

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

SINARA PEREIRA FRAGOSO

**APROVEITAMENTO DO DORSO MECANICAMENTE
SEPARADO DA RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeiana*) NA
ELABORAÇÃO DE SURIMI**

**JOÃO PESSOA
2017**

SINARA PEREIRA FRAGOSO

**APROVEITAMENTO DO DORSO MECANICAMENTE
SEPARADO DA RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeiana*) NA
ELABORAÇÃO DE SURIMI**

JOÃO PESSOA

2017

SINARA PEREIRA FRAGOSO

**APROVEITAMENTO DO DORSO MECANICAMENTE
SEPARADO DA RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeiana*) NA
ELABORAÇÃO DE SURIMI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

**JOÃO PESSOA
2017**

F811a

Fragoso, Sinara Pereira.

Aproveitamento do dorso mecanicamente separado da rã-touro (*Lithobates catesbeiana*) na elaboração de surimi / Sinara Pereira Fragoso.- João Pessoa, 2017.

160f. : il.

Orientador: Carlos Alberto de Almeida Gadelha

Tese (Doutorado) - UFPB/CT

1. Tecnologia de alimentos. 2. Carne de rã - dorso. 3. Proteína. 4. Número de lavagens. 5. Surimi. 6. Estabilidade oxidativa.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

SINARA PEREIRA FRAGOSO

**APROVEITAMENTO DO DORSO MECANICAMENTE SEPARADO DA RÃ-
TOURO (*Lithobates catesbeiana*) NA ELABORAÇÃO DE SURIMI**

Tese de doutorado APROVADA em 16 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto de A. Gadelha – DBM / CCCEN / UFPB
Orientador/Coordenador da Banca Examinadora

Profa. Dra. Marta Suely Madruga – DEA / CT / UFPB
Examinador Interno

Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha – DBM/ CCEN / UFPB
Examinador Interno

Profa. Dra. Mônica Tejo Cavalcanti– UATA/CCTA/UFCG
Examinador Externo

Prof. Dr. Leonardo Augusto Fonseca Pascoal– DCA / CCHSA / UFPB
Examinador Externo

A meus pais, e minhas irmãs,
Ao meu amado esposo e a minha querida filha Rebeca,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pelo dom da vida renovado a cada provação que se apresenta e nos sonhos que se concretizam.

Ao meu amado esposo, Helson Bruno, pelo apoio, amor, carinho, compreensão e todo incentivo nessa longa jornada. E por ter me concedido o maior título que eu poderei ter na vida, mãe de Rebeca. Obrigado por tudo meu amor.

Aos meus pais Edson e Auxiliadora, por todo esforço que fizeram para me dar a melhor educação de todas, vocês são responsáveis por cada sucesso obtido e cada degrau avançado até hoje e pelo resto da minha vida.

As minhas irmãs, Sara e Raquel, e seus companheiros pelo apoio e ajuda sempre que necessário, e a toda minha família que tem sido meu porto seguro todos esses anos.

Ao meu orientador, Carlos Alberto de A. Gadelha, por todas as oportunidades e ensinamentos na orientação deste trabalho.

A Universidade Federal da Paraíba, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade proporcionada para a realização deste curso.

Ao Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA/UFPB), Bananeiras, por todo suporte financeiro, estrutural e pessoal, disponibilizado para realização desse trabalho. Em especial ao setor de ricultura, na pessoa do Professor Dr. Alex Poeta Casali, e colega Antônio Rosendo, pelo apoio e grande ajuda durante toda a execução do experimento.

Aos meus amigos, irmãos, “co-orientadores”, Fábio Anderson, Valquíria Cardoso e Íris Braz, que tem me acompanhado desde a graduação, meus sinceros agradecimentos por todo auxílio na elaboração dessa Tese, não teria conseguido sem a ajuda de vocês. Que nossa amizade continue a nos levar a lugares mais altos, onde nem imaginávamos chegar!!

As professoras Tatiane Santi Gadelha e Marta Suely Madruga, por disponibilizar os laboratórios sob sua responsabilidade para a realização das análises, e também toda a equipe de pesquisa dos laboratórios, em especial a Edilza Nascimento, Taliana Bezerra, Narciza Arcanjo e Mércia Galvão pela ajuda na realização das análises.

As professoras Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Mônica Tejo Cavalcanti que colaboraram na elaboração da Tese.

Ao Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba (IDEP/UFPB), pelo auxílio e assistência fornecido através das parcerias junto ao Laboratório de Proteômica Estrutural e Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (CCEN/UFPB).

E a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

RESUMO

A carne de rã-touro é uma iguaria em muitos países e seu consumo tem se expandido nas últimas décadas. O dorso é um subproduto que apresenta alto valor nutricional e sua utilização está sendo explorada através da desossa mecânica, na obtenção de carne mecanicamente separada, disponibilizando matéria prima para elaboração de diversos produtos alimentares, que venham agregar valor ao dorso, dentre eles o surimi. Neste contexto objetivou-se estudar a viabilidade da utilização da carne mecanicamente separada do dorso de rã-touro na elaboração de gel de surimi, avaliando a influência do número de ciclos de lavagem e de diferentes concentrações de amido de milho sobre as características de qualidade nutricional, propriedades físico-químicas, aceitação sensorial, além de avaliar sua estabilidade oxidativa lipídica e proteica durante armazenamento sob refrigeração (± 4 °C) por um período de 60 dias. A caracterização dos géis de surimi foi realizada a partir das propriedades físico-químicas de avaliação química parcial, pH, Aa, CRA, parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), perfil de textura, e a qualidade nutricional através da composição dos ácidos graxos e perfil aminoacídico. A avaliação da estabilidade oxidativa foi medida a partir da análise de TBARS, para lipídeos, e NBVT, compostos carbonílicos e tióis livres, para proteínas. A aceitação sensorial (aparência, sabor, cor, odor e textura) também foram determinados. Os resultados demonstraram que as variáveis estudadas exerceram efeitos significativo nas características dos géis. Sendo o número de lavagem o fator que afetou o maior número de parâmetros estudados. O aumento dos ciclos de lavagens foi positivo quando diminuiu o teor de lipídios, aperfeiçoou a cor do gel, aumentando o valor da brancura, e melhorou a firmeza do gel. Os géis possuem boas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (linoleico, linolênico e araquidônico), e apresenta todos os aminoácidos essenciais. Foi observado alterações na estabilidade oxidativa durante o armazenamento, sobretudo após o 30º dia. O aumento do número de ciclos de lavagem do surimi foi um método eficaz para reduzir significativamente ($p < 0,05$) a formação dos compostos indicadores da oxidação, pois os tratamentos com maior número de lavagens apresentaram os menores valores oxidativos. Na avaliação sensorial, a preferência dos consumidores foi por géis mais firmes e brancos, conduzindo a escolha dos tratamentos 4 e 5, porém todos os tratamentos apresentaram médias do índice de aceitação acima de 70%. Foi viável a utilização do DMS na elaboração de gel de surimi, pois o processamento melhorou as propriedades funcionais e sensoriais desse subproduto, tornando possível a utilização do mesmo em alimentos desse gênero.

Palavras chave: carne de rã, dorso, proteína, número de lavagens, amido, estabilidade oxidativa.

ABSTRACT

Bullfrog meat is a delicacy in many countries and its consumption has expanded in the last decades. The back is a byproduct that presents high nutritional value and its use is being exploited through mechanical deboning, obtaining mechanically separated meat, providing raw material for the elaboration of various food products, which add value to the back, among them surimi. The objective of this study was to study the feasibility of using mechanically separated meat from the back of bullfrogs in the elaboration of surimi gel, evaluating the influence of the number of washing cycles and of different concentrations of corn starch on the characteristics of nutritional quality, Physicochemical properties, sensorial acceptance, and to evaluate its lipid and protein oxidative stability during storage under refrigeration ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) for a period of 60 days. The characterization of the surimi gels was performed from the physicochemical properties of partial chemical evaluation, pH, Aw, CRA, color parameters (L^* , a^* and b^*), texture profile, and nutritional quality through composition Of fatty acids and amino acid profile. The evaluation of oxidative stability was measured by the analysis of TBARS, for lipids, and NBVT, carbonyl compounds and free thiols, for proteins. Sensory acceptance (appearance, taste, color, odor and texture) were also determined. The results showed that the studied variables exerted significant effects on the characteristics of the gels. The washing number was the factor that affected the highest number of parameters studied. Increasing the wash cycles was positive when the lipid content decreased, the gel color improved, the whiteness increased, and the gel firmness improved. Gels have good amounts of polyunsaturated fatty acids (linoleic, linolenic and arachidonic), and it has all the essential amino acids. Changes in oxidative stability were observed during storage, especially after the 30th day. The increase in the number of washing cycles of surimi was an effective method to significantly reduce ($p < 0.05$) the formation of oxidation-indicating compounds, since treatments with higher number of washes had the lowest oxidative values. In sensory evaluation, the preference of the consumers was for firmer and white gels, leading to the choice of treatments 4 and 5, but all the treatments presented means of acceptance index above 70%. It was possible to use DMS in the elaboration of surimi gel, since the processing improved the functional and sensorial properties of this by-product, making possible the use of the same in food of this genus.

Key words: frog meat, back, protein, number of washes, starch, oxidative stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Carcaça da rã-touro pós abate: divisão por cortes e principais músculos.	23
Figura 2.	Obtenção de géis de surimi.	28
Figura 3.	Da esquerda para direita, dorso de rã-touro (A), desossa mecânica do dorso (B), e DMS (dorso mecanicamente separado) (C).	37
Figura 4.	Fluxograma do processo de fabricação do surimi elaborado com DMS de carne de rã-touro.	38
Figura 5.	Etapas do processamento de elaboração de surimi de DMS de rã-touro: lavagem (A e B), filtragem (C), drenagem (D) e pesagem (E)	39
Figura 6.	Fluxograma do processo de elaboração do gel de surimi com DMS de carne de rã-touro	43
Figura 7.	Processamento de elaboração do gel de surimi: homogeneização em cutter (A), embutimento (B), cozimento em banho maria (C), e armazenamento em BOD (D).	44
Figura 8.	Experimento de análise sensorial do gel de surimi elaborado com DMS de carne de rã-touro: provadores não treinados (A); apresentação da amostra e ficha de avaliação.	52

ARTIGO I

Figure 1.	Surimi manufacturing process.	72
Figure 2.	Concentration of water-soluble proteins in surimi rinse water at different wash stages.	73
Figure 3.	SDS-PAGE patterns of water-soluble proteins in surimi rinse water at different wash stages stained with Coomassie.	73

Figure 4. SDS-PAGE patterns of water-soluble proteins in surimi 73
rinse water at different wash stages stained with silver
nitrate.

ARTIGO II

Figure 1. Pareto diagram of the effects of the number of washes, 98
starch concentration and the interaction (1by2), on the
response variables: (A) water activity; (B) cooking loss ; (C)
water holding capacity; (D) % protein; (E) value b*; (F)
whiteness and (G) Shear force, for gel of surimi elaborated
with bullfrog meat.

Figure 2. Response surfaces for: (A) water activity (aw); (B) cooking 100
loss; (C) water holding capacity (WHC); (D) % protein; (E)
value b*; (F) whiteness and (G) Shear force, as a function
of the number of washes and the concentration of starch
added to the gel of surimi elaborated with bullfrog meat.

Figure 3. Profile of predicted values and desirability for responses A. 102
Whiteness and B. Shear force for surimi gel elaborated with
bullfrog meat

ARTIGO III

Figure 1. Effect of number of washes, starch concentration and 136
refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C) on the
parameters of color (A) luminosity, (B) redness, (C)
yellowness and (D) whiteness, in surimi gel samples
elaborate from frog meat.

Figure 2. Lipid oxidation in surimi gel samples elaborate from frog 137
meat during refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C),
formation of soluble (A) Thiobarbituric acid reactive
substances (TBARS).

Figure 3. Protein oxidation in surimi gel samples elaborate from frogs 138
during refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C),
quantification of total (A) BVT-N, (B) SH-free and (B)
carbonyl compounds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores reais e codificados de entrada para elaboração do surimi de carne de rã	41
Tabela 2.	Matriz do delineamento fatorial 2 ² para elaboração do surimi de carne de rã	41

ARTIGO I

Table1.	Proximate composition of MSB samples	72
---------	--------------------------------------	----

ARTIGO II

Table 1.	Values of the independent variables and different levels of the factorial experimental design and the responses physico-chemical (means $\pm$ SD) evaluated, to identify the influence of the independent variables (number of washes and starch concentration) about the gel of surimi elaborated with bullfrog meat.	103
Table 2.	ANOVA for water activity (Aw), Cooking loss, Water holding capacity (WHC), moisture, protein, color (* b and W) and textural parameters (shear force and hardness), for gel of surimi elaborated with bullfrog meat.	104
Table 3.	First-order models for gel of surimi elaborated with bullfrog meat on the experimental responses: water activity (aw), cooking loss, water holding capacity (WHC), moisture, % protein, value b *, whiteness (W), shear force (SF) and hardness.	105

ARTIGO III

- Table 1. Chemical composition, pH and water activity (mean $\pm$ SD) of mechanically separated back and surimi gel samples elaborate from frog meat. 139
- Table 2. Aminoacids profile (mean $\pm$ SD) of mechanically separated back and surimi gel samples elaborate from frog meat. 140
- Table 3. Water holding capacity (WHC) and Texture profile (mean $\pm$ SD) of surimi gel samples elaborate from frog meat during refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C). 141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa - Atividade de água

ANOVA - Análise de Variância

BSA – Albumina sérica bovina

CMS - Carne mecanicamente separada

DCCD – Delineamento central composto rotacional

DMS – Dorso mecanicamente separado

EQ – Escore químico

FAO - Food and Agriculture Organization

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

JSA - Japanese Association of surimi

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA - Malondialdeído

MSR - Metodologia de Superfície de resposta

pH – potencial hidrogeniônico

TBARs - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TEP - 1,1,3,3-Tetraethoxypropane

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	CARNE DE RÃ.....	20
2.2	SURIMI.....	24
2.3	PROPRIEDADES DO AMIDO E SUA INFLUENCIA EM GEIS DE SURIMI	28
2.4	OXIDAÇÃO EM PRODUTOS CARNEOS	31
2.4.1	Oxidação lipídica	32
2.4.2	Oxidação protéica.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	LOCAL DO EXPERIMENTO	36
3.2	OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	36
3.3	PREPARO DO SURIMI DE RÃ.....	36
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS NAS SOLUÇÕES DE LAVAGEM DO SURIMI DE CARNE DE RÃ	40
3.4.1	Determinação das Proteínas	40
3.4.2	Perfil eletroforético.....	40
3.5	ELABORAÇÃO DO GEL DE SURIMI.....	41
3.6	DEPOSITO DE PEDIDO DE INVENÇÃO	42
3.7	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO DMS E DO GEL DE SURIMI 45	
3.7.1	Avaliação Química Parcial.....	45
3.7.2	Medição do pH e da Atividade e Água (Aa).....	45
3.7.3	Perda de Peso por Cocção (PPC)	45
3.7.4	Capacidade de Retenção de Água (CRA)	45
3.7.5	Cor Instrumental	46
3.7.6	Força de Cisalhamento.....	46
3.7.7	Perfil de Textura (TPA)	46
3.7.8	Ácidos Graxos	47
3.7.9	Perfil de Aminoácidos	48
3.7.10	Avaliação da estabilidade oxidativa lipídica e proteica do gel de surimi durante o armazenamento de 60 dias.....	48
3.8	ANÁLISE SENSORIAL DO GEL DE SURIMI.....	50
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	REFERÊNCIAS	53

5	RESULTADOS	70
5.1	Artigo I: Electrophoretic profile of proteins present in the rinse water of surimi produced with bullfrog (<i>Lithobates catesbeianus</i>) meat.....	70
5.2	Artigo II: Effects of number of washes and starch concentration on the quality characteristics of surimi gel from bullfrog meat.....	705
5.3	Artigo III: Characterization and stability oxidative of surimi gel from bullfrog meat (<i>Lithobates catesbeianus</i>).	106
5.4	Patente: Pedido de invenção nº BR 10 2016 024450 1, Título: “ Método de fabricação de surimi com carne de rã- touro”	142
6.	CONCLUSÕES GERAIS.....	154
	ANEXOS	156

1 INTRODUÇÃO

A rã-touro, a *Lithobates catesbeiana* nativa da América do Norte foi introduzida no Brasil em 1935 e desde então a ranicultura vem ganhando força de produção e espaço tanto no mercado nacional, quanto para a exportação. Sendo considerada exótica e contida no portfólio da alta gastronomia internacional (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002).

O Brasil detém uma das melhores tecnologias de criação em cativeiro da rã-touro, o sistema anfigranja, isso lhe permitiu ocupar a 2ª posição mundial de maior produtor até o ano de 2012, atrás apenas de Taiwan, segundo o banco de dados da FAO/FIGIS (2014). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no último censo agropecuário realizado, o país possui 193 estabelecimentos de criação de rã, e no ano de 2014 produziu 260 toneladas da carne do animal. Apesar disso o mercado da ranicultura enfrenta sérios desafios quanto ao aproveitamento integral da carcaça.

A principal forma de comercialização da rã consiste em coxas congeladas, tanto para o mercado interno como para exportação, o que aumenta os custos da produção da carne devido ao grande desperdício dos demais cortes. (FRAGOSO, 2012).

O dorso representa 40% do peso vivo do animal podendo ser aproveitado na obtenção de dorso mecanicamente separado (DMS), através de desossa mecânica. A utilização do DMS na elaboração de produtos alimentícios é uma opção para agregar valor ao subproduto do abate da rã (FRAGOSO, 2012). Sendo utilizado na elaboração de patê (CONCEIÇÃO et al., 2000), salsicha (FURTADO et al., 2005), linguiça (MARENGONI; SANTOS, 2002), e hambúrguer (GONÇALVES; OTTA, 2008); porém ainda existe um leque de novos produtos possíveis a partir de tecnologias alternativas, que aproveitem melhor o DMS de rã disponível, dentre as quais se inclui a elaboração de surimi.

O surimi é um produto oriundo do músculo de pescado, constituído principalmente por proteínas miofibrilares, obtido a partir da carne de pescado mecanicamente separada (CPMS), constitui um concentrado de alta qualidade nutritiva e excelente funcionalidade (TEJADA, 1991) resultado de um processo tecnológico de lavagens e congelamento (KUHN; SOARES, 2002).

O surimi é apenas o produto intermediário, que serve de matéria-prima empregada para produzir produtos, dentre eles os géis de surimi termoestáveis formados pelo aquecimento do surimi, com adição de alguns ingredientes e crioprotetores, que vem sendo produzido e consumido no Japão (KUHN; SOARES, 2002).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade da utilização da carne mecanicamente separada do dorso de rã-touro na elaboração de gel de surimi, avaliando a influência do número de ciclos de lavagem e de diferentes concentrações de amido sobre as características de qualidade nutricional, propriedades físico-químicas, aceitação sensorial, além de avaliar a sua estabilidade oxidativa de lipídeos e proteínas durante armazenamento sob refrigeração ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período de 60 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARNE DE RÃ

Pertencente à família *Anura*, Ranidae, Rana de Amphibia, a rã-touro é uma das maiores espécies de rã, que apresenta papel ecológico e alto valor econômico (WANG et al., 2014). Anteriormente descrita como *Rana catesbeiana*, a rã-touro recebeu novo nome científico passando a se chamar *Lithobates catesbeianus* (IHDA, 2007). A espécie é popularmente conhecida como rã-touro porque o macho, na época da reprodução, emite um som potente, o coaxar, muito parecido com o mugido de um touro, este som é utilizado para atrair as fêmeas (BRUENING, 2002).

No Brasil, a criação da rã-touro teve seu início em 1935, quando o agricultor canadense, Thomas Cyrill, importou 300 casais da espécie para a implantação do primeiro ranário do Brasil, no estado do Rio de Janeiro, mais precisamente na baixada fluminense, com fins de exploração comercial (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 1997).

O desenvolvimento da rã-touro no Brasil foi maior do que o obtido em suas regiões de origem, pois ela teve uma ótima adaptação ao regime climático brasileiro, bem como aos diferentes tipos de manejo físico e alimentar (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002). Segundo Vizotto (1984), em seu país de origem, a rã-touro tem somente um período reprodutivo por ano, porém nas condições brasileiras, a partir do segundo ano de vida, ela passa a ter dois períodos reprodutivos, sendo o primeiro de setembro a janeiro e o segundo, de fevereiro a meados de abril e em condições laboratoriais pode-se obter desova a cada 45 dias (fertilização *in vitro*) (AGOSTINHO et al., 2000).

Nos últimos anos, a ranicultura teve uma rápida expansão no sudeste da China, devido ao excelente desempenho reprodutivo do animal, taxa de crescimento rápido, ambientes culturais desejáveis e aumento do investimento em infraestrutura para produzir esses animais. Só em 2013, a produção de rã-touro na China foi estimada em 150.000 toneladas (ZHANG et al., 2015). Segundo a base de dados FIGIS (*Fisheries Global Information System*) em seu último levantamento, até 2012 o Brasil era apontado como segundo maior

produtor mundial de rã, ficando atrás apenas de Taiwan. Já a nível de América Latina, o Brasil é o maior produtor e exportador da *Lithobates catesbeiana*, sendo a carne exportada principalmente para o Chile e Argentina, países que têm disponíveis apenas 10% das suas necessidades nacionais (FAO, 2014).

Os números sobre a ranicultura nacional são bem imprecisos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no último censo agropecuário realizado, o país possui 193 estabelecimentos de criação de rã, e no ano de 2014 produziu 260 toneladas da carne do animal.

Hoje no Brasil é comum encontrarmos restaurantes que ofereçam pratos com carne de rã, principalmente na região sudeste, especialmente São Paulo e Rio de Janeiro, com tendência ao preparo de pratos na tecnologia denominada “*sous vide*”, considerada novidade no mercado consumidor brasileiro, e que consiste no cozimento da carne de rã embalada a vácuo, pasteurizada e congelada. Isso confere mais sabor, melhor textura e ainda conserva o aroma e cores naturais da carne (LIMA, 2012).

A carne de rã está no conjunto das mais nobres fontes de pescado existentes, seu consumo tem aumentado ao longo dos últimos anos, devido não somente ao seu paladar, mas por suas características nutricionais (PAIXÃO; BRESSAN, 2009). Ela está inserida no grupo dos alimentos saudáveis, pois além de sabor característico, ela possui propriedades nutricionais que atraem pessoas interessadas em produtos alimentares que trazem benefícios à saúde (AFONSO, 2010).

A carne de rã destaca-se nutricionalmente por sua grande quantidade de proteínas e por seu baixo teor em gorduras; sendo por estas características indicada para dietas hipocalóricas (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002). Segundo Moura (2003), a carne de rã possui características que a diferenciam das de animais de sangue quente. A rã não deposita gordura intracelular, essa ausência confere à carne suavidade no sabor, além disso, sua coloração branco-cremosa de difícil pigmentação, deve-se a falta de sítios para a ligação do pigmento adicionado. Além do delicado sabor, fatores como alta digestibilidade vêm atraindo os consumidores, que encontram muitos benefícios na carne de rã quando comparadas às principais espécies de carnes consumidas no país (NOBREGA et al., 2007).

Em função de sua composição, a carne de rã está sendo indicada em dietas restritivas para determinados componentes na alimentação humana (NOLL; LINDAU, 1988); no tratamento de doenças gastrointestinais, em recuperação de pós-operatórios (AZEVEDO; OLIVEIRA, 1988); e em diversas formas de alergias alimentares em crianças (PAIXÃO; BRESSAN, 2009).

As proteínas presentes na carne de rã possuem alto valor biológico, com perfil aminoacídico contendo escore químico maior que 1,0 para os aminoácidos essenciais (PIRES et al., 2006). Já em relação ao teor de lipídios, a espécie apresenta grande prevalência de ácidos graxos insaturados sobre os saturados, tanto na carne quanto no corpo gorduroso sendo fontes de ácidos graxos essenciais (COUTINHO, 2001).

Apesar das carnes em geral não serem consideradas fontes primárias de cálcio, alguns estudos com a carne de rã têm relatado a presença de elevados teores deste mineral com alta biodisponibilidade, comportando-se semelhante ao cálcio presente em leite e derivados (20% a 30%). Por esse motivo, essa carne pode ser indicada como uma alternativa alimentar no combate à carência desse mineral, assim como na prevenção da osteoporose, hipertensão arterial, câncer de cólon e outras patologias. Quanto à biodisponibilidade de ferro, a carne sem osso apresenta semelhança à do sulfato ferroso (24 ppm), enquanto que na carne com osso ou mecanicamente separada (DMS), a elevada quantidade de cálcio interfere na biodisponibilidade do ferro (PAIXÃO; BRESSAN, 2009).

Alguns subprodutos do abate, como fígado, gordura, intestino e pele, têm sido estudados e possuem potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas e bioquímicas, muitos deles até já se encontram disponíveis no mercado (PASTERIS et al., 2006). Porém este aproveitamento ainda não foi estendido a toda carcaça.

Depois de abatida a carcaça da rã é dividida em dois cortes principais, as coxas e o dorso (Figura 1). Os principais músculos da coxa são: *tríceps femoris*, *semimembranosus*, *gastrocnemius*, *bíceps femoris*, *peroneus* e outros menores associados. Já o dorso é composto dos músculos: *obliquus internus e externus*, *longissimus dorsi*, *latissimus dorsi*, *tríceps brachii*, *coccygeoiliacus*, *gluteus* e outros menores associados.

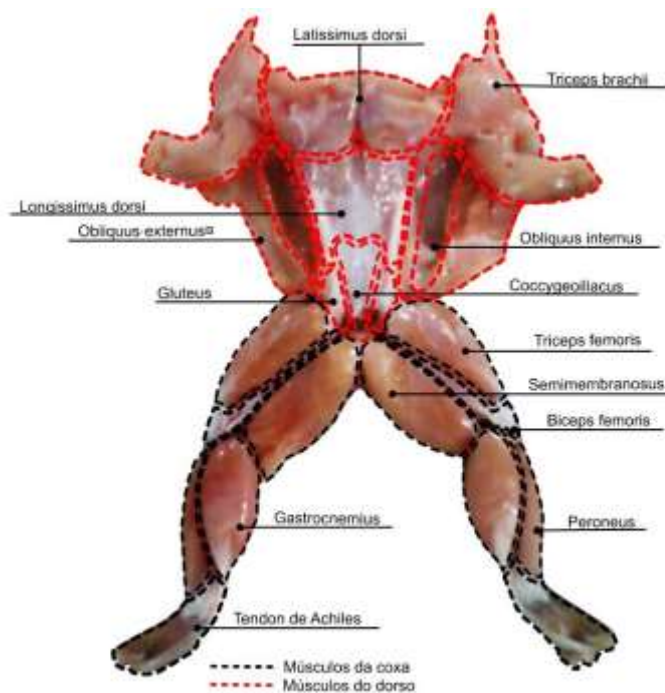


Figura 1. Carcaça da rã-touro pós abates: divisão por cortes e principais músculos (Fonte: FRAGOSO, 2012).

A principal forma de comercialização da rã consiste em coxas congeladas tanto para o mercado interno como para exportação, essas correspondem a 60% do peso da carcaça após o abate. Os 40% restantes correspondem ao dorso, e este é praticamente descartado após o abate, o que aumenta o custo de produção da carne devido ao grande desperdício (MELLO et al., 2006; LINDENER JUNIOR et al., 2013).

Segundo Mello et al. (2006), a carne do dorso, composto pelo tórax e braços, apresenta alto valor nutricional e potencial fisiológico, porém falta investigação para melhor aproveitamento.

Devido ao baixo valor comercial do dorso, estes podem ser destinados à obtenção de dorso mecanicamente separado (DMS). A terminologia DMS reporta a uma distinção à carne mecanicamente separada (CMS), em função dos seus macro constituintes, em especial no teor de lipídico, assemelhando-se mais à polpa que é obtida por desossa do animal inteiro. A carne assim obtida, por sua vez, pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de vários produtos à base de carne de rã (MOURA, 2000).

Visando a aplicação da técnica de produção de CMS de rã-touro e seu baixo custo de produção, pesquisadores do Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura (CCHSA/UFPB), desenvolveram um desossador de baixo custo (Patente MU-8200639-3 U), tipo rosca sem “fim”, apropriada para a desossa de rãs, e peixes menores de 500 g. Assim, tem sido possível a elaboração de produtos partindo de pequenas quantidades de matéria prima, estimulando a pequena e/ou média indústria a ofertar um leque diversificado de opções de derivados da carne de rãs (FRAGOSO, 2012).

A utilização do dorso para obtenção do DMS e aplicação na elaboração de produtos é uma alternativa para agregar valor a esse subproduto do abate da rã (FRAGOSO, 2012). Alguns produtos já foram desenvolvidos com essa matéria prima: patê (CONCEIÇÃO et al., 2000), salsicha (FURTADO et al., 2005), linguiça (MARENGONI; SANTOS, 2002), e hambúrguer (GONÇALVES; OTTA, 2008); porém ainda existe inúmeros outros produtos a partir de tecnologias alternativas, que podem ser utilizadas para aproveitar o DMS da rã.

2.2 SURIMI

Originada no Japão por volta do século XI, a tecnologia de preparo do surimi surgiu a partir de pescadores japoneses, que descobriram que se poderia aumentar o período de vida útil dos produtos à base de pescado, se a polpa lavada do peixe fosse misturada com sal e cozida no vapor. A palavra japonesa surimi significa literalmente carne moída. Não é um produto de consumo direto, é uma matéria-prima intermediária a partir da qual podem ser elaborados produtos como embutidos de pescado (RAMIREZ et al., 2011). E é obtida a partir da polpa do pescado, submetida a lavagens sucessivas, refino, desidratação, adição de crioprotetores e congelamento para sua preservação (LEE, 1984).

A elaboração do surimi permite o aproveitamento máximo dos recursos alimentares disponíveis e a utilização de espécies de baixo valor comercial, tidas como magras, como de subprodutos do processamento industrial, a exemplo do que ocorre com alguns pescados, suínos, bovinos e frangos empregadas no processamento deste tipo de produto, pois produzem um surimi com cor branca e sabor neutro (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002). A utilização destas matérias-primas anteriormente desprezadas e o processamento dos

subprodutos, podem diminuir os impactos ambientais gerada pela indústria de processamento de carnes (CHOMNAWANG et al., 2007).

No final do processamento, o produto é composto por uma pasta de pescado branca, sem odor e sabor acentuado de pescado, e depois de gelatinizado torna-se um produto intermediário, que pode ser moldado na forma desejada (GOMES et al., 1994). Os produtos à base de surimi são muitos, sendo classificados em moldados, texturizados, compostos e emulsionados, destacando-se nestas classes os presuntos, salsicha de peixe, os géis de surimi e as imitações de palitos de camarão e caranguejo (*kamaboko*, *kani-kama* ou *crab sticks*) (LEE, 1984).

Algumas características finais do surimi são de grande importância, pois vão ser determinantes na aceitação do produto. Como coloração o mais branco possível, odor suave e textura firme. Uma das propriedades importantes do surimi é a capacidade de formar géis fortes e deformáveis ao se processar termicamente. Geralmente quanto mais forte seja o gel do surimi, melhor a sua qualidade (BARRETO; BEIRÃO, 1999).

Algumas etapas do processamento são de extrema importância para se elaborar um surimi de alta qualidade, dentre as quais podemos citar a etapa de lavagem, pois o perfil de textura, cor, odor e o sabor do produto final são grandemente melhoradas quando as impurezas são removidas do lavado (PARK; LIN, 2005). Estas propriedades funcionais são os principais fatores responsáveis pela aceitação final de produtos à base de surimi (TABILO; BARBOSA, 2004; PARK; LIN, 2005).

A etapa de lavagem da carne é um passo crítico no processo de elaboração do surimi, pois ela promove eliminação das proteínas sarcoplasmáticas (o que contribui diretamente em uma melhor elasticidade do produto). Repetidas lavagens são realizadas visando o aumento da concentração de miosina, promovendo condições favoráveis para uma boa formação gelatinosa e elástica (HOLLINGWORTH, 1998). A remoção destas proteínas resulta em um surimi de cor mais clara, devido à remoção dos compostos carbonílicos (SHIMIZU et al., 1992). Processos de lavagens insuficientes podem resultar em perdas substanciais na qualidade do gel de

surimi durante a estocagem congelada. Por outro lado, muitas lavagens podem causar perdas de finas partículas e umidade excessiva (PARK; LIN, 2005).

A Associação Japonesa de Surimi (JSA) desenvolveu um método que compreende três ciclos de lavagem, sendo na primeira utilizada uma solução de bicarbonato de sódio 0,5%, com duração de 20 minutos, no segundo ciclo utiliza-se água resfriada com duração de 15 minutos, e no terceiro com solução de 0,3% de sal com duração de 10 minutos (TEIXEIRA, 2002).

As lavagens repetidas que são aplicadas durante o processamento de surimi exigem uma grande quantidade de água doce, e podem causar grave contaminação quando essas águas residuais são descartadas nos efluentes (PARK; LIN, 2005). Neste contexto, o número de ciclos de lavagem é o ponto crítico na produção de surimi (FOGAÇA et al., 2015). Estudos para utilização das proteínas sarcoplasmáticas presentes nas águas residuais das lavagens estão sendo conduzidos como uma abordagem alternativa de reciclagem: Bourtoom et al. (2009); Iwata et al. (2000) e Lin, Park & Morrissey (1995). Uma redução significativa da água residual do processo geraria menor demanda de água na indústria, diminuindo a quantidade de água enviada para o sistema de tratamento de resíduos e menor custo de refrigeração da água (VAZ, 2005).

Uma maneira de manter o mesmo efeito da lavagem, utilizando-se menos água, seria o aumento do tempo e do número de ciclos de lavagens com menores proporções água/pescado. Teoricamente, quando um tempo de lavagem prolongado for usado, maior quantidade de proteína será solubilizada até se chegar a um estágio de equilíbrio. Lin e Park (1997), estudaram os efeitos da redução da proporção água/pescado variando de 1:4 (P:V) até 1:1 (P:V), e do aumento dos ciclos e do tempo de lavagem do músculo (de dois a cinco ciclos de 15 minutos cada). Os resultados mostraram que o aumento do tempo de lavagem não melhorou a remoção das proteínas sarcoplasmáticas, sendo que, ao final, três ciclos de lavagem de amostras em proporção 1:2 (P:V) foram recomendados para elaboração do surimi (FOGAÇA et al., 2013).

Tradicionalmente, o surimi japonês, era preparado de pescado fresco e imediatamente processado em produtos, hoje, no entanto, o surimi congelado é usado principalmente como matéria-prima para a fabricação de distintas classes de produtos, sejam eles: géis de surimi, salsichas de pescado, embutido de

pescado e também para a confecção de alimentos prontos como hambúrgueres e palitos de peixe (MELLO, 2009; ORDÓÑEZ, 2005).

Para a elaboração dos géis, são adicionadas a pasta de surimi, NaCl e crioprotetores (tripolifosfato, glicerol ou sacarose), necessários para a manutenção das características de geleificação, importantes na elaboração deste produto. Além dos crioprotetores, a adição do amido tem sido considerada de grande importância em produtos derivados do surimi, devido aos seus efeitos sobre as características de textura, e físicas de géis de proteína de surimi (BUREY et al., 2008; HUNT; GETTY; PARK, 2010). O amido promove a formação de uma matriz contínua, interagindo com água e proteína na pasta de peixe, desempenhando um papel importante na melhoria das propriedades mecânicas e funcionais do surimi (RAMIREZ et al., 2011). No gel, o amido é geralmente adicionado ao surimi variando de 4-12%. Os amidos mais frequentemente utilizados são derivados do trigo, milho, batata, milho ceroso e mandioca (HUNT; GETTY; PARK, 2010).

Dependendo do tempo e da temperatura de aquecimento, a partir da mistura dos ingredientes, podemos obter diferentes tipos de gel de surimi, quando se aquece o colóide de actomiosina a aproximadamente 50 °C, aparece um gel translúcido chamado suwari (Figura 2), no qual prevalecem as ligações de pontes de hidrogênio. Se aquecido entre 80 e 90 °C, consegue-se um gel mais firme e opaco definitivo denominado kamaboko (Figura 2), no qual predominam as ligações hidrofóbicas. Se o gel suwari é mantido a temperatura ambiente ou, em alguns casos, aquecido lentamente a 60 °C, ocorre a ruptura do gel, conhecida com o nome de fenômeno modori (ORDÓÑEZ, 2005; KUHN et al., 2007).

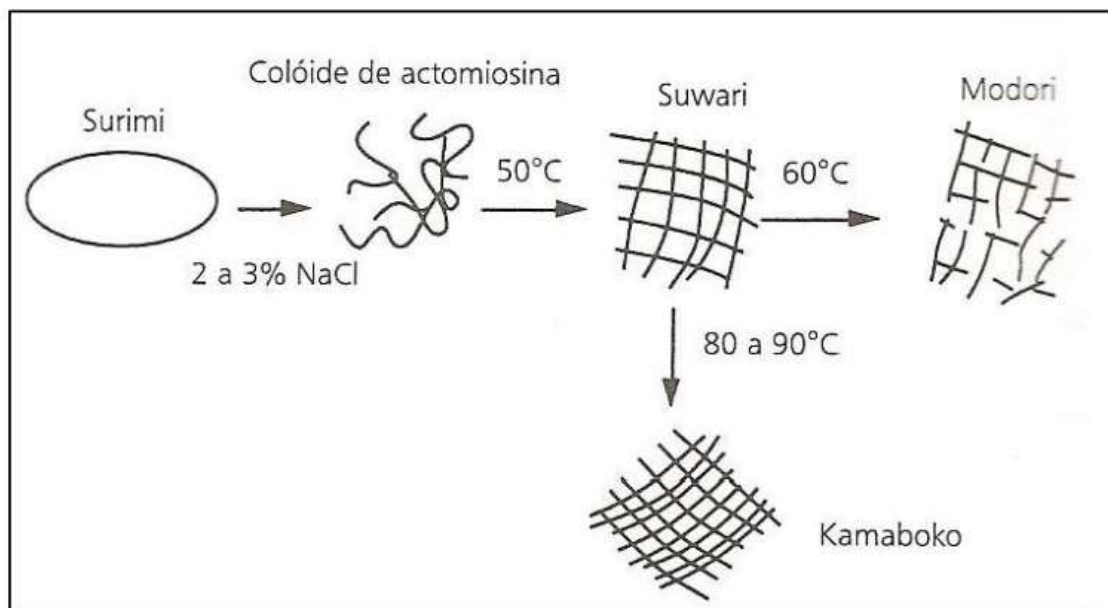


Figura 2. Obtenção de géis de surimi. (Fonte: ORDÓÑEZ, 2005)

Os géis de surimi mais conhecidos são os *Kamaboko*, esses por sua vez ainda diferem na forma de apresentação e preparo. Dentre eles podemos citar o tipo *itatsuki*, que é aquecido a vapor ou na grelha, o *Kamaboko tempurá*, que se obtêm por fritura em óleo de soja ou de colza, o *Hanpen*, que se ferve e é muito esponjoso, e o *Chikuwa*, que é um produto cilíndrico assado na grelha (TAHA, 1996; ORDÓÑEZ, 2005).

Em geral a recomendação dado pelo ministério do bem-estar do Japão para elaboração do gel de surimi, sugere que durante o aquecimento a temperatura no centro do produto deve ser superior a 75 °C, e que sua composição química pode variar de 91 a 149 kcal; 66,2 a 75,7% de umidade; 9,9 a 16,2% de proteínas; 0,3 a 4,5% de lipídios; 7,4 a 13,9% de carboidratos; 2,7 a 3,6% de cinzas; 15 a 60 mg de cálcio; 800 a 1200 mg de sódio; 60 a 110 mg de fósforo; 1 a 2 mg de ferro e 1,9 a 2,9 g de cloreto de sódio (SUZUKI, 1987; OGAWA; MAIA 1999).

2.3 PROPRIEDADES DO AMIDO E SUA INFLUENCIA EM GEIS DE SURIMI

O amido é o polissacarídeo de reserva alimentar predominante das plantas, e fornece cerca de 70% das calorias do consumo humano no mundo. São obtidos a partir de sementes (principalmente milho, trigo, arroz), raízes (batata e

mandioca) e tubérculos. Quimicamente o amido se distingue entre os demais carboidratos por ocorrer na natureza em partículas características denominadas grânulos. Essas por sua vez, em sua maioria são compostas de uma mistura de dois polímeros: um polissacarídeo linear, chamado amilose, e um polissacarídeo ramificado, chamado amilopectina (FENNEMA, 2010).

A amilose é um polímero de cadeia linear, formado de 500 a 2000 unidades de glicose ligadas entre si através de ligações α -1,4, e possui baixa solubilidade em água fria, enquanto que, a amilopectina é um polímero de cadeia altamente ramificada, constituído por pequenas cadeias de amilose que contêm entre 25 e 30 unidades de glicose, ligadas entre si através de ligações α -1,6, apresentando tamanho maior que a amilose devido as suas ramificações, e boa solubilidade em água (SHARMA, 1981). O teor de amilose nos grânulos de amido pode variar de acordo com a fonte vegetal de origem, mas, geralmente, encontra-se nos intervalos de 20 a 30% em amidos normais de cereais. No amido de milho por exemplo, ele contém entre 25 e 28% de amilose, enquanto o de mandioca possui apenas 17% (LINEBACK, 1984).

As propriedades físico-químicas do amido são afetadas principalmente pelo tamanho do grânulo, bem como pela proporção de amilose/amilopectina, peso molecular e estrutura molecular (LINDEBOOM et al., 2004). Na indústria de alimentos o amido é utilizado principalmente como agente gelificante. Esse fenômeno ocorre quando os grânulos são aquecidos em água à temperatura característica para cada fonte de amido, que varia de 60 a 70 °C. Nessas condições, os grânulos incham irreversivelmente para um tamanho muitas vezes maior que seu tamanho original. Durante esse processo, parte dos grânulos continua a intumescer e outros se rompem (MILES et al., 1985).

Após a gelatinização, os polímeros que constituem o amido têm tendência a se associarem através de ligações de hidrogênio, formando zonas mais organizadas. Essa reassociação de amilose, amilopectina e grânulos inchados, forma uma rede tridimensional, constituída por zonas mais organizadas, muitas vezes cristalinas, e outras amorfas. Este fenômeno é conhecido como retrogradação, tendo influência na textura, solubilidade, susceptibilidade a enzimas, entre outros (BILIADERIS, 1992).

Na indústria alimentícia os amidos são amplamente utilizados em uma grande variedade de produtos, pois eles proporcionam mudanças desejáveis na textura e propriedades gelatinizantes dos alimentos (MISHRA; RAI, 2006). Mais especificamente, em produtos à base de surimi, os amidos melhoram suas propriedades físico-químicas, por sua habilidade em modificar sua textura, sua estabilidade em processos de “congelamento-descongelamento”, além de diminuir os custos de produção, visto que ele pode substituir parcialmente as proteínas do peixe, mantendo as características desejadas do gel (HUNT; GETTY; PARK, 2009; KIM; LEE, 1987; LI; YEH, 2002).

Durante o processo de elaboração do gel de surimi as transformações térmicas dos grãos do amido são diferentes nos sistemas: amido - água e surimi -amido. Durante o preparo do surimi ocorre absorção de água, e logo que se inicia a cocção há um inchaço dos grânulos de amido, e o vapor força a expansão destes, proporcionando maior viscosidade (YANG; PARK, 1998).

As propriedades físico-químicas do gel do surimi podem ser profundamente afetadas pelo tipo de amido (origem botânica) e quantidade de amilose/amilopectina presente no grão. A textura do surimi por exemplo, em suas propriedades reológicas: retrogradação e gelatinização, sendo que o amido gelatinizado pode aumentar a força do gel e a firmeza do produto. (HSU; CHIANG, 2002; LEE, 1986; LI; YEH, 2002; KIM; LEE, 1987). Já a firmeza e coesividade do gel melhoram com o aumento da viscosidade e da capacidade de ligação com a água do amido utilizado (LEE, 1986). Géis preparados com amidos contendo altos teores de amilose proporcionam aumento de umidade e força de penetração (LANIER; LEE, 1992).

Dentre os amidos disponíveis no mercado, o amido de batata aumenta mais a força do gel que o amido de milho, devido a sua propriedade de absorver uma grande quantidade de água, e de sua melhor rigidez, coesividade e firmeza (YANG; PARK, 1998). Já em relação a coesividade o amido de milho foi destacado por aumentar essa propriedade em comparação ao amido de mandioca (BARRETO; BEIRÃO, 1999), e também proporciona melhor estabilidade ao surimi durante o congelamento (LEE, 1986).

O amido também influencia na umidade final dos géis de surimi. Esta por sua vez desempenha importante papel na textura e na estabilidade durante o

congelamento. Em formulações comerciais o surimi possui entre 72 e 78% de umidade, sendo que níveis altos de umidade tornam o produto mais suscetível à desestabilização durante a estocagem (LEE, 1986). Uma boa estabilidade durante o armazenamento é fundamental para todos os alimentos. No caso dos alimentos que contêm amido, pode ocorrer o fenômeno da retrogradação, que resulta em deterioração da textura e aparecimento de turbidez nos produtos.

2.4 OXIDAÇÃO EM PRODUTOS CARNEOS

Produtos elaborados com carne reestruturada representam um grande percentual dos alimentos consumidos hoje no mundo. Eles são obtidos a partir de uma emulsão de ingredientes hidrossolúveis e lipossolúveis, e tem como ingrediente principal as carnes mecanicamente separadas. Essas por sua vez apresentam considerado percentual de gordura e proteínas em sua composição, além de passarem por várias etapas de processamento que podem afetar as propriedades físico-químicas da carne, como também comprometer os seus componentes nutricionais, ou produzir alguns compostos que podem colocar em risco a saúde humana (SOLADOYE et al., 2015).

O processo de deterioração em produtos cárneos pode ocorrer de duas formas, deterioração microbiana e química (SEBRANEK et al., 2005). A oxidação é uma reação bioquímica de origem não-microbiana que ocasiona a perda da qualidade nos alimentos. Os produtos cárneos tornam-se susceptíveis a deterioração oxidativa, devido a altas concentrações de lipídeos insaturados, pigmentos heme, catalisadores de metal e uma variedade de agentes oxidantes no tecido muscular. Essas reações de oxidação são geralmente associadas a efeitos negativos nos alimentos como: descoloração, desenvolvimento de sabor residual, formação de compostos tóxicos, diminuição da vida de prateleira e perdas de nutrientes (CONTINI et al., 2014; PALMIERI; SBLENDORIO, 2007).

A oxidação de lipídeos e proteínas é resultante de um desequilíbrio no conteúdo de pró-oxidantes/antioxidantes. Basicamente, a oxidação envolve a perda de pelo menos um elétron quando os produtos químicos nos alimentos são expostos ao oxigênio do ar. A oxidação lipídica e protéica em produtos cárneos tem sido demonstrada como a principal causa, não-microbiana de deterioração da qualidade durante o processamento e armazenamento. Apesar

da utilização de várias tecnologias, a oxidação de carnes ainda é uma grande preocupação na indústria da carne (JO; AHN; BYUN, 2002).

O papel desempenhado pelas reações oxidativas na perda da qualidade em alimentos cárneos tem desafiado cientistas a desenvolver metodologias adequadas para avaliar o estado oxidativo dos alimentos (ESTEVEZ et al., 2008). Apesar da potencial ligação entre oxidação lipídica e protéica, ambos os processos são regidos por diferentes fatores e mecanismos (ESTÉVEZ, 2011).

2.4.1 Oxidação lipídica

Os lipídeos são largamente distribuídos em ambos os espaços, intra e extracelular, da carne, e são encontrados na forma de triacilgliceróis, fosfolipídios e esteróis. No entanto, os lipídeos são quimicamente instáveis e, portanto, facilmente sujeitos a oxidação, especialmente durante processamento e a estocagem (FALOWO et al., 2014).

A oxidação dos lipídeos, é uma reação na qual espécies reativas de oxigênio (ROS), atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios das membranas das células, desintegrando-as e permitindo, desta forma, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Ela é uma reação em cadeia de radicais e acontece em três etapas: iniciação, propagação e terminação, com a produção de radicais livres. A taxa e a extensão da oxidação de lipídeos são influenciadas por inúmeros fatores, que incluem o teor de ferro no alimento, a distribuição de ácidos graxos insaturados, pH, níveis de antioxidantes, modo de preparo (cozimento ou aquecimento), processos de redução de tamanho, desossa mecânica, aditivos, temperaturas inadequadas no manuseio e distribuição, e estocagem prolongada (GATELLIER et al., 2007; WSOWICZ et al., 2004; SILVA, 2016).

Os lipídeos alimentares são mais suscetíveis à oxidação e, como tal, os protocolos analíticos são obrigados a medir a sua qualidade. Existem muitos métodos de análise para medir o estado oxidativo de carnes e produtos derivados, que vão desde avaliações sensoriais simples, a métodos químicos mais complexos. Os métodos químicos podem ser classificados em dois grupos de acordo com o que eles avaliam, podendo medir os produtos formados na

oxidação primária, e os produtos provenientes da oxidação secundária (ESTEVEZ et al., 2008).

Dentre os métodos químicos utilizados para mensurar a oxidação lipídica está o teste para malonaldeído (MDA), este composto é considerado um produto secundário da oxidação de lipídios. Neste procedimento é usado o ácido tiobarbitúrico (TBA), devido a sua sensibilidade e a metodologia relativamente simples (RAHARJO; SOFOS, 1993). O teste de TBA quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

O acompanhamento da estabilidade oxidativa dos lipídios em surimi e produtos derivados tem sido objetivo de inúmeras pesquisas, muitas delas visando a utilização de antioxidantes e crioprotetores com intuito de reduzir ou estacionar essa reação (LIU et al., 2014; ORDONEZ RAMOS et al., 2012; HUR et al., 2011; MAO; WU, 2007). Segundo Eymard et al. (2005) a etapa de lavagens é de grande importância na prevenção da oxidação pois ela remove produtos primários e secundários da oxidação lipídica prevenindo a degradação do produto. Valores acima de 1,51 mg de MDA kg⁻¹ em pescado podem vir acompanhados de odor e sabor característicos de ranço (KE, CERVANTES; ROBLE-MARTINEZ, 1984; OGAWA; MAIA 1999).

A legislação vigente no Brasil não apresenta limite máximo para malonaldeído/kg em produtos cárneos e produtos derivados de pescado, entretanto, segundo Al-Kahtani et al. (1996), produtos cárneos podem ser considerados em bom estado, se apresentar valores abaixo de 3mg de malonaldeído/Kg de amostra.

2.4.2 Oxidação protéica

A oxidação de proteínas é uma das questões mais inovadoras na avaliação da qualidade da carne. Isto porque o tecido muscular contém quantidades elevadas de proteínas que desempenham um papel fundamental na qualidade da carne, sobretudo em relação às propriedades nutricionais,

sensoriais e físico-químicas da carne e produtos cárneos (FALOWO et al., 2014). Atualmente a oxidação de proteínas tornou-se um dos tópicos mais inovadores dentro da ciência dos alimentos (SOUZA, 2011).

As proteínas musculares são altamente suscetíveis à oxidação, e o conhecimento em relação a este campo particular ainda é bem escasso. Recentemente, vários autores têm encontrado que as proteínas musculares são oxidadas durante o processamento e armazenamento dos alimentos cárneos, mas a ocorrência, extensão e consequências do início da oxidação de proteínas nos músculos e produtos à base de carne é ainda mal compreendida (ESTEVEZ et al., 2008).

Semelhante a oxidação lipídica, a oxidação proteica é descrita como um processo de reações em cadeia, mediadas por radicais livres. Os mecanismos da reação têm uma complexidade mais elevada, e uma grande variedade de compostos pode ser formadas (SOUZA, 2011).

Essa reação tem sido definida como uma modificação covalente da proteína induzida, quer diretamente por espécies reativas ou indiretamente por reação com subprodutos secundários do stress oxidativo. Essas modificações são críticas não apenas para processo tecnológico e propriedades sensoriais dos alimentos, mas elas podem ter implicações sobre a saúde e a segurança das pessoas quando consumidos (SOLADOYE et al., 2015). De acordo com Estevez et al. (2008), as modificações das proteínas musculares têm como resultado alterações por oxidação, e por sua vez, a proteólise induz mudanças na qualidade da carne, incluindo traços de textura, cor, aroma, sabor, capacidade de retenção de água e funcionalidade biológica.

Muitas técnicas e etapas do processamento das carnes, bem como outras tecnologias emergentes, podem afetar significativamente a oxidação protéica e qualidade global de proteínas. Dentre elas o envelhecimento, fermentação, salga e cura, trituração, armazenamento, congelamento, cozimento, tratamento com calor, processamento de alta pressão, irradiação e embalagem (SOLADOYE et al., 2015).

Dependendo do alvo do agente oxidante, a oxidação de proteínas se propaga e termina de acordo com vários mecanismos, e as consequências incluem a perda de grupos sulfídricos, formação de compostos carbonílicos,

formação de ligações cruzadas e a modificação de aminoácidos aromáticos, entre outros (LUND et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Os compostos carbonílicos têm sido amplamente utilizados para avaliar oxidação em proteínas, porque sua geração ocorre por vários mecanismos, e sua detecção é fácil de ser feita pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), sendo um procedimento simples e barato. Acredita-se que representa uma das expressões mais relevantes do dano oxidativo a proteínas biológicas, em sistemas alimentares (SHACTER, 2000; ESTEVEZ, 2011). No método da 2,4-dinitrofenilhidrazina, o grupo carbonílico reage com o DNPH para formar um derivado da 2,4-dinitrofenilhidrazona e a quantidade de hidrazona formada é quantificada espectrofotometricamente. A quantidade de carbonilos é geralmente medida em comprimento de onda de 370 nm e expresso como nanomolar de carbonilos por miligrama de proteína usando o coeficiente de adsorção para as hidrazonas de proteína (21,0 / mm / cm) (ARMENTEROS et al., 2009). A concentração de proteínas é geralmente calculada a partir da absorbância a 280 nm, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

As proteínas são o componente orgânico mais abundante do músculo e desempenham um papel extremamente relevante na qualidade da carne do ponto de vista sensorial, nutricional e tecnológico. Portanto, é razoável considerarmos que a degradação por oxidação de proteínas pode ter consequências graves sobre a funcionalidade da proteína e na qualidade da carne (ESTEVEZ et al, 2008).

Além das perdas na qualidade da carne e dos produtos cárneos, a oxidação de proteínas induz várias alterações físico-químicas e nutricional nas proteínas da carne; dentre elas, diminuição da biodisponibilidade dos aminoácidos da proteína, mudança na composição dos aminoácidos, diminuição da solubilidade da proteína devido à polimerização de proteínas, perda de atividade proteolítica e digestibilidade deficiente da proteína (LEVINE et al., 1990; LUND et al., 2011).

A identificação dos mecanismos subjacentes, pelos quais as proteínas são oxidadas nos alimentos podendo afetar suas funções biológicas, exige a realização de estudos por grupos de pesquisa interdisciplinares. O cumprimento deste objetivo desafiante poderá permitir a melhoria na formulação de comidas,

a otimização de tecnologias de processamento, bem como a concepção de estratégias dietéticas para controlar a oxidação de proteínas em tecidos vivos, e, por conseguinte, inibir processos patológicos ou mesmo exercer um potencial benefício para a saúde (SOLADOYE et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus III, Bananeiras, Paraíba. As análises foram realizadas em parceria com os seguintes laboratórios: Laboratório de Físico-Química de Alimentos (CCHSA/UFPB), Laboratório de *Flavour* (LAF/CT/UFPB), Laboratório de Proteômica Estrutural, Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (CCEN/UFPB) e com o Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (ITAL/SP).

3.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O dorso mecanicamente separado (DMS) foi obtido a partir da desossa mecânica do dorso das rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) disponibilizadas pelo Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura (CCHSA/UFPB), que depois de abatidos os animais, foram separadas as coxas do dorso, esses foram pesados (Figuras 3A), desossados em desossadora mecânica (Figura 3B), e obtido o dorso mecanicamente separado (Figura 3C). Após desossa, o DMS foi embalado em sacos de polietileno, uma amostra foi retirada para realização das análises microbiológicas, o restante foi armazenado em freezer (-18 °C) durante 24 horas, e conduzido para a elaboração do surimi.

3.3 PREPARO DO SURIMI DE RÃ

O surimi foi obtido por um processo manual em laboratório, de acordo com a metodologia descrita por Cortez-Vega et al. (2013), com pequenas modificações (Figura 4). Depois de descongelado, o DMS foi submetido a sucessivas lavagens (duas, três ou quatro) com o planejamento experimental

fatorial 2² (Tabela 1), em recipiente de polietileno (Figura 5A) utilizando uma proporção de 1:3 (DMS/água), a uma temperatura de 5 ° C por 10 minutos sobre agitação constante (Figura 5B). Foi utilizada uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 0,5% para a primeira lavagem e 0,3% de solução de cloreto de sódio (NaCl) para as demais. Após cada ciclo, o lavado (DMS) foi drenado em peneira de aço inox (Ø 32 mesh) (Figura 5C). Durante o processamento, o refino do surimi, envolvido em tela de nylon, foi realizado através de compressão em prensa manual de aço inox (Zatti®) (Figura 5D) por aproximadamente 10 minutos. Ao final do processamento, o surimi foi pesado (Figura 5E), e adicionado a sua massa de 4% sorbitol e 0,2% de tripolifosfato de sódio como agentes crioprotetores. O surimi foi embalado em sacos de polietileno e armazenado durante 24 horas a -18 ° C.

O rendimento foi calculado a partir da diferença entre o peso de toda massa muscular do DMS e do peso final do surimi.

$$\text{Rendimento \%} = (\text{massa do DMS} - \text{peso do surimi}) / (\text{massa do DMS}) * 100$$

(JIN et al., 2007).

Figura 3. Da esquerda para direita, dorso de rã-touro (A), desossa mecânica do dorso (B), e DMS (dorso mecanicamente separado) (C).

A)



B)



C)



Figura 4. Fluxograma do processo de fabricação do surimi elaborado com DMS de carne de rã-touro.

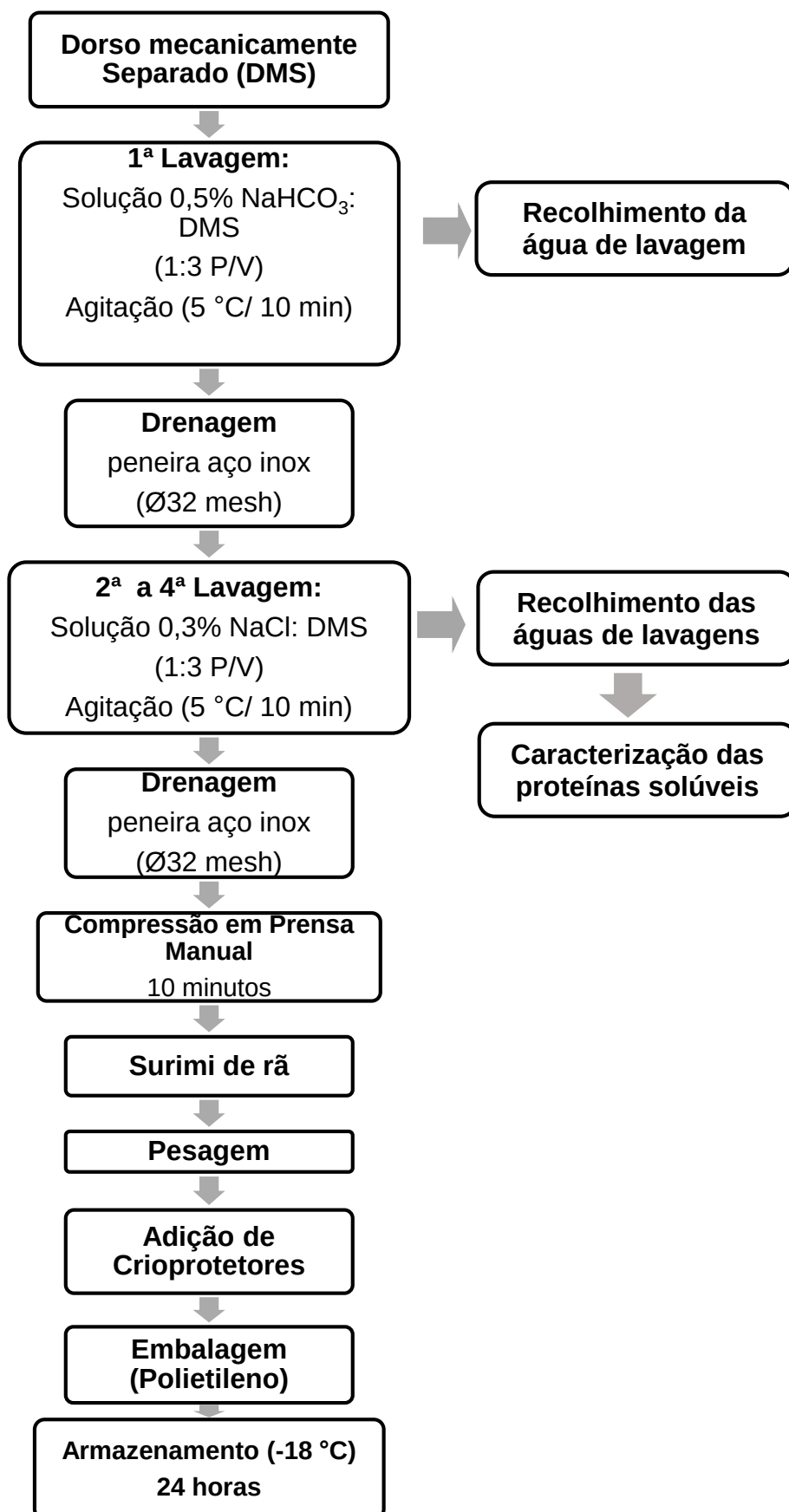


Figura 5. Etapas do processamento de elaboração de surimi de DMS de rã-touro: lavagem (A e B), filtragem (C), drenagem (D) e pesagem (E).

A)



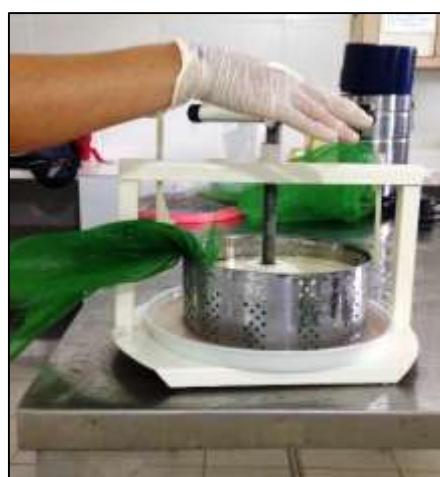
B)



C)



D)



E)



3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS NAS SOLUÇÕES DE LAVAGEM DO SURIMI DE CARNE DE RÃ

3.4.1 Determinação das Proteínas

Para caracterizar e quantificar as proteínas solúveis das águas de lavagem do surimi, o resíduo aquoso foi centrifugado à frio, durante 3 min a 5000g, para sedimentar as proteínas insolúveis. O sobrenadante foi utilizado para quantificar as proteínas solúveis através do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão analítico. A leitura das amostras proteicas foi feita em espectrofotômetro NovaSpec™ Plus (Visible Spectrophotometer, GE Healthcare®) no comprimento de onda 595 nm.

3.4.2 Perfil eletroforético

O perfil molecular das proteínas presentes nas águas de lavagem foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Para tanto, as amostras de proteínas foram solubilizadas em tampão de Tris-HCl 0,0625 M, contendo 2% de SDS, 2% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,010% azul de bromofenol, seguida pela aplicação de uma alíquota no gel empilhamento de 4% e 12,5% em gel de corrida de poliacrilamida (10 x 10,5 cm, com espaçadores de 0,30 mm), submetido a uma corrente constante de 25 mA por aproximadamente 2 horas. Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão comercial Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker da GE Healthcare. Após a eletroforese o gel foi corado segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando-se Coomassie Blue R-250 (Sigma Chemical Co.) a 1% diluída em solução aquosa contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. O descoramento foi feito em solução aquosa contendo 10% de ácido acético e 20% de metanol.

Para melhor visualização das bandas proteicas o gel foi submetido à revelação com nitrato de prata, e em continuação, desidratado com uma solução de etanol 50%, submetendo-se a três lavagens de 20 minutos cada. Em seguida, foi adicionada uma solução de tiosulfato de sódio (20 mg/100 mL H₂O) e mantida por 1 minuto sob leve agitação. Decorrido esse tempo, foram feitas três lavagens

rápidas em água destilada, sendo então adicionada a solução de nitrato de prata (200 mg + 74 µL de formaldeído em 100 mL de H₂O) e mantendo-se por 20 minutos sob leve agitação. Após esse tempo, o gel foi submetido a três lavagens rápidas em água destilada e adicionou-se a solução reveladora (6 g de carbonato de cálcio + 50 µL de formaldeído + 2 mL de tiosulfato de sódio em 100 mL de H₂O). Para cessar a revelação, adicionou-se uma solução de ácido acético 13 % (BLUM; BEIER; GROSS, 1997).

3.5 ELABORAÇÃO DO GEL DE SURIMI

O processo de elaboração do gel de surimi (Figura 6), foi realizado de acordo com planejamento experimental fatorial 2² (Tabela 1) a fim de se verificar a influência das variáveis de entrada (nº de lavagens do surimi e concentração de amido de milho) nas respostas escolhidas, com três repetições no ponto central, totalizando 7 (sete) tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1. Valores reais e codificados de entrada para elaboração do surimi de carne de rã

Variáveis	Código	-1	0	+1
Nº de lavagens	X ₁	2	3	4
Concentração de amido	X ₂	5	10	15

Tabela 2. Matriz do delineamento fatorial 2² para elaboração do surimi de carne de rã

Experimentos	Variáveis	
	Nº de lavagens	Conc.de amido
1	-1(2)	-1(5)
2	+1(4)	-1(5)
3	-1(2)	+1(15)
4	+1(4)	+1(15)
5	0(3)	0(10)
6	0(3)	0(10)
7	0(3)	0(10)

O gel de surimi obtido na etapa anterior foi misturado com os demais ingredientes, a saber: 2% de cloreto de sódio; 0,3% de aroma de caranguejo SY-Y06008 (Crab powder® - Guangdong Shinyee Marine Biology Engineering Corp - Guangdong, China) água gelada (para ajustar o teor de umidade), e amido de milho (na concentração estabelecida pelo planejamento). Toda a mistura foi homogeneizada em processador de alimentos a baixa velocidade (Figura 7A). As pastas assim obtidas foram embutidas (Figura 7B) em invólucro de polietileno (Ø2.5 cm) (Viscofan® Brazil – São Paulo-SP/Brasil) e ambas as extremidades foram seladas hermeticamente. As amostras foram aquecidas em banho maria (MA127 – Marconi® equipamentos para laboratório – SP/Brasil) a 90 °C durante 30 min (Figura 7C). Após o aquecimento, os géis foram resfriados em banho de gelo (± 0 °C), embalados à vácuo, e armazenados em estufa B.O.D à ± 4 °C (Figura 7D).

3.6 DEPOSITO DE PEDIDO DE INVENÇÃO

Foram realizadas buscas sobre processos de fabricação de surimi a partir de carne de rã, como também diferentes produtos elaborados com carne de rã. No entanto, não consta na literatura nenhum método de fabricação de surimi e produto derivado elaborado com carne de rã-touro (*Lithobates catesbeiana*). Logo as etapas de elaboração do surimi e o processo de produção do gel de surimi de carne de rã, gerou um pedido inicial de depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial -INPI sob o número de protocolo: BR 10 2016 024450 1, intitulado “Método de fabricação de surimi com carne de rã-touro”.

A presente invenção traz como inovação o método que permite o aproveitamento do dorso, co-produto do abate da rã, e resulta na obtenção de um produto alimentício altamente nutritivo, rico em proteína animal, e com preço acessível a todas as classes sociais. O presente pedido descreve adicionalmente, as condições adequadas para elaboração de um produto derivado, o gel de surimi. A invenção amplia a aplicação dos derivados da carne de rã-touro, contribuindo assim para o aproveitamento e valorização da cadeia produtiva da rã.

Figura 6. Fluxograma do processo de elaboração do gel de surimi com DMS de carne de rã-touro.

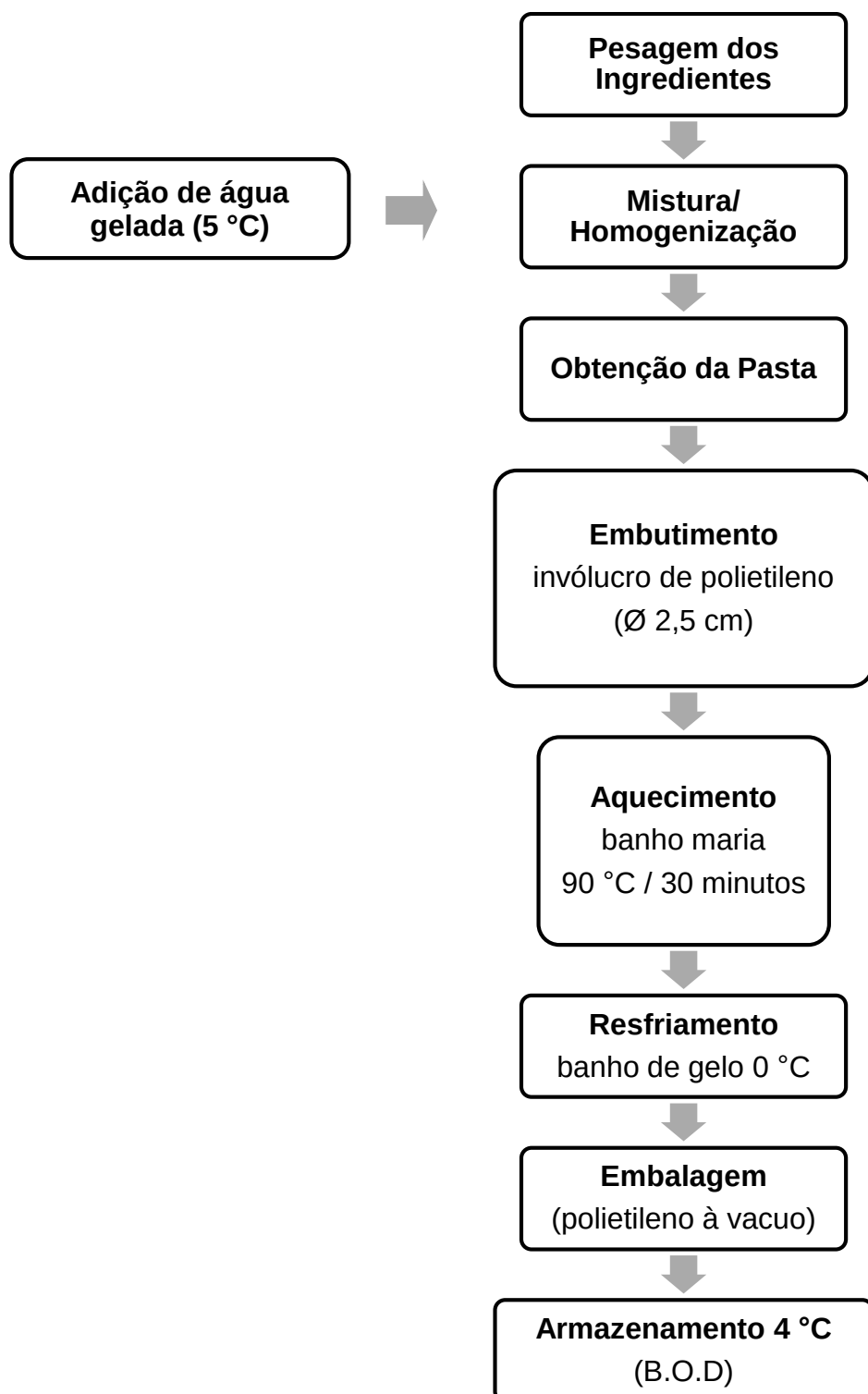


Figura 7. Processamento de elaboração do gel de surimi: homogeneização em cutter (A), embutimento (B), cozimento em banho maria (C), e armazenamento em BOD (D).



3.7 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO DMS E DO GEL DE SURIMI

3.7.1 Avaliação Química Parcial

Para avaliação dos parâmetros químicos do DMS e do gel de surimi, foram realizadas análises da composição centesimal (umidade, cinzas, proteínas e lipídeos) além da determinação dos carboidratos. O teor de umidade do foi medido pela diferença entre o peso inicial da amostra antes do aquecimento em estufa a 105 °C e o peso da amostra depois de aquecimento durante 24 h (método 950,46) (AOAC, 2000). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de micro Kjeldahl (método 981.10), sendo o teor de proteína estimado através do coeficiente de conversão de 6,25 (AOAC, 2000). O teor de lipídios foi determinado pela extração com clorofórmio e metanol de acordo com o método de Folch; Less; Stanley (1957), e os carboidratos foram determinados por diferença.

3.7.2 Medição do pH e da Atividade e Água (Aa)

O pH foi medido utilizando um medidor de pH digital (Marconi, Modelo Mapa 200, Piracicaba, BR). A medição da atividade de água (Aa) foi realizada com o auxílio de um analisador de atividade de água (Aqualab, modelo 4TE, São Paulo, Brasil) conforme procedimento nº 978.18 (AOAC, 2000).

3.7.3 Perda de Peso por Cocção (PPC)

A perda de peso no cozimento foi realizada nas amostras de gel de surimi na etapa final do processamento do gel, onde as amostras foram aquecidas num banho maria (MA127 – Marconi® equipamentos para laboratório – SP/Brazil) a 90 °C durante 30 min. A perda de peso por cocção foi calculada a partir de diferenças no peso das amostras cruas e cozidas, expresso em percentagem do peso inicial.

3.7.4 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com o método de Awad e Diehl (1975), com modificações sugeridas por Moura

(2000). Para isso cerca de 1g da amostra foi pesada entre duas folhas de papel-filtro previamente seca em estufa a 105 °C. O conjunto foi colocado entre duas placas sob um peso de 10 kg durante 20 minutos. As amostras foram retiradas e pesadas novamente. Pela diferença entre peso inicial e final da amostra, obteve-se a quantidade de água livre da amostra.

Cálculos:

% de água livre = [(mg de água livre/mg de amostra) x percentagem de umidade]

CRA = 100 – % de água livre

3.7.5 Cor Instrumental

A cor instrumental das amostras dos géis de surimi de rã foi determinada, por medição da luminosidade (L^*), teor de vermelho (a^*), teor de amarelo (b^*) e brancura ($w = L^* - 3 b^*$), usando um colorímetro digital (Konica Minolta, RC-400, Tokyo, Japão). Cinco medições por amostra foram feitas de forma aleatória sobre a superfície do gel usando o tamanho da abertura de 8 mm, fonte iluminante C, com medidas padronizadas em relação à placa de calibragem branco.

3.7.6 Força de Cisalhamento

Determinou-se a força de cisalhamento (FC) dos géis utilizando um analisador de textura TA.XT Express, (Stable Micro Systems®, Surrey, Inglaterra) equipado com uma lâmina de corte retangular Warner-Bratzler (2.0 mm/s pre-test; 2.0 mm/s test speed; 10 mm/s pos test; 25.0 mm). Os géis foram cortados em cinco cilindros (2,5 cm × 2,5 cm) e comprimidos até obtenção de um corte completo da amostra. Os resultados foram analisados através do software Exponent. Life Express (versão 4.0.13.0, Godalming, UK) e expressos em newtons (N).

3.7.7 Perfil de Textura (TPA)

Análise do perfil de textura dos géis de surimi foi determinada em analisador de textura TA.XT plus (Stable Micro Systems®, Surrey, Reino Unido) equipado com um êmbolo cilíndrico de 6 mm de diâmetro. As amostras foram

equilibradas e avaliadas à temperatura ambiente (25 – 30 °C). Os géis foram cortados em cilindros (2.5 cm de comprimento com 2.5 cm Ø), resultando em 7 amostras por tratamento, que foram comprimidas axialmente em dois ciclos consecutivos de compressão. As configurações de medição dos parâmetros foram: Hardness (N), Springiness (cm), Cohesiveness, Gumminess (N), Chewiness (N/cm). Pelo menos 7 medições foram feitas para cada amostra.

3.7.8 Ácidos Graxos

A extração dos ácidos graxos foi realizada segundo a metodologia descrita por O'Fallon et al. (2007). Foram pesadas 0,5 g da amostra liofilizada em tubos de ensaio com tampa rosqueada (16x125 mm), adicionadas em seguida de 1 mL do padrão interno (C:21), 0,7 ml de KOH 10 N e 5,3 mL de metanol. Posteriormente os tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 1,5 horas, sendo realizada agitação vigorosa por 5 segundos a cada 20 minutos. Em seguida foi adicionado 0,58 mL de H₂SO₄ 24 N, agitando os tubos em vortex modelo AT 56 da marca PHOENIX. Os tubos foram incubados novamente em banho-maria a 55 °C por 1,5 horas com agitação por 5 segundo a cada 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 3 mL de hexano grau cromatográfico e os tubos foram agitados em vortex por 5 minutos; para obtenção dos ésteres metílicos. O material foi transferido para tubos de centrifuga e centrifugados (25 °C) a 2.000 rpm por 5 minutos. A camada de hexano formada foi transferida para vidros de cromatografia de 1,5 mL, os quais foram armazenados a -20 °C em freezer até a injeção no cromatógrafo.

Os ácidos graxos foram analisados num Cromatógrafo Gasoso HP Hewlett Packard 6890 Series GC System, equipado com um injetor na coluna da porta e um detector de ionização de chama (DIC) a 260 °C. Uma coluna capilar de sílica fundida polar (100m x 0,25mm 0,2 µm, Supelco, USA) foi utilizada para a separação dos ácidos graxos. A programação do forno foi: T_{inicial} = 40 °C por 2mim; Rampa 1 = 10 °C/ mim até 180 °C por 30 minutos; Rampa 2 = 180 °C/ mim até 240 °C por 34 mim resultando num tempo total da corrida de 86 minutos. Foi utilizado hélio como gás de arraste (vazão de 1mL/min). Hidrogênio e ar sintético para a formação da chama no detector. O injetor utilizado foi o Split/ Split less a 250 °C - Split 1:50. O Software utilizado para identificação foi

EZChrom Elite Versão 3.3.2 SP2 (Agilent, EUA, 2005- 2010). Cada ácido graxo foi detectado com base em comparação com o tempo de retenção do padrão (C21).

3.7.9 Perfil de Aminoácidos

A análise de composição de aminoácidos totais foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas-SP), segundo metodologia descrita por White, Hart e Kry (1986). As amostras de DMS e gel de surimi liofilizadas foram derivatizadas em pré-coluna de aminoácidos liberados após a hidrólise ácida das proteínas (6 mol/L HCl), sob aquecimento (115 °C/22 h). A análise de aminoácidos foi realizada em cromatógrafo líquido (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). A identificação dos aminoácidos foi realizada conforme descrito por White, Hart e Kry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989), por comparação com padrão externo (Pierce, PN 20088) e para a quantificação, foi utilizado o padrão interno ácido α -aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA).

3.7.10 Avaliação da estabilidade oxidativa lipídica e proteica do gel de surimi durante o armazenamento de 60 dias

Oxidação lipídica

A avaliação da oxidação lipídica foi realizada através da determinação do número de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Salih et al. (1987). As amostras de gel de surimi (2,5 g) foram distribuídas em tubos plásticos de 50 mL e homogeneizadas em turrax com 7,5 mL de ácido perclórico (3,86%) e 0,25 mL de BHT (4,2% em etanol). Durante a homogeneização, os tubos foram imersos em banho de gelo para minimizar o desenvolvimento de reações oxidativas durante a extração de TBARS. A pasta resultante foi filtrada e centrifugada (4000 g por 3 minutos) e alíquotas de 2 mL foram misturadas com 2 mL de ácido tiobarbitúrico (0,02 M) em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram aquecidos em banho de água

quente (90 °C) durante 30 minutos. A concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada com base na curva de calibração obtida utilizando-se o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), um precursor de MDA. A leitura da absorbância foi realizada a 532 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS (modelo Q898U, Quimis, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de MDA por kg de amostra.

O acompanhamento da oxidação lipídica nas amostras do gel aconteceu nos dias: 1, 15, 30, 45 e 60.

Oxidação Proteica

A oxidação proteica foi avaliada através da determinação do nitrogênio em base volátil (NBV), dos grupos sulfidrilas livres (SH livres) e dos grupos carbonílicos (DNPH). O acompanhamento da oxidação proteica nas amostras do gel aconteceu nos dias: 1, 15, 30, 45 e 60.

O nitrogênio em base volátil (NBV) foi determinado utilizando ácido tricloroacético (TCA) de acordo com Stefansson et al. (2000). Dessa forma, a proteína no músculo foi precipitada por adição de 10% de TCA. Após filtração, a quantidade de compostos de proteína solúveis em TCA foi medida usando o método de micro Kjeldahl.

Para determinação de grupos SH livres presentes nas amostras do gel de surimi foi utilizado o (DTNB) 5,5'-Ditiobis ácido 2-nitrobenzóico, (ELLMANS, 1959). Neste procedimento 0,5 g do gel de surimi foram homogeneizadas com 12,5 mL de SDS 5% em 0,10 M de tampão fosfato (pH=8,0), com auxílio de um ultra-turrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 13500 g por 30s. O homogenato permaneceu em um banho maria a 80 °C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas (25 °C) e centrifugadas a 10000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. A concentração proteica foi determinada no filtrado pela medida da absorbância a 540 nm, usando uma curva de albumina bovina (BSA) (1 – 10 mg/mL). Tomou-se 0,25 mL do filtrado, adicionou-se 2,5 mL do tampão fosfato (pH=8,0) e 50µL de DTNB 10 mM em 0,10 M de tampão fosfato (pH=8,0). As amostras foram misturadas em agitador de tubos vortex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. A absorbância foi obtida por leitura no comprimento de onda de 412 nm em

espectrofotômetro UV-Vis (modelo Q898U, Quimis, Brasil), contra um branco contendo 250 µL de SDS 5%, 2,5 mL de tampão fosfato, e 50 µL de DTNB. Os dados obtidos foram plotados em uma curva de padrão de L-cisteína. Os resultados foram expressos em nmol de L-cisteína/mg de proteína.

O teor total de compostos carbonílos foi avaliada por derivatização com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) de acordo com o método descrito por Ganhão, Morcuende e Estévez (2010). A concentração de proteína foi calculada por espectrofotometria, utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. Amostras de gel de surimi (1 g) foram picadas e em seguida homogeneizadas na proporção de 1:10 (v/v) em tampão de fosfato de sódio 20 mM contendo 6 M de NaCl (pH 6,5) usando um homogeneizador Ultra Turrax durante 30 segundos. Duas alíquotas iguais de 0,2 mL foram tomadas a partir dos homogenatos e dispensadas em tubos eppendorf de 2 mL. As proteínas foram precipitadas em 1 mL de TCA 10% a frio, agitadas em vortex, e subsequentemente centrifugadas durante 5 min (5 °C) a 5000 g. A fração líquida foi descartada e o sedimento foi tratado com 1 mL de HCl 2 M (usado na medição de concentração de proteína) e o outro com um volume igual de 0,2% (v/v) DNPH em HCl 2 M (usado na medição das concentrações de carbonílos). Ambas as amostras foram agitadas em vortex e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram precipitadas em TCA a 10% (1 mL), e depois lavadas três vezes com 1 mL de etanol: acetato de etilo (1: 1, v /v) para remover o excesso de DNPH. Os pellets foram, em seguida, dissolvidos em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 6 M guanidina-HCl (pH 6,5), agitados e centrifugados durante 2 min (5 °C) a 5000 g para remover eventuais fragmentos insolúveis. A quantidade de carbonílos foi expressa em nmol de carbonilo por mg de proteína usando um coeficiente de absorção de $21,0 \text{ NM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 370 nm para hidrazonas de proteína.

3.8 ANÁLISE SENSORIAL DO GEL DE SURIMI

Com intuito de assegurar as condições sanitárias para elaboração e consumo na etapa da análise sensorial, foram realizadas análises microbiológicas no DMS e no gel de surimi. As análises exigidas pela resolução

são: coliformes a 45 °C / g, *Staphylococcus* coagulase positiva / g e *Salmonella* spp./25 g. Além delas, também foi realizada contagem de bactérias aeróbicas totais (CFU/g). Todos os parâmetros microbiológicos foram avaliados de acordo com as metodologias propostas pela *American Public Health Association* (APHA, 2000).

A avaliação sensorial foi realizada no Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA/UFPB), Campus III- Bananeiras. As amostras foram submetidas a análise sensorial de aceitação, com 80 provadores não treinados (Figura 8A). Os provadores foram compostos de servidores e alunos do CCHSA-UFPB, que foram pré-selecionados por apreciarem produtos cárneos derivados de carne de rã.

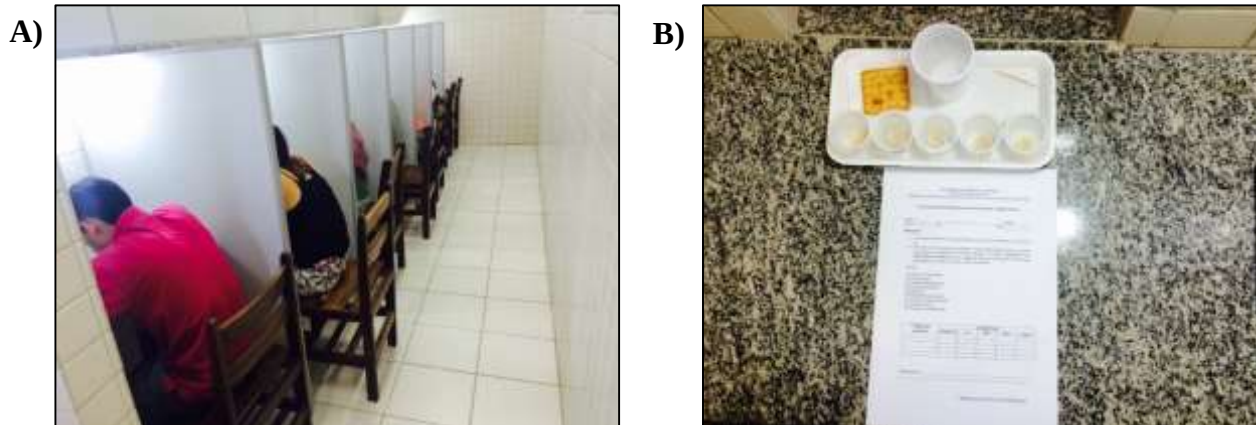
Para a análise, os géis foram cortados em pedaços de ± 2 cm, e servidos acondicionadas em recipientes codificados com números aleatórios e de três dígitos (Figura 8B), acompanhados de um copo de água e biscoito (OLIVEIRA, 2010). Todas as amostras foram servidas de forma aleatória.

O teste de aceitação foi realizado com uma escala hedônica de 9 pontos, onde 1 - significa desgostei muito e 9 - gostei muitíssimo; sendo avaliada a qualidade do produto obtido com relação aos seguintes atributos: aparência, cor, aroma, sabor e textura. O modelo da ficha utilizada encontra-se no ANEXO A.

O projeto de análise sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Paraíba (CAAE – 30319214.3.000.5188) (ANEXO C), conforme resolução 466/12. A análise sensorial foi realizada somente após emissão do laudo das análises microbiológicas e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (ANEXO B), estando os provadores cientes do objetivo da pesquisa e concordando com sua participação voluntária.

Com as médias obtidas na análise sensorial, foram calculados os índices de aceitabilidade das amostras. Tal índice foi obtido de acordo com a seguinte equação: Índice de aceitação (%) = [(médias das notas por atributo/nota máxima para o atributo) x 100]. Para que o produto fosse considerado como aceito, seria necessário que obtivesse um índice de aceitabilidade de, no mínimo, 70% (NASSU, 2007).

Figura 8. Experimento de análise sensorial do gel de surimi elaborado com DMS de carne de rã-touro: provadores não treinados (A); apresentação da amostra e ficha de avaliação.



3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para o tratamento dos dados com o auxílio do software Statistica v. 7.0 (STATSOFT, 2004). As médias foram comparadas através do teste de Tukey com nível de significância de 5%. Dois ensaios experimentais independentes do processamento foram realizados. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4 REFERÊNCIAS

AFONSO, A. M. A Carne de Rã como Alimento Funcional. **Jornal Saúde e Lazer**. Rio de Janeiro, 14 jun. 2010. Disponível em: < <http://www.saudelazer.com/noticias-comentarios.php?uid=11675> >. Acesso em: 10 fev. 2016.

AGOSTINHO, C. A.; WESCHSLER, F. S.; NICTHEROY, P. E. O.; PINHEIRO, D. F.; Indução à Ovulação pelo Uso de LHRH Análogo e Fertilização Artificial em Rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29. n.5, p 1261-1265, 2000.

AL-KAHTANI, H. A.; ABU-TARBOUSH, H. M.; BAJABER, A. S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in Tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 729-733, 1996.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods Analysis**. Washington: AOAC, 1018 p. 2000.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001, 676p.

ARMENTEROS M, HEINONEN M, OLLILAINEN V, TOLDRA F, ESTEVEZ M. Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). **Meat Science**. v. 83, n.1, p 104–12, 2009.

AWAD, A. A.; DIEHL, J. F. Physical changes in irradiated trout (*Salmo gairdneri*), **Journal of Food Science**, v. 40, n. 2, p. 319-321, 1975.

AZEVEDO, S.; OLIVEIRA, C.C. 1988 Composição química e análise microbiológica de carne de rã (*Rana catesbeiana*). In: ENAR – 6º Encontro Nacional de Ranicultura, **Anais...** Rio de Janeiro, 07 -12 ago./1988, p.262-270.

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

BELIBAGLI, K. B.; SPEERS, R. A; PAULSON, A. T. Thermophysical properties of silver hake and mackerel surimi at cooking temperatures. **Journal of Food Engineer**, v.60, n.1, p.439-448, 2003.

BILIADERIS, C.G. Structures and phase transitions of starch in food systems. **Food Technology**, v.46, n.6, p.98-109, 1992.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p 93-99, 1997.

BOURTOOM, T., CHINNAN, M. S., JANTAWAT, P., SANGUANDEEKUL, R. Recovery and characterization of proteins precipitated from surimi wash-water. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p 599-605, 2009.

BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. 2001. In: Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 10 fev. 2016.

BRUENING, S. *Rana catesbeiana* – North American bullfrog. 2002. The Animal Diversity Web (online). **University of Michigan**. Disponível em: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rana_catesbeiana.html. Acesso em: 23 de março de 2016.

BUREY, P., BHANDARI, B.R., HOWES, T., GIDLEY, M.J., Hydrocolloidgel particles: formation, characterization and application.Crit. **Jornal Food Science Nutrition**, v.48, p. 361–367, 2008.

CHEN, J. S.; LEE, C. M.; CRAPO, C. Linear Programming and Response Surface Methodology to Optimize Surimi Gel Texture. **Journal of Food Science**, v. 58, n.3, p.535-538, 1993.

CHOMNAWANG. C., NANTACHAI. K., YONGSAWATDIGUL. J., THAWORNCHINSOMBUT. S., TUNGKAWACHARA, S. Chemical and biochemical changes of hybrid catfish fillet stored 4° C and its gel properties. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 420-427, 2007.

CONCEIÇÃO C., FURTADO A.A.L., SILVA A.T., DELIZA R. Patê de carne de rã (*Rana catesbeiana*) formulação e aceitabilidade. *In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais... (vol. 3)*, Fortaleza (CE), UFCE, 2000, p.11-75.

CONTINI, C., ÁLVAREZ, R., O`SULLIVAN, M., DOWLING, D. P., GARGAN, S. O., & MONAHAN, F. J. Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. **Meat Science**, v.96, p.1171-1176, 2014.

CORTEZ-VEGA, W.R., FONSECA, G.G., PRENTICE, C. Optimization of parameters for obtaining surimi-like material from mechanically separated chicken meat using response surface methodology. **Jornal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 763–772, 2013.

COUTINHO, C. M. **Teor de Lipídeos e Composição em Ácidos Graxos da Gordura da Rã-Touro (*Rana Catesbeiana*, Shaw, 1802)**. 94p. Tese (Doutorado) - Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science & Technology**, v.31, n.5, p.419-426, 1996.

ELLMANS, G. L.: 'Tissue sulfhydryl groups'. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n.1, p.70 – 77, 1959.

ESTEVEZ M. Protein carbonyls in meat systems: a review. **Meat Science**. v. 89, p. 259–79, 2011.

ESTEVEZ, M., KYLLI, P., PUOLANNE, E., KIVIKARI, R., HEINONEN, M. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. **Meat Science**, v. 80, p. 1290–1296, 2008.

EYMARD, S.; CARCOUET, E.; ROCHET, M.J.; DUMAY, J.; CHOPIN, C.; GENOT, C. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.1750-756, 2005.

FALOWO, A.B, FAYEMI, P.O, MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171–181, 2014.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Global Aquaculture Production 1986-2008. FAOSTAT: Departamento de Pesca e Aquicultura, 2009. Disponível em: < <http://www.fao.org/figis/servlet/>>. Acessado em: 11 abril. 2016.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema** – 4ª ed. - Editora Artmed, 2010.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; NETO, J. S. P. Introdução à ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, p.15-25, 2002.

FOGAÇA, F. H. S., TRINCA, L. A, BOMBO, A. J., SILVIA SANT'ANA, L., Optimization of the surimi production from Mechanically Recovered Fish Meat (MRFM) using response surface methodology. **Jornal of Food Quality**, v. 36, p. 209–216, 2013.

FOGAÇA, F.H., SANT'ANA, L.S., LARA, J.A.F., MAI, A.C.G., CARNEIRO, D.J., Restructured products from tilapia industry byproducts: The effects of tapioca starch and washing cycles. **Food Bioproducts and Process**, v. 94, p.482–488, 2015.

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

FRAGOSO, S. P. **Avaliação de características físico-químicas da carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) liofilizada de pigmentação normal e albina**. 2012, 89p. Dissertação (Mestrado em tecnologia agroalimentar). Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, 2012.

FURTADO, A. A. L.; MODESTA, R. C. D.; SIQUEIRA, R. S.; FREITAS, S. C. Processamento de Salsicha de Carne de Rã. **Comunicado Técnico 90**. MAPA – ISSN 0103 – 5231. Rio de Janeiro. Dez. 2005.

GANHÃO, R., MORCUENDE, D., ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. **Meat Science**, v. 85, p. 402–409, 2010.

GATELLIER, P., GOMEZ, S., GIGAUD, V., BERRI, V., BIHAN-DUVAL, E. L., & SANTE-LHOUTELLIER, V. Use of a fluorescence front faces technique for

measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. **Meat Science**, v. 76, n.3, p. 543–547, 2007.

GOMES, J.C.; BIANCHINI, M.G.A.; PEREIRA, C.A.S.; COELHO, D.T.; COSTA, P.M.A. Processing and characterization of freshwater fish surimi. **Freshwater Fish Science and Technology**, v.14, n.2, p. 226-237, 1994.

GONÇALVES, A.A.; OTTA, M.C.M. Aproveitamento da carne da carcaça de rã-touro gigante no desenvolvimento de Hambúrguer. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v.3, n.2, p 7-15, 2008.

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

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE JMC. In free radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed; Oxford University Press, Oxford, UK, 1989.

HOLLINGWORTH, T. A. Chemical indicators of decomposition for raw surimi and Affected by Added Ingredients. **Journal of Food Science**, v.63, n.4, p.638-643, 1998.

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

HUNT, A.; GETTY, K. J. K.; PARK, J. W. Roles of starch in surimi seafood: a review. **Food Reviews International**, v. 25, n. 2, p. 299-312, 2009.

HUNT, A., GETTY, K.J., PARK, J.W. Screening of special starches for use in temperature-tolerant fish proteins gels. **Journal of Food Quality**, v.33, p.100–118, 2010.

HUR, S.J., CHOI, B.D., CHOI, Y.J., KIM, B.G., JIN, S.K. Quality characteristics of imitation crab sticks made from Alaska Pollack and spent laying hen meat. **LWT - Food Science Technology**, v. 44, p.1482–1489, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, 2007, 777p. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf> Acesso em 02 jul. 2016.

IHDA – Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental (The Nature Conservancy), 02 mar. 2007. Disponível em:<<http://www.institutohorus.org.br/>>. acesso em: 02 de abril de 2016.

IWATA, K., ISHIZAKI, S., HANDA, A., TANAKA, M. Preparation and characterization of edible film from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v.66, p.327–378, 2000.

JEONG, G.-T., YANG, H.-S. PARK, D.H. Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.25–30. 2009.

JIN, S.-K., KIM, I.-S., KIM, S.-J., JEONG, K.-J., CHOI, Y.-J., HUR, S.-J. Effect of muscle type and washing times on physico-chemical characteristics and qualities of surimi. **Journal of Food Engineer**. v.81, p.618–623. 2007.

JO, C, AHN, D.U, BYUN, M.W. Changes and oxidative production of volatile compounds sausages prepared with vitamin E-irradiation induced enriched commercial soybean oil. **Food Chemistry**, v.76, n.3, p. 299-305, 2002.

KE, P. J.; CERVANTES, E.; ROBLES-MARTINEZ, C. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fish tissue by an improved

distillation-spectrophotometric method. **Journal Science Food Agriculture**, v.35, p.1248-1256, 1984.

KIM, J. M.; LEE, C. M. Effect of starch of textural properties of surimi gel. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 3, p. 722, 1987.

KUHN, C. R.; FILGUERAS, R. S.; TORRES, L. M.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; SOARES, G. J. D. Caracterização textural e físico-química do Gel de surimi de jundiá (*rhamdia quelen*). **Boletim do CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 305-314, 2007.

KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases e inibidores no processamento de surimi. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.1, p.5-11, 2002.

KUHN, C.R.; PRENTICE, C. Estudo tecnológico para obtenção de surimi utilizando resíduos do processamento de Pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), Cap. 06, In: **Prêmio Jovem Cientista**: Oceanos, Fonte de Alimentos. Publicação dos trabalhos vencedores. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Rio de Janeiro, 1999, p.181-211.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680–685, 1970.

LANIER, T.; LEE, C. M. **Surimi technology**. New York: Marcel Decker, 396p. 1992.

LEE, C. M. Surimi process technology. **Food Technology**, v.40, p.69-80, 1984.

LEE, C. M. Surimi manufacturing and fabrication of surimi-based products. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 118-124, 1986.

LEVINE, R.L, GARLAND, D, OLIVER, C.N, CLIMENT, A. I, LENZ, A.G. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 464-478, 1990.

LIMA, S. L. Curso Criação de Rãs - Novas Tecnologias. Viçosa MG: CPT, 2012. 260p. ISBN: 978-85-7601-484-3.

LIN, T. M.; PARK, J. W. Effective washing conditions reduce water usage for surimi processing. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.6, n.2, p. 65-79, 1997.

LIN, T.M., PARK, J.W., MORRISSEY, M.T. Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste. **Journal of Food Science**, v.60, p.4–9, 1995.

LI, J-Y.; YEH, A. Functions of starch in formation of starch-meat composite during heating. **Journal of Texture Studies**, v. 33, n. 4, p. 341-366, 2002.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

LINDENER JUNIOR, E. J. ; VASCONCELLOS, M. L. ; FERREIRA, T. M. P. ; MELLO, S. C. R. P. ; Seixas Filho, J. T. ; CALIXTO, F. A. A. . Rendimento industrial da carne de dorso de rã obtida por desossa manual. **Higiene Alimentar**, v. 27, p. 3585-3588, 2013.

LINEBACK, D.R. The starch granule: organization and properties. **Bakers Digest**, v.58, n.2, p.16-21, 1984.

LIU, Q., CHEN, Q., KONG, B., HAN, J., HE, X. The influence of superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural changes in the myofibrillar

proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi. **LWT - Food Science Technology**, v.57, p.603–611, 2014.

LUND, M. N., HEINONEN, M., BARON, C. P., & ESTEVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular, Nutrition and Food Research**, v. 55, p. 83–95. 2011.

MAO, L., WU, T. Gelling properties and lipid oxidation of kamaboko gels from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) influenced by chitosan. **Journal Food Engineer**, v.82, p.128–134, 2007.

MARENGONI, N.G., SANTOS, R.S., Teores de minerais em filé e lingüiça de rã (*Rana catesbeiana*) e peixes (*Hopliassp.*, *Leporinus sp.* e *Cichla sp.*) . XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura – SIMBRAQ- **Anais** ...Goiânia, 2002, p.247-249.

MEDINA, J. R.; GARROTE, R. L. Determining washing conditions during the preparation of frozen surimi from surubim (*Pseudoplatystome coruscans*) using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v.67, n.3, p.1455-1461, 2001.

MELLO, P.R.C.S.; **Caracterização físico-química, bacteriológica e sensorial da fishburger e kamaboko obtidos da polpa e surimi de tilápia (*Oreochomis niloticus*)**. p.119. Tese. Doutorado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2009.

MELLO, S. C. R. P; SILVA, L. E; S. MANO; FRANCO, R. M. Bacteriological and physical-chemical evaluation of the meat of the dorsum and frog's thigh (*rana catesbeiana*) processed in a commercial slaughterhouse. **Brazilian Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 151-154, 2006.

MILES, M.J., MORRIS, V.J., ORFORD, .D., RING, S.G. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. **Carbohydrate Research**, v.135, p.271-281, 1985.

MISHRA, S.; RAI, T. Morphology and functional of corns, potato and tapioca starches. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 5, p. 557-566, 2006.

MOURA, O. M. A carne de rã como matéria-prima e seu uso em produtos derivados **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 68-73, 2003.

MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e perfil das indústrias de abate**. 2000, 208p. Tese (doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

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

NASSU, R. T. **Análise Sensorial de Carne: Conceitos e Recomendações**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste (Comunicado Técnico - Embrapa Pecuária Sudeste, n. 79), 2007.

NETO, B, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 401p. 2003.

NÓBREGA, I.C.C., ATAÍDE, C.S., MOURA, O.M., LIVERA, A. V., MENEZES, P.H., Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. **Food Chemistry**, v.102, p.186–191, 2007.

NOLL, I. B; LINDAU, C. F. Aspectos da Composição em nutrientes da carne de rã- touro gigante. (*Rana catesbeiana*). **Caderno de Farmácia**, v.3, n. 1/2, p. 29-36, 1987.

NORZIAH, M.H., KEE, H.Y., NORITA, M., Response surface optimization of bromelain-assisted gelatin extraction from surimi processing wastes. **Food Bioscience**, v.5, p.9–18. 2014.

O'FALLON, J.V, BUSBOOM, J. R, NELSON, M. L, GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 15511-1521, 2007.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. (Ed). **Manual de pesca, ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Livraria Vilela, 1999, v. 1, p. 221-249.

OLIVEIRA, M. A.B. **Análise Sensorial de Alimentos: práticas e experimentos**. 1 ed. Editora Noryam: Cachoeiro de Itapemirim, 2010.

OLIVEIRA, V. M.; OLIVEIRA, G.A. Contribuição ao estudo da qualidade da carne de rã fresca (*Rana catesbeiana*). **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.49, p.31-35, 1997.p.

ORDONEZ RAMOS, L.R.O., CHOI, N. DO, RYU, H.S.Effects of processing conditions on the protein quality of fried anchovy kamaboko *Engraulis japonica*. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v.15, p.265–273, 2012.

ORDOÑEZ, J. A. **Food Technology: Food of animal origin**. v.2. Tradução Fátima Murad. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

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

PAIXÃO, M. P. C. P.; BRESSAN, J. Aplicação Terapêutica da Carne de Rã. **Nutrição em Pauta**, v. 94, p.21-25, 2009.

PALMIERI, B.; BLENDORIO, V. Oxidative stress tests: Overview on reliability and use Part II. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.11, p.383–399, 2007.

PARK, J.W., LIN, T.M., **Surimi: manufacturing and evaluation**. In: Park, J.E. (Ed.), *Surimi and Surimi Seafood*. Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 33–105, 2005.

PASTERIS, S.E., BÜHLER, M.I., NADER-MACÍAS, M.E., Microbiological and histological studies of farmed-bullfrog (*Rana catesbeiana*) tissues displaying red-leg syndrome. **Aquaculture**, v.251, p.11–18, 2006.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.179-187, 2006.

RAHARJO, S. SOFOS, J.N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: **A Review Meat Science**, v.35, p. 145– 169, 1992.

RAMIREZ, J.A., URESTI, R.M., VELASQUEZ, G., VÁZQUEZ, M. Food hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products: a review. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1842–1852, 2011.

REINHEIMER, M.A., MEDINA, J.R., SCENNA, N.J., MUSSATI, S.F., FREYRE, M., PÉREZ, G.A. Mathematical modeling and simulation of soluble protein extraction during leaching process in surimi elaboration. **Journal of Food Engineer**, v.120, p.167–174, 2014.

RODRIGUES, E; CASTAGNA, A. A; SEIXAS FILHO, J. T. ; MELLO, S. C. R. P. ; SOUSA, M. A. ; PEREIRA, U. S. Frog meat microbiota (*Lithobates catesbeianus*) used in infant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Online), v. 25, p. 1-4, 2014.

SAGHIR, S, WAGNER, K.H, ELMADFA, I. Lipid oxidation of beef steaks for braised with different cooking oils. **Meat Science**, v. 71, n.3, p. 440-445, 2005.

SALIH A.M., SMITH, D. M. PRICE,J. F. DAWSON.L.E. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. **Poultry Science**, v.66, p. 1483–1488, 1987.

SEBRANEK, J.G, SEWALT, V.G.H, ROBBINS, K.L, HOUSER, T.A. Comparing a natural rosemary extract and BHA / BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v.69, n.2, p. 289-296, 2005.

SHACTER E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v.32, p.307–26, 2000.

SHAN, H., GORCZYCA, E., KASAPIS, S., LOPATA, A., Optimization of hydrogen-peroxide washing of common carp kamaboko using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v.43, p.765–770, 2010.

SHARMA, S.C. Gums and hydrocolloids in oil water emulsions. **Food Technology**, v.35, n.1, p.59-67, 1981.

SHIMIZU, Y., TOYOHARA, H., LANIER, T. C. Surimi production from fatty and darkfleshed fish species. In: LANIER, T. C., LEE, C. M. (eds). **Surimi Tecnology**. New York: Marcel Dekker, 1992, cap 8, p. 181-207.

SILVA, F. A. P. **Carne de frango e de galinhas de postura para elaboração de charque**. 215f. Tese. Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB. 2016.

SOLADOYE, O.P., JUÁREZ, M.L., AALHUS, J.L., SHAND, P., ESTÉVEZ, M., Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.14, p.106–122, 2015.

SOUZA, M. A. A. **Oxidação lipídica e protéica em carnes**. 245 p. Tese. Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

STATSOFT, INC. **Programa computacional Statistica 7.0**. E.A.U. 2004.

STEFANSSON, G.; NIELSEN, H.H.; SKÅRA, T.; SCHUBRING, R.; OEHLenschläger, J.; LUTEN, J.; DERRICK, S.; GUDMUNDSDÓTTIR, G. Frozen herring as raw material for spice-salting. **Journal Science Food and Agriculture**, v.80, p.1319-1324, 2000.

SUZUKI, T. **Tecnología de las proteínas de pescado y krill**. Zaragoza: Acribia, 1987.

TABILO, M. G., BARBOSA, C. G. V., Pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white: microstructure and water-holding capacity. **LWT Food Science and Technology**, v.38, p.47–57, 2004.

TAHA, P. **Estudo de viabilidade técnico-econômica da produção de surimi**. pg 120. Dissertação. Mestrado em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

TEIXEIRA, D. Mercado internacional de ancas de ranas. Argentina: **Globefish**, v. 68, p.1- 44, 2002.

TEJADA, M. Tendencias actuales en la utilización de surimi. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.31, n.3, p.310-318, 1991.

UOSUKAINEN E, LÄMSÄ M, LINKO YY, LINKO P, LEISOLA M. Optimization of enzymatic transesterification of rapeseed oil ester using response surface and principal component methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 236-243, 1999.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de lingüiça fresca "tipo toscana" de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 113p. Dissertação. Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2005.

VIZOTTO, L. D. Ranicultura. **Ciência e Cultura**. v.36, p. 42-45, 1984.

WANG, H., ZHOU, N., ZHANG, R., WU, Y., ZHANG, R., ZHANG, S. Identification and localization of gastrointestinal hormones in the skin of the bullfrog *Rana catesbeiana* during periods of activity and hibernation. **Acta Histochemistry**, v.116, p.1418–26, 2014.

WEBER, K.; OSBORNE, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal Biology Chemistry** v. 214, p.4406-4412, 1969.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag. **The Science and Food Agriculture**, v.80, p.1319-1324, 2000.

WSOWICZ, E., GRAMZA, A., HÊOE, M., JELEŃ, H. H., KORCZAK, J., MAECKA, M. Oxidation of lipids in food Polish. **Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 13, n.1, p.87–100, 2004.

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

ZHANG, C., HUANG, K., WANG, L., SONG, K., ZHANG, L., LI, P. Apparent digestibility coefficients and amino acid availability of common protein ingredients

in the diets of bullfrog, Rana (*Lithobates catesbeiana*). **Aquaculture**, v.437, p. 38–45, 2015.

ZHANG, W, XIAO S, AHN D.U. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p.1191–201, 2013.

5 RESULTADOS

A apresentação dos resultados obtidos no experimento foi realizada em forma de artigos, conforme as normas pré-estabelecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB (Norma Complementar nº 03/2011).

5.1 Artigo I: Electrophoretic profile of proteins present in the rinse water of surimi produced with bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) meat.

(Publicado no periódico Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, em agosto de 2014)

5.2 Artigo II: Effects of number of washes and starch concentration on the quality characteristics of surimi gel from bullfrog meat.

(Submetido ao periódico Journal of Food Science and Technology, em: 19 de dezembro de 2016 - Anexo D)

5.3 Artigo III: Characterization and stability oxidative of surimi gel from bullfrog meat (*Lithobates catesbeianus*).

(Submetido ao periódico Food Chemistry, em: 05 de fevereiro de 2017 - Anexo E)

5.4 Patente: Pedido de invenção nº BR 10 2016 024450 1, Título: “ Método de fabricação de surimi com carne de rã- touro”.

(Pedido depositado em outubro de 2016)

ELECTROPHORETIC PROFILE OF PROTEINS PRESENT IN THE RINSE WATER OF SURIMI PRODUCED WITH BULLFROG

(*Lithobates catesbeianus*) MEAT

Sinara P. Fragoso¹, Edilza S. do Nascimento¹, and Carlos A. A. Gadelha²

¹ Post-Graduate Program Food Science and Technology, PPGCTA, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Department of Molecular Biology, DBM, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brazil

*sinarafragoso@hotmail.com

Abstract - The aim of this study was to characterize the approximate molecular weight of soluble proteins present in the rinse water of surimi produced with bullfrog meat. The electrophoretic profile was used to characterize the soluble proteins from four washes (1stRW, 2ndRW, 3rdRW and 4thRW) of surimi produced from mechanically separated back (MSB) of bullfrog. The proteins were characterized by gel electrophoresis (SDS- PAGE). As a result, it was found that the content of soluble proteins in the rinse water of surimi showed higher level in the 1stRW (2.420 mg / mL), followed by proportional reductions in the 2nd RW (1.590 mg / mL), 3rd RW (0.620 mg / mL) and 4thRW (0.305 mg / mL). The electrophoretic profile revealed a greater abundance of proteins with relative molecular weight in the range from 31.0 to 52.0 kDa and little bands of weight less than 24.0 kDa. The presence of protein bands weighing between 76 and 225 kDa for the 1stRW was also verified, and in the other washes, bands were repeated in the same range, but in lower amounts. The proteins found can be recovered and have great potential for application in food products, as in the production of biofilms.

I. INTRODUCTION

Bullfrog meat is nutritionally distinguished due to its high content of proteins of high biological value and its low fat content [1]. Brazil has the best technology for the production of *Lithobates catesbeianus* in captivity and is one of the largest world's producers [2]. The legs (including the thigh) are the main edible and marketable part, which increases the cost of the meat due to the great waste of other cuts. The back, for example, consists of chest and arms and due to its low commercial value is used to obtain mechanically separated back (MSB) [3], and as raw material in the preparation of restructured products [4] [5].

There is a wide range of new products that can be used in the better utilization of frog MSB, among which includes surimi. The technology used to produce surimi allows adding functional, nutritional and commercial value for the production of restructured products [6]. In the industrial manufacturing process of surimi, meat is minced and washed repeatedly with cold water to remove sarcoplasmic proteins and impurities such as lipids to produce a tasteless and odorless product. As a result of washing, about 40-50 g/100 g of pulp solids from fish (mainly containing water soluble proteins) are lost throughout the process [7]. Thus, 40-50 % of the product is considered improper for consumption and is discarded into the environment, which has caused a negative environmental impact. The recovery of proteins present in the rinse water of surimi would not only reduce the environmental impact and costs of waste disposal but also generate potential profits [7]. Some studies have been conducted aiming to use these proteins in obtaining proteases [8], in the production of edible biofilm [9] and re-use in surimi production [7].

Thus, the objective of this study was to quantify and analyze the electrophoretic profile of soluble proteins present in the rinse water of surimi produced with bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) meat.

I. MATERIALS AND METHODS

The mechanically separated backs (MSB) of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) were provided by the Laboratory of Frog Breeding and Aquaculture Products (LRPA) - CCHSA / UFPB. The animals were slaughtered at an average live weight of 230 ± 20 g, had their legs (thighs) separated and back submitted to mechanical deboning using mechanical deboner prototype (Patent MU 8200639-3).

Surimi with MSB was produced according to methodology described by Kuhn et al. [10] with modifications (Fig. 1).

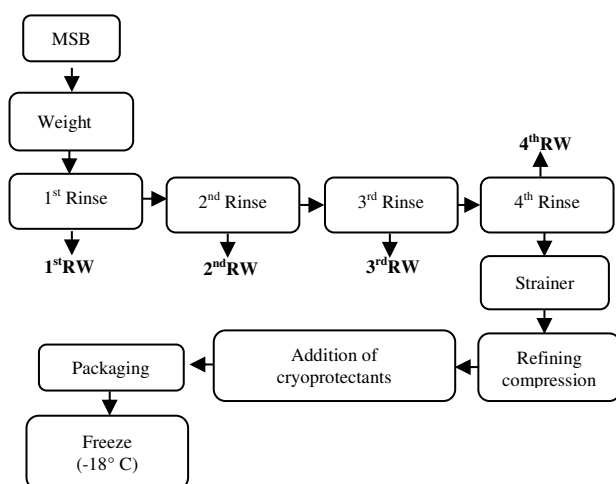


Figure 1. Surimi manufacturing process

MSB was submitted to four successive washes in polyethylene tanks with cold water ($T = 5^{\circ}\text{C}$), and the volume of water used was three times the sample weight (3:1, water / pulp). In each washing cycle, the pulp was wrapped in cotton cloth and drained through compression in stainless steel cylinder with pore size of 32 mesh. After each wash, rinse waters were collected (1stRW, 2ndRW, 3rdRW and 4thRW). Analyses of moisture, lipid, protein ($N \times 6.25$) and ash in the MSB of bullfrogs were performed according to procedure described by Association of Official Analytical Chemists [11].

For the quantification of soluble proteins in the rinse water of surimi, the aqueous residue was centrifuged in refrigerated centrifuge (model 2K15, Sigma, Germany) for 3 min at 3000 rpm to pellet insoluble proteins. The supernatant was used to quantify soluble proteins by the method of Bradford [12] using bovine serum albumin (BSA) as analytical standard. The protein quantification reading was performed using spectrophotometer at wavelength of 595 nm.

The molecular profile of proteins present in the rinsing waters was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to method of Lammeli [13]. For this, protein samples were solubilized in 0.0625 M Tris-HCl buffer containing 2 % SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol and 0.010 % bromophenol blue, followed by the application of an aliquot in the stacking gel of 4 g/100 g and 12.5 g/100 g in running polyacrylamide gel (10 x 10.5 cm with 0.30 mm spacers) submitted to a constant current of 25 mA for approximately 2 hours. Commercial standard Full-Range RainbowTM Molecular Weight Marker from GE

Healthcare was used as molecular weight marker. After electrophoresis, the gel was stained according to procedure described by Weber and Osborne [14]. The dye solution was prepared using 1% Coomassie Blue R-250 (Sigma Chemical Co.), 40% methanol, 10% acetic acid in distilled water. Bleaching was performed with solution containing 10% acetic acid and 20% methanol in distilled water.

For better visualization of protein bands, the gel was submitted to development with silver nitrate, which was dehydrated with a 50% ethanol solution, being submitted to three washes of 20 minutes each. Then, a sodium thiosulfate solution was added (20mg/100 ml H_2O) and held for 1 minute under gentle agitation. After this time, three quick washes were made in distilled water, then adding the silver nitrate solution (200 mg + 74 μL of formaldehyde in 100 mL H_2O), maintained for 20 minutes under gentle agitation. After this time, the gel was submitted to three rapid washes in distilled water and the developing solution was added (6 g of calcium carbonate + 50 μL formaldehyde + 2 ml of sodium thiosulfate in 100 mL H_2O). To stop the development, a 13% acetic acid solution was added [15].

III. RESULTS AND DISCUSSION

The proximate composition analyses of the MSB of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) are presented in Table 1. This table shows the large amount of proteins present in the raw material of surimi produced with MSB.

Table 1. Proximate composition of MSB samples

Sample	MSB
Moisture (%)	76,75
Ash (%)	2,30
Protein (%)	18,19
Lipid (%)	2,74

Regarding the contents of soluble protein, 1stRW contained the highest level (2.420 mg / mL), followed by 2ndRW (1.590 mg / mL), 3rdRW (0.620 mg / mL) and 4thRW (0.305 mg / mL) (Fig. 2). The same behavior was observed in a study with surimi made with catfish (*Nemipterus hexodon*), with levels of 1.23 mg / mL, 0.64 mg / mL, 0.54 mg / mL, respectively, in three rinse waters [7].

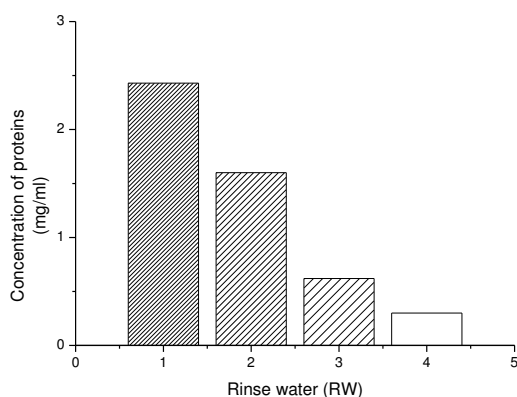


Figure 2. Concentration of water-soluble proteins in surimi rinse water at different wash stages.

The electrophoretic profile obtained by PAGE-SDS of proteins present in the four washings is illustrated in Figures 3 and 4.

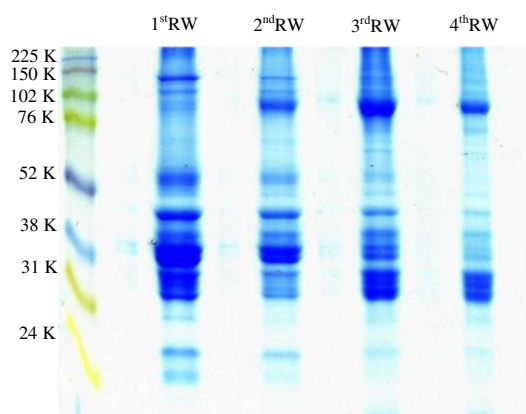


Figure 3. SDS-PAGE patterns of water-soluble proteins in surimi rinse water at different wash stages stained with Coomassie

After examining the bands present on the electrophoresis gel, it was found that most of the soluble proteins of the 1stWS had relative molecular weight (MW) between 31.0 and 52.0 kDa, with some bands of molecular weight below 24.0 kDa. Some proteins weighing between 76 and 225 kDa were also observed. Proteins of the 2ndWS, 3rdWS and 4thWS had similar molecular weights, although present in lower amounts. Similar results were found by Bourtoom et al. [7], where the range of higher protein concentration was between 23.2 and 71.6 kDa. Iwata et al. [16] also found soluble proteins in the range between 30.0 and 66.6 kDa, and a well-defined band of approximately 98.0 kDa in the rinse water of surimi prepared with blue marlin (*Makaira mazara*).

Silver stained gels have better sensitivity in the detection of proteins present in low concentrations. Thus, after staining the gel with silver (Figure 4), bands of lower molecular weight were observed, which were not previously observed when the gel was stained with Coomassie. It was also observed that for proteins with molecular weight close to 52 kDa and less than 24 kDa, there was a decrease in their concentrations in solution with successive washing cycles.

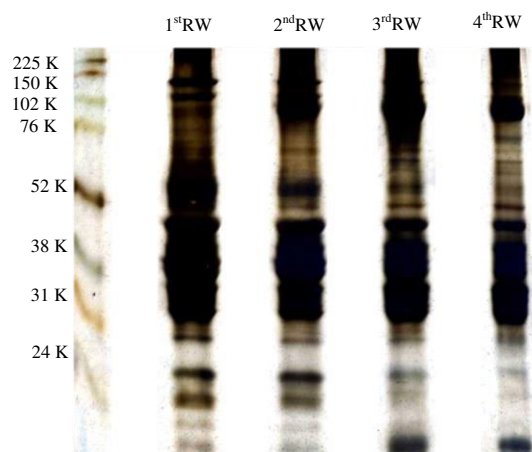


Figure 4. SDS-PAGE patterns of water-soluble proteins in surimi rinse water at different wash stages stained with silver nitrate

As previously mentioned, the largest amount of soluble proteins present in the washing cycles are in the range from 31.0 to 52.0 kDa. Studies have used these proteins in the production of edible biofilms [16], and claim that substitution of up to 10% of recovered proteins keeps the gel features such as hardness, elasticity, color and water retention [17].

These proteins can also be recovered by lyophilization, which in turn, when added to food products, enrich these products with high biological value proteins and avoid the disposal of these waters into the environment.

IV. CONCLUSIONS

Soluble proteins recovered from the rinse water of surimi produced with mechanically separated back (MSB) of bullfrog have great potential for application in food products and in the production of biofilms. Future studies are needed to define new ways of using these proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Federal University of Paraíba; Center for Human, Social and Agrarian Sciences; Department of Molecular Biology; Graduate Program in Food Science and Technology - UFPB for the scientific and financial support.

REFERENCES

1. Moura, O. M. (2003). A carne de rã como matéria-prima e seu uso em produtos derivados Boletim Técnico do Instituto de Pesca 34: 68-73.
2. Cabral, A. D., Hipólito, M., Cabral, D. D., Silva, N. R. da. (2011). Ocorrência de oocistos de cryptosporidium spp. em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus* shaw, 1802), no município de uberlândia, MG, Brasil. Ciência Animal Brasileira 12:109-114 .
3. Fragoso, S. P., Ferreira, V. C. S., Araújo, I. B. S., Oliveira, E. N., Silva, F. A. P., Moura, O. M. (2013). Características físicas e químicas de diferentes cortes da carne liofilizada de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) pigmentada e albina. Higiene alimentar 27: 951-955.
4. Conceição, C., Furtado, A. A. L., Silva, A.T., Deliza, R. (2000). Patê de carne de rã (*Rana catesbeiana*) formulação e aceitabilidade. In Proceedings 17th Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (pp. 11-75), Agosto 2000, Fortaleza, Brasil.
5. Gonçalves, A. A., Otta, M. C. M. (2008). Aproveitamento da carne da carcaça de rã-touro gigante no desenvolvimento de Hambúrguer. Revista Brasileira de Engenharia de Pesca 3(2): 7-15.
6. Sant'ana, L. S., Jamas, E. (2011). Material balance for the tilapia surimi manufacturing process. In Proceedings Aquaculture World 2011, 6-10 June, Natal, Brasil.
7. Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawat, P., Sanguandeeikul, R. (2009). Recovery and characterization of proteins precipitated from surimi wash-water. LWT - Food Science and Technology 42: 599-605.
8. Witt, C. A. M. de., Morrissey, M. T. (2002). Pilot plant recovery of catheptic proteases from surimi wash water. Bioresource Technology 82: 295-301.
9. Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawata, P., Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of select parameters on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. LWT - Food Science and Technology 39: 405-418.
10. Kuhn, C. R., Filgueras, R. S., Torres, L. M., Vendruscolo, J. L. S., Soares, G. J. D. (2007). Caracterização textural e físico-química do Gel de surimi de jundiá (*Rhamdia quelen*). Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos 25: 305-314.
11. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17 th ed.,n Gaithersburg, Maryland.
12. Bradford, M. (1976). Analytical Biochemistry 72: 248-254.
13. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
14. Weber, K.; Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biology Chemistry 214: 4406-4412.
15. Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1997). Improved silver staining of plant-proteins, Rna and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis 8(2): 93-99.
16. Iwata, K., Ishizaki, S., Handa, A., Tanaka, M. (2000). Preparation and characterization of edible film from fish water-soluble proteins. Fisheries Science 66: 327-378.
17. Lin, T.M., Park, J.W., Morrissey, M.T. (1995). Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste. Journal of Food Science 60: 4-9.

Effects of number of washes and starch concentration on the quality characteristics of surimi gel from bullfrog meat

Sinara P. Fragoso^{1*}, Irís B. S. Araújo¹, Antônio R. da Silva¹, Raquel F. Pereira²,
Marta S. Madruga³, Tatiane Santi' Gadelha³, Carlos A. A. Gadelha³

¹ Department of Management and Technology Agrifood, Federal University of Paraíba, Bananeiras, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

* Corresponding author: Sinara Pereira Fragoso, Email:
sinarafragoso@hotmail.com - Phone: +55 (83) 99992948

Abstract

The use of the mechanically separated back of the bullfrog in the elaboration of surimi gel provides a new approach for exploiting this co-product. The process of manufacturing surimi requires large amounts of water, which generates residue rich in organic compounds that end up contaminating the environment. A study to possibly reduce the number of washing cycles contributes to a more sustainable production. The objective of this work was to study the effect of the number of washing cycles and concentration of added starch on the quality parameters and texture properties of the surimi gel elaborated with bullfrog meat. Surimi gel was subjected to two, three or four wash cycles and added with 5, 10 or 15% starch. The gel presented means of 76.18% humidity, 14.77% protein, 45.24 whiteness and 43.04 N shear force. The number factor of wash cycles was the one that most affected the studied parameters; it was significant for weight loss after heating, protein, instrumental color (*b and w) and shear force. The best color and strength of the gel were obtained with four wash cycles. Finally, the product was within the pre-established parameters of the literature, making the use of the meat extracted from the back of bullfrog in the elaboration of surimi and derived products totally viable.

Keywords: surimi; frog meat; washes; starch; quality.

INTRODUCTION

Raniculture (frog breeding) is a prominent field in the fishery sector, mainly in the Asian continent and in some European countries. In Brazil, frog breeding began in 1935, and since then raniculture has gained strength in production and space in both the domestic and export markets (Moura, 2000). Today, Brazil ranks 4th in the world, and is the largest producer and exporter in Latin America. The country has 170 frog breeding establishments, generating a production of around 160 tons/year. However, the raniculture market in the country has faced a great challenge to fully use the carcass (Fragoso et al., 2013). The thighs (the main cut), have higher commercial value, but represent only 26% of the carcass, while the back is responsible for almost half the carcass weight, but is almost completely discarded after slaughter (Ayres et al., 2015). The flesh of the dorsum presents high nutritional value, although there are few alternatives for the use of this material. Due to the low commercial value of the back, it can be used to obtain a mechanically separated back (MSB), and serve as an intermediate raw material for the elaboration of several restructured products (Mello et al., 2006; Fragoso et al., 2013). Mechanically separated meats present high levels of heme pigments, connective tissue, calcium and fat, which restrict their use in producing some foods. This demonstrates the need for a technology to eliminate some of these residues (Cortez-Vega et al., 2013).

Among other technologies, the production of surimi stands out as a process that allows maximum utilization of available food resources and the use of low commercial value species as byproducts of industrial processing (Ordoñez, 2005). Surimi is an extract of myofibrillar proteins, obtained from mechanically separated meat (MSM) or filleting residues from different species, subjected to

successive washes and added cryoprotectants. At the end of processing, the product is a white paste without a characteristic odor or taste, becoming a raw material that can be used as a basis for the production of a wide range of products (Gomes et al., 1994). This washing step is the key to producing a high quality surimi, as it not only removes pigments, sarcoplasmic proteins and undesirable fatty materials, but also increases the concentration of myofibrillar proteins, thereby improving the gel's formation capacity (Nopianti et al., 2011). However, these successive washes require large amounts of fresh water, and this becomes a serious problem; as well as increasing production costs, it also causes pollution in the environment by the disposal of these waters (Park & Lin, 2005).

Another important factor that determines the quality of surimi is the addition of starch, since it promotes the formation of a continuous matrix interacting with water and protein in the fish paste and plays an important role in improving the texture and functional properties of surimi (Ramirez et al., 2011). Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the number of washing cycles and the concentration of added starch on the quality characteristics of surimi gel obtained from bullfrog MSB by response surface methodology.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Obtaining the mechanically separated back (MSB)

The mechanically separated back (MSB) was obtained from mechanically deboning the backs of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) made available from the Raniculture and Aquaculture Products Laboratory (CCHSA/UFPB). After deboning, the MSB was packed in polyethylene bags and stored in a freezer (-18°C) until use.

2.2 Preparation of surimi and surimi gel

The process of producing surimi was performed in a laboratory, based on the method proposed by Cortez-Vega et al. (2013), with some modifications. The MSB obtained after thawing was subjected to successive washes according to the factorial experimental design (Table 1) using a ratio of 3:1 (solution/MSB), at a temperature of 5°C for 10 minutes under constant agitation. In the first wash, 0.5% sodium bicarbonate solution was used, and 0.3% sodium chloride solution was used in the following washes. The supernatants were collected after each washing step to determine the soluble protein content, then the extract was retained using a stainless steel sieve (Ø 32 mesh), and finally re-washed.

At the end of the washing process, the extract was wrapped in nylon cloth and compressed using a stainless steel hand press for 20 minutes. Cryoprotectants (4% sorbitol and 0.2% sodium tripolyphosphate) were added to the obtained mass and the surimi packed in polyethylene bags and stored at -18°C until use. The surimi gel was prepared from the produced surimi using different numbers of washes and concentrations of corn starch determined according to the experimental design of factorial 2² with three central points, thus totaling seven experiments (Table 1).

The experiments were conducted with the goal to observe the effects of the independent variables on the process response, namely the product's physicochemical properties and texture. The remaining ingredients, 0.3% crab flavor SY-Y06008 (Crab powder®-Guangdong Shinyee Marine Biology Engineering Corp., Guangdong, China) and ice water were then added to the formulations of surimi gel and blended at low speed. The obtained pastes were embedded in a polyethylene sheath (Ø2.5 cm) (®Viscofan Brazil - São Paulo-

SP/Brazil) and both ends were hermetically sealed. The samples were heated in a water bath (MA127 - Marconi® laboratory equipment - SP / Brazil) at 90°C for 30 min and the gels were cooled in ice water ($\pm 0^\circ\text{C}$), vacuum packed and stored in a BOD oven at 4°C.

The effects of the independent variables on the responses were evaluated using analysis of variance (ANOVA) using Statistica® 7.0 software. The regressions were considered significant when the value of F calculated (F_{cal}) presented a value higher than the F tabulated (F_{tab}), at a significance level of 5% ($p < 0.05$) and with a coefficient of determination (R^2) higher than 0.91. A significant predictive model was also considered when the $F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$ ratio was equal to or greater than 4.0. Response surfaces were only generated for responses that presented significant patterns. Two independent experimental tests (repetitions) were performed. The experimental factorial planning matrix is presented in Table 1.

2.3 Yield

The yield was calculated from the difference between the weight of the entire mass of the MSB and the final weight of the surimi, according to equation 1.

$$\text{EQ (1): } Y \% = \left(\frac{\text{Surimi weight}}{\text{MSB mass}} \right) \times 100$$

2.4 Surimi Gel Quality Parameters

Moisture and total protein: Moisture and crude protein were determined in triplicate according to the methods described by AOAC (2000). Moisture was determined by the oven drying method at 105°C until constant weight (method 950.46), and total nitrogen by the Kjeldhal method (method 928.08). The protein content was estimated by the conversion coefficient of 6.25.

Water activity measurements: The water activity (aw) was measured using an AquaLab 4TE hygrometer analyzer (Decagon Devices, AquaLab PRE, Washington, USA).

Water holding capacity (WHC) and cooking loss analysis: The water-holding capacity (WHC) was determined by the method of Awad & Diehl (1975) with some modifications. Briefly, 1.0 g of surimi gel samples were weighed on a filter paper, which had been previously preconditioned by standing overnight in a drying chamber at 105°C. The filter paper with surimi gel samples were submitted to a 10.0 kg pressure for 1 minute. The water-holding capacity results were expressed in percentage. The cooking loss was performed on the surimi gel samples in the final stage of their processing, where the samples were heated in a water bath at 90°C for 30 minutes. The percentage of cooking loss was calculated from differences in the weight of uncooked and cooked samples, expressed as percentage of initial weight, as follows:

$$\text{Cooking loss \%} = \left(\frac{\text{before cooking weight} - \text{after cooking weight}}{\text{before cooking weight}} \right) \times 100$$

Instrumental Color: The instrumental color of the frog surimi gels samples was determined by measuring the brightness (L *), red (a*), yellow (b *) and whiteness (w = L * - 3 B *), using a digital colorimeter (Konica Minolta, RC-400, Tokyo, Japan). Seven measurements per sample were randomly made on the surface of the gel using the aperture size of 8 mm, illuminating source C, with standardized measurements for the white calibration plate.

2.5 Texture properties of surimi gel

Shear Force: The shear force (SF) of the gels was determined using a TA.XT Express texture analyzer (Stable Micro Systems®, Surrey, England) equipped with a Warner-Bratzler rectangular cutting blade (2.0 mm/s; 2.0mm/s test speed; 10mm/s post-test 25.0mm). The gels were cut into 2.5 cm pieces, and compressed until the sample was completely cut. The results were recorded in Life Express Exponent software (version 4.0.13.0, Godalming, UK) and expressed in newtons (N).

Texture Analysis: Texture analysis of surimi gels was determined on a TA-Xt plus texture analyzer (Stable Micro Systems®, Surrey, UK) equipped with a cylindrical piston of 6 mm in diameter. Samples were equilibrated and evaluated at room temperature (25 - 30°C). The gels were cut into cylinders (2.5 cm long with 2.5 cm Ø), 7 samples per treatment, and axially compressed into two consecutive cycles of compression. The measured parameters were: hardness (g) and deformation (cohesiveness/elasticity) (mm).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The influence of input variables (number of washes and concentration of starch) from the performed experimental design was observed on physicochemical property responses (yield, aw, cooking loss, WHC, moisture, protein and color) and texture (shear force, hardness and deformation) (Table 1) in the produced surimi gel.

The highest averages for gel yield (T5 = 58.90%, T6 = 59.60% and T7 = 60.05%) were obtained under the processing conditions of three washings with

addition of 10% starch. These treatments represent the central point of the experimental design. Consequently, the same treatments obtained a lower percentage of cooking loss (11.0%, 11.9% and 11.9%, respectively). The treatments with the lowest number of washes (T1 and T2) obtained the highest amount of moisture (77.4% and 77.5%, respectively), while variation in the protein content occurred due to the two analyzed factors. In the analysis of instrumental color, the parameter *w* (whiteness) was directly affected by the concentration of starch added into the surimi mass, with treatments T2 and T4 (both having 15% starch added) being the ones that presented the highest values (47.4 and 47.1, respectively).

The responses to shear force (SF), hardness and deformation of the surimi gel prepared with bullfrog MSB they are presents in Table 1. The highest shear strength and hardness were found in the treatment with the highest number of washes and the highest concentration of starch (T4), with 57.2 N and 571.9 g respectively. The deformation parameter was not influenced by any of the studied factors. Figure 1 shows the Pareto diagram, presenting the main effect of each input variable (number of washes and concentration of starch) on the responses, as well as their interactions. From the Pareto diagram (Figure 1), it may be observed that the number of washes is the most significant factor in the gel preparation, showing a positive effect on the cooking loss (Figure 1B), whiteness (Figure 1F) and SF (Figure 1G) responses. The concentration of starch had a significant negative effect on cooking loss (Figure 1B), WHC (Figure 1C), protein (Figure 1D) and value b^* (Figure 1E). Ultimately, as starch was added to the surimi gel, such responses decreased.

The analysis of variance (ANOVA) was performed on each response variable and the effect of each process variable was compared (Table 2). The analysis of the effects for each response was performed when $F_{cal} \geq F_{tab}$, and the F_{tab} values were obtained through the F 5% table (Rodrigues & Iemma, 2005). The statistically significant models were verified, each response was analyzed separately, and then the model was generated. In turn, the ANOVA of the constructed model (Table 3) allowed for determining the regression coefficients and the coefficient of determination (R^2).

The results of the physicochemical and texture characterization provided first-order models with an interval and interaction of 95% confidence. The non-significant coefficients were eliminated in the complete models, obtaining the adjusted models using real variables (Table 3).

It was observed that the models adjusted to water activity, weight loss after cooking, water retention capacity, instrumental color (*b and w) and shear force was significant ($F_{cal}/F_{tab} \geq 1.0$), showing good experimental data with coefficient of determination data (R^2) greater than 0.91. It was also verified that the models adjusted to the experimental data of water activity, weight loss after cooking, value of * b and shear force, and in addition to being significant, they were also predictive since they present values of the relation between the F_{cal}/F_{tab} superior to 4 at a 95% confidence level.

The adjusted models to the responses of moisture and hardness revealed lower adjustment with R^2 values of 0.7249 and 0.8021, respectively. The relation between F_{cal}/F_{tab} was inferior to 1 at 95% confidence level, which confirms that the regressions were not significant.

Figure 2 shows the response surfaces generated from the response parameters that presented significant models. Based on this, it is observed that the region with the best response values is located in the darker regions of the surface. The straight line of the predictive model was obtained from the Predicted vs. Observed values available in the analysis of variance by Statistica® 7.0 software, evidencing the treatments that best fit the generated model. According to the arrangement of the closest points of the line, it was found that the treatments that best fit the model were T3, T1, T4 and T2. On the other hand, the treatments that represent the central point (T5, T6 and T7) were always more distant from the line, and this was observed in all generated models.

3.1 Effect of the process variables on the parameters of quality and texture of surimi gel processed with frog MSB.

Moisture is a critical factor for surimi products. Suzuki (1987), Ogawa & Maia (1999) established a limit between 66.2 and 75.7%, while Uddin et al. (2006) stated that the water content in surimi should be 78%. In this study, all treatments were within the humidity limits mentioned above, averaging 76.18%. It was verified that moisture had a negative influence of the starch concentration and the interaction between the factors, because the higher the starch concentration added, the lower the water content. The number of washing cycles also influenced the moisture content, since some proteins were washed away in the washing process, and with these outer proteins being responsible for making connections with the water molecules, the consequent result is a lower moisture content.

The inverse effect was observed in the treatments that suffered the least number of washes (T1 and T2), since they obtained a higher moisture content. Similar results were found by Jin et al. (2007) for surimi made from pork leg and chicken breast, both submitted to two washes with percentages of 77.88 and 77.55, respectively. These results are very close to the treatments submitted to two washing cycles (T1 and T2 with percentages of 77.4 and 77.5, respectively). However, Fogaça et al. (2013) found lower values for treatments with 3 washes and the addition of 10% of starch (74.05%) in surimi gel produced with fish meat. The differences in moisture content can be due to several factors, such as the type of muscle used to make the surimi gel.

Water activity (a_w) was only influenced by the interaction of factors. On its surface (Figure 2A) it can be observed that the highest values were reached in the least number of washing cycles and with the lowest concentration of starch T1 (0.988). These results corroborate with the analysis of the moisture content. Because surimi gel is a restructured meat product produced with chopped washed muscle, it has the characteristic of having high water activity. A similar value was observed by Liu et al. (2014) (0.985) in fish surimi.

In analyzing the response surface of cooking loss (Figure 2B), we may observe the influence of both studied factors. However, the effect of the starch concentration is higher and negatively influences the treatments, so that the treatments with lower starch concentration obtained the highest weight loss after cooking, being 13.7 and 20.6% for T1 and T3, respectively. The T3 treatment, in addition to having a lower proportion of starch, also went through a greater number of washing cycles, causing the loss of the outermost proteins, thus reducing the water binding capacity with the starch, and consequently, the gel

formation. The same trend was observed in the other treatments, because the starch that was added to the surimi gel maintained the gel formation due to its ability to bind with water. According to Lee et al. (1984), starch has this property of forming a stronger gel, and at the same time improves stability during refrigeration or freezing. Similar results were found by Zhang et al. (2013), which obtained a negative effect of the starches on the weight loss in cooking surimi meat gels. Lyons et al. (1999) and Li and Yeh (2003) also reported similar behavior in pork gels added with corn starch.

The same as water activity (a_w), water holding capacity (WHC) was only influenced by interaction between factors; this condition can be observed on the response surface (Figure 2C) which presented two regions with the same behaviors. It was also observed that, even though the proteins were submitted to the leaching process during the washing cycles, the 4-cycle treatments (T3 and T4) still obtained expressive values of water retention. This shows that the proteins present in the gel exhibited high functionality. In addition, the water retention capacity correlates with the starch swelling property (Wang & Seib, 1996). On the other hand, this depends on the amylose and amylopectin content of the starch used in gel manufacturing (Sasaki & Matsuki, 1998; Tester & Morrison, 1990). Starches with high amylopectin content have high water holding capacity and low weight loss in cooking (Sasaki & Matsuki, 1998). In the present study, this relation was only verified for weight loss in cooking, where the treatments with the highest starch concentration (T2 and T4) presented the lowest weight loss. As for the water holding capacity, the starch concentration was not determinant, as it was observed that the T2 treatment contained 15% starch, and obtained the lowest value for WHC. Jin et al. (2007) obtained a similar

result of WHC for surimi produced with fish muscle (83.77%); for pork leg (75.49%); and chicken breast (77.31%), where the values were lower, and all treatments were submitted to two washes.

The protein content of all treatments was within the limits established by Japan's welfare ministry, being 9.9 to 16.2% (Suzuky, 1987; Ogawa & Maia, 199). The ANOVA result showed that both the number of washing cycles and the concentration of starch exerted a significant influence on the protein content of the gel. For the response surface (Figure 2D), it is observed that the behavior of the curve is linear to the number of washing cycles, whereas the variation is higher for the starch concentration, since its influence on the treatments was more significant. This effect can be better observed by the treatment results of lower starch addition (T1 and T3), which presented higher protein percentages (15.09 and 15.91%, respectively).

Regarding the other treatments, they presented lower values. Similar results were previously reported by Jin et al. (2007) for pork leg (14.82 and 14.95%) and chicken breast (14.71 and 14.55%) surimis submitted to two and four washes, respectively. Fogaça et al. (2015) found lower values for tilapia surimi (14.10% and 12.07%) submitted to one and five washing cycles, respectively. Consumer preference for a whiter surimi gel raises the importance of studying the influence of the number of washes and starch concentration factors on the instrumental color analysis. Thus, in the present research the values of b^* and w (whiteness) were affected by both studied factors, including their interaction. The effects on the value of b^* presented a negative influence; regarding whiteness, all factors had a positive influence, since removal of the color compounds was more efficient when washing cycles were increased,

resulting in a clearer sample (Figure 2E). In this way, the addition of starch also contributed significantly to the increase of this whiteness.

Kim et al. (1996) reported that the color of surimi can be improved by increasing the cycles and washing time. The results obtained in this work confirm such observations, since the greater the number of washes, the better the whiteness (w) of the product. From the evaluated texture parameters, only the shear force (SF) presented statistical significance in the regression, being the only parameter that generated response surface (Figure 2G). In said figure, it is verified that the concentration of tested starch did not influence the shear force, which can be proven by the fact that every starch variation region is represented in only one color on the response surface.

On the other hand, the number of washing cycles exerted a positive influence on the force measurement. According to Ramirez et al. (2011), starch promotes the formation of a continuous matrix interacting with water and protein in fish paste, and all together play an important role in improving the mechanics and functional properties of surimi. However, diverging from the logic proposed by Ramirez et al. (2011), the obtained results showed that the concentration of starch added to the mass had no influence on the texture properties of the surimi gel produced with bullfrog MSB. Yongsawatdigul et al. (2013) stated that difficulties in gel formation are a result from the degradation of myofibrillar proteins by proteinases which are found in muscle tissue, and these enzymes can be easily removed by the washing process. Another approach that must be considered to justify this increase in shear force is that the leaching from the washing cycles breaks down the outermost bonds of the proteins, and while these bonds are drawn, only the stronger bonds will remain, leaving the firmer material.

This explains the fact that the treatments with the highest number of washing cycles present higher shear force (Zayas, 1997).

The improved characteristics of gels with higher number of washes are probably due to the removal of tropomyosin, troponin and light chain myosin in the first two washes, as they may interfere with the protein-protein interactions involved in gel formation (Baxter & Skonberg, 2008). This effect has already been reported by other authors for gel produced with duck meat (Ismail et al., 2010) (Ramadhan et al., 2014), with sutchi catfish (Priyadarshini et al., 2015) and tilapia meat surimi gel (*Oreochromis niloticus*) (Fogaça et al., 2013).

3.2 *Parameter desirability*

The evaluation of the quality of the surimi gel is based essentially on the strength of the gel and the whiteness of the product (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Canóvas 2004, Park and Morrissey, 2005). Therefore, the parameters that presented statistical significance and were chosen to generate the profile of the predicted values and the desirability option in the software Statistica® 7.0 were shear force and whiteness.

Figure 3 shows the graph of the desirability profile for the parameters of the whiteness (Figure 3A) and shear force (Figure 3B) of bullfrog meat surimi gel. By assigning predicted values on a scale ranging from 0.0 (undesirable) to 1.0 (very desirable), it is observed that the T4 treatment was the closest approach to the very desirable attribute. Thus, based on the results obtained for the adjustment of the experimental model, it may be suggested that production of surimi gel with four washes and the addition of 15% of starch is the best formulation for commercial acceptance of the product. However, in considering

only two washes, the manufacturing process of surimi would only be efficient from the point of view of reducing the environmental impact due to the reduction of waste water.

4. CONCLUSION

The mechanically separated back of the bullfrog can be perfectly utilized in the production of surimi, and can also be used as raw material in the production of surimi gel, as it meets the existing standards. The number of washing cycles was the most important factor in this process, since it influenced the highest number of quality parameters. Four washes was the best treatment to achieve color enhancement and strengthening of surimi gel, although it should be considered that a reduction in the number of washing cycles is desirable to decrease waste into the environment. Future studies are needed to evaluate other alternatives for processing bullfrog meat surimi gel, such as variations in time and washing temperature, aiming to decrease the washing cycles.

REFERENCES

- AOAC (2000). *Official methods of analysis*. In: Gaithersburgh M (ed) 17th ed. Association of Official Analytical Chemists.
- Ayres, A.A.C., Damasceno, D.Z., Moro, E.B., Maccari, G.M.R., Löscher Nervis, J.A., Bittencourt, F., (2015). Carcass yield and proximate composition of bullfrog. *Acta Science Animal. Sci.* 37, 329. doi:10.4025/actascianimsci.v37i4.28196
- Awad, A. A.; Diehl, J. F. (1975). Physical changes in irradiated trout (*Salmo gairdneri*), *Journal of Food Science*, v. 40, n. 2, p. 319-321.
- Baxter, S.R. and D.I. Skonberg. (2008). Gelation properties of previously cooked minced meat from Jonah crab (*Cancer borealis*) as affected by washing treatment and salt concentration. *Food Chemistry*. 109: 332-339. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.044
- Cortez-Vega, W. R., Fonseca, G. G., Prentice, C., (2013). Optimization of parameters for obtaining surimi-like material from mechanically separated chicken meat using response surface methodology. *Jornal of Food Science and Technology*. 52, 763–772. doi:10.1007/s13197-013-1056-1
- Fragoso, S. P., Ferreira, V. C. S., Araújo, I. B. S., Oliveira, E. N., Silva, F. A. P., Moura, O. M. (2013). Physical and chemical characteristics of different cuts of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) pigmented and albino. *Food Hygiene*, 27: 951-55.
- Fogaça, F.H., Sant'Ana, L.S., Lara, J.A.F., Mai, A.C.G., Carneiro, D.J., (2015). Restructured products from tilapia industry byproducts: The effects of

- tapioca starch and washing cycles. *Food Bioproducts and Process*, 94, 482–488. doi:10.1016/j.fbp.2014.07.003
- Fogaça, F. H. S., Trinca, L. A., Bombo, A. J., Silvia Sant'Ana, L., (2013). Optimization of the surimi production from Mechanically Recovered Fish Meat (MRFM) using response surface methodology. *Jornal of Food Quality*. 36, 209–216. doi:10.1111/jfq.12019
- Gomes, J.C.; Bianchini, M.G.A.; Pereira, C.A.S.; Coelho, D.T.; Costa, P.M.A. (1994) Processing and characterization of freshwater fish surimi. *Freshwater Fish Science and Technology*, 14(2): 226-237.
- Ismail, I., Huda, N., Ariffin, F., Ismail, N., (2010). Effects of washing on the functional properties of duck meat. *International Jornal Poultry Science*. 9, 556–561. doi:10.3923/ijps.2010.556.561
- Jin S. K, Kim I. S, Kim S. J, Jeong K. J, Choi Y. J, Hur S. J (2007). Effect of muscle type and washing times on physico-chemical characteristics and qualities of surimi. *Jornal of Food Engineer*, 81:618–623. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.001
- Kim, J. M., Liu, C. H., Eun, J. B., Park, J. W., Oshimi, R., Hayashi, K., et al. (1996). Surimi from fillet frames of channel catfish. *Journal of Food Science*, 61, 428–438.
- Lee, C. M. Surimi process technology (1984). *Food Technology*, v.40, p.69-80.
- Li, J. Y., & Yeh, A. I. (2003). Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *Journal of Food Engineering*, 50(3), 141–148. doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00236-3
- Liu, Q., Chen, Q., Kong, B., Han, J., He, X., (2014). The influence of superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural changes in the

- myofibrillar proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi. *LWT - Food Sci. Technol*, 57, 603–611. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.023
- Lyons, P. H., Kerry, J. F., Morrissey, P. A., & Buckley, D. J. (1999). The influence of added whey protein/carrageenan gels and tapioca starch on the textural properties of low fat pork sausages. *Meat Science*, 51(1), 43–52. doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00095-3
- Mello, S. C. R. P; Silva, L. E; S. Mano; Franco, R. M. (2006) Bacteriological and physical-chemical evaluation of the meat of the dorsum and frog's thigh (*rana catesbeiana*) processed in a commercial slaughterhouse. *Brazilian Journal of Veterinary Science*, v. 13, n. 3, p. 151-154, 2006.
- Moura, O.M. (2000) Effect of desensitization and bleeding methods on quality characteristics of bullfrog meat and profile of slaughtering industries. Thesis (Doctorate) – UFV, 227p. Viçosa, MG.
- Nopianti, R., Huda, N., Ismail, N., (2011). A review on the loss of the functional properties of proteins during frozen storage and the improvement of gel-forming properties of surimi. *American Jornal Food Technology*. 6, 19–30. doi: 10.3923/ajft.2011.19.30
- Ogawa, M.; Maia, E. L. (1999) Manual of fishing, science and technology of fish. São Paulo: Livraria Vilela, Ed 2, v. 1, p. 221-249.
- Ordoñez, J. A. Food Technology: Food of animal origin. v.2. Tradução Fátima Murad. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
- Park, J.W., Lin, T.M., (2005). Surimi: manufacturing and evaluation. In: Park, J.E. (Ed.), *Surimi and Surimi Seafood*. Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 33–105.

- Park, J.W., & Morrissey, M. T. (2000). Manufacturing of Surimi from light muscle fish. In J. W. Park (Ed.), *Surimi and surimi seafood* (pp. 23–58). New York: Marcel Dekker.
- Priyadarshini, B., Majumdar, R. K., Parhi, J., Maurya, P. K., Roy, D., Saha, A., (2015). Gel properties of sutchi catfish (*Pangasius hypophthalmus*) surimi as affected by selected washing process and number of washing cycles. *Food Sci. Technol. Int.* 1082013215597086–. doi:10.1177/1082013215597086
- Ramadhan, K., Huda, N., Ahmad, R., (2014). Effect of number and washing solutions on functional properties of surimi-like material from duck meat. *J. Food Sci. Technol.* 51, 256–266. doi:10.1007/s13197-011-0510-1
- Ramirez, J. A., Uresti, R. M., Velasquez, G., Vázquez, M., (2011). Food hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products: a review. *Food Hydrocoll.* 25, 1842–1852. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.05.009.
- Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. (2005) Experiment Planning and Process Optimization: a sequential strategy of planning, Ed. Bread House .Campinas, SP,
- Sasaki. T., Matsuki. J. (1998) Effect of wheat starch structure on swelling power. *Cereal Chemistry*, 75 (4), pp. 525–529. doi: 10.1094/CCHEM.1998.75.4.525
- Suzuki, T. (1987) *Tecnología de las proteínas de pescado y krill*. Zaragoza: Acribia.
- Tabilo, M. G., Barbosa, C. G. V., (2004). Pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white: microstructure and water-

- holding capacity. *LWT –Food Sci. Technol.* 38, 47–57. doi: 10.1016/j.lwt.2004.04.013
- Tester, R.F., Morrison. W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. (1990) Effect of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry*, 67 (6), pp. 551–557.
- Uddin M, Okazaki E, Fukushima H, Turza S, Yumiko Y, Fukuda Y (2006) Nondestructive determination of water and protein in surimi by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 96:491–495. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.04.017
- Wang, P. A., Seib. A. J (1996) Australian salt-noodle flours and their starches compared to us wheat flours and their starches. *Cereal Chemistry*, 73 (2), pp. 167–175.
- Yongsawatdigul J, Pivisan S, Wongngam W and Benjakul S. (2013). Gelation characteristics of mince and washed mince from small-scale mud carp and common carp. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 22(5): 460–473. doi:10.1080/10498850.2012.664251
- Zayas, J. F., (1997) - Functionality of proteins in food / Joseph F. Zayas. p. cm. Includes bibliographical references and index. doi:10.1007/978-3-642-59116-7
- Zhang, F., Fang, L., Wang, C., Shi, L., Chang, T., Yang, H., Cui, M., (2013). Effects of starches on the textural, rheological, and color properties of surimi-beef gels with microbial transglutaminase. *Meat Science*. 93, 533–537. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.013

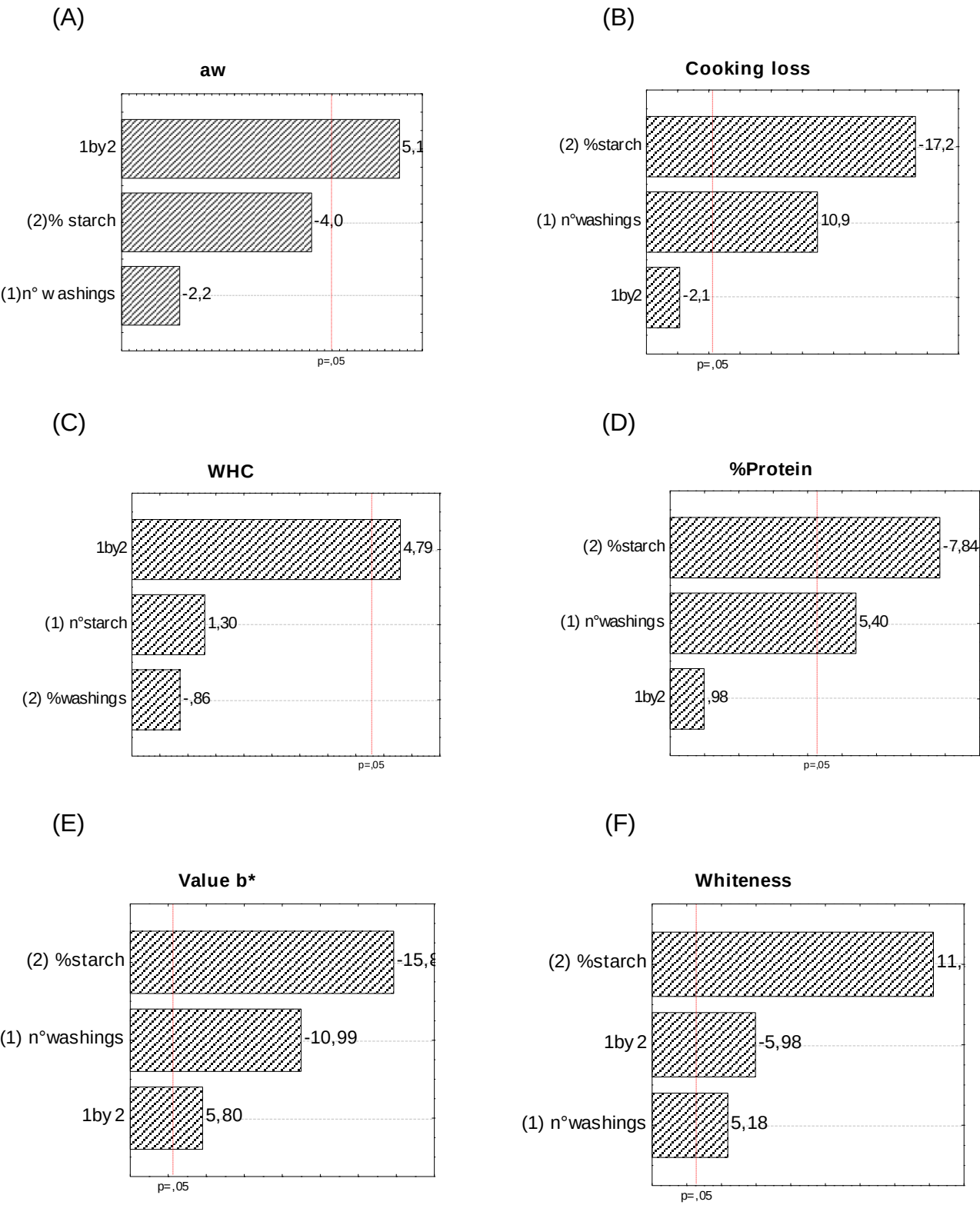
FIGURES CAPTIONS

Figure 1. Pareto diagram of the effects of the number of washes, starch concentration and the interaction (1by2), on the response variables: (A) water activity; (B) cooking loss ; (C) water holding capacity; (D) % protein; (E) value b*; (F) whiteness and (G) Shear force, for gel of surimi elaborated with bullfrog meat.

Figure 2. Response surfaces for: (A) water activity (aw); (B) cooking loss; (C) water holding capacity (WHC); (D) % protein; (E) value b*; (F) whiteness and (G) Shear force, as a function of the number of washes and the concentration of starch added to the gel of surimi elaborated with bullfrog meat.

Figure 3. Profile of predicted values and desirability for responses A. Whiteness and B. Shear force for surimi gel elaborated with bullfrog meat.

Figure 1.



(G)

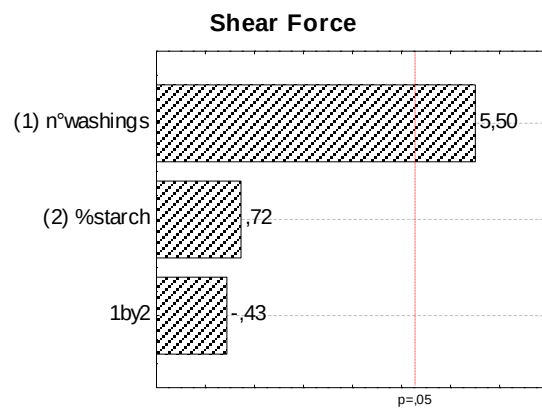
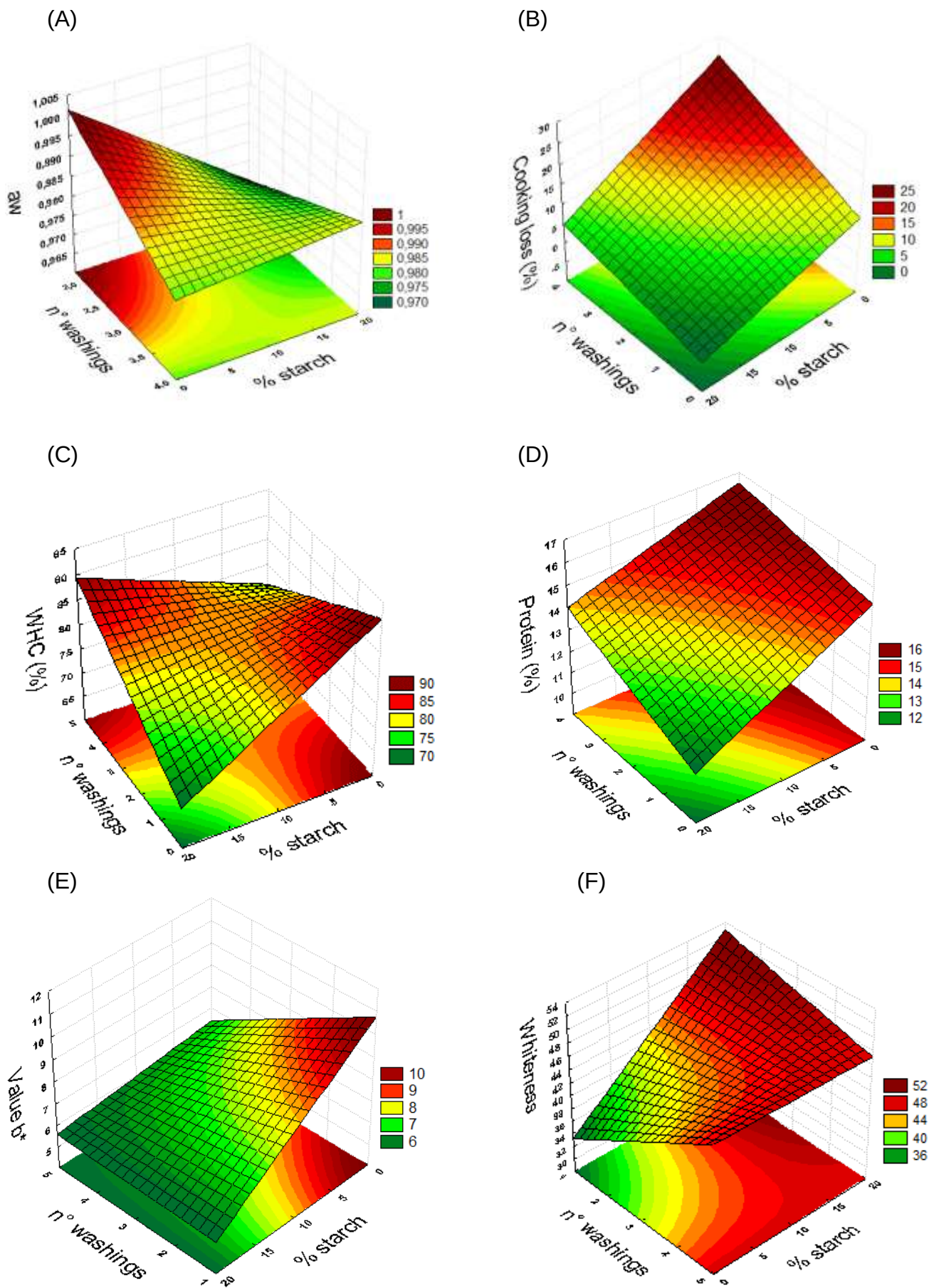


Figure 2.



(G)

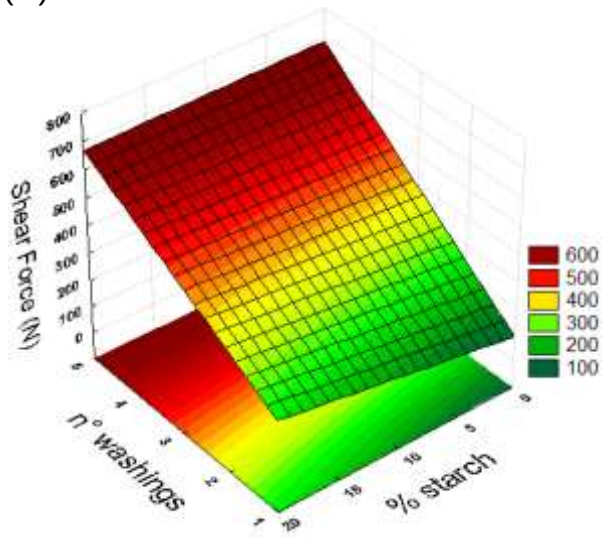
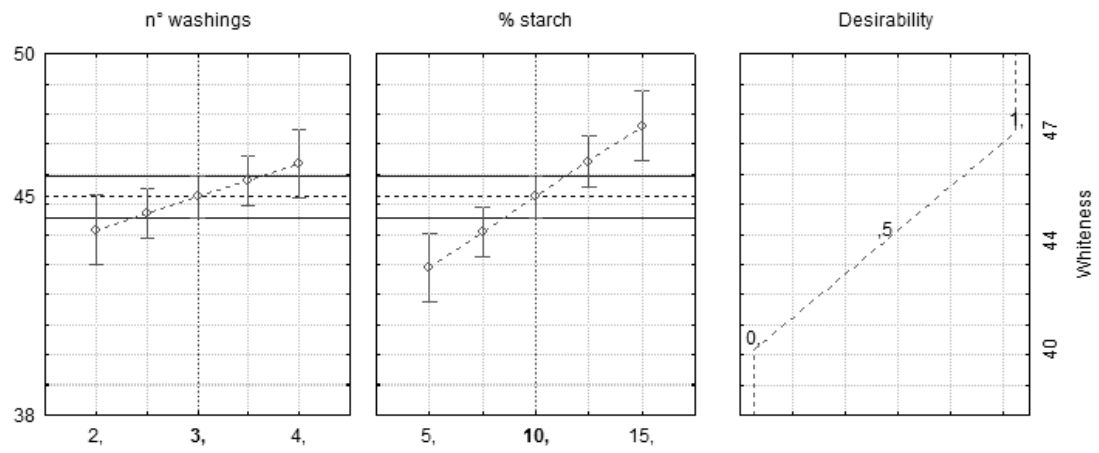


Figure 3.

(A)



(B)

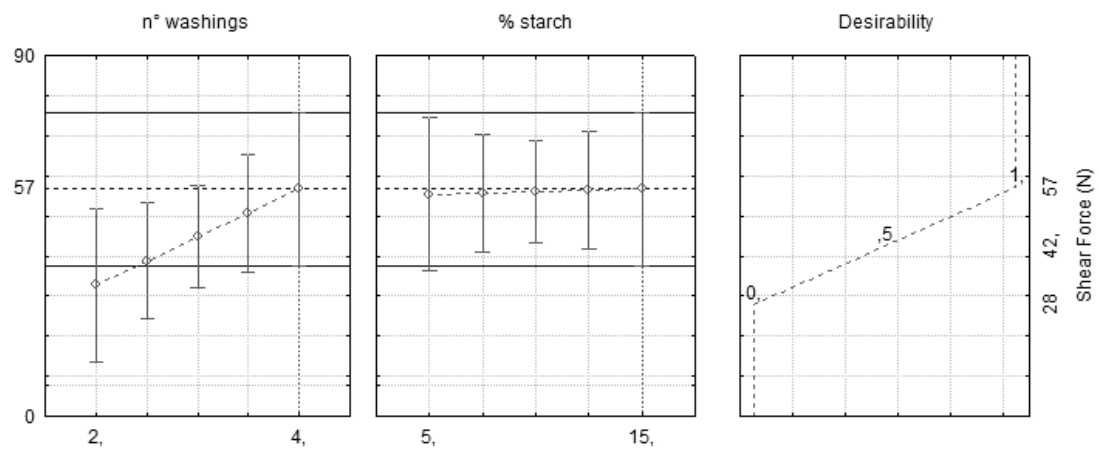


Table 1. Values of the independent variables and different levels of the factorial experimental design and the responses physico-chemical (means $\pm$ SD) evaluated, to identify the influence of the independent variables (number of washes and starch concentration) about the gel of surimi elaborated with bullfrog meat.

Variables			Responses												
T	X ₁	X ₂	Yield (%)	aw	Cooking loss (%)	WHC (%)	Moisture (%)	Protein (%)	L	*a	*b	W	SF(N)	Hardness (g)	Deformation (mm)
1	2	5	52.60	0.988 $\pm$ 0.007	13.7 $\pm$ 0.3	82.3 $\pm$ 1.0	77.4 $\pm$ 0.1	15.09 $\pm$ 0.8	66.2 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.3	40.2 $\pm$ 1.1	27.8 $\pm$ 0.7	276.7 $\pm$ 17.9	4.02 $\pm$ 0.20
2	2	15	57.50	0.980 $\pm$ 0.002	5.7 $\pm$ 0.2	78.8 $\pm$ 3.0	77.5 $\pm$ 0.3	13.46 $\pm$ 0.7	67.2 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.3	47.4 $\pm$ 0.4	33.2 $\pm$ 1.2	313.7 $\pm$ 11.7	5.92 $\pm$ 0.07
3	4	5	52.44	0.982 $\pm$ 0.002	20.6 $\pm$ 2.2	80.5 $\pm$ 0.8	75.8 $\pm$ 0.5	15.91 $\pm$ 0.3	66.1 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.2	44.9 $\pm$ 1.3	55.7 $\pm$ 0.6	544.7 $\pm$ 22.7	5.96 $\pm$ 0.09
4	4	15	57.30	0.983 $\pm$ 0.002	10.4 $\pm$ 0.8	83.5 $\pm$ 1.2	75.3 $\pm$ 0.4	14.65 $\pm$ 0.1	65.3 $\pm$ 0.6	-0.3 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.2	47.1 $\pm$ 0.9	57.2 $\pm$ 2.1	571.9 $\pm$ 9.24	5.97 $\pm$ 0.14
5	3	10	58.90	0.983 $\pm$ 0.001	11.0 $\pm$ 0.4	81.2 $\pm$ 1.0	75.7 $\pm$ 0.2	14.59 $\pm$ 0.4	67.2 $\pm$ 0.6	-0.6 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.3	46.0 $\pm$ 0.7	40.3 $\pm$ 0.7	356.4 $\pm$ 12.6	5.34 $\pm$ 0.11
6	3	10	59.60	0.986 $\pm$ 0.001	11.9 $\pm$ 0.6	81.0 $\pm$ 1.7	75.6 $\pm$ 0.2	14.79 $\pm$ 1.4	66.6 $\pm$ 0.3	-0.4 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.2	45.9 $\pm$ 0.8	39.1 $\pm$ 1.9	393.5 $\pm$ 43.7	5.42 $\pm$ 0.14
7	3	10	60.05	0.985 $\pm$ 0.002	11.9 $\pm$ 0.9	82.5 $\pm$ 1.7	75.6 $\pm$ 0.1	14.96 $\pm$ 0.1	66.5 $\pm$ 0.4	-0.5 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.2	45.3 $\pm$ 0.8	47.7 $\pm$ 1.0	286.0 $\pm$ 26.9	5.84 $\pm$ 0.13

T – Treatments.

X₁ - Washing number.

X₂ – Corn starch concentration.

aw – Water activity.

WHC - Water holding capacity.

SF – Shear Force

Table 2. ANOVA for water activity (Aw), Cooking loss, Water holding capacity (WHC), moisture, protein, color (* b and W) and textural parameters (shear force and hardness), for gel of surimi elaborated with bullfrog meat.

Responses	Variation source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F _{cal}	F _{tab}
aw	Regression	0.000114	1	0.000114	114	9.27*
	Residue	0.000005	5	0.000001		
	Total	0.000119	6			
Cooking loss (%)	Regression	116.67	2	58.35	102.36	6.94*
	Residue	2.28	4	0.57		
	Total	118.96	6			
WHC (%)	Regression	15.36	1	15.36	62.95	6.60*
	Residue	1.22	5	0.244		
	Total	16.58	6			
Moisture (%)	Regression	3.64	2	1.82	5.27	6.94
	Residue	1.38	4	0.345		
	Total	5.02	6			
Protein (%)	Regression	3.13	2	1.56	104	6.60*
	Residue	0.06	4	0.015		
	Total	3.19	6			
b*	Regression	3.77	3	1.25	125.93	9.27*
	Residue	0.04	3	0.01		
	Total	3.81	6			
W	Regression	33.56	3	11.18	20.71	9.27*
	Residue	1.61	3	0.54		
	Total	35.18	6			
SF (N)	Regression	672.71	1	672.71	54.03	6.60*
	Residue	62.29	5	12.45		
	Total	734.97	6			
Hardness (g)	Regression	70292.38	1	70292.38	20.26	6.60*
	Residue	17344.69	5	3468.94		
	Total	87637.07	6			

aw – Water activity.

WHC – Water holding capacity.

W – Whiteness.

SF - Shear force.

* Significant at the 5% level of significance ($p < 0.05$), when the calculated F value (F_{cal}) is higher than the tabulated F (F_{tab}).

Table 3. First-order models for gel of surimi elaborated with bullfrog meat on the experimental responses: water activity (aw), cooking loss, water holding capacity (WHC), moisture, % protein, value b *, whiteness (W), shear force (SF) and hardness.

Responses	Modelo de primeira ordem	R ²
aw	= 0.98 – 0.003X ₁ – 0.006X ₂ + 0.0008X₁X₂	0.9602
Cooking loss(%)	= 12.15 + 5.76X₁ – 9.06X₂ – 1.12X ₁ X ₂	0.9807
WHC (%)	= 81.53 + 3.72X₁X₂	0.9268
Moisture (%)	= 76.18 – 1.87X₂ – 0.28 X₁X₂	0.7249*
Protein(%)	= 14.77 + 0.99X₁ – 1.44X₂	0.9786
*b	= 7.06 – 1.06X₁ – 1.53X₂ + 0.56X₁X₂	0.9910
W	= 45.24 + 2.20X₁ + 4.72X₂ – 2.54X₁X₂	0.9540
SF (N)	= 43.04 + 25.93X₁	0.9369
Hardeness (g)	= 391.84 + 263.12X₁	0.8021*

aw – Water activity.

WHC – Water holding capacity.

W – Whiteness.

SF - Shear force.

Means in **bold** significant value.

*R² < 0,91.

**Characterization and oxidative stability of surimi gel produced from
bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) back meat**

Sinara P. Fragoso^{1*}, Fábio A. P. Silva², Valquíria C. S. Ferreira¹, Marta S.
Madruga³, Maria Teresa B. Pacheco⁴, Tatiane Santi' Gadelha³, Carlos A. A.
Gadelha³

¹ Department of Management and Technology Agrifood, Bananeiras, Brazil

² Academic unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brazil

³ Department of Food Engineering, Federal University of Paraiba, Joao Pessoa, Paraiba, Brazil

⁴Institute of Food Technology (ITAL), Applied Chemistry and Nutrition Center, Campinas, São Paulo,
Brazil

* Corresponding author: Sinara Pereira Fragoso, Email:
sinarafragoso@hotmail.com - Phone: +55 (83) 99992948

ABSTRACT

Raniculture is a booming economic activity, this growth brings the need for developing technological processes that will take advantage of all the productive chain co-products of frogs. In this study, surimi gels were elaborated using the back meat of bullfrogs, aiming to investigate the effects of numbers of wash cycles and starch concentrations on the physico-chemical and sensory characteristics on oxidative stability during storage. There was decrease the moisture and lipids content, and an increase in the whiteness and hardness of the gels with more washes and starch. Same ones received the highest scores on the sensory evaluation. After 30th day, the products of lipid and protein oxidation presented changes in their values. An increase of washing cycles showed to be effective method to reduce the formation of these compounds. The use of back meat proved to be a possible alternative for using the co-product of this genus in foods.

Keywords: raniculture; bullfrog; surimi; back meat; lipid and protein oxidation

1. INTRODUCTION

The economic activity of raniculture has been highlighted in recent years, with an increase in the consumption of white and healthy meats as a source of protein driving this growth (Casali et al., 2005). Frog meat has low lipid content and high percentages of polyunsaturated fatty acids. In addition, a high concentration of proteins with high biological value associated with a balanced and highly digestible amino acid profile make frog meat frequently recommended by physicians and nutritionists in the fight against child malnutrition (Rodrigues et al., 2014).

Brazil is one of the largest producers of frog meat, and stands out in relation to the breeding technology of the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in captivity (Casali et al., 2005). Despite this, the national raniculture industry faces problems with the complete use of the carcass, since only fresh and/or frozen thighs are marketed in both the domestic and export markets. This fact increases the meat's cost due to the great amount of waste of the other cuts, such as the back which is destined to obtain mechanically separated meat (MSM) through the process of mechanical deboning due to its low commercial value (Fragoso et al., 2013).

Mechanical deboning is a technology that allows for efficient use of the lower quality or even residual parts of some animals, transforming them into MSM. However, high fat and pigment content limits the use of some MSM in certain meat products (Cortez-Vega et al., 2013). Application of surimi manufacturing technology may be an alternative to this problem, as it is possible to remove blood, tissues, pigments, and fats (among other undesirable impurities) through its washing steps. The washes promote removal of these residues and the

concentration of myofibrillar protein (actomyosin), thus improving gel strength and elasticity (Park & Lin, 2005). At the end of processing surimi gel, the product is a white, odorless and flavored fish paste, thus becoming an intermediate product which can be molded into the desired shape (Gomes et al., 1994). There are many surimi-based products and are classified into molded, textured, and emulsified with ham, fish sausages, and surimi gels which can be added with shrimp or crab flavor (Kamaboko, kani-kama or crab sticks) (Lee, 1984).

Some changes during processing of meat products directly affect the quality of the final product. Such changes can bring beneficial effects, such as the destruction of anti-nutritional factors caused by the cooking process which decreases the amylase enzyme and the trypsin inhibitors, and increases digestibility of the starch and protein. However, other factors may negatively affect the final product such as chemical reactions that decrease the nutritional value of food. Oxidation reactions can occur in the processing and storage stages, and degrade the lipids and proteins reacting with the functional groups, resulting in altered nutritional value, in addition to modifying the texture, color and taste of oxidized food (Ordóñez Ramos et al., 2012).

The objective of this study was to evaluate the feasibility of using meat from the backs of bull frogs (*Lithobates catesbeianus*) for elaborating surimi gel, and to evaluate its physicochemical characteristics, nutritional quality, texture and color properties, the oxidative stability of lipids and proteins during storage, as well as to analyze its acceptance through sensory analysis.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Processing of surimi and surimi gel

The mechanically separated back (MSB) was obtained from mechanically deboning the backs of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) made available from the Raniculture and Aquaculture Products Laboratory (CCHSA/UFPB). After deboning, the MSB was packed in polyethylene bags and stored under freezing (-18°C) for 24 hours.

The surimi elaboration process was also carried out in the raniculture laboratory, and was executed based on the method proposed by Cortez-Vega et al. (2013) with some modifications. The MSB obtained after thawing was subjected to successive washes (two, three or four) using a ratio of 3:1 (solution/MSB) at a temperature of 5°C for 10 minutes under constant agitation. 0.5% sodium bicarbonate solution was used in the first wash. The MSB pulp was drained in a stainless steel sieve (Ø 32 mesh) after each washing cycle. At end of the washing process, the extract was wrapped in nylon cloth and compressed using a stainless steel hand press for 20 minutes, aiming to remove the maximum amount of moisture. After this step, cryoprotectants (4% sorbitol and 0.2% sodium tripolyphosphate) were added in relation to the weight of the surimi mass obtained.

The surimi gel was obtained from the surimis submitted to different numbers of washes. Different amounts of corn starch concentrations were added to the mass in the elaboration process, according to the following pre-established treatments: T1 (5% starch, 2 washes), T2 (15% starch, 2 washes), T3 (10% starch, 3 washes), T4 (5% starch, 4 washes), and T5 (15% starch, 4 washes). To this end, sodium chloride (2%) was added to the surimi mass, as well as corn starch (Duryea®) at the pre-established concentrations (5, 10 and 15%) and 0.3% SY-Y06008 crab flavor (Crab powder®-Guangdong Shinyee Marine Biology

Engineering Corp., Guangdong, China). All ingredients were mixed in a cutter food processor (CUT.2,5, METVISA®) at low speed. The obtained pastes were embedded in polyethylene casings (Ø2.5cm) (®Viscofan Brasil - São Paulo-SP/Brazil) and both ends were manually sealed. The samples were heated in a water bath (MA127 - Marconi® laboratory equipment - SP / Brazil) at 90°C for 30 min and the gels were cooled in ice water ($\pm 0^{\circ}\text{C}$). After cooling, the samples were vacuum packed and stored at 4°C for 60 days, and oxidative stability was evaluated at every 15 days of storage (1, 15, 30, 45 and 60 days).

2.2 Experimental procedures

The experiment was divided into two stages of analysis. The first stage was to characterize the gels, which occurred on the 1st day soon after its preparation. The gels were analyzed for chemical composition (moisture, ash, proteins, lipids, carbohydrates), aw, pH, WHC, instrumental color and texture profile analysis (TPA). In the 2nd part of the experiment, gel samples stored at 4°C were collected every 15 days for analysis over a period of 60 days. Analyzes carried out during storage aimed to evaluate lipid (BVT-N and TBARS) and protein (SH-free and carbonyl compounds) oxidative stability, and their consequences on the gels' physical structure.

2.3. Chemical composition and physical characteristics of surimi gels

Moisture, ash and total protein were determined using AOAC methods (AOAC, 2000). Lipid content of surimi gel patties was determined using the Folch, Lees & Stanley (1959) method, and carbohydrates were determined by the difference. pH was measured using a digital pH meter (Marconi, Model Map 200, Piracicaba,

BR), and water activity (a_w) was determined using a water activity analyzer (Aqualab, model 4TE, São Paulo, Brazil).

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by methylation with a cold 10 N potassium hydroxide methanol solution (O'Fallon et al., 2007). FAMES were separated using a Hewlett Packard 6890 GC Series gas chromatography system equipped with an on-column injector, a flame ionization detector and a Supelco® capillary column (100m x 0.25mm internal diameter, 0.2 μ m film). Hydrogen and synthetic air were used to ignite the flame in the detector. Helium was used as the entrainment gas at a flow rate of 1mL min⁻¹. The initial column temperature was programmed to 40°C for 2 min, then increased to 180° C at 10°C min⁻¹ and held at the maximum temperature for 30 min. The temperature was subsequently increased to 240°C at 10°C min⁻¹ and held at the maximum temperature for 34 min, resulting in a total run time of 86 min. Mix C21 (Sigma-Aldrich®, EUA) was used as a reference standard to identify the fatty acid peaks.

2.3.2 Profile of free amino acids

The free amino acids of the evaluated surimi gels were extracted by shaking for 60 min with 6 M of chloric acid (g mL⁻¹), followed derivatization in a pre-column according to White, Hart, and Fry (1986). The amino acid derivative separation was performed in an HPLC system (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) and Luna C18 reversed-phase column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). The mobile phases consisted of an acetate buffer and a 40% acetonitrile solution. The samples were injected automatically. Amino acid identification was performed by comparison with the external standard (Pierce,

PN 20088) and the quantification was performed by adding the α -aminobutyric acid (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA) internal standard.

2.3.3 Water holding capacity (WHC)

Analysis of Water Holding Capacity (WHC) of the surimi gels was performed according to the methodology described by Awad & Diehl (1975) with some modifications. First, 1.0 g of a surimi gel sample was weighed on a filter paper, previously dried in a drying chamber at 105°C. The sample was then placed between two plates under a weight of 10 kg for 10 min. The samples were withdrawn and weighed again. The WHC results were expressed in percentage.

$$\% \text{ Free water} = [(\text{mg free water} / \text{mg sample}) \times \% \text{ moisture}]$$

$$\text{WHC} = 100 - \% \text{ free water}$$

2.3.4 Instrumental color

Instrumental color parameters of surimi gels were performed by measuring lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*) and whiteness ($w = L^* - 3b^*$) values. Color parameters were provided by a digital colorimeter (KONICA MINOLTA, Chroma Meter CR-400, Osaka, Japan) as the average of five measurements randomly made on the gel samples' surface, using an aperture with a size of 8 mm and an illuminating source (C), with standardized readings relative to the white calibration plate.

2.3.5 Texture Profile Analysis (TPA)

Texture profile analysis was carried out at 20°C with a TA-XT plus texture analyzer (Stable Micro Systems®, Surrey, UK). Four cylindrical samples (2.5 cm

diameter, height 2.0 cm) of each type of surimi gel were taken and subjected to a two-cycle compression test. Analyses were performed in triplicate for each sample. The samples were compressed to 40% of their original height with a cylindrical probe of 6 cm diameter and a cross-head speed of 5 mm s⁻¹. The following parameters were determined: hardness (g), springiness (dimensionless), cohesiveness (dimensionless), gumminess and chewiness (g).

2.3.6 Oxidative stability assessments

In order to evaluate lipid oxidation, TBARs values of surimi gels were determined using the 2-thiobarbituric acid (TBA) method of Salih et al. (1987), and calculated from a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) solution. Results are expressed as mg of MDA per kg of sample.

Protein oxidation was evaluated from measuring total volatile basic nitrogen (TVB-N), and determining total free thiols (SH) and carbonyl compounds. Measurements of TVB-N were performed according to the method described by Stefansson et al. (2000). The surimi samples (10 g) were homogenized for 5 min with 60 mL of 5% trichloroacetic acid. The mixture was centrifuged at 3000 g and 4°C for 10 min. One milliliter of the sample solution and 1.0 mL of a MgO solution were then placed on the outer section of the Kjeldahl micro-diffusion. The cell was incubated at 40°C for 10 min, distilled in nitrogen distiller and then titrated against 0.01 N sulphuric acid. The TVB-N concentration was calculated as ammonia equivalents and expressed in mg N kg⁻¹ of sample.

The content of free SH groups in surimi gel samples was measured according to the method of Ellman (1959) using Ellman's reagent (5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoic acid - DTNB). Next, samples (0.5 grams) were homogenized in 0.1 M phosphate

226 buffer (pH 8.0) with the aid of an ultra-turrax (IKA Labortechnik, T25 basic,
227 Wilmington, USA) for 30s. Homogenate was filtered and mixed with 50 μ L
228 Ellman's reagent. Free thiol content was measured at 412 nm and calculated
229 from a standard curve of L-cysteine. Protein concentration of soluble fraction was
230 determined at 280 nm using a standard BSA curve (ranging from 1 to 10 mg mL⁻¹).
231 The results were expressed as nmol of L-cysteine per mg of protein.

232 The carbonyl compounds of the surimi gel samples were quantified after
233 derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), according to the
234 methodology of Ganhão, Morcuende, & Estévez, (2010) with some modifications.

235 Gel samples (1 g) were homogenized with 20 mM of 0.6 M NaCl pH 6.5 (1:10,
236 w/v) phosphate buffer, and 200 μ L of this homogenate was then used to
237 determine the protein concentration and the content of carbonyl compounds. In
238 both cases, the proteins were precipitated with 1mL of 10% trichloroacetic acid
239 (TCA) after cold (5°C) centrifugation to 2700 g. 1 mL of 0.2% DNPH in 2 N HCl
240 was added for determining carbonyl compounds, and 1 mL of 2N HCl was added
241 for the protein concentration. After incubation at room temperature for 1 hour,
242 proteins were precipitated again with 1mL of 10% TCA and centrifuged at 7500g
243 for 10 minutes. After two washes with 1 mL of ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v)
244 followed by centrifugation at 7500g for 5 minutes, the precipitated proteins were
245 then dissolved in 1.5 mL of 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) with 6 M GuHCl.

246 The samples' protein concentration was calculated from the absorbance read at
247 280 nm using a five point standard BSA curve. The amount of carbonyl was
248 expressed as nmol of carbonyls per mg of protein using a molar extinction
249 coefficient of hydrazones (21.0 nM⁻¹ cm⁻¹) with the absorbance read at 370 nm.

250

2.4 Microbiological assessment

In order to ensure hygienic-sanitary conditions for consumption, microbiological analyzes were carried out on the MSB and surimi gels. The reference criteria used were established by RDC Resolution no. 12, group 7, item (d), which states that Coliforms at 45°C/g, Staphylococcus coagulase positive/g and Salmonella spp./25 g must be analyzed for smoked fish, mollusks and crustaceans, as well as fish products (surimi and similar). Analysis of mesophilic bacteria was also performed. All microbiological parameters were assessed according to American Public Health Association (APHA 2000) methodology.

2.5 Sensory assessment

Sensory acceptance analysis of the surimi gels was performed with 80 untrained tasters, randomly recruited (servers and students from the Federal University of Paraíba, Bananeiras, PB/BR). The project was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Paraíba (CAAE - 30319214.3.000.5188), according to resolution 466/12 (BRASIL, 2012). For analysis, the gels were cut into 2 x 2 cm pieces, and served in randomly encoded containers. The panel members were asked to evaluate five attributes: appearance, color, odor, taste and texture using a 9-point hedonic scale, which ranged from "I liked it very much" (9) to "I disliked very much" (1). A score of 5 was considered acceptable.

2.6 Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was applied to assess the effect of input variables on the assessed parameters, with the aid of Statistica v. 7.0 software

(STATSOFT, 2004). Post hoc analyses (Tukey's test) were carried out when significant differences were found ($p \leq 0.05$). Two independent experimental processing trials were performed. All analyzes were performed in triplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of the factors studied on the physical-chemical characterization of surimi gels

The chemical composition of MSB (**Table 1**) presented low lipid content and high protein content compared to CMS of other species, including: chicken (Cortez-Vega et al., 2014), duck (Ramadhan et al., 2014) and fish (Fogaça et al., 2015).

The age of the animal, species, bone relationship, skin content, cutting and boning method, protein denaturation, and pigments are significant sources of variation that directly influence the composition of CMS (Perlo et al., 2006).

Moisture content was reduced with the increase in the number of washing cycles in the gel treatments, and this difference was significant ($p < 0.05$) from the third wash. This decrease was also observed in the ash content and in the lipid content, which presented a reduction in percentage of 25 and 40%, respectively, after the fourth washing cycle. Such behavior was also observed by Jin et al. (2007), Ismail et al. (2010) and Fogaça et al. (2015) for surimi gels subjected to several washing cycles. This explains why it subsided.

The combination of washing number and starch concentration significantly affected ($p < 0.05$) the amount of protein contained in frog meat surimi gels. These results were already expected because the washing step removes a portion of the soluble proteins due to the leaching of sarcoplasmic tissues (Fogaça et al., 2015). However, the observed variation in the protein values of the gels that were

submitted to the same number of washes can be attributed to the added starch concentration. This is because the increase in the carbohydrate value changes the individual percentages of the chemical composition, even though it does not have protein in its composition.

The carbohydrate content varied according to the starch concentration added to the surimi mass because it had 85% carbohydrate in its composition, so the treatments with the highest concentration obtained higher values of this parameter. The Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) establishes that these products must contain up to 30% carbohydrates and at least 10% protein (Brazil, 2001). Therefore, all treatments are within the limits established by Brazilian legislation.

The number of washing cycles had a significant effect on the decrease of the protein and lipid concentration of the surimi gels. The observed reduction in proteins can be regarded as an undesirable effect. However, the decrease in lipid concentration can be seen as favorable since the lipids in surimi products can cause an adverse effect on the quality due to its oxidation, directly interacting with the proteins, and thereby causing denaturation, polymerization and changes in the functional properties of food (Ordóñez Ramos et al., 200).

The values of a_w and pH were significantly affected by both factors considered (**Table 1**). For water activity (a_w), the highest value was determined in the treatment with the lowest number of washes and the lowest amount of starch (0.988). With regard to pH, it was verified that there was a reduction in the acidity with an increase in the number of washes. This could be verified by the comparison between the pH value obtained in the raw material MSB (6.5), and the value obtained after two washes T1 (7.2). The lowest pH value in the raw

material occurred due to the presence of lactic acid resulting from post-rigor anaerobic glycolysis. According to Jin et al. (2007), washing processes reduce lactic acid and affect the increase in pH.

The MSB fatty acid composition was different from the other treatments of surimi gels, which did not present significant differences ($p>0.05$) between them (**Table 1**). DMS presented higher levels of monounsaturated fatty acids (MUFA), with oleic acid (C18:1 cis-9) being the most abundant. The surimi gel samples presented higher percentages of saturated fatty acids (SFA), with emphasis on palmitic acid (C16:0).

The percentage of MUFA found in the MSB was similar to the values reported by Nobrega et al. (2007) in frog legs. However, the SFA content was determined by Mc Mullin, Smith & Wright (1968) and Coutinho (2001) (33 and 32.5%, respectively), as determined in the lipid fraction of the bullfrog muscle. According to Coutinho (2010), both MSB and frog surimi genus presented three essential fatty acids (linoleic, linolenic and arachidonic) in their composition. This is not common in all meats, and mainly in the case of pigs and cattle.

The nutritional value of food depends on the type and amount of amino acids available for bodily functions (El-Beltagy et al., 2012). The amino acid profile of MSB and surimi gels is presented in **Table 2**. The amino acid content of MSB and T1 had no significant difference between them, but both differed statistically ($p<0.05$) from the other treatments. Glutamic acid was the most abundant amino acid found in all samples, with cysteine and tryptophan having the lowest values. This result was also observed by Ordonez Ramos et al. (2012) for surimi and kamaboko made with anchovies (*Engraulis japonica*).

MSB presented all essential amino acids in appropriate amounts according to the standard established by WHO/FAO/UNU (FAO, 2007). The gel treatments exhibited high amino acid content, but not all presented the minimum amount recommended to meet daily necessities. This difference in composition may be related to the heat treatment of surimi gels, which may have resulted in denaturing some essential amino acids.

The amount of essential amino acids in the MSB proteins was 39.9%, similar to that of beef (41.8%) and pork (42.5%) as reported by Schweigert, (1987). The process of making the surimi gel resulted in a loss of 22% of these essential amino acids compared to the raw material (frog MSB). The total amino acid composition in frog surimi gels was similar to that previously cited by Mira & Marquez (2005) for fish surimi, and Cortez-vegas et al. (2014) for chicken kamaboko.

Water holding capacity (WHC) was directly affected by the amount of starch added to the gel (**Table 3**). This in turn retained gel formation because of its ability to interact with water. Therefore, the treatments containing the highest amount of starch obtained the highest WHC values. According to Lee (1984), starch has the property of forming a stronger gel. Other authors have observed the same behavior of starch in beef surimi (Zhang et al., 2013), and in pork gels (Li & Yeh, 2003).

The effects of the number of washes and the starch concentration on the instrumental color of the frog meat surimi gels are shown in **Figure 1**. In general, there is a consumer preference for whiter gels, which according to Kim et al. (1996) can be achieved by increasing cycles and washing time. The market

generally demands gels with high L^* (luminosity) and W (whiteness) values, and low b^* value (Hsu & Chiang, 2002).

3.2 Effects of refrigerated storage on the physical parameters of surimi gels

According to the results presented in **Table 3**, reduction in the water retention capacity to 13.6% of the gels along the storage days was observed. This reduction was more accentuated in treatments containing more starch. According to Alvarado & McKee (2007), the property of water retention in the meat can be affected by any substance that interferes in the spacing between actin and myosin. Another factor that can be attributed to this reduction is the oxidation of proteins during storage, since the formation of carbonylated proteins may alter the protein's ability to chemically interact with water molecules, weakening the bonds and thus damaging WHC (Silva et al., 2016)

The objective color parameters of the surimi gels made with frog meat throughout storage (1 to 60 days at $\pm 4^\circ\text{C}$) are shown in **Figure 1**. The number of washings and the different concentrations of starch produced a decrease in luminosity (L^*) of the gels (**Figure 1A**), and this difference was significant ($p < 0.05$). On average, the frog meat surimi gels had a luminosity value of 66.4, a value similar to that found by Ramadhan et al. (2014) in duck meat gel subjected to two washes (66.6). All treatments presented similar behavior during the storage period, and their luminosity increased during the 60 days. This result contradicts the data reported by Liu et al. (2014) who observed a decrease in the luminosity of surimi gels over 35 days of storage.

The redness (a^*) of the surimi gel samples was also affected by both factors studied (**Figure 1B**). The value of a^* decreased throughout the washes as

expected, due to the elimination of the colored pigments, especially the myoglobin contained in the red muscle and blood. In addition, the red color was neutralized by the addition of starch (Fogaça et al., 2015). There were no significant differences ($p>0.05$) between treatments with the same number of washes. Treatments did not present constant behavior throughout storage, since there was variation between the loss and gain of redness in the samples. The treatment with the highest value of a^* at the end of the 60 days was T1 (1.37), which was justified because it was submitted to the lowest number of washes and the least amount of starch. The lowest value of a^* was for T5 treatment (-0.34), which had been subjected to the highest number of washes and the highest concentration of starch.

Regarding the b^* value (yellowing), it was verified that all treatments (**Figure 1C**) presented similar behavior, although they differed significantly from each other ($p<0.05$). The number of washes and the starch concentration had a negative influence on the yellow (b^*) content, therefore the treatment with the highest b^* value was T1 (9.45), and the lowest value was T5 (6.68). In general, the surimi gel samples presented b^* values below those reported by Ordonez Ramos et al., (2012), Priyadarshini et al., (2015) and Ismail et al., (2010) for Kamaboko Anchovy gel (*Engraulis japonica*), catfish gel (*Pangasius hypophthalmus*) and duck meat surimi, respectively.

On the other hand, there was an increase in the b^* values in the surimi gel samples during storage, which can be attributed to both the formation of carbonyl compounds and the development of the Maillard Reaction (Miranda, Rakovski & Were, 2012). Silva et al. (2016) also observed an increase in yellowish color in chicken jerky samples during storage.

Whiteness (W) is one of the most important parameters that define the quality of surimi-based products. In our study, increasing the number of wash cycles and the starch concentration were determinant for whiteness improvement (**Figure 1D**). The treatment with less number of washes and lower starch concentration obtained the lowest W value (41.9). **Figure 1D** shows that all treatments differed significantly from each other ($p < 0.05$), and that treatments increased in their whiteness from the 15th day of storage. This fact was unexpected and contradicts the behavior described by Liu et al., (2014) who observed a decrease in whiteness of surimis during 35 days of storage. Although the effect of the number of wash cycles and the starch concentration for improving the color of gels is proven, further investigations are required as to what happens during the storage period.

The results of the texture profile of frog surimi gels during the storage period are presented in **Table 3**, where it is verified that hardness was the only parameter that presented significant difference ($p < 0.05$) for the two factors studied (number of washes and starch concentration). A significant increase was observed in the same from the third washing (T3), and the highest values were obtained in the gels after four washes (T4 and T5). According to Priyadarshini et al. (2015), this happens due to the effect of salinization, because moisture is reduced and hardness increases expressively. With regard to the effect of storage, an increase in hardness can be noticed from day 15, while it is more expressive from the 30th day. This result seems to be related to the growth of ice crystals during storage, which could lead to a re-union of the junction zones by constructing a rigid gel network, and thus raising the hardness (Solo-de-Zaldívar et al., 2014).

It was also observed in **Table 3** that the values of springiness and cohesiveness did not show significant difference at the beginning of the experiment; however, these parameters also suffered an increase in their values over the course of the storage time. As with hardness, it was observed that the number of wash cycles contributed to an increase of gumminess and chewiness. This effect can be easily verified when comparing treatments T1 with T4, or T2 with T5, since both had the same starch concentration, but different numbers of washes. The gumminess parameter is very important because it determines the energy required to chew the sample. Similar results were found by Ismail et al. (2010) and Ramadhan et al. (2014) working with duck meat, Priyadarshini et al. (2015) with sutchi catfish, and Fogaça et al. (2015) with tilapia meat (*Oreochromis niloticus*), in studying the effect of the number of washes on surimi gels.

3.3 Development of lipid and protein oxidation during storage

Lipid and protein oxidation markers indicated that reactions of this nature occurred during the washing and elaboration process of surimi, as well as in the storage ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) of gels made from frog meat.

The development of lipid oxidation through the formation of TBARS during storage can be observed in **Figure 3**. Initially, the treatments did not present a significant difference, but the values found in treatments T1 and T2 after the 15th day were significantly higher ($p < 0.05$) than in the other treatments. These results suggest that the studied parameters (number of wash cycles and starch concentration) have a relevant impact on lipid oxidation.

A similar result was observed by Fogaça et al. (2015), who studied the influence of the number of washes and starch quantity on surimi gels made with tilapia

meat. Storage time also caused an increase in TBARS levels of the surimi gels studied by Ordonez Ramos et al. (2012) and Liu et al. (2014).

As observed for lipid oxidation, protein oxidation markers also exhibited variation in values during storage. The TVB-N of the frog surimi gels showed a progressive increase over the 60 days of storage (**Figure 3A**). The mean value of treatments was 3.46 mg/100 g on the first day of storage, reaching values of 8.52 mg/100 g on day 60. TVB-N production was higher ($p<0.05$) in the T1 treatment, reaching a value of 10.12 mg/100g (60th day), however, T4 and T5 treatments had the lowest values after the 60th day of storage (7.6 And 6.5 mg/100g respectively). TVB-N content is used as an index to evaluate the quality and shelf life of seafood products (Fernández et al., 2009). These results indicate that increasing the number of washes was shown to reduce the formation of TVB-N. According to current standards required by legislation a level of up to 40 mg N/100 g of fish muscle is considered as the deterioration limit. Thus, the TVB-N values found on all surimi gel samples were below the limit established in the legislation throughout the storage period.

The content of SH-free groups decreased during storage in all treatments, indicating the formation of disulfide bonds (**Figure 3B**). A further reduction of sulfhydryl content was observed after the 30th day of storage in treatments T1 and T2. Sulfhydryl levels decreased by 25.9%, 14.3% and 13.2% for T1, T2 and T3 after 45 days respectively, from the initial sulfhydryl content measured in the respective treatments. A small reduction in sulfhydryl groups was observed throughout the storage period for T4 and T5. However, this reduction became more pronounced only after 60 days of storage (**Figure 3B**).

The formation of carbonyl compounds is one of the main chemical responses of protein oxidation (Liu et al., 2014). Total carbonyl compound content of the frog-meat surimi gel samples increased with increased storage time (**Figure 3C**). There was no difference between the treatments in the first 15 days, however, during that same period the oxidation of proteins was already noticed by the addition of more than 50% in the values of carbonyl compounds in all treatments. From the 30th day of storage, the gels that received the lowest number of washes (T1 and T2) presented a higher increase of carbonyl groups, differing statistically ($p < 0.05$) from the other treatments. At the end of the 60th day of storage, all treatments presented an increase of at least 4 times the carbonyl compound content of their initial value, thus evidencing the oxidative state of the gel proteins. The results also indicated that washing created an imbalance between the initial pro-oxidant/antioxidant components of muscle tissue, contributing to the differences observed in the oxidative state of the 5 gel treatments. Similar behavior was reported by Eymard et al. (2009) and by Liu et al. (2014), who also studied lipid and protein oxidation in fish surimi gels.

3.4. Microbial characterization of DMS and surimi gel elaborate with bullfrog meat

All samples showed microbial counts of fecal coliforms (45 ° C) $< 1.0 \times 10^3$, Staphylococcus coagulase positive $< 3 \times 10^3$ and absence of Salmonella sp, evidencing that they are all in according to Brazilian legislation (Brazil 2001). The mechanically separated back (MSB) showed a higher count of mesophilic aerobic bacteria than the other treatments (1×10^3 CFU / g). The washing step was efficient in reducing the population of these microorganisms, since no gel treatment had a count above 1×10^1 CFU / g. Rodrigues et al. (2014) found much

higher values of mesophilic bacteria for frog meat (4.5×10^5 CFU / g), even after the bleaching process. The result of this experiment indicates good sanitary quality, both for the raw material and for all the elaboration processes of surimi gels.

3.5 Sensory evaluation

All treatments obtained a mean score of their attributes above five, which was the pre-established acceptance limit. Appearance, color and texture were the attributes that received the highest scores for surimi gels (7.8, 6.9, 6.6 respectively). The treatments that obtained the highest overall mean were T3 and T4 with 6.9 and 6.7, respectively. The results of the sensory evaluation for color and texture corroborated with the instrumental analyzes, where T3 and T4 treatments reached the highest scores for these attributes. This confirms the preference of consumers for gels that are whiter and firmer in texture.

4. CONCLUSION

The results presented herein show that the processing of MSB for the purpose of surimi gel elaboration is a viable technique and a promising strategy to improve utilization of frog backs. The production mechanism and surimi gel elaboration did not cause limitations in the physicochemical characteristics or significant losses in nutritional quality. The physicochemical properties of the gels were influenced by the two factors studied, with the number of washing cycles being the most important. In addition to being effective in reducing the compounds formed in lipid and protein oxidation reactions, it also improved the color and hardness of the gel, which are important attributes in evaluating the quality of this

product. The T4 and T5 treatments received the highest scores in the sensory evaluation, indicating that they were the products that best met consumers' preferences. This surimi production technique allows for incorporating MSB into several types of frog meat products to be better studied in the future.

REFERENCES

- Alvarado C, Mc kee S (2007). Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. *Journal of Applied Poultry Research* 16:113– 120
doi: <https://doi.org/10.1093/japr/16.1.113>
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. (M. Gaithersburgh, Ed.) (17th ed.) Association of Official Analytical Chemists.
- APHA. American Public Health Association. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: American Public Health Association.
- Awad, A. A.; Diehl, J. F. (1975). Physical changes in irradiated trout (*Salmo gairdneri*), *Journal of Food Science*, v. 40, n. 2, p. 319-321.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2001). Resolução RDC nº 12, de 02/01/01. Regulamento técnico Sobre Padrões microbiológicos parágrafo Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, janeiro 10. Seção 1, n. 7, p. 4553.
- Casali, AP, Moura, OM, & Lima, SL (2005). Rações comerciais e o rendimento de carcaça e subprodutos de rã touro. *Ciencia Rural* 35 (5), 1172-1178.
- Cortez-Vega, W. R., Fonseca, G. G., Prentice, C., (2013). Optimization of parameters for obtaining surimi-like material from mechanically separated chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*. 52, 763–772.
- Coutinho, C. M. Teor de Lipídeos e Composição em Ácidos Graxos da Gordura da Rã-Touro (*Rana Catesbeiana*, Shaw, 1802). (2001). 94f. Tese (Doutorado) - Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Viçosa.

- 597 Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and*
 598 *Biophysics*.vol. 82, pages 70 – 77.
- 599 Eymard, S., Baron, C.P., Jacobsen, C., (2009). Oxidation of lipid and protein in
 600 horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during
 601 processing and storage. *Food Chemistry*. 114, 57–65.
- 602 FAO (2007). Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO.
 603 World Health Organization. **Protein and amino acid requirements in**
 604 **human nutrition**. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation.
 605 Geneva. Available in<http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_935_eng.pdf>. Acess 02/01/2017.
- 607 Fogaça, F.H., Sant’Ana, L.S., Lara, J.A.F., Mai, A.C.G., Carneiro, D.J., (2015).
 608 Restructured products from tilapia industry byproducts: The effects of
 609 tapioca starch and washing cycles. *Food Bioproducts and Process*, 94,
 610 482–488.
- 611 Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., (1957). A simple method for isolation
 612 and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological*
 613 *Chemistry*. 226, 497–509.
- 614 Fragoso, S. P., Ferreira, V. C. S., Araújo, I. B. S., Oliveira, E. N., Silva, F. A. P.,
 615 Moura, O. M. (2013). Physical and chemical characteristics of different cuts
 616 of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) pigmented and albino. *Food Hygiene*,
 617 27: 951-55.
- 618 Ganhão, R., Morcuende, D., Estévez, M. Protein oxidation in emulsified cooked
 619 burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture
 620 deterioration during chill storage. (2010). *Meat Science*, 85, pp. 402–409.

- 621 Gomes, J.C.; Bianchini, M.G.A.; Pereira, C.A.S.; Coelho, D.T.; Costa, P.M.A.
622 (1994) Processing and characterization of freshwater fish surimi.
623 *Freshwater Fish Science and Technology*, 14(2): 226-237.
- 624 Hsu, C. K., Chiang, B. H. (2002) Effects of water, oil, starch, calcium carbonate
625 and titanium dioxide on the color and texture of threadfin and hair tail surimi
626 gels. *International Journal of Food Science and Technology*, v.37, p.387-
627 393.
- 628 Ismail, I., Huda, N., Ariffin, F., Ismail, N., (2010). Effects of washing on the
629 functional properties of duck meat. *International Journal Poultry Science*. 9,
630 556–561.
- 631 Jin S. K, Kim I. S, Kim S. J, Jeong K. J, Choi Y. J, Hur S. J (2007). Effect of
632 muscle type and washing times on physico-chemical characteristics and
633 qualities of surimi. *Journal of Food Engineer*, 81:618–623.
- 634 Kim, J. M., Liu, C. H., Eun, J. B., Park, J. W., Oshimi, R., Hayashi, K., et al.
635 (1996). Surimi from fillet frames of channel catfish. *Journal of Food Science*,
636 61, 428–438.
- 637 Lee, C. M. Surimi process technology (1984). *Food Technology*, v.40, p.69-80.
- 638 Li, J. Y., & Yeh, A. I. (2003). Relationships between thermal, rheological
639 characteristics and swelling power for various starches. *Journal of Food*
640 *Engineering*, 50(3), 141–148.
- 641 Liu, Q., Chen, Q., Kong, B., Han, J., He, X., (2014). The influence of
642 superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural
643 changes in the myofibrillar proteins of common carp (*Cyprinus carpio*)
644 surimi. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 603–611.

- 645 MC Mullin, G. F., S. C. Smith, and P. A. Wright. (1968). Tissue fatty acid
646 composition in four diverse vertebrate species. *Comparative Biochemistry
647 and Physiology*. 26:211-221.
- 648 Mira, N. V. M.; Lanfer-Marquez, U. M. (2005). Evaluation of the centesimal
649 composition, amino acids and contaminant mercury in surimi. *Food Science
650 and Technology*. v. 25(4), p. 665-671.
- 651 Miranda, L.T., Rakovski, C., & Were, L.M. (2012). Effect of Maillard reaction
652 products on oxidation products in ground chicken breast. *Meat Sci*
653 90(2):352-360.
- 654 Nóbrega, I.C.C., Ataíde, C.S., Moura, O.M., Livera, A. V., Menezes, P.H.,
655 (2007). Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs.
656 *Food Chemistry*. 102, 186–191.
- 657 O'Fallon, J.V, Busboom, J. R, Nelson, M. L, Gaskins, C. T. (2007). A direct
658 method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues,
659 oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, v. 85, n. 6, p.15511-1521.
- 660 Ordonez Ramos, L.R.O., Choi, N. Do, Ryu, H.S., (2012). Effects of processing
661 conditions on the protein quality of fried anchovy kamaboko *Engraulis*
662 *japonica*. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Sci. 15, 265–273.
- 663 Park, J.W., Lin, T.M., (2005). Surimi: manufacturing and evaluation. In: Park,
664 J.E. (Ed.), *Surimi and Surimi Seafood*. Taylor and Francis, Boca Raton, pp.
665 33–105.
- 666 Perlo, F.; Bonato, P.; Teira, G.; Fabre, R.; Kueider, S. (2006). Physicochemical
667 and sensory properties of chicken nuggets with washed mechanically
668 deboned chicken meat: Research note, *Meat Science*. 72: 785–788.
- 669 Priyadarshini, B., Majumdar, R. K., Parhi, J., Maurya, P. K., Roy, D., Saha, A.,

- 670 (2015). Gel properties of sutchi catfish (*Pangasius hypophthalmus*) surimi
 671 as affected by selected washing process and number of washing cycles.
 672 *Food Science and Technology*. 22(3): 266-74.
- 673 Ramadhan, K., Huda, N., Ahmad, R., (2014). Effect of number and washing
 674 solutions on functional properties of surimi-like material from duck meat.
 675 *Journal of Food Science and Technology*. 51, 256–266.
- 676 Rodrigues, E., Seixas Filho, JT, Mello, SCRP, Castagna, AA, Sousa, MA, &
 677 Silva, UP (2014). Microbiota frog meat (*Lithobates catesbeianus*) used in
 678 baby food. *Food Science and Technology* 34 (1), 5154.
- 679 Salih A.M., Smith, D. M. Price, J.F. Dawson. L.E. (1987). Modified extraction 2-
 680 thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry*
 681 *Science*, 66, pp. 1483–1488
- 682 Silva, F.A.P. Ferreira, V. C. S. Madruga, M. S. Estevez, M. (2016). Effect of the
 683 cooking method (grilling, roasting, frying and sous-vide) on the oxidation of
 684 thiols, tryptophan, alkaline amino acids and protein cross-linking in jerky
 685 chicken. *Journal of Food Science and Technology*, p. 1-10.
- 686 Solo-de-Zaldívar, B., Herranz, B., Borderías, A.J., Tovar, C.A., (2014). Effect of
 687 freezing and frozen storage on restructured FISH prototypes made
 688 with glucomannan and FISH mince. *Food Hydrocolloides*. 41, 233–240.
- 689 Stefansson G, Nielsen HH, Skåra T, Oehlenschläger J, Schubring R, Luten J,
 690 Derrick S, Gudmundsdóttir G. (2000). Frozen herring as raw material for
 691 spice-salting, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80,
 692 1319-1324.
- 693 White, J. A.; Hart, R. J.; Fry, J. C. (2000). An evaluation of the Waters Pico-Tag.
 694 *The Science and Food Agriculture*, v.80, p.1319-1324.

Zhang, F., Fang, L., Wang, C., Shi, L., Chang, T., Yang, H., Cui, M., (2013).
Effects of starches on the textural, rheological, and color properties of
surimi-beef gels with microbial transglutaminase. *Meat Science*. 93, 533–
537.

FIGURES CAPTIONS

Figure 1. Effect of number of washes, starch concentration and refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C) on the parameters of color (A) luminosity, (B) redness, (C) yellowness and (D) whiteness, in surimi gel samples elaborate from frog meat.

Different letters at the top of the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments within a given storage phase.

Figure 2. Lipid oxidation in surimi gel samples elaborate from frog meat during refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C), formation of soluble (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

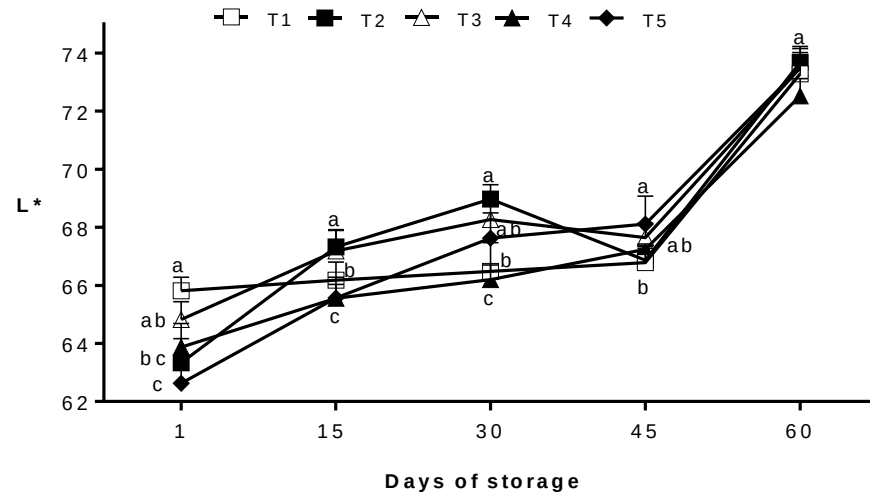
Different letters at the top of the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments within a given storage phase.

Figure 3. Protein oxidation in surimi gel samples elaborate from frogs during refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C), quantification of total (A) BVT-N, (B) SH-free and (B) carbonyl compounds.

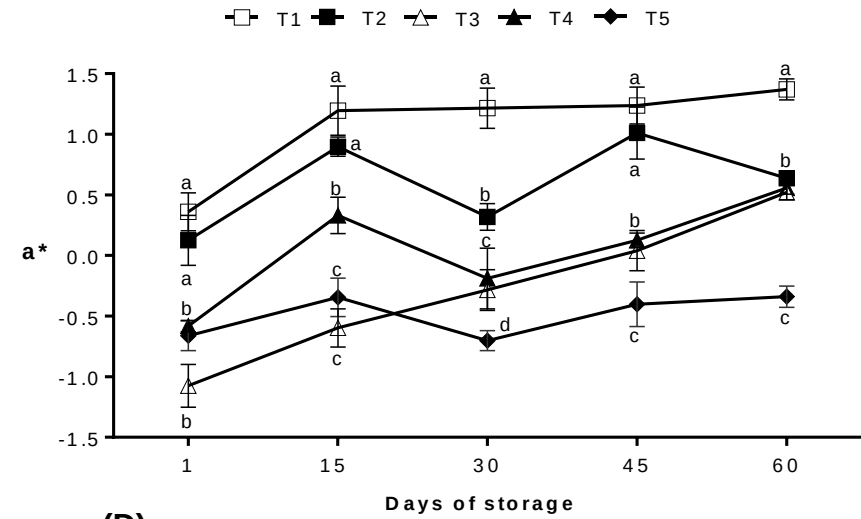
Different letters at the top of the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments within a given storage phase.

Figure 1.

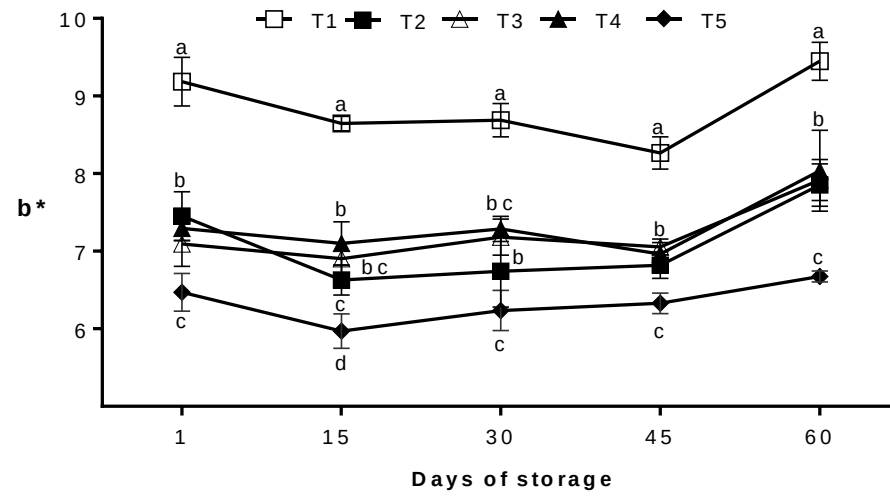
(A)



(B)



(C)



(D)

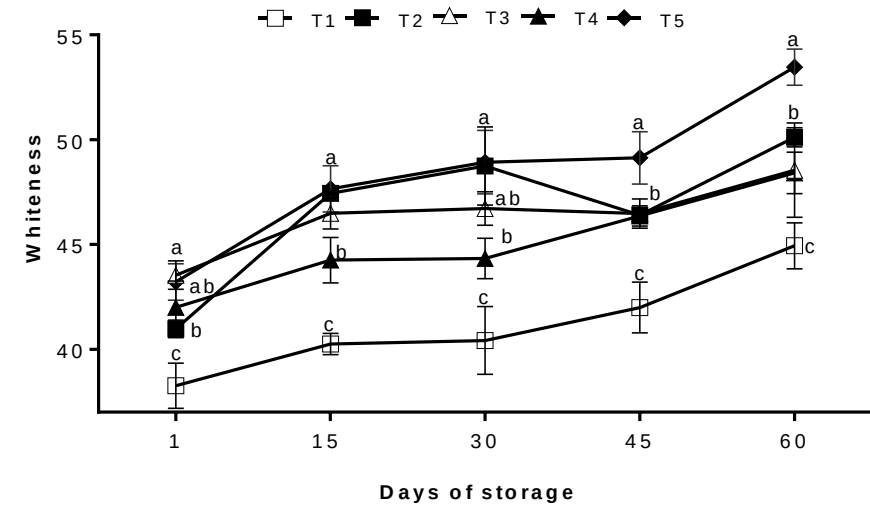


Figure 2.
(A)

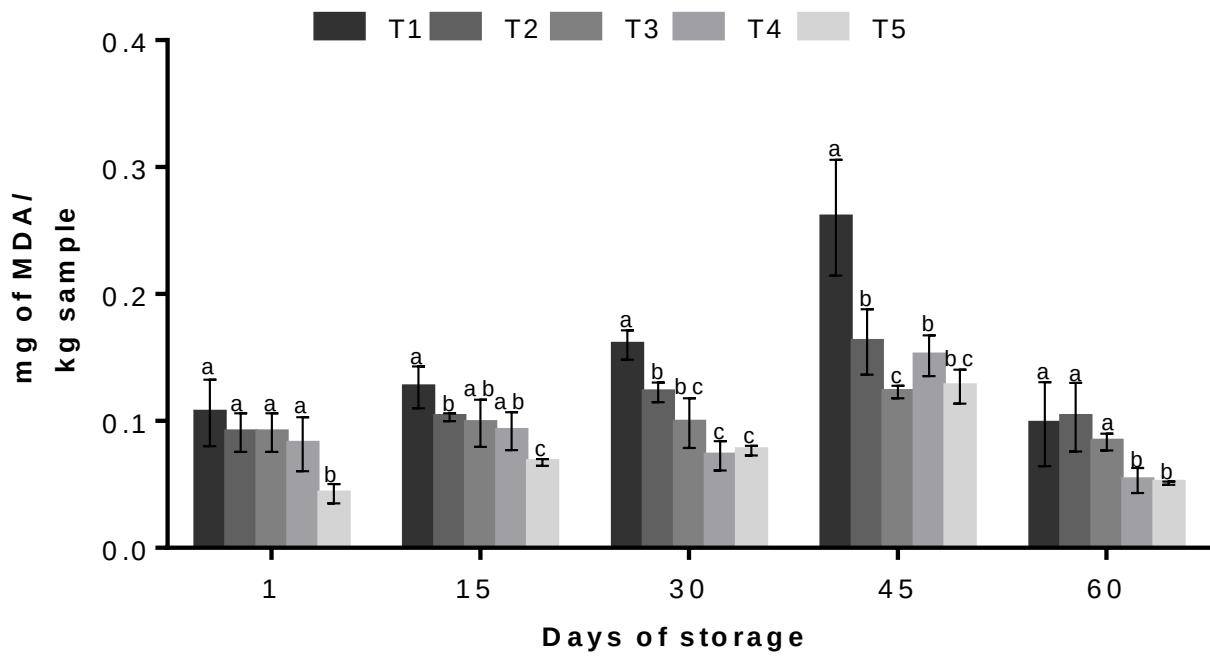
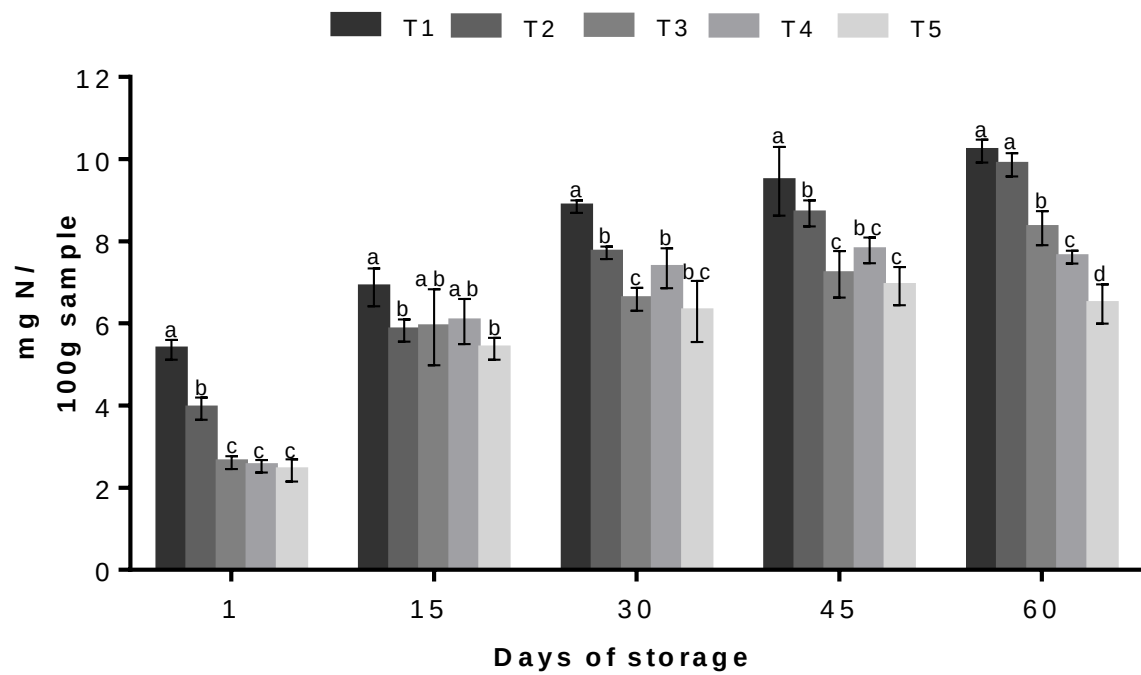
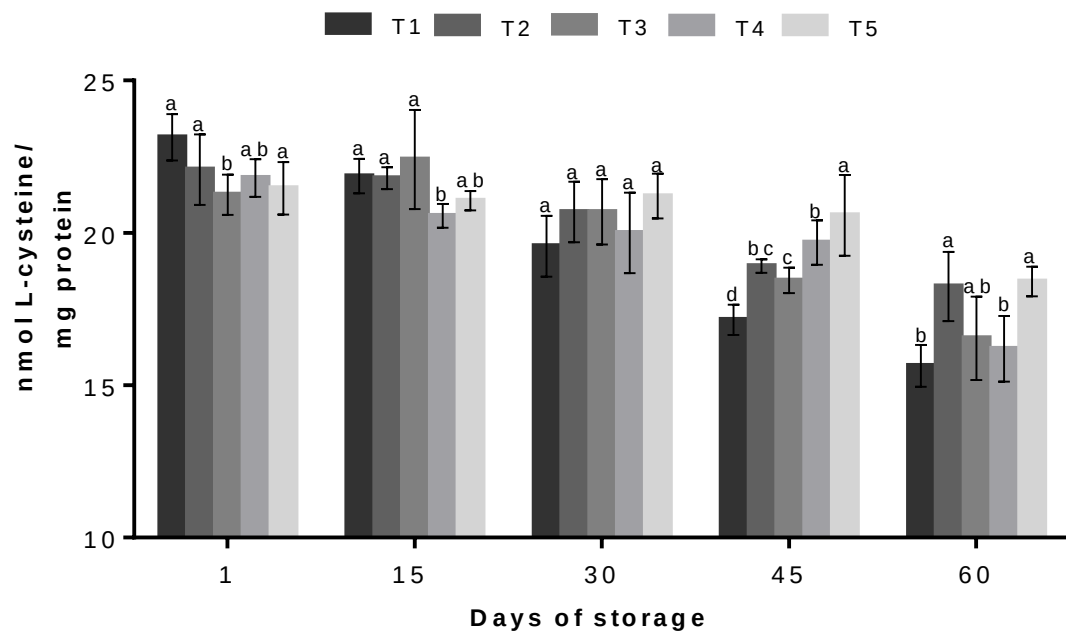


Figure 3.
(A)



(B)



(C)

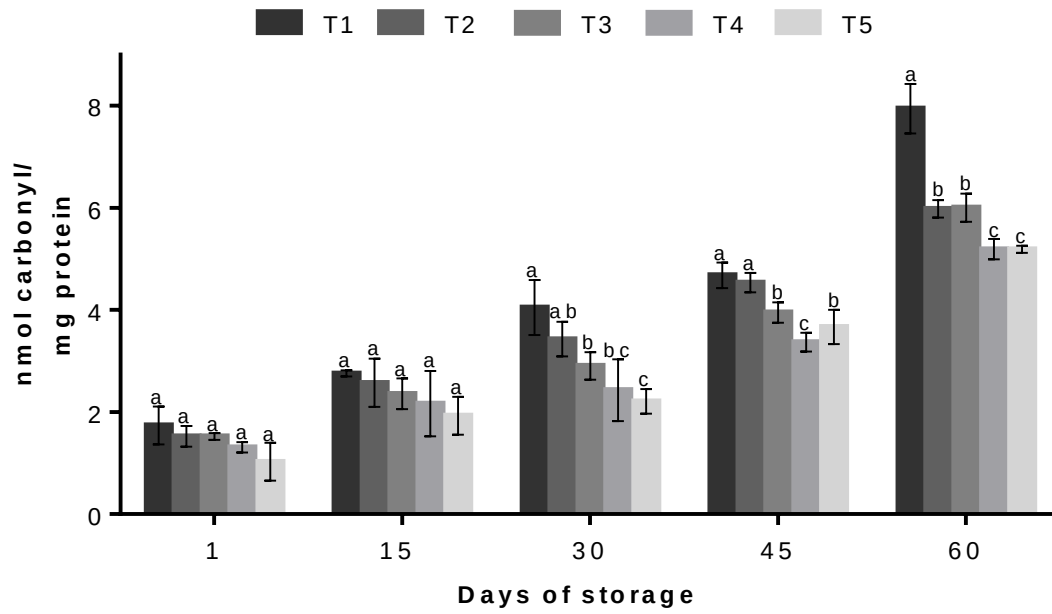


Table 1. Chemical composition, pH and water activity (mean $\pm$ SD) of mechanically separated back (MSB) and surimi gel samples produced from bullfrog meat.

	MSB	T1	T2	T3	T4	T5
Moisture ^B	78.4 ^a $\pm$ 0.3	77.34 ^a $\pm$ 0.1	77.32 ^a $\pm$ 0.3	75.47 ^b $\pm$ 0.4	75.62 ^b $\pm$ 0.5	75.51 ^b $\pm$ 0.4
Ash ^B	2.19 ^a $\pm$ 0.6	1.91 ^b $\pm$ 0.2	1.89 ^b $\pm$ 0.2	1.86 ^c $\pm$ 0.3	1.44 ^d $\pm$ 0.1	1.43 ^d $\pm$ 0.2
Protein ^B	16.44 ^a $\pm$ 1.7	15.09 ^{bc} $\pm$ 0.8	13.46 ^c $\pm$ 0.7	14.59 ^{bc} $\pm$ 0.4	15.91 ^{ab} $\pm$ 0.3	14.64 ^{bc} $\pm$ 0.1
Lípid ^B	2.43 ^a $\pm$ 0.1	1.75 ^b $\pm$ 0.2	1.26 ^c $\pm$ 0.2	1.20 ^c $\pm$ 0.2	1.13 ^c $\pm$ 0.1	1.03 ^c $\pm$ 0.3
Carbohydrate ^B	0.78 ^d $\pm$ 0.1	4.39 ^c $\pm$ 1.2	6.59 ^{ab} $\pm$ 1.1	5.44 ^{bc} $\pm$ 0.6	6.94 ^a $\pm$ 0.4	6.88 ^a $\pm$ 0.6
pH	6.5 ^c $\pm$ 0.2	7.2 ^b $\pm$ 0.1	7.2 ^b $\pm$ 0.3	7.0 ^c $\pm$ 0.3	7.1 ^b $\pm$ 0.2	7.5 ^a $\pm$ 0.2
aw	0.992 ^a $\pm$ 0.0	0.988 ^b $\pm$ 0.01	0.983 ^c $\pm$ 0.0	0.983 ^c $\pm$ 0.0	0.980 ^c $\pm$ 0.0	0.982 ^c $\pm$ 0.0
Fatty acid profile^c						
C12	0.51 ^a $\pm$ 0.01	0.39 ^{bc} $\pm$ 0.19	0.29 ^{bc} $\pm$ 0.13	0.26 ^c $\pm$ 0.07	0.21 ^c $\pm$ 0.03	0.23 ^c $\pm$ 0.04
C14	0.25 ^a $\pm$ 0.02	0.23 ^a $\pm$ 0.05	0.16 ^b $\pm$ 0.01	0.15 ^b $\pm$ 0.03	0.19 ^{ab} $\pm$ 0.06	0.12 ^b $\pm$ 0.03
C16	2.83 ^a $\pm$ 0.03	1.37 ^b $\pm$ 0.19	1.10 ^c $\pm$ 0.13	1.04 ^c $\pm$ 0.14	1.17 ^c $\pm$ 0.01	0.90 ^{cd} $\pm$ 0.07
C16:1	0.90 ^a $\pm$ 0.02	0.44 ^a $\pm$ 0.07	0.31 ^c $\pm$ 0.04	0.34 ^c $\pm$ 0.06	0.36 ^c $\pm$ 0.01	0.27 ^d $\pm$ 0.02
C17	0.02 ^a $\pm$ 0.01	0.03 ^a $\pm$ 0.01	0.03 ^a $\pm$ 0.00	0.03 ^a $\pm$ 0.00	0.03 ^a $\pm$ 0.00	0.02 ^a $\pm$ 0.00
C17:1	0.05 ^b $\pm$ 0.01	0.09 ^a $\pm$ 0.01	0.06 ^b $\pm$ 0.01	0.07 ^{ab} $\pm$ 0.01	0.08 ^{ab} $\pm$ 0.00	0.06 ^a $\pm$ 0.00
C18	0.59 ^a $\pm$ 0.02	0.31 ^b $\pm$ 0.04	0.26 ^{bc} $\pm$ 0.03	0.25 ^c $\pm$ 0.01	0.29 ^{bc} $\pm$ 0.01	0.21 ^c $\pm$ 0.02
C18:1n9c	4.48 ^a $\pm$ 0.04	1.91 ^b $\pm$ 0.27	1.41 ^c $\pm$ 0.16	1.37 ^c $\pm$ 0.15	1.48 ^c $\pm$ 0.01	1.13 ^d $\pm$ 0.09
C18:2n6c	3.10 ^a $\pm$ 0.02	1.42 ^b $\pm$ 0.24	1.11 ^{bc} $\pm$ 0.13	1.02 ^c $\pm$ 0.15	1.12 ^c $\pm$ 0.01	0.90 ^d $\pm$ 0.07
C18:3n6	0.06 ^{ab} $\pm$ 0.01	0.05 ^a $\pm$ 0.03	0.02 ^b $\pm$ 0.00	0.02 ^b $\pm$ 0.00	0.02 ^b $\pm$ 0.00	0.02 ^b $\pm$ 0.00
C20	0.07 ^b $\pm$ 0.00	0.06 ^a $\pm$ 0.04	0.06 ^a $\pm$ 0.01	0.05 ^a $\pm$ 0.01	0.06 ^a $\pm$ 0.01	0.05 ^a $\pm$ 0.00
C20:1	0.23 ^a $\pm$ 0.01	0.01 ^b $\pm$ 0.00	0.01 ^b $\pm$ 0.00	0.01 ^b $\pm$ 0.00	0.01 ^b $\pm$ 0.00	0.01 ^b $\pm$ 0.00
C20:3n6	0.05 ^a $\pm$ 0.01	0.04 ^{ab} $\pm$ 0.02	0.04 ^{ab} $\pm$ 0.01	0.03 ^b $\pm$ 0.00	0.03 ^b $\pm$ 0.00	0.03 ^b $\pm$ 0.01
C20:4n6	0.25 ^a $\pm$ 0.01	0.17 ^b $\pm$ 0.04	0.16 ^b $\pm$ 0.01	0.11 ^{bc} $\pm$ 0.02	0.16 ^b $\pm$ 0.01	0.10 ^c $\pm$ 0.01
C22:6n3	0.23 ^a $\pm$ 0.03	0.17 ^{ab} $\pm$ 0.06	0.18 ^{ab} $\pm$ 0.02	0.13 ^b $\pm$ 0.09	0.12 ^b $\pm$ 0.05	0.11 ^c $\pm$ 0.06
Σ SFA ^D	31.8	36.5	37.2	41.1	37.8	37.6
Σ MUFA ^D	41.6	36.5	34.5	34.2	35.2	36.6
Σ PUFA ^D	27.1	27.7	29.2	25.9	27.8	26.8
n-6/n-3	15	9,8	7,3	11,0	9,5	9,1

MSB - Mechanically separated back

^A Statistical significance in ANOVA test;^B Data expressed as g/100 g sample.^C Data expressed in g / 100 g of sample (dry basis).^D Data expressed as percentage (%).Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Table 2. Aminoacids profile (mean $\pm$ SD) of mechanically separated back (MSB) and surimi gel samples produced from bullfrog meat.

Aminoacids ^B	MSB	T1	T2	T3	T4	T5	WHO/FAO /UNU**
Histidina*	14.6 ^a $\pm$ 0.22	13.7 ^{ab} $\pm$ 0.77	12.2 ^c $\pm$ 0.74	12.2 ^c $\pm$ 0.29	13.4 ^b $\pm$ 0.33	11.5 ^c $\pm$ 0.41	15.0
Isoleucina*	32.8 ^a $\pm$ 0.64	30.7 ^{ab} $\pm$ 1.89	27.4 ^d $\pm$ 1.77	27.5 ^{cd} $\pm$ 0.67	30.1 ^{bc} $\pm$ 0.52	25.7 ^d $\pm$ 0.79	30.0
Leucina*	59.1 ^a $\pm$ 0.84	50.6 ^{ab} $\pm$ 2.98	45.1 ^c $\pm$ 2.82	45.3 ^c $\pm$ 1.06	49.6 ^b $\pm$ 1.01	42.5 ^c $\pm$ 1.40	59.0
Lisina*	64.2 ^a $\pm$ 0.75	60.1 ^{ab} $\pm$ 3.38	53.6 ^c $\pm$ 3.25	53.8 ^c $\pm$ 1.26	58.9 ^b $\pm$ 1.43	50.5 ^c $\pm$ 1.80	45.0
Fenil + Tiros*	51.0 ^a $\pm$ 1.00	47.8 ^a $\pm$ 2.85	42.6 ^b $\pm$ 1.75	42.8 ^b $\pm$ 2.06	46.8 ^a $\pm$ 1.03	40.2 ^b $\pm$ 1.10	38.0
Met + Cist*	23.6 ^a $\pm$ 0.38	22.1 ^a $\pm$ 1.31	19.7 ^b $\pm$ 1.24	19.7 ^b $\pm$ 0.47	21.7 ^a $\pm$ 0.43	18.5 ^b $\pm$ 0.60	22.0
Treonina*	37.3 ^a $\pm$ 0.54	34.9 ^{ab} $\pm$ 2.03	31.1 ^c $\pm$ 1.93	31.2 ^c $\pm$ 0.73	34.2 ^b $\pm$ 0.73	29.3 ^c $\pm$ 0.98	23.0
Triptofano*	7.8 ^a $\pm$ 0.89	7.3 ^a $\pm$ 1.05	6.5 ^a $\pm$ 0.91	6.5 ^a $\pm$ 0.69	7.1 ^a $\pm$ 0.60	6.1 ^a $\pm$ 0.53	6.0
Valina*	39.7 ^a $\pm$ 0.47	32.5 ^{ab} $\pm$ 1.87	28.9 ^c $\pm$ 1.78	29.1 ^c $\pm$ 0.68	31.8 ^b $\pm$ 0.71	27.2 ^c $\pm$ 0.94	39.0
Ácido Aspártico	60.5 ^a $\pm$ 0.82	60.5 ^{ab} $\pm$ 3.45	54.0 ^c $\pm$ 3.30	54.2 ^c $\pm$ 1.27	59.3 ^b $\pm$ 1.38	50.8 ^c $\pm$ 1.78	-
Ácido Glutâmico	110.9 ^a $\pm$ 1.77	110.2 ^{ab} $\pm$ 6.45	100.1 ^c $\pm$ 6.22	100.6 ^c $\pm$ 2.35	110.0 ^b $\pm$ 2.33	94.2 ^c $\pm$ 3.15	-
Alanina	40.0 ^a $\pm$ 0.60	37.9 ^{ab} $\pm$ 2.11	33.8 ^d $\pm$ 2.04	33.9 ^{cd} $\pm$ 0.80	37.0 ^{bc} $\pm$ 0.78	31.7 ^d $\pm$ 1.06	-
Arginina	50.5 ^a $\pm$ 0.74	51.4 ^{ab} $\pm$ 2.95	45.9 ^c $\pm$ 2.82	46.0 ^c $\pm$ 1.07	50.4 ^b $\pm$ 1.14	43.2 ^c $\pm$ 1.49	-
Glicina	43.7 ^a $\pm$ 0.65	40.8 ^{ab} $\pm$ 2.29	36.4 ^c $\pm$ 2.20	36.5 ^c $\pm$ 0.86	40.0 ^b $\pm$ 0.97	34.3 ^c $\pm$ 1.15	-
Prolina	32.5 ^a $\pm$ 0.40	30.4 ^{ab} $\pm$ 1.72	27.1 ^c $\pm$ 1.65	27.2 ^c $\pm$ 0.64	29.8 ^b $\pm$ 0.70	25.5 ^c $\pm$ 0.90	-
Serina	35.0 ^a $\pm$ 0.43	32.7 ^{ab} $\pm$ 1.86	29.2 ^c $\pm$ 1.78	29.3 ^c $\pm$ 0.69	32.1 ^b $\pm$ 0.79	27.5 ^c $\pm$ 0.97	-
Total –S	23.6	22.1	19.7	19.8	21.6	18.5	
*AA. Essenciais	288.0	260.3	232.1	232.9	255.0	218.4	
Total de AA	721.1	665.9	593.6	596.0	652.2	558.7	

MSB - Mechanically separated back; ** RDA for adults from FAO/WHO/UNU (2007)

^A Statistical significance in ANOVA test;^B mg de protein /g de sample.

Different letters denote significant differences (p<0.05) between treatments.

Table 3. Water holding capacity (WHC) and texture profile (mean $\pm$ SD) of surimi gel samples produced from bullfrog MSB meat during refrigerated storage (1 to 60 days at + 4 ° C).

	Day	T1	T2	T3	T4	T5
WHC (%)	1	82.1 ^b $\pm$ 1.0	85.0 ^a $\pm$ 0.7	81.5 ^b $\pm$ 0.6	79.1 ^c $\pm$ 0.5	81.9 ^b $\pm$ 1.0
	15	80.1 ^a $\pm$ 1.0	79.9 ^a $\pm$ 1.0	79.0 ^{ab} $\pm$ 1.6	77.7 ^{ab} $\pm$ 1.6	76.3 ^b $\pm$ 0.6
	30	77.5 ^a $\pm$ 1.0	77.8 ^a $\pm$ 1.5	76.8 ^a $\pm$ 0.3	77.4 ^a $\pm$ 0.5	75.6 ^a $\pm$ 1.1
	45	73.4 ^b $\pm$ 0.7	76.5 ^a $\pm$ 0.6	73.1 ^b $\pm$ 1.6	72.9 ^b $\pm$ 0.5	76.4 ^a $\pm$ 1.0
	60	73.4 ^a $\pm$ 1.0	71.5 ^{ab} $\pm$ 1.8	68.8 ^{bc} $\pm$ 1.4	67.6 ^c $\pm$ 1.8	72.7 ^a $\pm$ 0.6
Hardness (g)	1	264.3 ^e $\pm$ 17.9	325.6 ^d $\pm$ 11.7	390.3 ^c $\pm$ 6.1	432.9 ^b $\pm$ 24.6	570.2 ^a $\pm$ 9.2
	15	443.9 ^b $\pm$ 12.2	477.3 ^b $\pm$ 4.1	446.7 ^b $\pm$ 12.7	549.9 ^a $\pm$ 25.9	586.3 ^a $\pm$ 6.5
	30	427.3 ^d $\pm$ 6.9	489.2 ^{bc} $\pm$ 23.4	466.2 ^{cd} $\pm$ 21.7	535.5 ^{ab} $\pm$ 29.7	573.9 ^a $\pm$ 5.2
	45	463.6 ^c $\pm$ 10.8	602.8 ^b $\pm$ 19.8	486.2 ^c $\pm$ 10.7	585.9 ^b $\pm$ 11.0	724.4 ^a $\pm$ 21.9
	60	568.5 ^c $\pm$ 28.0	651.9 ^b $\pm$ 27.2	545.8 ^c $\pm$ 10.6	584.2 ^c $\pm$ 16.5	792.4 ^a $\pm$ 10.8
Springiness	1	0.68 ^a $\pm$ 0.10	0.52 ^a $\pm$ 0.04	0.54 ^a $\pm$ 0.02	0.63 ^a $\pm$ 0.04	0.55 ^a $\pm$ 0.09
	15	0.86 ^a $\pm$ 0.00	0.63 ^b $\pm$ 0.07	0.77 ^{ab} $\pm$ 0.13	0.80 ^{ab} $\pm$ 0.10	0.58 ^b $\pm$ 0.01
	30	0.84 ^a $\pm$ 0.01	0.63 ^{bc} $\pm$ 0.01	0.74 ^{ab} $\pm$ 0.02	0.84 ^a $\pm$ 0.05	0.60 ^c $\pm$ 0.08
	45	0.87 ^a $\pm$ 0.07	0.86 ^a $\pm$ 0.03	0.84 ^a $\pm$ 0.02	0.85 ^a $\pm$ 0.03	0.61 ^b $\pm$ 0.11
	60	0.94 ^a $\pm$ 0.05	0.86 ^a $\pm$ 0.02	0.84 ^a $\pm$ 0.01	0.86 ^a $\pm$ 0.02	0.65 ^b $\pm$ 0.09
Cohesiveness	1	0.46 ^a $\pm$ 0.02	0.41 ^a $\pm$ 0.01	0.47 ^a $\pm$ 0.02	0.47 ^a $\pm$ 0.03	0.44 ^a $\pm$ 0.04
	15	0.54 ^a $\pm$ 0.01	0.44 ^b $\pm$ 0.04	0.43 ^b $\pm$ 0.04	0.46 ^b $\pm$ 0.02	0.43 ^b $\pm$ 0.00
	30	0.53 ^a $\pm$ 0.00	0.43 ^c $\pm$ 0.03	0.47 ^{bc} $\pm$ 0.01	0.51 ^{ab} $\pm$ 0.03	0.47 ^{bc} $\pm$ 0.01
	45	0.54 ^a $\pm$ 0.02	0.47 ^a $\pm$ 0.04	0.49 ^a $\pm$ 0.06	0.54 ^a $\pm$ 0.04	0.47 ^a $\pm$ 0.04
	60	0.72 ^a $\pm$ 0.02	0.51 ^b $\pm$ 0.01	0.55 ^b $\pm$ 0.04	0.56 ^b $\pm$ 0.02	0.53 ^b $\pm$ 0.02
Gumminess	1	121.7 ^c $\pm$ 5.9	134.5 ^c $\pm$ 9.7	181.5 ^b $\pm$ 8.3	203.8 ^b $\pm$ 2.5	2501.1 ^a $\pm$ 2.4
	15	239.2 ^a $\pm$ 2.9	208.5 ^{ab} $\pm$ 17.1	190.7 ^b $\pm$ 5.5	254.4 ^a $\pm$ 2.6	249.7 ^a $\pm$ 1.2
	30	226.6 ^b $\pm$ 3.2	212.5 ^b $\pm$ 15.8	219.3 ^b $\pm$ 6.4	272.5 ^a $\pm$ 8.6	268.9 ^a $\pm$ 8.1
	45	251.6 ^b $\pm$ 17.4	284.7 ^{ab} $\pm$ 20.3	238.5 ^b $\pm$ 4.3	315.5 ^a $\pm$ 7.3	338.7 ^a $\pm$ 5.5
	60	409.2 ^a $\pm$ 12.8	333.5 ^b $\pm$ 7.8	302.6 ^b $\pm$ 9.9	325.1 ^b $\pm$ 16.5	418.0 ^a $\pm$ 6.3
Chewiness (g)	1	56.2 ^b $\pm$ 4.1	55.6 ^b $\pm$ 6.0	84.5 ^{ab} $\pm$ 8.0	96.2 ^a $\pm$ 7.9	110.3 ^a $\pm$ 4.0
	15	128.9 ^a $\pm$ 0.9	91.6 ^b $\pm$ 15.6	82.0 ^b $\pm$ 9.9	117.9 ^{ab} $\pm$ 6.5	106.4 ^{ab} $\pm$ 7.5
	30	120.2 ^{ab} $\pm$ 2.0	92.6 ^c $\pm$ 11.2	103.2 ^{bc} $\pm$ 1.9	139.1 ^a $\pm$ 12.6	126.1 ^{ab} $\pm$ 6.8
	45	136.8 ^a $\pm$ 15.8	135.0 ^a $\pm$ 9.1	118.1 ^a $\pm$ 8.8	170.4 ^a $\pm$ 3.4	158.9 ^a $\pm$ 4.1
	60	294.7 ^a $\pm$ 3.3	170.6 ^b $\pm$ 2.0	168.2 ^b $\pm$ 20.0	181.1 ^b $\pm$ 5.5	220.8 ^b $\pm$ 9.2

Statistical significance in ANOVA test;

Different letters on the line denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 024450 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal da Paraíba

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: cit@prpg.ufpb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): METODO DE FABRICAÇÃO DE SURIMI COM CARNE DE RÃ-TOURO

Resumo: A presente invenção refere-se a um método de fabricação de surimi e produto derivado a partir da carne de rã-touro. O presente método, permite o aproveitamento do dorso, co-produto do abate da rã, e resulta na obtenção de um produto alimentício altamente nutritivo, rico em proteína animal, e com preço acessível a todas as classes sociais. O presente pedido descreve adicionalmente, as condições adequadas para elaboração de um produto derivado, o kamaboko. A invenção amplia a aplicação dos derivados da carne de rã-touro, contribuindo assim para o aproveitamento e valorização da cadeia produtiva da rã.

“METODO DE FABRICAÇÃO DE SURIMI COM CARNE DE RÃ-TOURO”

[001] A presente invenção refere-se ao método de fabricação de um surimi elaborado com carne proveniente da desossa mecânica do dorso da rã-touro (*Lithobates catesbeiana*), e sua aplicação na elaboração de um produto derivado. A presente invenção tem como aspecto suplementar a possibilidade da utilização do surimi na elaboração de inúmeros outros novos produtos com alto valor agregado, que venham a contribuir para o crescimento da ranicultura no Brasil, bem como a tender à necessidade social de demanda por proteína de origem animal de primeira qualidade por um preço mais acessível.

[002] No corrente estado da técnica, verifica-se alguns processos de fabricação de surimi, a partir de diferentes carne de pescado, como também diferentes produtos elaborados com carne de rã. No entanto, não consta na literatura nenhum método de fabricação de surimi e produto derivado elaborado com carne de rã-touro (*Lithobates catesbeiana*).

[003] A seguir, estão elencadas algumas patentes relevantes, que apresentam, métodos de fabricação de produtos de pescados, e produtos com carne de rã semelhantes ao proposto neste documento:

[003] A patente US4816278A intitulada “Método de processamento e tratamento de matérias-primas de produtos marinhos” publicada em 28 de março de 1989, refere-se ao novo método de processamento e o tratamento de matérias-primas de produtos marinhos, tais como peixes, mariscos, crustáceos, moluscos, e algas, misturados com um aditivo de mistura opcional, como proteína de soja, farinha de trigo e/ou amido, por meio de um extrusora de parafuso, resultando em um produto de qualidades e características sensoriais diferentes da matéria-prima de origem. Diferente deste projeto de patente que utiliza carne de rã como matéria-prima para elaboração do surimi.

[004] A patente de invenção US4158065A intitulada “Método de preparação de substituto de carne de caranguejo” publicada em 13 de maio de 1986, refere-se ao método de produção de um produto tipo pasta de carne de

lagosta caracterizado pela textura moderadamente firme, e quando se mastiga, há uma sensação elástica e boa na boca, diferente da sensação que é obtida quando se come carne de lagosta natural. No presente invento, a pasta de peixe aquecida (kamaboko) é misturada com aditivos e proteínas, à pressão atmosférica, seguida por moldagem da mistura em máquina de moldar automática em que a pressão reduzida seja mantida. Nossa invenção é semelhante a essa patente, porém difere na matéria prima utilizada (carne de rã), e não utilizamos pressão reduzida.

[005] A patente de invenção US4584204A intitulada “Método para a preparação de um produto de carne de peixe, como camarão” publicada em 22 de abril de 1986, a invenção refere-se a um produto semelhante em textura e sabor de camarão e é constituído essencialmente de carne de peixe. Esse produto é basicamente um gel obtido a partir de fibras de músculo de peixe, com preparo semelhante ao processo de elaboração de surimi, que é um produto intermediário, que é usado como agente ligante no preparo do “kamaboko”. A mistura resultante é moldada em forma de camarão descascado, revestido na superfície com um agente de coloração apropriado e aquecido. Este produto é semelhante ao elaborado neste pedido de patente, porém eles diferem na carne utilizada para elaboração do surimi e kamaboko, e também que nosso trabalho não utilizou agente de coloração.

[006] A patente de invenção CN 102309016B intitulada “Método para processamento frito de tiras crocante de rã florestais chinês” publicada em 05 de dezembro de 2012, refere-se à elaboração de um produto semelhante a um salgadinho extrusado elaborado com água, especiarias, pó de arroz, milho, e resíduo de carne de rã (*Liangshai*) seca em pó. Além do aproveitamento do resíduo de rã, esta invenção tem como objetivo mudar a forma de se consumir carne de rã, bem como suprir as limitações sazonais e geográficas fornecidas em diferentes épocas, em diferentes regiões sendo capaz de se consumir um produto delicioso e nutritivo. Este produto é diferente do proposto neste pedido de patente, como também trata-se de uma espécie diferente de rã, a *Liangshai*.

[007] A patente CN103191156A intitulada “Salsicha de carne de rã” publicada em 28 de abril de 2014, refere-se a elaboração de uma salsicha com carne de rã com o objetivo de proporcionar um elevado teor de açúcar no sangue. Para tanto é adicionado a massa além da carne de rã picada no moedor de carne, uma mistura de molho de soja, pimenta da Jamaica, lycopodium clavatum extrato fluido em pó, xilitol, sal e licor. Todos os ingredientes são misturados em um recipiente até formar uma pasta uniforme. A pasta é embutida em máquina de salsicha. Este produto tem elaboração e ingredientes diferentes do produto elaborado neste pedido de patente, o surimi.

[008] A patente CN103519192A intitulada “Alimento de carne de rã” publicada em 22 de janeiro de 2014, trata-se da elaboração de um alimento tipo almôndegas elaborado com carne de rã, que tem potencial de prevenção de doenças hiperlipidemia. Além da carne de rã a formulação compreende, folhas de diferentes medicamentos em pó, anis, sal, açúcar, frango em pó, clara de ovo, shimizu, amido de milho, molho de alho. Entre outras as vantagens a invenção possui sabor doce, é uma nova forma de se consumir carne de rã, tipo almôndegas, além da função de cuidados com a saúde. Este produto tem elaboração e ingredientes diferentes do produto final deste pedido de patente, o kamaboko.

[009] A patente CN104872668A intitulada “Tecnologia de processamento de fatias da carne de rã-touro secas” publicada em 02 de setembro de 2015, refere-se a uma tecnologia de processamento de carne de rã touro seca em fatias. A tecnologia de processamento compreende os processos tecnológicos de desodorização, cura, tempero, fatiação e espalhamento, secagem, cozimento e embalagem (à vácuo, tipo jerky). O custo de produção dos produtos é baixo, o processo é simples, e a produção industrial é facilitada. O valor nutricional e a integridade sanitária das rãs são preservados, e vários tipos de temperos em pó ainda são acrescentados, de modo que a carne de rã-touro seca em fatias trazem benéficos a saúde, além de ser um produto natural, delicado, com qualidade na carne, delicioso em sabor, prático e conveniente para comer. No entanto trata-

se de um produto seco, diferente do surimi e kamaboko elaborados com carne de rã-touro.

[010] A presente invenção difere de todos os processos anteriormente descritos no estado da técnica, pelo fato de se usar como matéria prima carne do dorso da rã-touro desossado mecanicamente. A invenção aqui descrita, permite ofertar ao consumidor um produto inovador em relação aos descritos acima, a elaboração de surimi com carne proveniente de desossa mecânica do dorso da rã-touro, proporciona uma nova abordagem para o aproveitamento e utilização desse co-produto. Além de agregar valor ao dorso esta invenção irá contribuir para a valorização dos derivados da cadeia produtiva de rã, visando colocar no mercado um novo produto, com alto valor agregado e que venha a satisfazer as necessidades dos consumidores e produtores.

[011] O aumento no consumo de carne de pescado tem levado aos produtores e as indústrias de beneficiamento a preocupação do gerenciamento dos resíduos que são gerados no processamento, bem como o aproveitamento integral do animal. Muitos desses resíduos sólidos são destinados à alimentação animal. O alto valor nutricional desses resíduos, ricos em proteínas e ácidos graxos, motiva o desenvolvimento de produtos para a alimentação humana. A utilização de tecnologias com esta finalidade aumenta a capacidade da indústria da pesca de não só oferecer produtos diferenciados, mas também à tendência da busca por alimentos saudáveis e com alto valor nutritivo, suprimindo as necessidades nutricionais de proteínas animais, dos setores carentes da população, por um preço mais acessível.

[012] Entre outras tecnologias, a elaboração de surimi se destaca como processo que permite o aproveitamento máximo dos recursos alimentares disponíveis e a utilização de espécies de baixo valor comercial, como subprodutos do processamento industrial, a exemplo do que ocorre com alguns pescados, suínos, bovinos e frangos. O surimi é um extrato de proteínas miofibrilares, obtido a partir da carne mecanicamente separada (CMS) ou de resíduos da filetagem de diferentes espécies, submetido a lavagens sucessivas e adicionado de crioprotetores. Ao final do processamento o produto é uma pasta

branca, sem o odor e sabor característico, tornando-se matéria-prima que pode servir de base para a elaboração de ampla gama de produtos.

[013] A ranicultura é um campo em destaque no setor de pescado, principalmente no continente asiático e em alguns países da Europa. No Brasil a criação de rã iniciou no ano de 1935, e desde então a ranicultura vem ganhando força de produção e espaço tanto no mercado nacional, quanto para a exportação. Hoje o Brasil ocupa a 4º posição mundial, e é o maior produtor e exportador da América latina. O país possui 170 estabelecimentos de criação de rã, gerando uma produção de cerca de 160 toneladas/ano.

[014] A carne de rã é uma das delícias da gastronomia internacional, fazendo parte do portfólio premium da alta gastronomia. A exótica carne de rã está no conjunto das mais nobres fontes de pescado existentes. Ela está inserida no grupo dos alimentos funcionais, pois além de sabor característico, ela possui propriedades nutricionais que atraem pessoas interessadas em produtos alimentares que trazem benefícios à saúde, como alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, grandes quantidades de aminoácidos essenciais, além de possuir boa biodisponibilidade de cálcio e ferro. Por isso é indicada em dietas hipocalóricas, além de ser utilizada em doenças gastrointestinais e alérgicas de várias origens. Apesar de ser uma das delícias da gastronomia internacional, e de apresentar alta qualidade nutricional, a carne de rã enfrenta sérios desafio quanto ao aproveitamento integral da carcaça. As coxas, corte principal, tem maior valor comercial, porém representa apenas 26% da carcaça, enquanto que o dorso, responsável por quase metade do peso da carcaça, é praticamente descartado após o abate.

[015] O dorso da rã-touro, é um exemplo de corte que é praticamente perdido no abate. A carne do dorso apresenta alto valor nutricional e potencial fisiológico, porém existem poucas alternativas para o aproveitamento desse material.

[016] A elaboração de surimi com carne proveniente da desossa mecânica do dorso da rã-touro, proporciona uma nova abordagem para o aproveitamento e utilização do dorso. Deste modo a utilização do dorso para produção de surimi

e derivados é uma nova alternativa para agregar valor ao dorso, bem como valorizar os derivados da cadeia produtiva de rã.

[017] No âmbito da presente invenção, o surimi e produto derivado foi obtido a partir de lavagens sucessivas da carne do dorso de rãs-touro (*Lithobates catesbeiana*). O processo para obtenção do surimi elaborado com carne do dorso mecanicamente separado de rã-touro, em suma, compreende os seguintes passos: a) obtenção da carne do dorso através de desossa mecânica; b) lavagens sucessivas com água gelada; c) drenagem em peneira; d) compressão em prensa manual e e) adição de crioprotetores. O processo de lavagem foi realizado com controle das condições de temperatura da água, para evitar desnaturação protéica.

[018] A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada, onde:

[019] O processo inicia a partir na etapa de obtenção do dorso mecanicamente separado (DMS) da rã-touro, através de um desossador mecânico, seguido da etapa de pesagem do DMS, sendo esse passo necessário para o cálculo da quantidade de água que é utilizada nas lavagens do surimi. Após a pesagem o DMS é submetido a quatro lavagens em recipiente de polietileno, utilizando uma proporção de 3:1 (água/DMS), a temperatura da água não pode ultrapassar os 5 ° C, agita-se levemente por 10 minutos.

[020] Após cada ciclo, o lavado (DMS) é drenado em peneira de aço inox (Ø 32 mesh), e ao final do processamento a polpa é drenada em tela de nylon e comprimida em prensa manual de aço inox durante 10 minutos. No final do processamento, o surimi é pesado e adicionado de 4% sorbitol e 0,2% de tripolifosfato de sódio como agentes crioprotetores. A massa do surimi é embalada em sacos de polietileno e armazenado a temperatura de 4 ° C, O rendimento do surimi é definido pela Equação 1:

$$\text{EQ (1)} \quad R (\%) = \frac{PT_{\text{DMS}}}{P_{\text{Surimi}}} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: R (%) = rendimento do surimi; PT_{DMS} = peso total do dorso mecanicamente separado; P_{surimi} = peso final da massa do surimi.

[021] Para elaboração do produto derivado, o kamaboko, foi dada continuação ao processo, adicionando-se a massa do surimi 2% de cloreto de sódio e amido de milho, os ingredientes foram homogeneizados em um processador de alimentos a baixa velocidade. Foi adicionado ainda, 0,3 % de sabor do caranguejo (SY- Y06008) para intensificar o sabor, e água gelada (± 5 °C) para ajustar o teor de umidade.

[022] As pastas assim obtidas foram embutidas em invólucro de polietileno ($\varnothing 2.5$ cm) e ambas as extremidades seladas hermeticamente. As amostras de kamaboko foram cozidas em banho maria a 90 °C durante 30 minutos.

[023] Após o cozimento as amostras de kamaboko são resfriadas em banho de gelo (± 1 °C), os invólucros de polietileno são removidos e as amostras embaladas à vácuo, e armazenadas a temperatura de refrigeração (± 5 °C).

REIVINDICAÇÕES

1) “Metodo de fabricação de surimi com carne de rã-touro”

Caracterizado por obtenção de surimi a partir da carne de rãs-touro.

2) “Metodo de fabricação de surimi com carne de rã-touro” de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por:

- a) Utilização de um co-produto da industria da ranicultura com potencial aproveitamento;
- b) Transformação do dorso mecanicamente separado (DMS) de rã-touro em surimi;
- c) Aplicação do surimi obtido do DMS de rã na fabricação de produto derivado, o kamaboko.

3) “Metodo de fabricação de surimi com carne de rã-touro” de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por utilizar o dorso da rã, que possui baixo valor comercial, com o objetivo de criar alternativas para agregar valor a esse co-produtos do abate da rã;

4) “Metodo de fabricação de surimi com carne de rã-touro” de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por utilizar o surimi produzido com carne de rã, para elaboração de um produto derivado tipo kamaboko, preparado a partir da mistura da massa do surimi e outros ingrediente, embutido e cozido em banho maria a 90 ° C durante 30 min;

5) “Metodo de fabricação de surimi com carne de rã-touro” de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o produto final, tipo kamaboko, apresentar 14,74% de proteína e baixo teor de gordura 1,26%, sendo boa parte dessa gordura composta de ácidos graxos insaturados;

6) “Metodo de fabricação de surimi com carne de rã-touro” de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se tratar de uma nova técnica de aproveitamento do dorso da rã-touro, transformando um resíduo do abate de rã

em matéria prima, rica proteína de origem animal de primeira qualidade por um preço mais acessível, vindo assim a atender à necessidade social da população com renda limitada;

RESUMO

“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE SURIMI COM CARNE DE RÃ-TOURO”

A presente invenção refere-se a um método de fabricação de surimi e produto derivado a partir da carne de rã-touro. O presente método, permite o aproveitamento do dorso, co-produto do abate da rã, e resulta na obtenção de um produto alimentício altamente nutritivo, rico em proteína animal, e com preço acessível a todas as classes sociais. O presente pedido descreve adicionalmente, as condições adequadas para elaboração de um produto derivado, o kamaboko. A invenção amplia a aplicação dos derivados da carne de rã-touro, contribuindo assim para o aproveitamento e valorização da cadeia produtiva da rã.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) Foi viável a utilização do dorso mecanicamente separado (DMS) na elaboração de surimi, e este por sua vez, pôde ser empregado na elaboração de um gel de surimi similar aos produtos disponíveis no mercado, com característica físico-químicas e sensoriais semelhantes;
- b) O aumento do número de ciclos de lavagens e concentração de amido foi fator determinante no processamento do gel, pois influenciou significativamente os parâmetros de qualidade estudados. O tratamento cinco, com quatro lavagens e 15% de amido foi o melhor tratamento para alcançar a melhoria da cor e fortalecimento do gel de surimi;
- c) O mecanismo de obtenção e elaboração do gel de surimi não causaram limitações nas características físico-químicas, nem perdas significativas qualidade nutricional, visto que todos os tratamentos de gel exibiram boas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e a presença de todos os aminoácidos essenciais;
- d) O aumento do número de ciclos de lavagem foi um método eficaz para reduzir a formação dos compostos indicadores da oxidação lipídica e protéica durante o armazenamento, pois os tratamentos com maior número de lavagens apresentaram os menores valores desses compostos;
- e) A preferência sensorial dos consumidores foi por géis mais firmes e brancos, isso conduziu a escolha dos tratamentos com maior número de lavagens e maior concentração de amido, embora todos os tratamentos apresentaram médias do índice de aceitação acima de 70%;

- f) A elaboração de gel de surimi com DMS de rãs-touro, é uma técnica viável e uma estratégia promissora para melhorar aproveitamento do dorso e valorizar os subprodutos derivados da cadeia produtiva da ranicultura.

Por fim, apesar da redução do número de lavagens ser importante para diminuição das águas residuais e os descartes no meio ambiente, vimos que existe outra possibilidade para o aproveitamento das mesmas, como a recuperação das proteínas solúveis. Essas proteínas recuperadas podem ser liofilizadas e utilizadas na elaboração de biofilmes comestíveis, para aplicação em alimentos, ou mesmo serem inseridas em alguns produtos visando o enriquecimento proteico.

ANEXOS**ANEXO A**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE GEL DE SURIMI DE CARNE DE RÃ

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: () F () M

Data: ____/____/____

Instruções:

- Você está recebendo 5 amostras diferentes de gel de surimi elaborado com carne de rã;
- Por favor, avalie as amostras utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto segundo os atributos **Aparência, Cor, Odor, Sabor e Textura**. Escreva o código da amostra e classifique de acordo com a numeração da escala que melhor reflita sua opinião:

Escala:

- (9) Gostei extremamente
- (8) Gostei muito
- (7) Gostei moderadamente
- (6) Gostei ligeiramente
- (5) Desgostei
- (4) Desgostei ligeiramente
- (3) Desgostei moderadamente
- (2) Desgostei muito
- (1) Desgostei extremamente

Códigos das amostras	ATRIBUTOS				
	Aparência	Cor	Odor	Sabor	Textura

Observações: _____

OBRIGADA POR SUA CONTRIBUIÇÃO!

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, fui informado satisfatoriamente sobre a pesquisa: **“Aproveitamento do dorso mecanicamente separado da rã-touro (*Lithobates catesbeiana*) na elaboração de um surimi”**, cujo objetivo é agregar valor a um subproduto do abate da rã, o dorso mecanicamente separado (DMS), e contribuir para o crescimento no consumo de produtos de conveniência. Com a finalidade de contribuir para a valorização dos derivados da cadeia produtiva de rã, visando colocar no mercado um novo produto, com alto valor agregado e que venham satisfazer as necessidades dos consumidores e produtores. O trabalho está sendo desenvolvido pela pesquisadora Sinara Pereira Fragoso, aluna do Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em nível de Doutorado da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha.

Solicitamos a sua colaboração para análise sensorial do produto, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde. Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

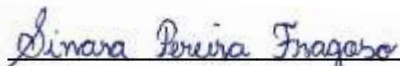
Assinatura do Participante da Pesquisa

Contato com o Pesquisador (a) Responsável: **Sinara Pereira Fragoso.**

Endereço: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial – CHSA/UFPB

- Email: sinarafragoso@hotmail.com Fones: 9992-9482 (tim)

Atenciosamente,



Assinatura do Pesquisador Responsável: Sinara Pereira Fragoso



Assinatura do Pesquisador Participante: Carlos Alberto de Almeida Gadelha

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 4ª Reunião realizada no dia 24/04/2014, o Projeto de pesquisa intitulado: **“APROVEITAMENTO DO DORSO MECANICAMENTE SEPARADO DA RÃ-TOURO (*LITHOBATES CATESBEIANA*) NA ELABORAÇÃO DE SURIMI”** da pesquisadora Sinara Pereira Fragoso. Protocolo 076/14. CAAE: 26681714.3.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andreia Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

ANEXO D

Journal of Food Science and Technology

Effects of number of washes and starch concentration on the quality characteristics of surimi gel from bullfrog meat

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JFST-D-16-02685
Full Title:	Effects of number of washes and starch concentration on the quality characteristics of surimi gel from bullfrog meat
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	SINARA Pereira FRAGOSO Universidade Federal da Paraiba Bananeiras, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal da Paraiba
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	SINARA Pereira FRAGOSO
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	SINARA Pereira FRAGOSO Iris Braz da Silva Araújo Antônio Rosendo da Silva Raquel Fragoso Pereira Marta Suely Madruga Tatiane Santi Gadelha Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The use of the mechanically separated back of the bullfrog in the elaboration of surimi gel provides a new approach for exploiting this co-product. The process of manufacturing surimi requires large amounts of water, which generates residue rich in organic compounds that end up contaminating the environment. A study to possibly reduce the number of washing cycles contributes to a more sustainable production. The objective of this work was to study the effect of the number of washing cycles and concentration of added starch on the quality parameters and texture properties of the surimi gel elaborated with bullfrog meat. Surimi gel was submitted to two, three or four wash cycles and added with 5, 10 or 15% starch. The gel presented means of 76.18% humidity, 14.77% protein, 45.24 whiteness and 43.04 N shear force. The number factor of wash cycles was the one that most affected the studied parameters; it was significant for weight loss after heating, protein, instrumental color (*b and w) and shear force. The best color and strength of the gel were obtained with four wash cycles. Finally, the product was within the pre-established parameters of the literature, making the use of the meat extracted from the back of bullfrog in the elaboration of surimi and derived products totally viable.
Suggested Reviewers:	Mario Estevez, Dr. Universidad de Extremadura mariovet@unex.es University of Extremadura, caceres SPAIN Fabio Anderson Pereira da Silva, Dr. Universidade Federal Rural de Pernambuco

ANEXO E

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-17-00926

Title: Characterization and oxidative stability of surimi gel produced from bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) back meat

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: raniculture; bullfrog; surimi; back meat; lipid and protein oxidation

Corresponding Author: Mrs. SINARA FRAGOSO,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Paraiba

First Author: SINARA FRAGOSO

Order of Authors: SINARA FRAGOSO; Fábio A Pereira da Silva, Dr.; Valquíria C S. Ferreira, Dra.; Maria T Bertoldo Pacheco , Ph.D; Marta S Madruga, Dra.; Tatiane S Gadelha, Dra.; Carlos A A. Gadelha, Dr.

Abstract: Raniculture is a booming economic activity, this growth brings the need for developing technological processes that will take advantage of all the productive chain co-products of frogs. In this study, surimi gels were elaborated using the back meat of bullfrogs, aiming to investigate the effects of numbers of wash cycles and starch concentrations on the physico-chemical and sensory characteristics on oxidative stability during storage. There was decrease the moisture and lipids content, and an increase in the whiteness and hardness of the gels with more washes and starch. Same ones received the highest scores on the sensory evaluation. After 30th day, the products of lipid and protein oxidation presented changes in their values. An increase of washing cycles showed to be effective method to reduce the formation of these compounds. The use of back meat proved to be a possible alternative for using the co-product of this genus in foods.