônia**. Revista Estudos Avançados. v.19 n.54. São Paulo: 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v19n54/09.pdf>>. Acesso em: 12 mai.2009.

SANTOS, J.S.S.; BECK, L.; MELISSA WALTER; SOBCZAK, M; OLIVO, C.J.; COSTABEBER, I; EMANUELLI, T. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico . **Ciências de Tecnologia de Alimentos**. v.25 n.2 Campinas: 2005.

SANTOS, G.M., EFREM J. G. F.; JANSEN A.S.Z.. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006.

SAMPAIO, L.A.; PISSETI, T.L.; MORENA, M.. Toxicidade aguda do nitrito em larvas do peixe-rei marinho *Odentesthes Argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae). *Ciência Rural*. v.36.n3. Santa Maria: 2006.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L.F. **Introducción a la toxicología de los alimentos**. Acribia. Zaragoza: 1996.

SILVA, F.A. S.; Azevedo, C. A. V. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress on computers in Agriculture. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. . v.4.p.393-96. Orlando-FL-USA: 2006.

SILVEIRA, N.F.A. *et al.* Bactérias Produtoras de Histamina e Potencial para sua Formação em Peixes de Origem Fluvial ou Lacustre. *Brazilian Journal Food Technology*, n. 4. p.19-25. São Paulo: 2001.

TRICKER, A.R.; PFUNDSTEIN, B.; THEOBALD, E.; PREUSSMANN, R.; Spiegelhalter, B.. Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. **Food Chemical Toxicology**. v.29. n.11. Institute for Toxicology and Chemotherapy, German Cancer Research Center, Heidelberg: 1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1761251>>. Acesso em 12.mai.2009.

WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds - review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, n. 6, p. 717-68, 1990.

WHO. International Program on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 5. **Nitrates, Nitrites and N-Nitroso Compounds**. Genebra: 1978. Disponível em: < <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc005.htm>> Acesso em: 12 mai.2009.

WHO. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO and NOAA/NMFS (National Oceanic and Atmospheric Administration) Research Laboratory, Gloucester, MA. Multilingual guide to EC freshness grades for fishery products. **Torry research station**, Aberdeen, Scotland. Diretrizes del codex para la evaluación sensorial del pescado Y los mariscos en laboratório. *Codex Alimentarium Commission, Guide Lines 31-1999*. 1999. (Acesso em 2013 Out 07). Disponível em: <http://www.fao.org/search/es/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=Torry+Research+%E2%80%93+Station+Escocia+&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fhome%2Fes%2F&ref=www.fao.org%2Fhome%2Fen%2F&ss=2752j1728192j10>.

## 5.1 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AMARAL, F.P.; SEUD, O.E.; ALVARENGA, M. A.; VICENTINI, G.; YOSHIDA, M.; FILHO, J.C.L.. **Fundamentos de Química Orgânica**. Edgard Blucher Ltda. São Paulo: 1997.

BRASIL, Portaria nº . 1004 de 11 de dezembro de 1998. Dispõe sobre Regulamento técnico de atribuição de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8: carne e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF: 1999.

CAMPOS, N.. *Jornal Amazonas em Tempo*. **Manaus lidera o ranking em consumo de gordura**. Manaus, AM. Disponível em: <http://www.amazonasemtempo.com.br>. Acesso em: 18.abr.2010.

IKEDA, K.; MIGLIORESE, K.G.. Analysis of nitrosamines in cosmetics. **Journal of Society Cosmetic**. n.41.p.283-333. Chicago, EUA: 1990.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Fatores de risco: Hábitos Alimentares**. Disponível em: < [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=18](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=18)>. Acesso em: 07.mai.2009.

SANZ, P.; REPETTO, M.. **GLOSARIO DE TERMINOS TOXICOLOGICOS, IUPAC**. Version Espanhola Ampliada 77p, Espanha: 1995.

SGARBIERI, V.C..Fontes de proteínas na alimentação *in*: Proteínas em Alimentos Protéicos. Livraria Varela. São Paulo, SP.: 1996.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE. v.7.American Society of Agricultural and Biological Engineers. Reno-NV-USA, 2009.

SOUZA, M.L.R; DOURADO, D.M. DOURADO; MACHADO, S. D.; BUCCINI, D.F. ; JARDIM, M.I.A; MATIAS, R. ; CORREIA C.; FERREIRA, I. C.. Análise da pele de três espécies de peixes: histologia, morfometria e testes de resistência. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.6, supl.1. 2003.

## CAPÍTULO 2

### Degradação miofibrilar avaliada por MFI e SDS-PAGE de sardinha (*Triportheus angulatus*) assada com carvão vegetal

#### RESUMO

A eletroforese SDS-PAGE descontínua mostra-se um mecanismo sensível capaz de separar componentes de uma mistura que de outro modo seria mais difícil fracionar. Possui importantes vantagens como simplicidade e pouco aparato, além de simultaneidade na análise de muitas amostras em um procedimento de rotina com fácil visualização.

Em alimentos, a eletroforese pode ser utilizada, por exemplo, na identificação unívoca de uma espécie e fornecer dados da ocorrência ou não de fraudes na substituição de um produto por outro ou ainda alterações em seus constituintes por ação física ou química.

O objetivo deste trabalho foi analisar as alterações quantitativas protéicas e qualitativas miofibrilares da sardinha (*Triportheus angulatus*) submetidas à ação do calor por assamento com carvão vegetal durante 30 e 60 minutos. Foram quantificadas as proteínas totais, determinação do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e obtenção de zimograma miofibrilar por SDS-PAGE.

As condições sob as quais a metodologia da SDS-PAGE descontínua foi conduzida foram: corrente elétrica de 100 volts, 25 mA durante 120 minutos. Foi demonstrado através do SDS-PAGE a degradação protéica em componentes com peso molecular entre 15 e 20 KDa.

A técnica de determinação do MIF aplicada neste trabalho consistiu na medida da turvação das amostras ajustadas a uma concentração comum de proteínas. Foi detectado um valor de 42,93%. A dosagem de proteínas totais realizadas através do método do biureto, onde foi demonstrado um decréscimo de 14,48%. Constatou-se, portanto, alteração na quantidade de proteínas e degradação miofibrilar com conseqüente perda nutricional.

Palavras-chave: SDS-PAGE, zimograma, *Triportheus angulatus*.

## ABSTRACT

### **Myofibril degradation assessed by SDS-PAGE and MFI of sardines (*Triportheus angulatus*) baked with charcoal**

The discontinuous SDS-PAGE shows a sensitive mechanism capable of separating components of a mixture that would otherwise be more difficult to fractionate. Have important advantages such as simplicity and low apparatus, and simultaneous analysis of many samples in a routine procedure for easy display. In foods, electrophoresis may be used, for example, the unique identification of a species and provide data from the occurrence of fraud in the substitution of one product for another or changes in its constituents.

The aim of this study was to analyze the changes and myofibrillar proteins of sardine (*Triportheus angulatus*) subjected to the action of heat for baking with charcoal for 30 to 60 minutes. We quantified the total proteins, determination of myofibrillar fragmentation index (MFI) and obtaining myofibril zymogram SDS-PAGE. The conditions under which the methodology of discontinuous SDS-PAGE was conducted were an electric current of 100 volts, 25 mA for 120 minutes. Was demonstrated by SDS-PAGE protein degradation in components with molecular weight between 15 and 20 KDa. The technique for determining the MIF applied in this study was to measure the turbidity of the samples adjusted to a common concentration of proteins. Detected a value of 42.93%. The determination of total proteins made by the biuret method, and a decrease of 14.48%. It was noted, therefore, change in amount of proteins through their degradation and loss nutrition.

Single words Keywords: SDS-PAGE, zymogram, *Triportheus angulatus*.

## 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 Eletroforese

A técnica é denominada eletroforese por depender da movimentação de partículas ou moléculas eletricamente carregadas em um determinado meio condutor sob a influência de uma diferença de potencial, em pH e força iônica constantes (SGARBIERI, 1996), de seu tamanho e da relação peso/carga elétrica (DUVAL, 1978; WESTERMEIER, 1993).

O ponto isoelétrico (pI) definido como sendo o valor da carga elétrica líquida igual a zero, ou seja, um estado de equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos também influencia a mobilidade. Em meios onde o pH é maior que o pI das moléculas, estas se comportam como um ânion e quando o pH é menor que o pI, comportam-se como cátion. Essa diferença de valor do pH do meio e o ponto isoelétrico da molécula deve ser de pelo menos duas unidades (SILVA JUNIOR, 2001).

Esta metodologia de análise foi aperfeiçoada pelo químico suíço Arne Wilhelm Kaurin Tiselius em 1930 que na sua tese de doutorado estudou o método divisional de proteínas, ganhando o prêmio Nobel de 1948 pelo feito (KEKWICK, 1974).

Mostra-se como um mecanismo sensível capaz de separar componentes de uma mistura que de outro modo seria mais difícil fracionar, além de possuir importantes vantagens como simplicidade e pouco aparato, permitindo análises simultâneas de muitas amostras em um procedimento de rotina de fácil visualização (POMERANZ, 1994).

Seu uso é freqüente na obtenção do perfil protéico sérico de enzimas de interesse industrial, amplificação gênica de bactérias com aplicação imunobiotecnológica, análise eletroforética de pureza e homogeneidade e na caracterização de proteínas, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e ácidos carboxílicos (BALDINI, 1981; SOARES, 2006; SILVA JUNIOR, 2001; MITSUHASHI, 2002).

Em alimentos, a eletroforese pode ser utilizada, por exemplo, na identificação unívoca de uma espécie e fornecer dados da ocorrência ou não de fraudes como as que ocorrem quando o produto vendido ao consumidor pode, na realidade, ser outro (EVANGELISTA, 1987), ou ainda, comparar possíveis alterações antes e após a aplicação de processos físicos ou químicos.

## **1.2 SDS-PAGE**

Uma separação mais eficiente de proteínas e de outros compostos tornou-se possível com o desenvolvimento da eletroforese em gel de poliacrilamida ou PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) em que às amostras é adicionado SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate, motivo pela qual a técnica é conhecida por SDS-PAGE.

O SDS tem como função desnaturar e cobrir as moléculas com cargas negativas, “mascarando” deste modo, a carga intrínseca da molécula tornando a razão carga/massa o elemento de distinção.

Em moléculas tridimensionalmente mais complexas onde o SDS não possui acesso, é utilizado o  $\beta$ -mercaptoetanol que age rompendo as pontes dissulfeto e

garantindo o acesso do SDS às partes mais internas da molécula, além de contribuir para separar cadeias polipeptídicas mantidas por ligações covalentes (ALBERTS, 2004).

A eletroforese em SDS-PAGE quanto à concentração do gel utilizado pode ser contínua (somente uma concentração, própria para fracionar, empilhar ou organizar ionicamente as moléculas carregadas) ou descontínua, onde é adicionado uma camada superior de gel mais concentrada que atua como “concentrador”. Graças ao grande poder de resolução sua revelação apresenta grande definição, sem as desvantagens comuns em outras metodologias como a adsorção, eletrosmose (pela migração do líquido do meio de fracionamento) e a tortuosidade (migração não linear) (SILVA JUNIOR, 2001).

### **1.3 Determinação do índice de fragmentação miofibrilar (MFI)**

São realizadas por inúmeras técnicas, entre as quais SDS-PAGE, determinação de aminoácidos livres e fragmentação miofibrilar. A técnica de determinação do MIF (do inglês, Myofibril Fragmentation Index), aplicada neste trabalho é a mais comumente utilizada, consistindo na homogeneização do músculo seguido pela determinação do índice de proteína e da medida da turvação das amostras ajustadas a uma concentração comum de proteínas. Esta técnica quantifica a degradação das miofibrilas especificamente da estrutura da banda I e Z do sarcômero (SILVA, 2005).

A dosagem resulta em um valor dentro de uma escala compreendida entre 0 a 100. Quanto mais próximo de zero mais tenra é a amostra, menos degradadas estão as miofibrilas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Foram utilizadas 20 amostras de sardinha (*Triportheus angulatus*) obtidas na feira do CEASA, Distrito Industrial de Manaus. Antes de qualquer procedimento, a estas amostras foi aplicada avaliação sensorial baseada na tabela da Torry Research – Station Escocia (anexo 6.1). Foram observadas características das guelras, olhos, pele, odor e textura visual.

As amostras receberam aprovação (“A”) em todos os itens. Em seguida, foi efetuada a evisceração através de corte no sentido ântero-posterior, ensacados individualmente e refrigerados em caixa térmica para o transporte, em seguida congeladas em freezer a -18°C (ELECTROLUX) até o momento do assamento.

### **2.2 Preparo das amostras**

Antes do assamento, com auxílio de uma faca e uma espátula, uma alíquota de aproximadamente 15g da musculatura foi retirada dos exemplares. Em seguida, em uma churrasqueira caseira (alvenaria) foram submetidas ao calor da brasa por 30 minutos, sendo a temperatura externa da amostra mantida e controlada a 90 °C através de termômetro de coluna de mercúrio (INCOTERM) e retirado aproximadamente 15g da musculatura. As amostras continuaram a ser submetidas ao calor por mais 30 minutos e retirado mais 15 g da musculatura. Para manter a temperatura sobre a amostra, a grelha

foi elevada ou abaixada. A pesagem da amostra foi realizada em laboratório com auxílio de uma balança não profissional (PLENNA).

O assamento não foi mantido por mais tempo, pois houve início de ressecamento e queima das amostras o que provocaria sua inutilização.

Todas as amostras retiradas foram devidamente envolvidas em plástico PVC e papel alumínio, recebendo a identificação “amostra crua”, “amostra 30 minutos” e “amostra 60 minutos”.

### **2.3 Determinação do MFI**

Foram adicionados em um frasco contendo 40 mL do tampão MFI, 4 g da amostra finamente cortada sem tecido conectivo e o máximo possível sem gordura e agitado com força por 30 segundos. Em seguida esta mistura foi transferida para um tubo cônico de 50 mL, centrifugado (NOVA TECNICA) a 1000 RPM por 15 minutos a 2°C, sendo o sobrenadante descartado. Esta ação foi repetida por mais uma vez. Ao precipitado foram adicionados 10 mL da solução tampão MFI, filtrado em filtro de polietileno e lavado com mais 10 mL de solução tampão MFI.

Desta solução foram retirados 0,25 mL para tubo de ensaio e adicionados 0,75 mL de solução tampão MFI e 4 mL do reagente de biureto, agitado e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Na solução padrão de miofibrilas foram adicionados 4 mL de reagente biureto para cada 1 mL de padrão.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro (QUIMIS) em comprimento de onda de 540 nm e calculado a quantidade em mg de proteínas para cada mL de solução.

Em outro tubo de ensaio, foi diluída uma alíquota da suspensão das amostras contendo 8 mL até alcançar concentração de 0,5mg/ml. Em seguida o tubo foi agitado em vortex e a amostra lida novamente em espectrofotômetro (QUIMIS) em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância obtida foi multiplicada por 200 e obtido o MFI.

#### **2.4 Extração das miofibrilas para SDS-PAGE**

Após pesagem analítica, homogeneizou-se 5g do músculo *in natura*, 5g do músculo assado 30 minutos e mais 5g do músculo assado 60 minutos com 20 mL de tampão de extração calpaína cujo objetivo é inibir a ação das proteases que degradam as proteínas e 10 microlitros de PMSF (SIGMA) com o auxílio de um ultra turrax T 25 (IKA LABORTECHNIK).

Em seguida as amostras foram submetidas à centrifugação refrigerada (NOVA TÉCNICA) por 20 minutos, 1500 RPM a 4°C, sendo o sobrenadante descartado.

O precipitado foi ressuspenso com 20 mL de tampão de eluição e submetido à centrifugação refrigerada por 20 minutos, 1500 RPM a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Este procedimento foi novamente repetido.

O precipitado final foi ressuspenso com 10 mL de tampão conservante de miofibrila e conservado a -18°C (ELECTROLUX) até realização da eletroforese. O congelamento não altera o teor de miofibrilas ou a ação das enzimas proteolíticas (BAGNIS-VERREZ, 2002).

## **2.5 Dosagem das proteínas totais para SDS-PAGE**

Com objetivo de manter a mesma quantidade de proteínas entre as amostras para realização da eletroforese, foi realizada a quantificação das amostras a partir da ressuspensão da última centrifugação. O método utilizado foi o método do biureto que se apresentou como uma técnica que sofre poucas interferências e por ser de rápida e simples execução.

Foi tomado 0,1 mL da última ressuspensão e misturado com 5 mL do reagente biureto. Depois de incubado por 15 minutos em temperatura ambiente, a amostra foi lida em espectrofotômetro (QUIMIS) em comprimento de onda de 535 nm em cubeta de cristal com 1 cm de caminho ótico. A quantidade de proteína/mL de amostra foi obtida através da multiplicação do resultado da leitura do espectrofotômetro pelo fator de correção (19,8), obtido pela divisão de 4 pela absorção da leitura do padrão (0,202).

## **2.6 Desnaturação das proteínas para SDS-PAGE**

A desnaturação objetiva a linearização das proteínas, fazendo com que percam sua estrutura tridimensional além de ajustar sua carga, facilitando seu deslocamento no gel. Foi realizada em microtubos em quantidades equitativas entre as amostras, tampão de diluição e solução de tratamento de amostra (solução tampão MCE, mercaptoetanol (SIGMA) e azul de bromofenol (REAGEN) (0,8%)).

Após o aquecimento em banho Maria fervente por 5 minutos, foi realizado seu resfriamento em temperatura ambiente e conservado em freezer (ELECTROLUX) a temperatura de -18°C até o momento da análise.

## 2.7 Preparo do gel de poliacrilamida e da cuba para SDS-PAGE

A poliacrilamida, um hidrogel, é a mistura de dois polímeros: acrilamida que atua como agente de polimerização não rígido e bisacrilamida (N, N'-metileno bis-acrilamida) que atua como agente de co-polimerização. A acrilamida é uma molécula linear, enquanto que a bisacrilamida possui forma de "T". Misturando essas duas moléculas, temos a formação de uma "rede". Diferentes relações entre as concentrações dessas moléculas permitem a criação de diferentes gradientes de separação (OSTER NETO, 2001).

Foi utilizado gel descontínuo com duas camadas: a inferior com uma concentração de 12,5% composta por 5 mL de Tris (INVITROGEN) pH 8,8 1, 5M, 8,35 mL de acrilamida (GIBCO BRL) 30%, 0,2 mL de solução de SDS 10% (SIGMA), 6,35 mL de água destilada, 0,1mL de persulfato de amônia 10% (APS) (SIGMA) como agente catalisador, e 0,01 mL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (INVITROGEN) como gerador de radicais livres.

Após a polimerização da camada inferior foi preparada a camada superior com uma concentração de 4,5% composta por 1,8 mL de tampão Tris (INVITROGEN) pH 6,8, 1 mL de acrilamida 30% (GIBCO BRL), 0,1 mL de SDS 10% (SIGMA), 4,55 mL de água, 0,05 mL de APS 10% (SIGMA) e 0,0075 mL de TEMED (INVITROGEN), onde após a polimerização, foi inserido o pente para a formação dos poços para a aplicação das amostras.

A base orgânica do TRIS (tampão TRIS-HCl e TRIS Glicina) denominada anfólita, tem como objetivo gerar um gradiente de pH, um contra-íon, aumentando a diferença do valor entre o pH do meio e a carga elétrica das moléculas otimizando

desta forma, a separação das moléculas conforme sua relação peso molecular (SILVA JUNIOR, 2001).

## 2.8 Aplicação das amostras e fracionamento eletroforético das amostras

Depois da adição da solução tampão de corrida na cuba eletroforética (Tris glicina 0,025M , pH 8,3), cobrindo totalmente o gel, foram aplicados 5 microlitros das amostras e do padrão (FERMENTAS PURE EXTREME LIVE SCIENCES) nos poços com auxílio de micropipeta (EXACTA). Foi aplicado em seguida corrente elétrica de 100 volts, 25 miliampères durante 120 minutos.

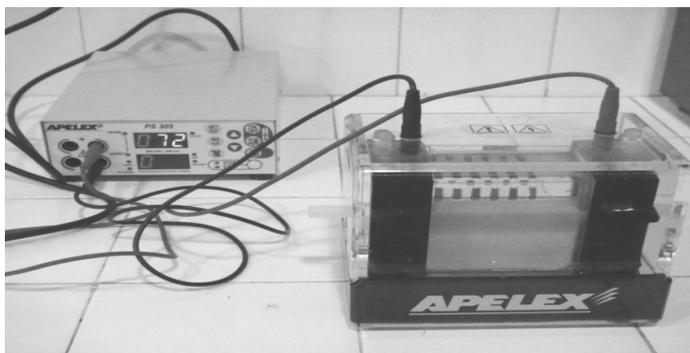


Figura 10. Equipamento de SDS-PAGE utilizado.

A coloração foi realizada com solução corante à base de água deionizada , ácido acético 7% (NUCLEAR), metanol 50% (NUCLEAR) e Comassie R 250 0,2% (SIGMA) por duas horas, seguida de descoloração por doze horas com solução descorante à base de água deionizada, ácido acético P.A. (NUCLEAR), álcool etílico 50% (VETEC).



Figura 11. Aparelho para obtenção da imagem do zimograma.

A imagem do zimograma foi registrada através de equipamento (PHARMACIA BIOTECH/IMAGEMASTER/FUJIFILM) (figura 11) e arquivada. Após o término dos trabalhos, os géis foram mantidos em solução conservante à base de água deionizada, ácido acético glacial P.A. (NUCLEAR) e glicerol P.A (SIGMA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Tratamento estatístico

Foi utilizada a metodologia KRUSKAL-WALLIS (não paramétrico), através do programa ASSISTAT 7.5 beta (SILVA, 2006).

Os termos paramétrico e não-paramétrico referem-se à média e ao desvio-padrão, que são os parâmetros que definem as populações que apresentam distribuição normal.

O valor numérico calculado pelo teste deve ser confrontado com valores críticos, que constam em tabelas apropriadas a cada teste. Essas tabelas geralmente associam dois parâmetros, que permitem localizar o valor crítico tabelado: nível de probabilidades usualmente 5 % [ $\alpha = 0,05$ ], ou 1 % [ $\alpha = 0,01$ ].

Valores menores que o tabelado indicam que ele não pode ser considerado diferente do que se obteria se as amostras comparadas fossem iguais, estaria configurado o que se chama de não-significância estatística, ou de aceitação da hipótese zero, ou de nulidade ( $H_0$ ).

#### 3.2 Dosagem protéica

Foi demonstrada a relação direta entre a degradação protéica e o tempo de exposição (figura 12). Esse decréscimo ocorre mais intensamente entre a amostra *in natura* e assada por 30 minutos com um valor aproximado de 10,48%. Entre as

amostras assadas por 30 minutos e 60 minutos a perda foi menor, em média 4%. O endurecimento da superfície auxiliou na proteção interna da amostra, consequentemente de seus constituintes. O total final de perda foi de aproximadamente 14,48% de proteínas.

Tabela 5

Quantificação de proteínas na amostra *in natura*, assadas 30 e 60 minutos para realização da eletroforese

Analito	Amostra <i>in natura</i>		Amostras assadas 30 minutos		Amostras assadas 60 minutos	
	<b>Média</b>	Desvio padrão	<b>Média</b>	Desvio padrão	<b>Média</b>	Desvio padrão
Proteína (g/mL)	<b>0,1955</b>	0,0018	<b>0,175</b>	0,0016	<b>0,171</b>	0,0037

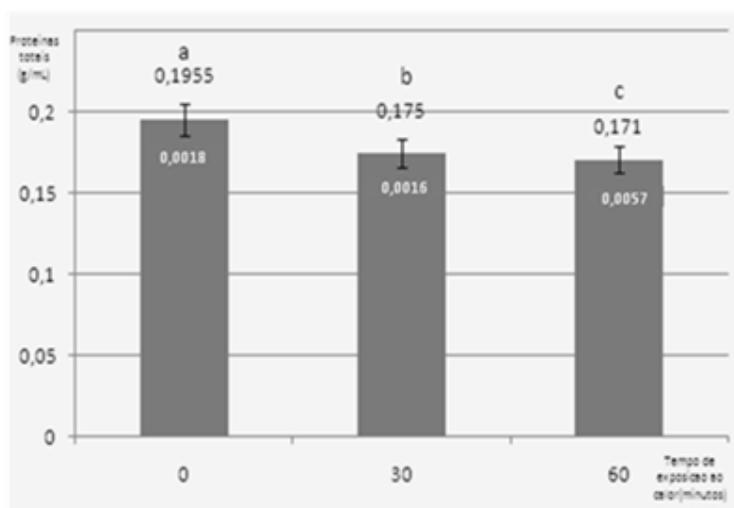


Figura 12. Gráfico da quantidade de proteínas totais (g/mL) presente na amostra *in natura* e assadas 30 e 60 minutos.

Tabela 6

Tratamento estatístico segundo Kruskal-Wallis da quantificação proteínas totais para realização da eletroforese em amostras *in natura* e assadas 30 e 60 minutos.

Tratamento	Amostra <i>in natura</i>	Assadas 30 minutos	Assadas 60 minutos
Repetições	20	20	20
Média	0.52343	0.48488	0.26159
Soma de graus	255.000	155.000	55.000
Classificação	A	b	C

### 3.3 MFI

Assim como nas análises quantitativas de proteínas totais, constatou-se uma proporção direta entre MFI e o aumento do tempo de exposição ao calor. A figura 13 demonstra que o MFI total foi de 42,93, sendo que entre as amostras *in natura* e assadas por 30 minutos foi de 21,93 e entre 30 e 60 minutos foi em média, de 20,99 (tabela 7). A pesquisa também demonstrou proporcionalidade entre proteínas totais e MFI.

Tabela 7

MFI em amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos.

Analito	Amostra <i>in natura</i>		Amostras assadas 30 minutos		Amostras assadas 60 minutos	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
MFI (%)	<b>49,8300</b>	1,8313	<b>38,7848</b>	0,0061	<b>28,2620</b>	0,2971

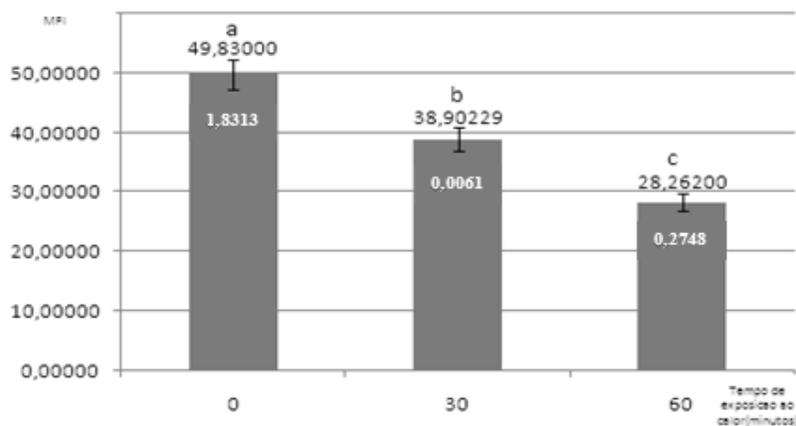


Figura 13. Gráfico da média da quantificação, desvio padrão do MFI em relação ao tempo de exposição ao calor.

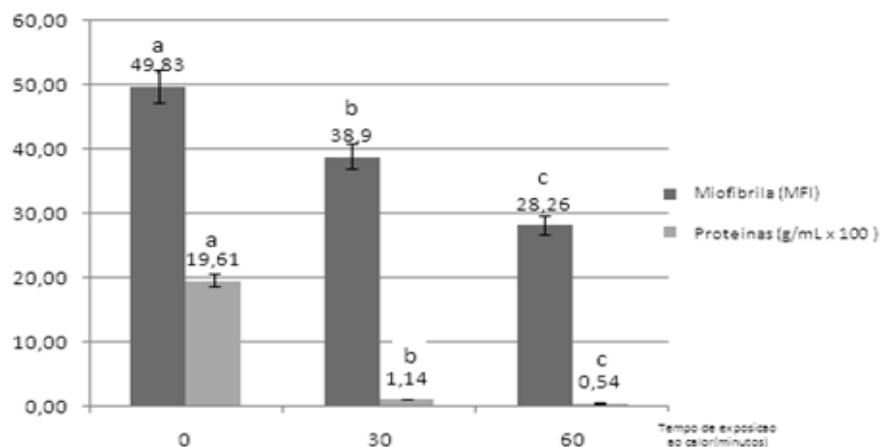


Figura 14. Gráfico da relação entre a média do MFI e quantificação das proteínas totais.

Tabela 8

Tratamento estatístico segundo Kruskal-Wallis do MFI em amostras *in natura* e assadas 30 e 60 minutos.

Tratamento	Amostras <i>in natura</i>	Amostras assadas 30 minutos	Amostras assadas 60 minutos
Repetições	20	20	20
Média	49,83000	38,78481	28,26200
Soma de graus	255.000	155.000	55.000
Classificação	A	b	C

Nas médias obtidas para a quantificação de proteínas totais e determinação do MFI, com níveis de significância para 1% (p valor <0,01) o  $H_0$  foi rejeitado, ou seja, a correlação matemática do tempo de assagem e média das análises realizadas mostrou-se significativa. O coeficiente de correlação entre proteínas totais e MFI *in natura*, e assados 30 e 60 minutos foi de 0,9210.

### 3.4 Zimograma das amostras

O zimograma demonstrou alterações caracterizadas com o surgimento de fragmentos com peso molecular entre 15 e 20 KDa a partir de 30 minutos de assamento.

Segundo Silva (2005), a SDS-PAGE possui ótima capacidade de separar polipeptídios com variados pesos moleculares.

Comparando-se trabalhos realizados através da análise por Western Blot com uso de anticorpos monoclonais, fragmentos miofibrilares com peso molecular entre 15 e 30 KDa foram identificadas como sendo subunidades de troponina, especificamente C, T e M (HO, 1994), importantes componentes estruturais e regulatórios da musculatura, localizadas imediatamente adjacente à linha Z (VERREZ-BAGNIS, 2002).

Na sardinha, ao contrário de grande número de espécies animais, a desmina também é significativamente degradada (BAGNIS-VERREZ, 2002).

Dependendo da ação química ou física ao qual a amostra é submetida, as mudanças associadas com a ação de enzimas nas miofibrilas envolvem proteólise de várias estruturas (LADRAT, 2003).

Estas degradações, determinantes sob a qualidade da textura do músculo, são resultados da ação proteolítica sinérgica das calpaínas (proteases cálcio-dependentes), especialmente as  $\mu$ -calpains, catepsinas (tipo B, D, L e H localizadas nos lisossomos) (MISIMA, 2003; LADRAT, 2000; PAPA, 1996) e de outras proteases ainda não identificadas. Elas contribuem significativamente para a origem de um grande número de subprodutos (SIGOLO, 2007).

Os eventos básicos que regulam a atividade destas proteinases, inclusive seu sítio de ação, ainda não são claros, mas sabe-se que o pH e temperatura são determinantes (VERREZ-BAGNIS, 2002).

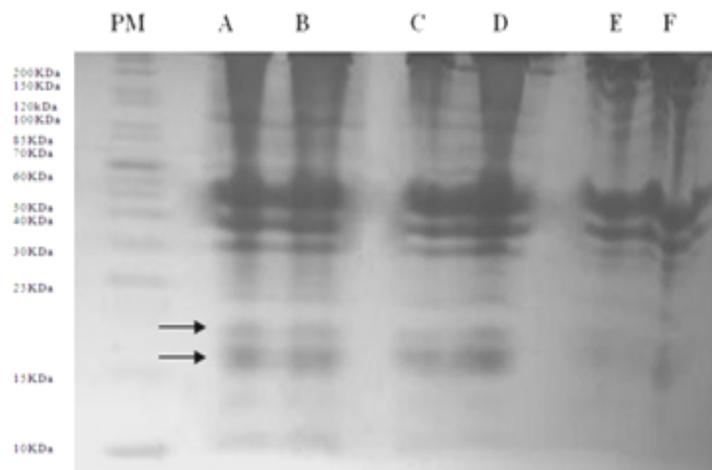


Figura 15. Análise das proteínas miofibrilares por SDS-PAGE, 12.5%, 100 V, 25 mA, 5 g por linha, sendo: PM, padrão de peso molecular (de cima para baixo: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 15, 10 KDa) e A-F, tempos de assamento, sendo: A e B (60 minutos de assamento), C e D (30 min. de assamento) e E e F (*in natura*). As setas indicam o aparecimento de produtos de degradação entre aproximadamente 1 KDa (60 minutos de processamento) e 20 KDa (30 e 60 minutos de processamento).

#### 4. CONCLUSÕES

Existe uma perda considerável de proteínas constatada pela dosagem de proteínas totais e determinação do MFI .

Quanto maior o tempo de exposição à temperatura, maior a quantidade de proteínas degradadas, o que pode ser evidenciado pela SDS-PAGE, quantificação de proteínas e pelo MFI.

A degradação protéica e a fragmentação miofibrilar são diretamente proporcionais.

Produtos da degradação miofibrilar com peso molecular entre 15 e 20 KDa, eficientemente demonstrado pelo SDS-PAGE, constituíram bons indicadores da ação de altas temperaturas sobre a estrutura muscular do peixe.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular. Uma introdução à biologia molecular da célula.** 3ª. ed. Artmed. São Paulo, SP: 2004.

BAGNIS-VERREZ, V.; LADRAT, C.; NOÉLLE, J.; FLEURENCE, J.. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax L*) by an endogenous m-capain. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* n.82. p.1256-62. 2002.

BALDINI, V.I.S. Eletroforese: conceitos teóricos e sua aplicação na pesquisa de proteínas. *Boletim do ITAL.* v.18.n2. p 155-56. Campinas: 1981.

EVANGELISTA, J.. **Tecnologia de Alimentos.** 2ª Ed. Atheneu. São Paulo, SP: 1987.

KEKWICK, R.A.; PEDERSEN K.O. "Arne Tiselius, 1902-1971". **Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society** v.20, p.401–28. 1974. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/769648>. Acessado em: 10.jun.2010.

LADRAT, C.; CHAPLET, M.; VERREZ-BAGNIS, V.; NOEL,J.; FLEURENCE,J.. Neutral Calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax L*) muscle: polymorphism and biochemical studies. **Comparative Biochemistry and Physiology** part B. n.125. p.83-95. 2000.

MISIMA, T.; FUJII, J.; TACHIBANA K.; TSUCHIMOTO, M.. The influence of thermal acclimation on fragmentation of myofibrils from cap stored at different temperatures. **Nippon Suisan Gakkaishi.** n.69. 948-54. 2003.

MITSUHASHI T.; KASAI, M.; HATAE, K.. **Detection of Giant Myofibrillar Proteins Connectin and Nebulin in Fish Meat by Electrophoresis in 3–5 Gradient Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Slab Gels.** *Journal of Agriculture Food Chemical,* v. 50, p.7499–503, Japan: 2002.

NETO, J.O.M.. **Separação de proteínas de músculo de peixes da Amazônia por uso de eletroforese em gel de poliacrilamida.** Faculdade de Ciências Farmacêutica. UFAM, Manaus: 2001. Dissertação de pós-graduação em Ciências de Alimentos. Faculdade de Farmácia. UFAM. 2001.

PAPA, I.; ALVAREZ, C.;VERREZ-BAGNIS, V.;FLEURENCE, J.; BENYAMIN, Y.. *Post mortem* Release of fish White muscle  $\alpha$ -actinin as a marker of disorganisation. **Journal of Science Food Agriculture.** n.72. p.63-70. France: 1996.

POMERANZ, Y.. **Electrophoresis in: Food Analysis Theory and Practice.** 3 ed. Chapman & Hall.1994.

SGARBIERI, V.C..Fontes de proteínas na alimentação *in*: **Proteínas em Alimentos Protéicos**. Livraria Varela. São Paulo: 1996.

SIGOLO, C.A.O.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, H.G.. Covalent modification of cytochrome c exposed to trans, trans -2,4-decadienal. **Chemical Res. Toxicology** n.20. p.1099-110. 2007.

SILVA JUNIOR, J.G.. **Eletroforese de proteínas – Guia teórico prático**. Interciência. Rio de Janeiro, RJ: 2001.

SILVA, E.B.. **Proteólise miofibrilar e maciez da carne de bovinos (*Bos indicus*) submetidos a diferentes técnicas pós-morte de suspensão das carcaças**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga.USP, 2005.. Dissertação de pós-graduação em Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. USP:2005.

SILVA, F.A. S.; Azevedo, C. A. V. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress on computers in Agriculture. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. . v.4.p.393-96. Orlando-FL-USA: 2006.

SOARES, L.V.. **Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Ed. Manole. São Paulo, SP.: 2006.

WESTERMEIER, R.. **Electrophoresis in Practice**. Weinheim. VCH. 1993.

WHO. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO and NOAA/NMFS (National Oceanic and Atmospheric Administration) Research Laboratory, Gloucester, MA. Multilingual guide to EC freshness grades for fishery products. **Torry research station**, Aberdeen, Scotland. Directrices del codex para la evaluación sensorial del pescado Y los mariscos en laboratorio. *Codex Alimentarium Commission, Guide Lines 31-1999*. 1999. (Acesso em 2013 Out 07). Disponível em: <http://www.fao.org/search/es/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=Torry+Research+%E2%80%93+Station+Escocia+&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fhome%2Fes%2F&ref=www.fao.org%2Fhome%2F&ss=2752j1728192j10>.

VERREZ-BAGNIS, V.; LADRAT, C.; NOÉLLE, J.; FLEURENCE, J.. *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax L*) by an endogenous m-capain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. n.82. p.1256-62. 2002.

## 5.1 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CULLER, P.; SMITH & CROSS. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal Food Science**. v.43. p.1177. 1978.

DA SILVA, M.L.C.C. Proteínas: Reação de Coloração e Precipitação. Faculdade de Ciência e Tecnologia. UNESP. Pres. Prudente, SP: 2010. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/29031871/PROTEINAS-Reacoes-de-coloracao-e-precipitacao>. Acessado em: jun.2010.

DELGADO, E.F.; GEESINK, G.H.; MARCHELLO, J.A.; GOLL, D.E.; KOOHMARAIE, M.. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of lambs and normal sheep. **American Society of Animal Science**. n.79. p.2097-107. EUA: 2001.

HO, C.Y.; STROMER, M.H.; ROBSON, R.M.. Identification of the 30 Kda polypeptide in *post mortem* skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. **Biochemistry**. n.76. p.369-75. France: 1994.

LENINGHER, A.L.. **Bioquímica: Componentes Moleculares das Células**. v.1. Ed. Edgar Blucher. 2ª ed. São Paulo, SP. 262p. 1976.

## 6. ANEXO

### 6.1 Tabela Torry Research – Station Escocia para análise sensorial de peixes.

	Classe A	*Pts	Classe B	Pts	Classe C	Pts	Rejeitável	Pts
Gueiras	Cor vermelho-vivo, muco límpido e forte odor de plantas aquáticas.	04	Cor vermelho-pálido e castanho-avermelhado, perda de odor de plantas aquáticas.	03	Castanho-escuro a castanho-amarelado, muco leitoso, odor de pão ou leite azedo.	02	Cor branca, muco granuloso, odores de amônia, ácido sulfúrico, odores fecais.	01
Olhos	Claros, brilhantes e salientes, pupilas negras com matrizes amareladas, córneas translúcidas.	04	Encovados, brancos, nebulosos ou amarelados, pupilas com algumas descolorações, córneas opacas.	03	Encovados, brancos, baços ou sangüíneos, pupilas leitosas ou acinzentadas, córneas côncavas sujeitas a descoloração.	02	Muito sangüíneos pupilas opacas e cobertas de muco, córneas descoloradas ou enrugadas.	01
Pele	Cor normal, lustrosa e clara.	04	Cor baça, sem aparência limosa.	03	Ausência de cor normal e lustrosa, estrutura muscular visível.	02	Descolorada em avançado estado de decomposição.	01
Cheiro	Tipico de peixe capturado recentemente.	04	Odor pouco acentuado, neutro.	03	Ligeiramente azedo ou rançoso, mas não a putrefação.	02	Azedo, mau cheiroso ou a putrefação.	01
Textura	Escamas brilhantes e fortemente aderidas, nenhuma deformação, musculatura firme e elástica, especialmente no abdômen.	04	Com pouco brilho, cor ligeiramente escura, ligeiras deformações ou mutilações, musculatura firme não elástica.	03	Superfície rugosa, escamas aderentes, algumas fendas, musculatura mole.	02	Superfície áspera, muitas fendas, musculatura flácida; quando apertada entre os dedos, não toma à posição inicial.	01
Órgãos Internos	Peritônio íntegro. Parede abdominal íntegra. Rim vermelho-vivo. Fígado íntegro.	04	Peritônio oxidado (escuro). Parede abdominal com início de digestão. Rim vermelho. Fígado e intestino em decomposição.	03	Peritônio desfeito (cor preta). Parede abdominal digerida e com espinhas salientes. Rim vermelho-escuro. Fígado e intestino ligeiramente desfeitos.	02	Escuros e desfeitos.	01
Valor	24 -19		18 -13		12 - 06		Menor do que 06	

Adaptado de: Directrices del codex para la evaluación sensorial dl pescado y los mariscos en laboratorio (31-1999). FAO. 1999.