

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DOUTORADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

CARLA DA SILVA CARNEIRO

**APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR (RMN) DE BAIXO CAMPO PARA
ANÁLISE DO PESCADO PROCESSADO**

**NITERÓI
2013**



CARLA DA SILVA CARNEIRO

**APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE BAIXO
CAMPO PARA ANÁLISE DO PESCADO PROCESSADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Eliane Teixeira Mársico

Prof. Dr. Edgar Francisco Oliveira De Jesus

Niterói, RJ
2013

CARLA DA SILVA CARNEIRO

**APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE BAIXO
CAMPO PARA ANÁLISE DO PESCADO PROCESSADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 04 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dr^a. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO
Universidade Federal Fluminense

Professor Dr. EDGAR FRANCISCO OLIVEIRA DE JESUS
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Professora Dr^a. MÁRCIA BARRETO FEIJÓ
Universidade Federal Fluminense

Professor Dr. CARLOS ADAM CONTE JÚNIOR
Universidade Federal Fluminense

Professor Dr. SÉRGIO BORGES MANO
Universidade Federal Fluminense

Niterói, RJ
2013

*A minha avó Maria Alexandrina da Silva (in memoriam),
pelo exemplo de caráter, generosidade e de tantas outras "coisas" boas
que ficaram em meu coração e em minha memória, com muito amor...*

...dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, minha saúde e pela saúde de todos aqueles próximos a mim.

A querida e sempre orientadora Dr^a. Eliane Teixeira Mársico, meu exemplo de generosidade, força e profissionalismo.

Ao co-orientador Dr. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, pela amizade, ensinamentos generosamente compartilhados e pela oportunidade de tornar possível a realização desta tese.

A amiga e Doutoranda Roberta de Oliveira Resende Ribeiro, pela amizade incontestável e, parceria sempre bem sucedida durante todo curso, através da qual a idealização deste e de muitos outros trabalhos se concretizou.

Aos Professores do Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos da Faculdade de Veterinária, Dr. Sérgio Borges Mano e Dr. Carlos Adam Conte Junior, por toda atenção e cooperação durante esta etapa.

A todos os professores vinculados ao Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária, que transmitiram fundamentais ensinamentos durante a realização deste curso.

Ao pesquisador Dr. Thiago Silveira Álvares, pelo indispensável auxílio nas análises estatísticas.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação, principalmente ao amigo Drausio de Paiva Ferreira, por toda colaboração e apoio.

Ao todos os amigos que fiz durante a pós-graduação, principalmente a Fernanda Lima Cunha e Kênia de Fátima Carrijo, pelo agradável convívio e troca de experiências e, a todos os demais amigos, que por falta de espaço não pude citar.

A minha irmã Yone, por ser um exemplo e, pelas constantes palavras de carinho, motivação e incentivo.

Aos meus pais José e Eunice, por tudo que representam, por todo apoio, amizade e amor incondicional.

Ao meu marido Marcus Vinicius, meu porto seguro, porque com amor o difícil se torna muito fácil.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

"Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

Cora Coralina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS, p. 17

2.1 CONGELAMENTO E COCÇÃO DO CAMARÃO, p. 17

2.1.1 ÁGUA E AS ALTERAÇÕES ESTRUTURA PROTEICA COMPONENTE DO PESCADO, p. 17

2.1.2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO CAMARÃO SUBMETIDO AO CONGELAMENTO E PROCESSAMENTO TÉRMICO, p. 18

2.1.3 USO DE FOSFATOS NA INDÚSTRIA DO PESCADO CONGELADO, p. 19

2.2 SALGA ÚMIDA DO PESCADO E AS ALTERAÇÕES QUE OCORREM DURANTE O ARMAZENAMENTO DO PESCADO SALGADO, p. 20

2.3 APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE BAIXO CAMPO PARA ANÁLISE DE QUALIDADE DO PESCADO, p. 21

3 DESENVOLVIMENTO, p.25

3.1 ARTIGO 1: STUDIES OF THE EFFECT OF SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE ON FROZEN SHRIMP BY PHYSICOCHEMICAL ANALYTICAL METHODS AND LOW FIELD NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (LF ^1H NMR) (Publicado em “LWT - Food Science and Technology”, Elsevier®), p. 26

3.2 ARTIGO 2: QUALITY ATTRIBUTES IN SHRIMP TREATED WITH POLYPHOSPHATE AFTER THAWING AND COOKING: A STUDY USING PHYSICOCHEMICAL ANALYTICAL METHODS AND LOW-FIELD ^1H NMR (Aceito para publicação em 04 de janeiro de 2013 no “Journal of Food Process Engineering”, Wiley Periodicals®), p. 47

3.3 ARTIGO 3: APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE BAIXO CAMPO DE PRÓTONS DE ^1H PARA AVALIAR A MOBILIDADE DA ÁGUA DURANTE O ARMAZENAMENTO DE PESCADO SALGADO (*Sardinella brasiliensis*) (Será enviado para publicação), p. 64

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 79

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 80

6. APÊNDICES, p. 85

6.1 FIGURAS RELATIVAS À ETAPA EXPERIMENTAL, p. 86

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Fig. 1 Sampling, materials and methods. For details, see text, f. 31
- Fig. 2 Continuous relaxation time spectra of thawed shrimp. C120 (—▽—) refers to control immersion in water without polyphosphate for 120 min; 2P60 (—▲—) refers to immersion in a solution of 20g /L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 60 min; GZP (—□—) refers to glazing in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$; and 5P120 (—◆—) refers to immersion in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min, f. 39
- Fig. 3 Correlation between Transverse relaxation time (T_{21}) and water-holding capacity (WHC) in shrimp muscle, according to the different treatments and controls, f. 42
- Fig. 4 Correlation between Transverse relaxation time (T_{21}), a^* (redness—intensity of red color) and b^* (yellowness—intensity of yellow color) in shrimp muscle, according to the different treatments and controls, f.43

ARTIGO 2

- Fig. 1 Correlations between the transversal relaxation time (t_{21}) and moisture in thawed and cooked shrimps, f. 59
- Fig. 2 Correlations between the transversal relaxation time (t_{21}) and cooking losses in thawed and cooked shrimps, f. 60

ARTIGO 3

- Fig. 1 Desenho Experimental, f. 68
- Fig. 2 Correlação entre os valores médios de T_{21} e T_{22} e os padrões de qualidade (bom, regular e ruim) observados de acordo com os resultados dos testes físico-químicos (cocção, amônia e H_2S) no decorrer do tempo de armazenamento em dias, f. 72

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1 Range of the physicochemical quality parameters measured after thawing of shrimp subjected to different polyphosphate and control treatments, f. 37
- Table 2 Range of the LF ^1H NMR parameters obtained in shrimp muscle, according to the different treatments and controls, f. 40

ARTIGO 2

- Table 1 Cooking loss, moisture, and ph in thawed and cooked shrimp, dipped in different concentration of sodium tripolyphosphate (STP) during different times (treatments) and dipped in water without polyphosphate (controls), f. 53
- Table 2 Color and texture of thawed and cooked shrimps, dipped in different concentrations of sodium tripolyphosphate (STP) during different times (treatments), and dipped in water without polyphosphate (controls), f. 56
- Table 3 Transversal relaxation times (LF ^1H NMR) T_{21} and T_{22} in thawed and cooked shrimps, dipped in different concentrations of sodium tripolyphosphate (STP) during different times (treatments) and dipped in water without polyphosphate (controls), f. 58

ARTIGO3

- Tabela 1 Dados de relaxação transversal obtidos por RMN de baixo campo (T_{2b} , T_{21} e T_{22}) em amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), processadas por salga úmida durante o armazenamento nos dias 15, 40, 83, 114, 143, f. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Redness
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	Yellowness
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CRA	Capacidade de Retenção de Água
FDA	Food and Drug Administration
et al.	E outros, do latim et alii
g/L	Gramas por litro
H ¹	Prótons de Hidrogênio
L*	Lightness
LF	Low-Field
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Ms	Microsegundo
mm	Milímetro
ms	Milisegundo
mm.s ⁻¹	Milímetros por segundo
Na ₅ P ₃ O ₁₀	Tripolifosfato de Sódio
NMR	Magnetic Nuclear Resonance
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
STP	Sodium Tripolyphosphate
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal
T ₂	Tempo de relaxação transversal
T _{2b}	Tempo de relaxação transversal mais curto em um ajuste tri-exponencial dos dados
T ₂₁	Tempo de relaxação transversal mais curto em um ajuste bi-exponencial dos dados
T ₂₂	Tempo de relaxação transversal mais longo em ajuste tri-exponencial e bi-exponencial dos dados
TPA	Texture Profile Analysis
TPS	Tripolifosfato de Sódio
WHC	Water-Holding Capacity

RESUMO

Neste estudo, verificou-se a aplicabilidade da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo (^1H) para medir a mobilidade e a distribuição de água em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), após o descongelamento e cocção, sendo estes previamente tratados com tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ou TPS) (em diferentes concentrações, tempo e modo de aplicação). Também foram avaliadas, através desta técnica, as modificações que ocorrem em sardinhas salgadas (*Sardinella brasiliensis*) durante o armazenamento. Utilizando a RMN foram obtidos dados dos tempos de relaxação transversal (T_2) e seus exponenciais. Análises físico-químicas de qualidade que avaliam a dinâmica da água nos tecidos também foram realizadas e os dados foram correlacionados com os tempos de relaxação. Para os camarões após o descongelamento, o ajuste bi-exponencial dos dados de T_2 revelou duas populações de água, T_{21} e T_{22} , que corresponderam a tempos de relaxação de 21-42 ms e 47-129 ms, respectivamente. As diferenças observadas nos tempos de relaxação foram causadas pela diferença no grau de aditivo utilizado. Significantes correlações também foram evidenciadas entre os dados de relaxação e análise físico-químicas de qualidade (umidade, pH, capacidade de retenção de água, cor e textura). Os dados obtidos nas análises dos camarões após a cocção demonstraram que os tratamentos com diferentes concentrações de tripolifosfato de sódio e diferentes tempos de contato influenciaram parâmetros de qualidade, tais como rendimento após a cocção, umidade, pH, cor e textura. Essas diferenças foram refletidas nos dados de T_2 . Neste caso, o ajuste exponencial também resultou na observação de duas populações de água em todas as amostras, T_{21} e T_{22} , com tempos de relaxação no intervalo de 24-47 ms e 63-120 ms, respectivamente. Para as amostras de pescado salgado armazenadas durante diferentes períodos (15, 40, 83, 114 e 143 dias) o ajuste dos dados de relaxação transversal obtidos durante o armazenamento revelou três componentes: T_{2b} , com tempo de relaxação entre 11 e 17 ms, T_{21} , variando entre 35 e 44 ms e T_{22} , com tempos de relaxação no intervalo de 161 e 256 ms. As mudanças na mobilidade da água induzidas por alterações de degradação que ocorrem durante o armazenamento do pescado salgado refletiram em alterações observadas nos parâmetros de RMN. A produção de histamina não foi expressiva no pescado salgado ao 143º dia de estocagem, indicando o efeito do sal na inibição do crescimento de determinados microrganismos descarboxilase positivos, formadores desta amina. Este estudo demonstrou que a RMN ^1H de baixo campo pode contribuir para uma melhor compreensão das alterações na qualidade de camarões, com o uso de polifosfato durante o processo de congelamento, e cocção, quando os mecanismos de ação do aditivo afetam as propriedades da água e da estrutura muscular. A técnica também foi sensível para detectar alterações causadas pelo tempo de armazenamento do pescado salgado, visto que os parâmetros de deterioração também se relacionam com a dinâmica e mobilização da água nos tecidos.

Palavras-chave: Ressonância magnética nuclear de baixo campo, pescado, polifosfato e qualidade físico-química.

ABSTRACT

In this study the applicability of Low Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR ^1H) was observed to measure the mobility and distribution of water in marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after thawing and cooking, these being pre-treated with sodium tripolyphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ or STP) (in different concentrations, time and mode of application). It was also studied, using this technique, the changes that occur in salted sardines (*Sardinella brasiliensis*) during storage. Using NMR data were obtained from the transverse relaxation time (T_2) and its exponentials. The physicochemical analysis which measure the water dynamics in tissues were also performed and the data were correlated with the relaxation times. Bi-exponential fitting of the transverse relaxation (T_2) data revealed two water populations in all samples, T_{21} and T_{22} , corresponding to relaxation times of 21-42 ms and 47-129 ms respectively. The observed differences in the relaxation times were clearly caused by the difference in the level of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. Bi-exponential fitting of the transverse relaxation (T_2) data revealed two water populations in all samples, T_{21} and T_{22} , corresponding to relaxation times of 21-42 ms and 47-129 ms respectively. The observed differences in the relaxation times were clearly caused by the difference in the level of additive. Significant correlations were also observed between the data relaxation and the physicochemical analysis (moisture, pH, water holding capacity, color and texture). The data obtained in analyzes of shrimps after cooking showed that. Different concentrations of sodium tripolyphosphate (STP) and different time exposures influenced parameters such as cook loss, moisture, pH, color, and texture. These differences were reflected in the transverse relaxation (T_2) data. Bi-exponential fitting of the T_2 resulted in the observation of two water populations in all samples, T_{21} and T_{22} , with relaxation times in the range of 24-47 ms and 63-120 ms, respectively. For the samples of salted fish stored for different periods (15, 40, 83, 114 and 143 days). The exponential fitting of the transverse relaxation obtained during storage revealed three components: T_{2b} , with a relaxation time of 11 to 17 ms, T_{21} , ranging from 35 to 44 ms and T_{22} , with relaxation times in the range of 161 to 256 ms. Changes in the water mobility induced by alterations of degradation that occurred during storage of salted fish reflected on changes in components observed in the NMR parameters. The production of histamine was not significant in the salted fish ° to 143 days of storage, indicating the effect of salt in inhibiting the growth of certain microorganisms forming this amine, decarboxylase positive. This study demonstrated that the low-field ^1H NMR can contribute to a better understanding of alterations in the quality of shrimps with the polyphosphate use during the freezing process, and cooking, when the common mechanisms of action of the additive affect the properties of the water and muscle structure. The technique was also sensitive to detect changes caused by the storage time of salted fish, since deterioration parameters also relate to the dynamics and water mobilization in the tissues.

Keywords: Low-field nuclear magnetic resonance, fish, polyphosphate and physicochemical quality.

1 INTRODUÇÃO

Métodos de conservação tradicionais como congelamento e a cocção, podem levar a desnaturação proteica, com consequente perda de água do produto. A utilização de fosfatos no processamento aumenta a capacidade de retenção de água em alimentos de origem animal, resultando em produtos mais atrativos sensorialmente nos parâmetros cor, textura e suculência (NETO; NAKAMURA, 2003). Além disto, durante os processos de alterações químicas e bioquímicas que culminam com a deterioração, ocorrem etapas de degradação e desnaturação proteica que interferem nos parâmetros de ligação água-proteína.

Com relação à adição de fosfatos no pescado, aspectos de relevância tecnológica como a quantidade adicionada, tempo, modo de aplicação e tipo de produto a ser beneficiado, exercem influência na retenção de água. Evitar a perda da água em pescado submetido ao congelamento e ao cozimento é um aspecto tecnológico desejável, tanto para a manutenção da qualidade, quanto por questões econômicas que visam diminuir a perda de peso do produto ao descongelamento e cocção (GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011b). No Brasil o uso de fosfatos antes do congelamento ainda não é uma realidade, mas verifica-se que esta prática é adotada em outros países, tornando o produto final bastante competitivo. Tendo em vista a procura do mercado e, a importância econômica que a venda destes produtos possui para as indústrias de pescado em todo o mundo (TSIRONI et al., 2009), destaca-se a relevância de estudos e avaliações que contribuam com dados sobre os efeitos da utilização deste aditivo (em diferentes concentrações, tempo e modo de contato) em camarões submetidos ao congelamento e cocção, assim como, a utilização de técnicas não convencionais e de interesse para indústria de alimentos, que avaliem estes resultados.

Ainda no âmbito do processamento de alimentos, destaca-se a salga, um dos processos mais antigos de conservação, com expressiva aplicação na área de pescado e derivados. O processo de adição de sal retarda, mas não inibe totalmente as alterações de degradação que ocorrem devido ao crescimento bacteriano durante o armazenamento. Durante a estocagem do pescado salgado, ocorrem alterações de degradação físico-químicas e alterações oriundas da ação de enzimas microbianas na estrutura proteica que, interferem diretamente na mobilidade da água presente no alimento (interação água-proteína) (COULTATE, 2004).

Estudos demonstram correlação significativa entre parâmetros da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Baixo Campo (“Low Field Nuclear Magnetic Resonance” – LF NMR) e a dinâmica da água no músculo de carnes e pescado. A literatura relata correlação entre as análises por RMN e análises físico-químicas e microbiológicas que verificam a qualidade e a deterioração, desde que estas análises indiquem alterações no conteúdo de água do músculo. Alguns artigos relatam que a RMN pode indicar a qualidade do pescado quando os mecanismos de deterioração afetam as propriedades da água e a estrutura dos músculos (proteínas) (BELTON, 1990; RUAN; CHEN 1998; ANDERSEN; RINNAN, 2002; BERTRAM; ANDERSEN, 2004; BERTRAM; ANDERSEN, 2007; AURSAND et al. 2009; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011a; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011b).

Nas indústrias de processamento de alimentos, há um crescente e atual interesse na utilização de metodologias rápidas, não invasivas e não destrutivas. Sendo assim, técnicas e procedimentos demorados, que necessitem de extração, cominuição e/ou diluição, não são de interesse nessa área (AURSAND et al., 2008). Nesse novo conceito aplica-se a técnica de RMN de baixo campo. Pesquisas realizadas em carnes e pescado verificaram boa aplicabilidade desta técnica, na avaliação da distribuição da água na musculatura, assim como, sua correlação com análises físico-químicas tais como pH muscular, umidade e capacidade de retenção de água, ou seja, parâmetros que são influenciados tanto por adição de fosfatos, quanto pela deterioração que ocorrem durante o tempo de armazenamento (GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011a; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011b).

O objetivo principal da tese foi verificar a aplicabilidade da RMN (^1H) de Baixo Campo, como metodologia analítica para obtenção de dados que contribuam para uma melhor compreensão da dinâmica de distribuição da água afetada pelo processamento e qualidade do pescado.

Deste modo, o presente estudo buscou trazer contribuições inéditas através da utilização de RMN de baixo campo de prótons de Hidrogênio (^1H), para obter dados sobre a distribuição da água no tecido muscular de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) descongelados e cozidos, previamente tratados com o aditivo tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ou STP ou TPS) em diferentes concentrações, tempo e modo de aplicação, assim como, correlacionar os resultados dos tempos de relaxação transversal T_2 e seus exponenciais T_{21} e T_{22} , obtidos através da RMN, com os dados obtidos em análises físico-químicas que

também avaliem a dinâmica da água nos tecidos (umidade, capacidade de retenção de água, pH, cor e textura). Objetivou-se também estudar as modificações ocorridas nos tempos de relaxação transversal de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) submetidas ao processo de salga úmida, em diferentes tempos de armazenamento de modo a avaliar a variação deste parâmetro durante a deterioração do pescado.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONGELAMENTO E COCÇÃO DO CAMARÃO

A indústria de pescado congelado cresceu nos últimos anos. Neste contexto a procura por camarões descascados congelados e camarões descascados cozidos e congelados é expressiva comercialmente (TSIRONI et al., 2009). Isto se deve a um preço competitivo e ao longo prazo de validade destes produtos (ibid.). No contexto da tecnologia do processamento destes produtos sabe-se que nas etapas de congelamento e cocção, a estrutura proteica do camarão é modificada, fator que afeta a relação da proteína muscular com a água e leva a mudanças na dinâmica da água na musculatura e consequentemente a exsudação e perda de algumas características de qualidade (GONÇALVES; RIBEIRO, 2008a).

2.1.1 ÁGUA E AS ALTERAÇÕES ESTRUTURA PROTEICA COMPONENTE DO PESCADO

A água é quantitativamente, o principal componente dos alimentos, incluindo o pescado. As propriedades reológicas, texturais, atributos sensoriais e a validade comercial dependem da interação da água com outros constituintes dos alimentos, principalmente, da interação com as moléculas de proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A estrutura de uma proteína é o resultado de várias interações atrativas e repulsivas que emanam de forças intramoleculares variadas, bem como, da interação dos grupos proteicos com a água (SGARBIERI, 1996). Qualquer mudança no meio, tais como: pH, força iônica, temperatura, entre outras, forçará a molécula proteica a assumir uma nova estrutura de equilíbrio (LAKSHMANAN et al., 2007). Esta mudança é chamada de desnaturação proteica, quando ocorre sem a clivagem das ligações peptídicas da cadeia principal e, de degradação quando a clivagem ocorre (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Com a desnaturação, a proteína perde suas características físico-químicas e, consequentemente, a capacidade de interação com a água (ibid.).

2.1.2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO CAMARÃO SUBMETIDO AO CONGELAMENTO E PROCESSAMENTO TÉRMICO

Tendo em vista o processamento do camarão congelado e do camarão congelado e cozido, sabe-se que as etapas de congelamento, armazenamento sob congelamento e cocção, são conhecidas por promoverem a desnaturação proteica e, conseqüentemente, a agregação das proteínas com considerável perda de água (JENSEN; JØRGENSEN et al., 2003).

A desnaturação de proteínas induzida pelo congelamento é atribuída a danos físicos resultantes da formação e crescimento de cristais de gelo, e a processos químicos associados a desidratação e concentração de solutos no tecido muscular. Na desnaturação induzida pelo congelamento, os fluidos externos das células do músculo resfriam nesse caso com mais rapidez do que os fluidos internos e, quando os fluidos extracelulares supergelados alcançam a temperatura crítica, a água se separa dos solutos e forma cristais de gelo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). À medida que ocorre a cristalização os sais extracelulares se tornam mais concentrados, criando uma pressão osmótica gradiente ao longo da membrana celular (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Esses processos podem ocasionar a desnaturação de proteínas e o rompimento da membrana celular.

As proteínas passam por variados graus de desnaturação durante o seu processamento térmico, devido principalmente, ao efeito do calor sobre a estabilidade das interações não covalentes; nesse aspecto, as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas proteicas, que são exotérmicas por natureza, são desestabilizadas; sendo que, as interações hidrofóbicas que são endotérmicas são estabilizadas à medida que a temperatura aumenta. A desnaturação extensiva das proteínas, frequentemente resulta em insolubilização, a qual pode prejudicar as propriedades funcionais que dependem da solubilidade (COULTATE, 2004). Como dito anteriormente, desnaturação afeta a capacidade da proteína em se ligar a água e assim, interfere em características proteicas como dispersibilidade, umectabilidade, expansão, solubilidade, capacidade de retenção de água, coagulação, entre outras (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As práticas tecnológicas utilizadas pelas indústrias que congelam e cozinham o pescado têm por objetivo, dentre outros parâmetros, minimizar esta perda de água e as alterações

que podem ocorrer com as proteínas durante o processamento (SCHUBRING et al. 2003; TOLDRA 2003), neste contexto, destaca-se a utilização de fosfatos.

2.1.3 USO DE FOSFATOS NA INDÚSTRIA DO PESCADO CONGELADO

Os fosfatos possuem ocorrência natural em alimentos e seu uso como aditivo em alguns segmentos da indústria da pesca é objeto de estudos em vários países, incluindo no Brasil (GONÇALVES; RIBEIRO, 2008b). A utilização deste aditivo no pescado pode reduzir o gotejamento (“Drip loss”) que ocorre na etapa de descongelamento e também a perda de peso durante a cocção (TURAN et al., 2003). De acordo com a literatura, os mecanismos de interação dos sais fosfato com o tecido muscular não foram completamente esclarecidos. Alguns fatores vêm sendo discutidos como causas da hidratação e tenderização observadas, como: o aumento do pH da carne, o aumento da força iônica, a quelação de íons metálicos e a dissociação do complexo actomiosina (ORDÓÑEZ et al., 2005; ÜNAL et al., 2006; GONÇALVES et al., 2008; GONÇALVES; RIBEIRO, 2008b).

No entanto, a eficácia deste aditivo nas propriedades de retenção de água em produtos cárneos derivados da pesca, depende do tipo de fosfato utilizado, da etapa em que foi adicionado, da quantidade, aliado ao fato de que pode variar de acordo com o tipo de produto a ser beneficiado (THORARINSDOTTIR et al. 2004; ÜNAL et al., 2006). Do mesmo modo, quando utilizado inadequadamente, pode induzir a absorção excessiva de água, o que indica fraude econômica (GONÇALVES et al., 2008). Portanto, a adição de fosfatos em pescado congelado é regulamentada pela legislação em diversos países. O tipo de fosfato mais utilizado pela indústria da pesca é o Tripolifosfato de Sódio (TPS), aditivo que pode ser empregado como umectante, mantendo a umidade do produto (FDA, 2003).

No Brasil, o Ministério da Saúde, atualmente representado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece que sais de fosfatos podem ser utilizados após o congelamento do pescado, no processo de glaciamento, sendo obrigatório que o teor deste aditivo no produto final, não ultrapasse 0,5g em 100g (BRASIL, 1988). Em circular mais recente, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), ressalta que o uso destes sais antes do congelamento é permitido, desde que haja um parecer técnico favorável por parte de instituições de pesquisa, concomitantemente, com o aval da ANVISA (BRASIL, 2003). De acordo

com a “Food and Drug Administration” (FDA), não há proibições nem limites para este aditivo em pescado nos Estados Unidos, sendo a sua utilização adequada de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) da indústria (U.S. FDA, 2004). No Canadá, a Agência Nacional de Inspeção de Alimentos permite múltiplos usos para fosfato em pescado, desde que não exceda a concentração máxima de 0,1 a 0,5%, dependendo do tipo, no produto final (CFIA, 2007). O *Codex Alimentarius* tolera uma porcentagem mais elevada, de até 1% (CODEX, 2011). Assim sendo, este aditivo deve ser utilizado apenas para fins tecnicamente justificáveis, pois, aliado as BPFs, induz a significativos e desejáveis efeitos nas características físico-químicas e sensoriais de qualidade do camarão (GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011a).

2.2 SALGA ÚMIDA DO PESCADO E AS ALTERAÇÕES QUE OCORREM DURANTE O ARMAZENAMENTO DO PESCADO SALGADO

A utilização da salga como método de conservação do pescado é descrita há mais de quatro mil anos; com registros desde as civilizações do antigo Egito e Mesopotâmia (FLANTRIN; MONTANARI, 1998).

A salga é um processo físico-químico de difusão e osmose no qual se verifica a penetração do sal e a saída de água do músculo, com efeitos acentuados nas proteínas musculares. Com a salga há redução na solubilidade e capacidade de retenção de água dos tecidos. O sal extrai a água ao mesmo tempo em que penetra no tecido muscular do pescado, convertendo a água presente na musculatura em uma solução concentrada de cloreto de sódio. As membranas celulares são semipermeáveis. Quando há penetração de sal em quantidade suficiente (equilíbrio osmótico), as proteínas coaguláveis se estabilizam e o tecido se contrai por perda de água. Durante a salga ocorre desnaturação das proteínas do pescado, verificando-se o desdobramento destas em peptídeos e aminoácidos (FELLOWS, 2006).

No processo de salga, o peixe é geralmente tratado em tanques na proporção de 30% de cloreto de sódio em relação ao peso da matéria-prima eviscerada, espalhada em formas de filés ou mantas. Por esse processo, o cloreto de sódio é colocado sobre o peixe, onde se dissolve, formando uma solução concentrada (salmoura) em conjunto com água liberada da musculatura através da ação osmótica (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Produtos com altos teores de sal apresentam o prazo de validade comercial estendidos sendo considerados de fácil conservação, apesar das possíveis alterações bioquímicas e enzimáticas que podem a longo tempo diminuir a qualidade e ou até consolidar o processo de deterioração (OGAWA, 1999). Durante a estocagem podem ocorrer alterações de deterioração como mucosidade e crescimento de microrganismos (bactérias e fungos). A mucosidade é caracterizada pela coloração amarelada e alteração na textura. O crescimento bacteriano acarreta a produção de enzimas autolíticas exógenas que atuarão degradando proteínas e peptídeos, causando alterações físico-químicas e sensoriais (textura, aspecto, odor). Em regra, o processo de deterioração origina odores amoniacais e sulfídricos oriundos da degradação proteica (GONÇALVES, 2011).

2.3 APLICAÇÕES DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE BAIXO CAMPO PARA ANÁLISE DE QUALIDADE DO PESCADO

Descoberta independentemente por Bloch (BLOCH et al., 1946) e Purcell (PURCELL et al., 1946) em 1946, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica rápida, não destrutiva e não invasiva que pode ser utilizada para análise de diversas matrizes, incluindo alimentos (RUAN et al., 2001; MARTINEZ et al., 2003; GUDJONSDOTTIR et al., 2011a). Os métodos baseados na RMN têm várias vantagens, tais como ser permitir medições relativamente rápidas, não destrutivas e não invasivas. No entanto, o uso da RMN no campo da ciência dos alimentos está longe de ser plenamente explorado, e muito conhecimento ainda está para ser adquirido (Aursand et al., 2009).

O fenômeno da RMN baseia-se no fato de os núcleos de determinados átomos possuírem propriedades magnéticas que podem ser utilizadas para fornecer informações químicas. Do ponto de vista da mecânica quântica subatômica, as partículas (prótons, nêutrons e elétrons) possuem uma propriedade chamada spin nuclear. O spin pode assumir apenas valores de $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$. Em núcleos com um número par de subpartículas de mesmo nome, (prótons ou nêutrons) os spins se cancelam mutuamente de modo que o núcleo do átomo não possui nenhum momento magnético total. No entanto, em certos átomos como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , ^{23}Na , entre outros, o núcleo possui um spin total diferente de zero, o que gera um momento magnético. A técnica de RMN se aplica ao estudo de núcleos com

momento magnético não nulo, ou seja, com spin $I \neq 0$. Estes núcleos se comportam como pequenos ímãs. A aplicação de um campo magnético afeta os níveis de energia de spin permitindo observar, em ressonância, os espectros resultantes das transições entre estes níveis. Quando o núcleo que possui um momento magnético é colocado num campo magnético estático, irá interagir com este campo resultando em um movimento giratório oscilante ou angular que é chamado de precessão nuclear. A frequência desta precessão do núcleo é chamada de frequência de Larmor (Equação 1) (GIL; GERALDES; 1987).

$$\omega = \gamma \beta_0 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: ω , é a frequência de precessão; β_0 , é a intensidade do campo magnético estático, e γ é denominada é a razão giromagnética. Cada núcleo possui um valor diferente para essa razão. Ela representa uma indicação da intensidade do magnetismo nuclear (RUAN; CHEN, 2001).

O núcleo do átomo de hidrogênio (um próton) configura-se como o mais abundante núcleo dentro dos tecidos biológicos sendo, conseqüentemente, o átomo de maior importância em estudos de RMN na área da ciência dos alimentos (GUDJONSDOTTIR et al., 2011a).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo de prótons de hidrogênio (^1H) tem sido empregada para avaliar alterações na distribuição da água dos alimentos, durante o processamento e armazenamento (AURSAND et al., 2008). Este método possui interesse para a indústria de alimentos, pois possibilita avaliar parâmetros físico-químicos e sensoriais, visto a correlação da técnica com as análises de água e lipídeos (AZEREDO; COLNAGO, 2000). Além disto, destaca-se como um método rápido, econômico e não destrutivo (BELTON, 2003). Como exemplos da utilização de RMN de baixo campo em alimentos destacam-se a análise de óleo em sementes, o estudo da distribuição de água e óleo em alimentos, o estudo do estágio de maturação de frutas e vegetais e a caracterização da água na estrutura muscular de carnes e pescado (GUNASEKARAN, 2001).

A aplicação da RMN de baixo campo (^1H) em pescado permite relacionar o estado e a dinâmica da água para vários parâmetros tecnológicos, como: medidas de condições de armazenamento, de matérias-primas, de qualidade e de

processamento. Além disso, a estrutura dos músculos pode ser estudada indiretamente (AURSAND et al., 2009).

Como relatado anteriormente, a ressonância é um método no qual ocorre absorção de radiação eletromagnética por um núcleo atômico, colocado em um campo magnético estático (PANEPUCCI; TANNÚS, 2000). Os parâmetros de análise por RMN de baixo campo são os tempos de relaxação denominados T_1 (longitudinal) e T_2 (transversal), que dependem da mobilidade molecular da amostra. Sendo assim, populações diferentes de água nos tecidos podem ser estudadas porque os prótons em ambientes diferentes apresentam diferentes propriedades de relaxamento (AURSAND et al., 2009). T_1 e T_2 representam o tempo de retorno da amostra ao seu estado inicial, quando a excitação da mesma por um campo magnético é finalizada (GIL, 1987). Este método se aplica a núcleos de ^1H de espécies químicas no estado líquido mesmo que estejam dispersos em amostras sólidas (PRESTES et al., 2007).

Quando os átomos de hidrogênio estão dispersos em uma matriz sólida, como, por exemplo, em um tecido muscular, o tempo de decaimento de T_2 (tempo de relaxação transversal) no tecido muscular é multiexponencial, indicando a existência de diferentes “populações” de água no tecido (RUAN; CHEN, 2001; COPE, 1969). Nos últimos anos, investigações no tempo de relaxação T_2 têm apoiado esta afirmação, tanto para pescado, quanto para outras carnes (BERTRAM et al., 2002; BERTRAM; PURSLOW; ANDERSEN, 2002; LAKSHMANAN et al., 2007; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011a; AURSAND et al., 2008; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011b).

A distribuição de água no músculo pode normalmente ser dividida em três compartimentos. O “primeiro” compartimento refere-se à água denominada “ligada”, que representa menos de 10% da água muscular e está intimamente ligada às proteínas, tendo mobilidade reduzida e, não podendo se deslocar facilmente para outros compartimentos. Em estudos de RMN de baixo campo, esta água tem sido relatada com relaxação entre 1-10ms, e tem sido referida como o componente de relaxamento T_{2b} (BERTRAM; PURSLOW; ANDERSEN, 2002). A quantidade de água ligada muda muito pouco, e é muito resistente aos processos de *rigor mortis*, congelamento e cocção (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). No “segundo” compartimento encontra-se a água chamada de “entrapped water”, ou seja, água de revestimento. Esta sim pode ser afetada pela conversão do músculo em carne,

congelamento e cocção, podendo ser perdida ou não, com o gotejamento (OFFER, 1988). Esta fração é citada em estudos de RMN de baixo campo com carnes e pescado, como T_{21} , sendo encontrada em tempos de relaxação que variam aproximadamente entre 40 até cerca de 80-100ms (BERTRAM et al., 2002; BERTRAM; PURSLOW; ANDERSEN, 2002). O terceiro compartimento é onde se encontra a “água livre”, que se mantêm na superfície do alimento por ligações fracas e é descrita em RMN de baixo campo como T_{22} , com tempo de relaxação próximo de 100 e até 400ms (BERTRAM; PURSLOW; ANDERSEN, 2002). A água de revestimento e a água livre correspondem a cerca de 90% da água encontrada nas carnes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Em se tratando da influência da água na qualidade das carnes, sabe-se que aspectos como a distribuição desta na fibra muscular, estado de ligação com as moléculas proteicas e mobilidade no músculo, são tão importantes quanto o total de água presente (RUAN; CHEN, 1998; AURSAND et al., 2008). Neste contexto, a RMN de baixo campo é capaz de revelar mudanças nas propriedades do tecido muscular do pescado durante processamentos e armazenamento que alterem a mobilidade da água (LAKSHMANAN et al., 2007; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011a; AURSAND et al., 2008; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011b).

3 DESENVOLVIMENTO

Este estudo teve início com a análise de camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei* descongelados e cozidos tratados com o aditivo tripolifosfato de sódio em diferentes concentrações, tempo e modo de aplicação. Os camarões foram analisados antes do congelamento e após a cocção, através da técnica RMN de baixo campo de prótons de hidrogênio (^1H) e através de análises físico-químicas convencionais, objetivando, a obtenção de dados sobre a distribuição da água no tecido muscular das matrizes, assim como, a comparação dos resultados da técnica de RMN com os obtidos de análises físico-químicas rotineiras, que também avaliam este parâmetro. Os dados obtidos com a investigação acima geraram dois artigos científicos. Um dos artigos já foi publicado e outro foi aceito para publicação.

Em uma segunda etapa do doutoramento foram realizadas análises através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo de prótons de Hidrogênio (^1H) em sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) salgadas por salga úmida em diferentes dias de estocagem, avaliando-se assim, a variação encontrada nos tempos de relaxação da técnica. Esses dados deram origem a um terceiro artigo científico que ainda será enviado para publicação.

Como dito anteriormente os resultados obtidos encontram-se na forma de três manuscritos que serão apresentados a seguir. O primeiro artigo foi publicado na revista "LWT - Food Science and Technology" (Elsevier®), v.50, n.2, p.401–407, 2013. O segundo artigo foi aceito para publicação no periódico "Journal of Food Process Engineering" (Wiley Periodicals®) em 04 de janeiro de 2013. Os artigos seguem abaixo. A formatação dos textos segue a norma de cada periódico. O terceiro artigo ainda será enviado para publicação em um periódico internacional de elevado fator de impacto. Nos apêndices encontram-se figuras com o objetivo de ilustrar a etapa experimental da tese.

3.1 ARTIGO 1: STUDIES OF THE EFFECT OF SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE ON FROZEN SHRIMP BY PHYSICOCHEMICAL ANALYTICAL METHODS AND LOW

FIELD NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (LF ^1H NMR) (Publicado em “LWT - Food Science and Technology”, Elsevier®)

Studies of the effect of sodium tripolyphosphate on frozen shrimp by physicochemical analytical methods and Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF ^1H NMR)

Carla da Silva Carneiro^{a,*}, Eliane Teixeira Mársico^a, Roberta de Oliveira Resende Ribeiro^a, Carlos Adam Conte Júnior^a, Thiago Silveira Álvares^b, Edgar Francisco Oliveira de Jesus^c

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Fluminense, Vital Brasil Filho 64, Zip Code 24230-340, Niterói, RJ, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Zip Code 21941-909, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratório de Instrumentação Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P.O. Box 68509, Zip Code 21941-972, Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2629 9545; fax: +55 21 2629 9541. E-mail address: carlavet.s@gmail.com (C.S. Carneiro).

Article history:

Received 5 April 2012

Received in revised form 8 September 2012

Accepted 11 September 2012

Published in v.50, n. 2, march 2013

ABSTRACT

This work describes studies of the sodium tripolyphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) treatments on frozen shrimp muscle using Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF ^1H NMR). Samples containing water only without any additives were used as controls. All experimental data were collected using thawed samples. A close correlation was established between the LF ^1H NMR analysis and other physicochemical measurements ($p < 0.01$) used in this work including moisture, water-holding capacity, pH and color. Bi-exponential fitting of the transverse relaxation (T_2) data revealed two water populations in all samples, T_{21} and T_{22} , corresponding to relaxation times of 21-42 ms and 47-129 ms respectively. The observed differences in the relaxation times were clearly caused by the difference in the level of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. This study demonstrated that LF ^1H NMR is a viable technique and can be applied to provide an improved understanding of the effect of additives such as sodium polyphosphate on the quality of frozen shrimps.

KEYWORDS: Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF NMR); Transversal relaxation; shrimp freeze process; polyphosphate.

1. Introduction

The use of phosphates prior to freezing shrimp has a significant effect on the chemical composition and physicochemical properties of the thawed product. This additive can be used in fish processing to improve yields, water holding capacity, and the sensory attributes of the final product (Nguyen et al., 2012). When used properly, phosphates in shrimp preserve the natural moisture content of the muscle, leading to a softer, higher-quality product (Gonçalves, Rech, Rodrigues, & Pucci, 2008). Phosphate affects the muscle tissue by increasing the pH,

the ionic force between proteins and water molecules, the chelation of metal ions, and the dissociation of the actomyosin complex, thus changing the dynamics of water in the tissues (Ünal, Erdogdu, & Ekiz, 2006; Erdogdu, Erdogdu, & Ekiz, 2007; Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008). The content and distribution of water in fish muscle are important quality parameters because they influence color, texture and commercial value (Toldrá, 2003; Lakshmanan, Parkinson, & Piggott, 2007; Gonçalves & Ribeiro, 2009).

Low Field (LF) ^1H Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) relaxation is a rapid, noninvasive method to investigate water mobility in materials and foods (Ruan & Chen, 2001; Martinez et al., 2003; Thybo, Andersen, Karlsson, Donstrup, & Stodkilde-Jørgensen, 2003). LF ^1H NMR can measure proton relaxation and thus can be used to investigate changes in water mobility and muscle structure during processing (Belton, 1990; Andersen & Rinnan, 2002; Bertram & Andersen, 2007; Bertram, Meyer, & Andersen, 2009; Aursand et al., 2009). In LF ^1H NMR studies, proton relaxation is described by the relaxation time constants T_1 (longitudinal) and T_2 (transverse), where T_2 relaxation decay in muscle tissue is multiexponential, indicating the presence of different water populations or water “pools” in the muscle tissue (Cope, 1969; Finch, Harmon, & Muller, 1971; Belton, 1990; Bertram et al., 2001). The distribution of water in the muscle described by T_2 may be divided into three components: T_{2b} , which represents the relaxation component in which water is closely associated with macromolecules; T_{21} , which represents intra-myofibrillar water; and T_{22} , which represents water located outside the myofibrillar network (extra-myofibrillar) (Bertram et al., 2001; Bertram, Purslow, & Andersen, 2002).

The LF ^1H NMR parameters correlate well with various physicochemical properties of meat and fish muscle. Aursand et al. (2009); Gudjónsdóttir Lauzon, Magnússon, Sveinsdóttir, Arason, Martinsdóttir, & Rustad (2011a) and Gudjónsdóttir, Arason, & Rustad (2011b) found significant correlations between T_2 relaxation times and water-holding capacity (WHC) in

salmon and cod muscle. Gudjónsdóttir, Jónsson, Bergsson, Arason, & Rustad (2011c) also observed correlations between LF ^1H NMR data and physicochemical measurements (moisture, pH and WHC). These studies show the general applicability of LF ^1H NMR for assessing quality and other important parameters in seafood processing. The addition of phosphate is an important industrial practice that improves the quality of shrimp upon thawing. However, LF ^1H NMR studies to evaluate the effect of additives (polyphosphate) on fish muscle are lacking. Therefore, this study used measurements of the LF ^1H NMR relaxation time to investigate changes in the distribution of water in the muscle of thawed shrimp that had been submitted to different treatments with sodium tripolyphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) during the freezing process. The LF NMR parameters obtained were compared to physicochemical measurements of moisture, pH, WHC, color, and texture.

2. Materials and methods

2.1. Sample

Forty kilograms of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were caught in June 2011 on the coast of Rio de Janeiro (22°51'S and 42°03'W), Brazil. The shrimp were immediately brought to the laboratory stored on ice, and were manually peeled and the heads removed. They were weighed and divided equally into eight groups, which were submitted to different treatments and controls. For analysis, 30 samples from each group were used ($n = 240$).

2.2. Experimental design

The treatments differed in the concentration of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (Nutrifos BR®) used (20 g/L or 50 g/L), form of contact (immersion in a solution of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ or glazing) and time in contact with the solution (60 or 120 min) (Fig. 1). Five different treatments were applied: 1

(5P120), the shrimp were immersed in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min and then frozen; 2 (5P60), the shrimp were immersed in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 60 min and then frozen; 3 (2P120), the shrimp were immersed in a solution of 20 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min and then frozen; 4 (2P60), the shrimp were immersed in a solution of 20 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 60 min and then frozen; and 5(GZP), glazing, i.e., previously frozen shrimp were immersed in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 1 min at 1 ± 0.5 °C, according to the methodology described by Gonçalves & Ribeiro (2009). Three control treatments consisted of immersion in water without $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ or glazing without the additive: 1(C120), control in which the shrimp were immersed in water for 120 min with subsequent freezing; 2(C60), control in which the shrimp were immersed in water for 60 min with subsequent freezing; and 3(GCZ), glazing control, in which previously frozen shrimp were immersed in water at 1 ± 0.5 °C. For all treatments and controls, the water and solutions were maintained at 2 ± 1 °C. After immersion, the shrimps were drained for 1 min and quick-frozen. The samples were stored in a freezer at -22 °C. The physicochemical measurements and the LF ^1H NMR analyses were performed on raw shrimp after slow thawing (4 ± 1 °C for 24 h). The thawing process was adapted from the methodology described by Gonçalves & Ribeiro (2008).

40Kg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
Caught in Rio de Janeiro Coast (22°S 42°W)
by bottom trawling in July 2011

Storage on ice (0°C): Removing the head and Peeled
Laboratory: Were divided equally between 8 groups (5Kg)

Fig. 1. Sampling, materials and methods. For details, see text.

2.3. Physicochemical measurements

The moisture analyses were performed with an Infrared Dryer (ID) (Mettler-Toledo GmbH® Model LJ16, Greifensee, Switzerland). This is a compact instrument with an integrated balance and an electromagnetic radiation lamp. This type of drying involves heating the sample. The measurements were performed with 5 ± 0.1 g of triturated shrimp muscle.

The pH was measured with a pH electrode connected to a pH meter (Digimed® Model DM-32, São Paulo, Brazil). The electrode was immersed in a suspension made by mixing 5 g of minced shrimp with 50 mL of distilled water.

The water-holding capacity (WHC) of shrimp muscle was determined as described by Gómez-Guillén, Montero, Hurtado, & Borderias (2000) and Lakshmanana et al. (2007). An aliquot (2 ± 0.1 g, four digits) was weighed and placed in a pre-weighed tube with a pre-weighed piece of filter paper. The tube was centrifuged for 10 min at 500g at 10 °C (Hermle® Z 360K Centrifuge, Deutsch, Germany). The wet filter paper was then weighed, and the tube

was weighed without the paper, which contained only the aliquot after centrifugation. The WHC of the shrimp was calculated from the amount of sample remaining after centrifugation. Three replicates were performed for each sample, and the mean was expressed as g/100g WHC on a wet-weight basis.

The intensity of the color was measured with a Minolta type CR-400 colorimeter (Konika Minolta®, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. The instrument records values of L* (lightness—intensity of white color), a* (redness—intensity of red color) and b* (yellowness—intensity of yellow color).

Texture was measured with a texture analyzer (MODEL TA-XT plus, Stable Micro Systems®, Godalming, Surrey, United Kingdom) equipped with a flattened cylinder (75 mm diameter) by a modification of the method described by Sigurgisladottir et al. (1999) and Tsironi et al. (2009). A penetration depth of 50% of the initial sample height was selected as the maximum distance that could be applied. Double compression was applied to construct the Texture Profile Analysis (TPA). The flattened cylinder approached the sample at a speed of 0.8 mm.s⁻¹ and penetrated into the shrimp flesh. The holding time between the two compressions was 5 s. The cylinder was then pressed on the sample a second time, force-distance curves were obtained, and texture parameters (hardness, springiness, cohesiveness) were determined.

2.4. Low field NMR measurements

For the NMR measurements, a bench-top NMR analyzer with a working frequency of 13 MHz was used (MARAN DXR 2, Oxford Instruments®, Osney Mead, Oxford, United Kingdom). The measurements were performed on 15-g samples at 25±1°C in NMR tubes (50 mm diameter). The transverse relaxation time (T₂) was measured with a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence (Carr & Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958), with

12 scans, 2048 points, 3.5 s between scans, and 300 μ s between pulses of 90° and 180°. The LF-NMR relaxation curve was fitted to a multi-exponential curve with the software RI-WINFIT (version 2.5, Oxford instruments®). Analysis of the exponential fits indicated that two exponentials were sufficient to describe the system for all samples. Bi-exponential fitting thus resulted in two water populations, A_{21} and A_{22} , with corresponding relaxation times T_{21} and T_{22} . T_2 distributions were obtained using the software WinDXP, version 1.8.1.0 from Resonance Instruments®, distributed by Oxford Instruments®

2.5. Statistical analysis

The assumptions of homogeneity of variances and sphericity were examined with the Levene and Mauchly tests, respectively. A one-way analysis of variance with repeated measures was used to identify differences between the physicochemical and relaxation parameters (T_{21} and T_{22}) among the different treatments and controls. Pearson correlations were used to examine the relationship between each physicochemical parameter (moisture, pH, WHC, texture, and color) and the transverse relaxation parameters (T_{21} and T_{22}). When a significant F was found, additional post-hoc tests with Bonferroni adjustment were performed. When unequal group variances were identified, a Dunnett's C test for pairwise comparisons was performed. When the assumption of sphericity was violated, the Greenhouse-Geisser adjustment was made. Statistical significance was set at the 0.01 level of confidence. All analyses were performed with a commercially available statistics package (SPSS Inc., Version 17.0, Chicago, Illinois, USA).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical results

Table 1 shows the results of the physicochemical analyses (moisture, pH, WHC, color, and texture). The results confirmed the hypothesis that the effects of this additive improved the quality characteristics of the shrimp.

As the concentration of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ and the immersion time increased, the moisture content increased as well ($p < 0.01$). The mean moisture content of the samples ranged from 85.9 g/100g for the 5P120 treatment to 72.2 g/100g for the control sample (GZC). Similarly, Erdogdu, Balaban, Otwell, & Garrido (2004) demonstrated that shrimp treated with solutions containing 4g/100g polyphosphate for 120 min or 20 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 30 min had moisture contents of 83 g/100g or 80 g/100g, respectively. According to those same authors, control shrimp (without polyphosphate) had a mean moisture content of 77 g/100g. Gudjónsdóttir et al. (2011c) also reported high greater moisture content (84.2 g/100g) in shrimp treated with NaCl and polyphosphate when compared to the control group (78.3 g/100g).

The treatment with 5P120 raised theyielded a higher average mean pH value (7.5) ($p < 0.01$). The mean pH found in the control groups (GZC, C120 and C60) was 6.4. Treatments 5P60, 2P120, 2P60 and GZP did not significantly change the mean pH, which ranged between 7.0 and 7.2. In analyzing shrimp, Gudjónsdóttir et al. (2011c) found a pH of 7.1 ± 0.1 for *in natura* samples and a pH of 7.4 - 7.5 for samples after 120 min immersion in brine containing 2.4 to 3.6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ polyphosphate. The increase of pH due to phosphates is an important factor in fish water retention, because it shifts the protein away from its isoelectric point (pH~5.1). This increases the distance between the polypeptide chains, increasing the space for water retention.

The WHC also increased in treatments with a higher $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ content (50 g/L) and longer contact time (120 min) (94.8 g/100g) ($p < 0.01$). These results show that LF ^1H NMR can be used to identify changes in water mobility in shrimp muscle treated with the $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ additive. The reason is that the effect of phosphates on water retention is correlated with the

changes in the muscle pH caused by the additive, thus altering the water-retention capacity of the proteins. Treatments 5P60, 2P120 and GZP showed similar mean WHC values of 92.7, 92.6 and 91.5 g/100g, respectively ($p < 0.01$). The control groups (GZC, C120 and C60) had lower WHC values (mean 87 g/100g) ($p < 0.01$) than did the treated groups, demonstrating that polyphosphate increases the WHC of shrimp. In this study, immersion in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min (5P120) yielded a higher WHC than immersion for 60 min (5P60) ($p < 0.01$), indicating that the time in contact with the additive influences the WHC. Thus, the effect of phosphates on shrimp water- holding capacity is dependent on the type and amount of phosphates used in the solution and on the contact time.

The parameters L^* , a^* and b^* of the samples in which $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ was used were significantly different, independently of the concentration used (20 or 50 g/L) or the contact time (60 or 120 min), from the control samples, which showed higher values. The mean values of L^* ranged between 52.1 and 56.1, a^* values between 5.9 and 7.4, and b^* values between 4.9 and 7.3. Rocha (2010) also reported higher a^* and b^* values for *Litopenaeus vannamei* shrimp *in natura* without polyphosphate ($a^* = 3.21$ and $b^* = 7.48$), compared to shrimp treated with solutions containing 50 g/L polyphosphate ($a^* = 2.21$ and $b^* = 4.32$). However, in contrast to the results of the present study, Rocha (2010) did not observe significant changes in L^* , which remained constant between 44.1 and 44.2 for the groups without and with polyphosphate. Freezing can cause fish protein denaturation and intensification of the crustaceans' red color upon thawing, due to the release of the prosthetic group astaxanthin (carotenoid pigment) (Shahidi, Metusalach, & Brown, 1998). Brightness can also increase due to increased exposure of the white color of shrimp muscle fiber upon thawing (Tenorio, García-Carreño, & Aguilar, 2007). Polyphosphate inhibits this change because it reduces protein denaturation by increasing the electrostatic repulsion between protein molecules (Ünal et al., 2006; Damodaran et al., 2008).

The mean hardness values were significantly lower in the samples in which 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ was used, ranging from 99.6 N for the 5P120 group to 100.9 N for GZP. Samples from other treatments did not differ significantly from the controls, ranging from 131.3 N for treatment 2P120 to 173.6 N for control C120. The polyphosphate additive had a significant influence on hardness when 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ was used, independently of the contact time. However, springiness was influenced by both the phosphate concentration and the contact time, because only the samples treated with 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min showed a significantly higher springiness (0.26) than the others. Cohesiveness was significantly modified by the addition of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, independently of concentration and contact time. There was no difference among the treatments. The samples treated with the additive (independently of concentration and contact time) showed lower cohesiveness than the control samples ($p < 0.01$). The mean values for cohesiveness ranged from 0.18 to 0.20 in the different treatments and from 0.21 to 0.23 in the control samples. These texture parameters are related to the strength of the internal links that compose the matrix of the samples. As polyphosphates increase the electrostatic repulsion between the peptide chains and the space between the myofibrils, more water is retained between the myofibrillar spaces, and the muscle tissue becomes more tender and springy and less cohesive (Damodaran et al., 2008).

Table 1

Treatment Control	Na ₅ P ₃ O ₁₀ solution	Immersion time	Moisture [g/100g]	pH	WHC [g/100g]	Color			Hardness (N)	Texture		Range of the physicochemical quality parameters measured after thawing of shrimp subjected to different polyphosphate and control treatments.
						L*	a*	b*		Springiness	Cohesiveness	
5P120	50 g/L	120 min	85.9 ± 0.2 ^a (85.4-86.2)	7.5 ± 0.1 ^a (7.4-7.6)	94.8 ± 0.4 ^a (94.6-96.8)	52.1 ± 0.8 ^a (50.4-55.1)	5.9 ± 0.3 ^a (5.5-6.4)	4.9 ± 0.6 ^a (4.2-7.3)	99.6 ± 13.6 ^a (67-115)	0.26 ± 0.03 ^a (0.22-0.35)	0.18 ± 0.02 ^a (0.16-0.26)	
5P60	50 g/L	60 min	82.2 ± 0.1 ^b (82.1-82.6)	7.2 ± 0.1 ^b (7.1-7.3)	92.7 ± 0.2 ^b (92.3-93.7)	52.0 ± 1.0 ^a (50.1-54.8)	5.9 ± 0.4 ^a (5.3-6.8)	5.1 ± 0.5 ^{ac} (4.0-5.9)	104.4 ± 25.9 ^a (57-166)	0.25 ± 0.03 ^{ab} (0.21-0.33)	0.19 ± 0.02 ^a (0.16-0.28)	
2P120	20 g/L	120 min	81.8 ± 0.2 ^c (81.6-82.1)	7.1 ± 0.1 ^b (7.0-7.3)	92.6 ± 0.2 ^b (92.2-93.0)	53.6 ± 0.5 ^b (52.4-54.5)	6.2 ± 0.3 ^{ab} (5.6-6.7)	6.1 ± 0.4 ^b (5.2-7.1)	131.0 ± 17.9 ^{ab} (86-167)	0.22 ± 0.07 ^b (0.17-0.46)	0.20 ± 0.03 ^a (0.17-0.28)	
2P60	20 g/L	60 min	80.4 ± 0.2 ^d (80.1-80.7)	7.0 ± 0.1 ^b (6.9-7.2)	89.9 ± 0.5 ^c (89.1-90.9)	53.6 ± 1.1 ^b (51.5-55.2)	6.5 ± 0.3 ^b (6.0-7.1)	6.5 ± 0.4 ^b (5.8-7.3)	141.0 ± 40.9 ^b (78-213)	0.20 ± 0.03 ^b (0.15-0.33)	0.20 ± 0.03 ^{ab} (0.26-0.27)	
GZP	50 g/L	1min*	81.4 ± 0.1 ^c (81.2-81.7)	7.2 ± 0.2 ^b (7.0-7.4)	91.0 ± 0.2 ^{bc} (89.9-91.3)	52.0 ± 0.8 ^a (50.0-53.3)	6.0 ± 0.1 ^a (5.8-6.2)	5.4 ± 0.4 ^c (4.7-6.3)	100.9 ± 19.6 ^a (76-177)	0.22 ± 0.03 ^b (0.19-0.31)	0.19 ± 0.04 ^a (0.14-0.38)	

GZC	---	1min*	72.2 ± 0.1 ^f (72.0-72.5)	6.4 ± 0.1 ^c (6.1-6.7)	87.3 ± 0.3 ^d (87.1-88.1)	59.0 ± 0.6 ^c (57.6-60.2)	7.2 ± 0.3 ^c (7.0-7.6)	7.5 ± 0.2 ^d (7.0-7.8)	155.9 ± 23.4 ^b (114-206)	0.20 ± 0.03 ^b (0.17-0.27)	0.21 ± 0.04 ^b (0.15-0.32)
C120	---	120 min	72.9 ± 0.1 ^f (72.6-73.2)	6.4 ± 0.1 ^c (6.2-6.9)	87.4 ± 0 ^d (87.1-87.9)	56.2 ± 0.6 ^c (55.4-57.2)	7.4 ± 0.3 ^c (6.9-7.7)	7.2 ± 0.4 ^d (6.3-7.9)	173.6 ± 41.8 ^b (133-309)	0.20 ± 0.02 ^b (0.18-0.25)	0.23 ± 0.41 ^b (0.17-34)
C60	---	60 min	72.4 ± 0.1 ^f (72.2-72.6)	6.4 ± 0.1 ^c (6.1-6.8)	87.1 ± 0.1 ^d (87.0-87.4)	56.1 ± 0.6 ^c (56.8-59.2)	7.4 ± 0.5 ^c (6.7-8.0)	7.3 ± 0.5 ^d (6.8-8.0)	162.7 ± 20.8 ^b (113-200)	0.20 ± 0.04 ^b (0.15-0.40)	0.21 ± 0.02 ^b (0.19-0.27)

a, b, c . . . Different letters in a column indicate significant differences ($p < 0.01$) within each treatment (ANOVA).

The treatment 5P120 refers to immersion in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min; 5P60 refers to immersion in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 60 min; 2P120 refers to immersion in a solution of 20 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min; 2P60 refers to immersion in a solution of 20 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 60 min; GZP refers to glazing in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. The control GZC refer to a glazing control in water without polyphosphate; C120 refers to a control immersion in water without polyphosphate for 120 min; and C60 refers to a control immersion in water without polyphosphate for 60 min.

--- solution without polyphosphate.

* Glazing process performed prior to freezing (Gonçalves & Ribeiro, 2009).

3.2. Low Field NMR results

Having established the physicochemical properties of the different treatments with $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ in frozen shrimp muscle, we studied the NMR proton relaxation measurements of these samples. Different methods were used to analyze the T_2 relaxation data: continuous distributed NMR relaxation curves, biexponential fitting of T_2 relaxation curves, and comparison of NMR and physicochemical data.

3.2.1. Continuous distributed NMR (T_2) relaxation curves

Fig. 2 shows the distributed T_2 relaxation-time spectra of thawed shrimp submitted to different treatments with phosphate during the freezing process. Both the treatment time and the phosphate concentration had a pronounced effect on the T_2 distributions. Comparison of the continuous distributed curves revealed visible differences in the distribution of water mobility between the treated shrimp and the control. The control tended to exhibit a slightly broader T_2 distribution than did the treatments, which is likely due to the differences in muscle composition and water distribution caused by polyphosphate use.

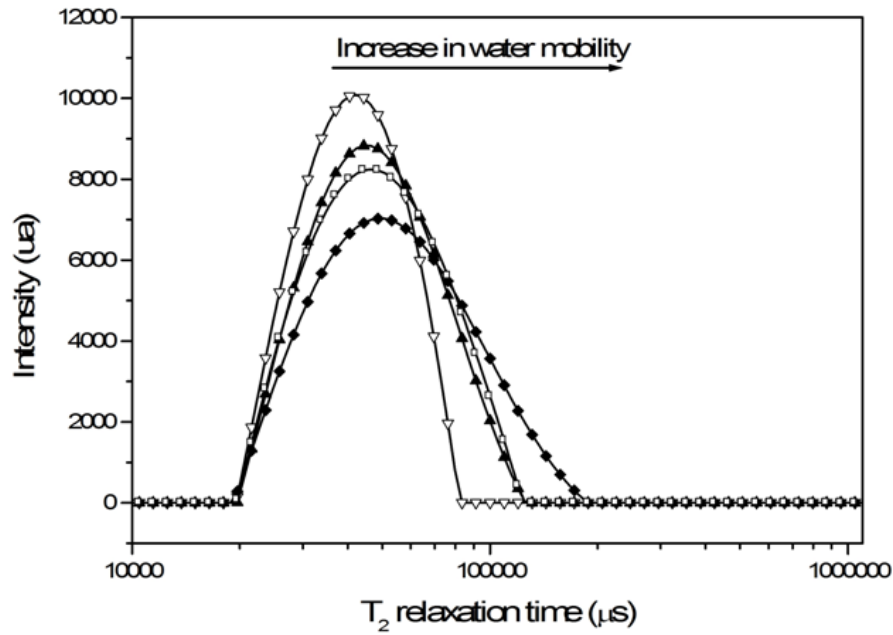


Fig. 2. Continuous relaxation time spectra of thawed shrimp. C120 (∇) refers to control immersion in water without polyphosphate for 120 min; 2P60 ($\blacktriangle$) refers to immersion in a solution of 20g /L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 60 min; GZP ($\square$) refers to glazing in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$; and 5P120 ($\bullet$) refers to immersion in a solution of 50 g/L $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ for 120 min.

3.2.2. Bi-exponential fitting of T_2 relaxation curves

Bi-exponential fitting of the transverse relaxation data resulted in the observation of two water populations in all samples, resulting in a faster relaxation time T_{21} in the range of 22.2 to 41.7 ms, and a slower relaxation time T_{22} in the range of 47.3–129.4 ms, depending on the group (treatment or control) (Table 2).

Table 2

Range of the LF ^1H NMR parameters obtained in shrimp muscle, according to the different treatments and controls.

Treatment Control	Na ₅ P ₃ O ₁₀ solution	Immersion Time	T ₂₁ (ms)	A ₂₁ (%)	T ₂₂ (ms)	A ₂₂ (%)
5P120	50 g/L	120 min	41.7 ± 2.0 ^a (38.4-46.1)	79.2 ± 7.0 ^a (68.3-90.9)	129.4 ± 34.9 ^a (88.9-217)	20.8 ± 7.0 ^a (9.1-31.7)
5P60	50 g/L	60 min	37.2 ± 2.2 ^b (32.9-42.5)	64.7 ± 9.3 ^b (50.6-86.5)	85.4 ± 17.8 ^b (68.8-146)	35.2 ± 9.3 ^b (13.5-49.4)
2P120	20 g/L	120 min	37.2 ± 2.0 ^b (33.2-40.6)	72.5 ± 9.6 ^c (50.1-87.3)	79.8 ± 14.03 ^b (59.8-116)	27.5 ± 9.6 ^c (12.6-50.0)
2P60	20 g/L	60 min	33.8 ± 2.9 ^c (27.0-37.0)	59.6 ± 15.2 ^b (50.8-81.2)	65.8 ± 8.9 ^c (53.1-79.5)	40.4 ± 15.2 ^d (18.8-70.2)
GZP	50 g/L	1min*	35.7 ± 1.4 ^{bc} (33.2-39.2)	64.8 ± 5.4 ^b (54.9-83.2)	75.5 ± 7.7 ^{bc} (67.7-96.5)	35.2 ± 5.4 ^b (16.8-45.1)
GZC	---	1min*	23.5 ± 3.3 ^d (20.0-30.8)	22.6 ± 9.5 ^f (12.0-56.8)	49.2 ± 3.4 ^d (47.1-60.0)	77.3 ± 9.5 ^e (42.2-88.0)
C120	---	120 min	22.2 ± 3.4 ^d (16.2-28.5)	19.3 ± 6.7 ^f (9.6-45.3)	47.3 ± 1.7 ^d (47.0-52.0)	80.6 ± 6.7 ^e (60.5-90.4)
C60	---	60 min	22.2 ± 4.0 ^d (14.3-29.2)	17.9 ± 6.9 ^f (6.9-33.0)	47.8 ± 2.1 ^d (47.2-53.4)	82.1 ± 6.9 ^e (67.8-93.1)

a, b, c . . . Different letters in a column indicate significant differences ($p < 0.01$) within each treatment (ANOVA).

The faster relaxation component (T₂₁) likely represents the water within the myofibrillar structure (intra-myofibrillar), while the slower component (T₂₂) likely represents the water outside the myofibrils (extra-myofibrillar) (Bertram et al., 2001; Bertram & Andersen, 2004). No previous studies on the relaxation time of thawed fish treated only with polyphosphate are available. However, in studies of fish treated with NaCl, the values of T₂₁ and T₂₂ were 38 – 86 and 85 – 169 ms, respectively (Gudjónsdóttir et al., 2011a). The T₂₁ values of shrimp treated with NaCl and then frozen and thawed ranged between 42 and 82 ms, and the T₂₂ values ranged between 495 and 1171 ms (Gudjónsdóttir et al., 2011c). The differences in relaxation time observed in different studies are most likely due to differences between the matrices analyzed (Bertram et al., 2001).

In the present study, the relaxation times T₂₁ and T₂₂ (which correspond to the intra-myofibrillar and extra-myofibrillar water, respectively) of the treated samples were different

from the control samples. Significant increases ($p < 0.01$) in the faster relaxation time (T_{21}) and slower relaxation time (T_{22}) were observed with the use of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. In the control samples (GZC, C120 and C60), T_{21} ranged from 22 to 23 ms, and T_{22} ranged from 47 to 49 ms. In the samples treated with the $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ additive, T_{21} ranged from 33 to 41 ms, and T_{22} ranged from 66 to 129 ms. The use of polyphosphate and the treatment time strongly affected the T_2 distribution. These results show that LF ^1H NMR can be used to identify changes in water mobility in shrimp muscle with the use of the $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ additive. The presence of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ affected the water to an extent measurable by LF ^1H NMR. Gudjónsdóttir et al. (2011c) also observed longer relaxation times T_{21} in samples of shrimp immersed in brine for longer times, and attributed this to myofibrillar swelling induced by the salt. The same trend was observed by Erikson, Veliyulin, Singstad, & Aursand (2004) and Aursand et al. (2009), who suggested that this increase in water mobility of the muscle tissues occurs due to the increase of electrostatic repulsion between proteins that increases when the salt content is increased, widening the space between myofilaments. The $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ additive may have the same effect. Polyphosphates increase pH and shift proteins away from their isoelectric point, increasing the electrostatic repulsion and consequently the distance between molecules. Phosphates also act as chelating agents/sequestrants of Ca^{2+} and Mg^{2+} , and because these ions are linked to muscle proteins, these protein myofilaments are released from cross-links. Once the polypeptide chains are separated, the distance between them is increased by electrostatic repulsion, and thus the spaces between protein networks increase, causing swelling of the muscles and increased water mobility, resulting in longer relaxation times T_{21} and T_{22} .

3.2.3. Comparison of NMR and physicochemical data

The NMR data obtained by biexponential fitting were correlated with the physicochemical parameters. Significant correlations were observed between the NMR

relaxation parameters and the physicochemical properties, with the exception of springiness and cohesiveness. The relaxation times T_{21} and T_{22} showed a direct correlation with the moisture content ($r_{T_{21}}=0.93$; $r_{T_{22}}=0.77$), pH ($r_{T_{21}}=0.87$; $r_{T_{22}}=0.70$) and WHC ($r_{T_{21}}=0.90$; $r_{T_{22}}=0.81$). The values of T_{21} and the WHC increased as the concentration of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ increased (Fig. 3). These parameters (T_{21} and WHC) did not change in the control samples. As in the present study, Gudjónsdóttir et al. (2011a) found that WHC increases were associated with longer T_{21} relaxation times in salted cod, and attributed this to the expansion of the muscle when salt is added. Gudjónsdóttir et al. (2011c) also observed a significant correlation between T_{22} and moisture content in salted shrimp. Bertram et al. (2001) demonstrated that the relaxation times were efficient parameters for indicating changes in muscle pH, because these changes induce structural changes in the postmortem muscle.

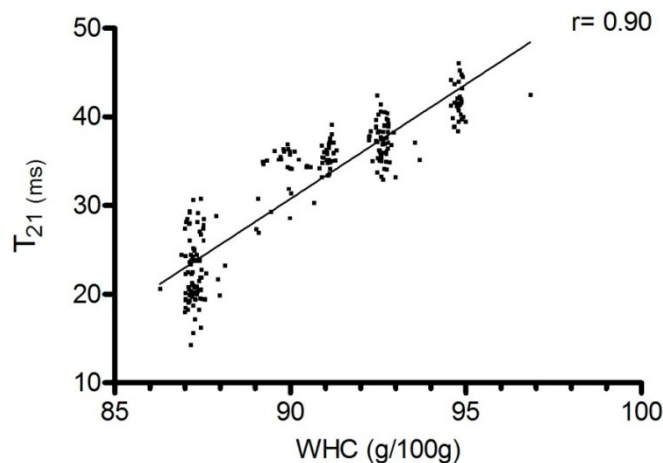


Fig. 3. Correlation between Transverse relaxation time (T_{21}) and water-holding capacity (WHC) in shrimp muscle, according to the different treatments and controls.

The relaxation times (T_{21}) were correlated with the parameters L^* ($r=-0.82$), a^* ($r=-0.82$), and b^* ($r=-0.79$). The fading of colors in shrimps and the increases in the relaxation time T_{21} are closely related to decreased protein denaturation. When the protein is not denatured, the pigment (astaxanthin) remains connected to the protein and its color is not

apparent. Gudjónsdóttir et al. (2011b) demonstrated in electrophoretic analyses of cod that an increase in T_{21} indicates reduced protein denaturation. This accords with the findings of the present study that longer T_{21} relaxation times were correlated with a lower intensity of a^* and b^* (Fig. 4).

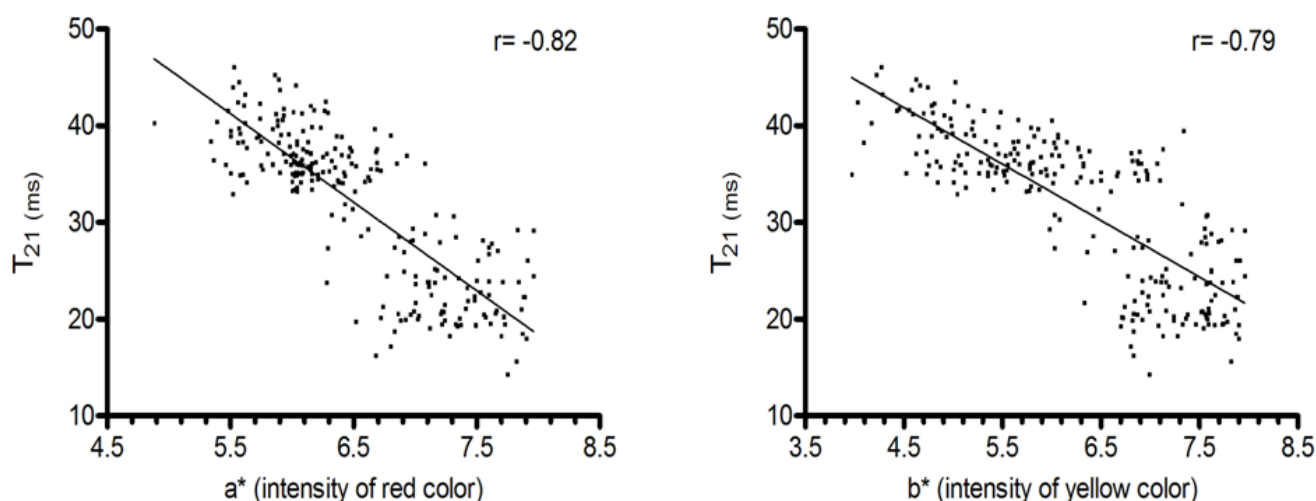


Fig. 4. Correlation between Transverse relaxation time (T_{21}), a^* (redness—intensity of red color) and b^* (yellowness—intensity of yellow color) in shrimp muscle, according to the different treatments and controls.

4. Conclusions

The changes in the samples with the use of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ at different concentrations, exposure times, and contact modes were reflected in the transverse relaxation times obtained in the LF ^1H NMR analyses. Relaxation times increased when higher concentrations of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ were used, indicating that the additive causes changes in the muscle structure. The relaxation times T_{21} and T_{22} were significantly correlated with moisture, pH, WHC and color. T_2 relaxation proved to be a sensitive tool to observe changes in the water mobility in shrimp muscle treated with polyphosphate, and offers a useful alternative for investigating the properties of water distribution, which indirectly indicates the quality of the thawed shrimp.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Coordination for the Improvement of Higher-Level Personnel (CAPES) for financial support.

References

- Andersen, C. M., & Rinnan, A. (2002). Distribution of Water in Fresh Cod. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 687-696.
- Aursand, I. G., Veliyulin, E., Böcker, U., Ofstad, R., Rustad, T., & Erikson, U. (2009). Water and salt distribution in Atlantic salmon (*Salmo salar*) studied by low-field ^1H NMR, ^1H and ^{23}Na MRI and light microscopy: Effects of raw material quality and brine salting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 46-54.
- Belton, P. S. (1990). Can nuclear magnetic resonance give useful information about the state of water in foodstuffs? *Agricultural and Food Chemistry*, 2, 179-209.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2007). NMR and the water-holding issue of pork. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124, 35-42.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2004). Applications of NMR in Meat Science. Review Article Annual Reports on *NMR Spectroscopy*, 53, 157-202.
- Bertram, H. C., Karlsson, A. H., Rasmussen, M., Pedersen, O. D., Døntrup, S., & Andersen, H. J. (2001) Origin of multiexponential T_2 relaxation in muscle myowater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3092-3100.
- Bertram, H. C., Meyer, R. L., & Andersen, H. J. (2009). A look at NMR relaxometry applications in meat science: recent advances in coupling NMR relaxometry with spectroscopic, thermodynamic, microscopic and sensory measurements. In M. Gudjónsdóttir, P. Belton, & G. Webb (Eds.), *Magnetic resonance in food science—Changes in a changing world* (pp. 241-250). Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Bertram, H. C., Purslow, P., & Andersen, H. J. (2002). Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 824-829.
- Carr, H. Y., Purcell, E. M. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *American Journal of Physiology*, 94, 630-638.
- Cope, F. W. (1969) Nuclear magnetic resonance evidence using D₂O for structured water in muscle and brain. *Biophysical Journal*, 9, 303- 319.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. (4th ed.). Boca Raton: CRC Press, (Chapter 5).

- Erdogdu, B. S., Erdogan, F., & Ekiz I. H. (2007) Influence of Sodium Tripolyphosphate treatment and cooking time on cook losses and textural properties of red meats. *Journal of Food Process Engineering*, 30, 685–700.
- Erdogdu, F., Balaban, M. O., Otwell, W. S., & Garrido, L. (2004) Cook-related yield loss for pacific white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. *Journal of Food Engineering*, 64, 297-300.
- Erikson, U., Veliyulin, E., Singstad, T. E., Aursand, M. (2004). Salting and desalting of fresh and frozen-thawed cod (*Gadus morhua*) fillets: a comparative study using ^{23}Na MRI, low-field ^1H NMR, and physicochemical analytical methods. *Journal of Food Science*, 69, 107–114.
- Finch, E. D., Harmon, J. D., & Muller, B. H. (1971). Pulsed NMR measurements of the diffusion constant of water in muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 147, 299–310.
- Gómez-Guillén, M. C., Montero, P., Hurtado, O., & Borderias, A. J. (2000). Biological characteristics affect the quality of farmed Atlantic salmon and smoked muscle. *Journal of Food Science*, 65, 53–60.
- Gonçalves, A. A., & Ribeiro, J. L. D. (2008). Optimization of the freezing process of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) previously treated with phosphates. *International Journal of Refrigeration*, 31, 1134–1144.
- Gonçalves, A. A., & Ribeiro, J. L. D. (2009). Effects of phosphate treatment on quality of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) processed with cryomechanical freezing. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1435–1438.
- Gonçalves, A. A., Rech, B. T., Rodrigues, P. M., & Pucci, D. M. T. (2008). Quality evaluation of frozen seafood (*Genypterus brasiliensis*, *Prionotus punctatus*, *Pleoticus muelleri* and *Perna perna*) previously treated with phosphates. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3, 248-258.
- Gudjónsdóttir M., Lauzon H. L., Magnússon, H., Sveinsdóttir, K., Arason, S., Martinsdóttir, E., & Rustad, T. (2011a). Low field Nuclear Magnetic Resonance on the effect of salt and modified atmosphere packaging on cod (*Gadus morhua*) during superchilled storage. *Food Research International*, 44, 241–249.
- Gudjónsdóttir, M., Arason, S., & Rustad, T. (2011b). The effects of pre-salting methods on water distribution and protein denaturation of dry salted and rehydrated cod – A low-field NMR study. *Journal of Food Engineering*, 104, 23–29.
- Gudjónsdóttir, M., Jónsson, Á., Bergsson, A.B., Arason, S., & Rustad T. (2011c) Shrimp Processing Assessed by Low Field Nuclear Magnetic Resonance, Near Infrared Spectroscopy, and Physicochemical Measurements: The Effect of Polyphosphate Content and Length of Prebrining on Shrimp Muscle. *Journal of Food Science*, 76, E357-E367.

Lakshmanan, R., Parkinson, J. A., & Piggott, J. R. (2007). High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). *LWT-Food Science and Technology*, 40, 544–555.

Martinez, I., Aursand, M., Erikson, U., Singstad, T. E., Veliyulin, E., & Van der Zwaag, C. (2003). Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Food Science and Technology*, 14, 489–498.

Meiboom, S. & Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear times. *Review of Scientific Instruments*, 29, 688–691.

Nguyen, M.V., Jonsson, J. O., Thorkelsson, G., Arason, S., Gudmundsdottir, A. & Thorarinsdottir, A.K. (2012). Quantitative and qualitative changes in added phosphates in cod (*Gadus morhua*) during salting, storage and rehydration. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 126-132.

Rocha, M. M. R. M. (2010). Liofilização como método de agregar valor ao camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). João Pessoa, PB, Brazil: Universidade Federal da Paraíba. 183pp.

Ruan, R. R., Chen, P. L. (2001). Nuclear magnetic resonance technique and their application in the food quality analysis. In Gunasekaran, S (Eds.), *Nondestructive food evaluation: techniques to analyze properties and quality* (pp.165-216). New York: Marcel Dekker.

Shahidi, F., Metusalach, A., & Brown, J. A. (1998). Carotenóid pigments in seafood an aquaculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 1-67.

Sigurgisladdottir, S., Hafsteinsson, H., Jonsson, A., Lie, O., Nortvedt, R., & Thomassen, M. (1999). Textural properties of raw salmon fillets as related to sampling method. *Journal of Food Science*, 64, 99–104.

Tenorio, L. M. D., García-Carreño, F. L., & Aguillar, R.P. (2007). Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*, 31, 563–576.

Thybo, A. K., Andersen, H.,J., Karlsson, A. H., Donstrup, S., & Stodkilde-Jørgensen , H. (2003). Low-field NMR relaxation and NMR-imaging as tools in differentiation between potato sample and determination of dry matter content in potatoes. *LWT-Food Scinece and Technology*, 36, 315–322.

Toldrá, F. Muscle Foods: water, structure and Functionality. (2003). *Food Science and Technology International*, 9, 173-177.

Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Giannakourou, M., & Taoukis, P. (2009) Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 664–671.

Ünal, B. S., Erdogdu, F., & Ekiz, H. I. (2006). Effect of temperature on phosphate diffusion in meats. *Journal of Food Engineering*, 76, 119–127.

3.2 ARTIGO 2: QUALITY ATTRIBUTES IN SHRIMP TREATED WITH POLYPHOSPHATE AFTER THAWING AND COOKING: A STUDY USING PHYSICOCHEMICAL ANALYTICAL METHODS AND LOW-FIELD ^1H NMR (Aceito para publicação em 04 de janeiro de 2013 no “Journal of Food Process Engineering”, Wiley Periodicals®)

Full title: QUALITY ATTRIBUTES IN SHRIMP TREATED WITH POLYPHOSPHATE AFTER THAWING AND COOKING: A STUDY USING PHYSICOCHEMICAL ANALYTICAL METHODS AND LOW-FIELD ^1H NMR

QUALITY OF SHRIMP COOKING TREATED WITH STP: PHYSICOCHEMICAL METHODS AND LF ^1H NMR

CARLA DA SILVA CARNEIRO^{1,4}, ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO¹, ROBERTA DE OLIVEIRA RESENDE RIBEIRO¹, CARLOS ADAM CONTE JÚNIOR¹, THIAGO SILVEIRA ÁLVARES², EDGAR FRANCISCO OLIVEIRA DE JESUS³

¹ *Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Fluminense, Vital Brasil Filho 64, Zip Code 24230-340, Niterói, RJ, Brazil*

² *Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Zip Code 21941-909, Rio de Janeiro, Brazil*

³ *Laboratório de Instrumentação Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P.O. Box 68509, Zip Code 21941-972, Rio de Janeiro, Brazil*

ABSTRACT

The effects of polyphosphate on parameters of quality in shrimp (after thawing and cooking) were investigated using physicochemical analytical methods and Low-Field Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (LF ^1H NMR). The NMR data were treated by bi-exponential fitting and compared with the physicochemical data. The physicochemical parameters demonstrated that treatments with different concentrations of sodium tripolyphosphate (STP) and different time exposures influenced parameters such as cook loss, moisture, pH, color, and texture. These differences were reflected in the transverse relaxation (T_2) data. Bi-exponential fitting of the T_2 resulted in the observation of two water populations

in all samples, T_{21} and T_{22} , with relaxation times in the range of 24-47 ms and 63-120 ms, respectively. Pronounced changes in the T_{21} and T_{22} relaxation data were observed during the different treatments with polyphosphate revealing changes in water properties. Good linear correlations were observed between the T_2 parameters and physicochemical data.

KEYWORDS: Shrimp, Frozen, Cooked, Tripolyphosphate, Quality, Low-Field Nuclear Magnetic Resonance.

PRACTICAL APPLICATIONS

Shrimp processing contains various steps that can lead to denaturation or aggregation of proteins, such as freezing and cooking. In this context, polyphosphates uses prior to the freezing of shrimp can improve yields, water holding capacity and the sensory attributes of the final product. The fish industry seeks to polyphosphates in order to optimize production and obtain better quality products. Therefore, studies to identify the ideal phosphate concentration and contact time required for quality production in the frozen shrimp industry are important. Traditional analytical methods for physicochemical measurements are, however, time-consuming, sample-destructive and expensive. Low Field ^1H Nuclear Magnetic Resonance is a rapid noninvasive method to investigate water mobility with in materials and foods. The method showed strong correlations to various physicochemical properties which are important quality factors during shrimp processing. Moreover, the techniques are fast, reliable, and non sample destructive.

INTRODUCTION

Freezing shrimps is an important preservation method that might lead to the denaturation and aggregation of proteins caused by low temperatures (Tsironi *et al.* 2009). These changes can result in drip loss and sensorial changes in the product (Gonçalves and Ribeiro 2009). Furthermore, cooking shrimps also leads to changes in quality attributes affecting textural and physicochemical properties and causing loss of weight. A loss in moisture is caused by the decreased capacity of proteins in holding water due to denaturation and internal forces caused by pressures from connective tissue shrinkage resultant from the increase in temperature (Erdogdu *et al.* 2004). The result is a product with reduced eating

quality (Burgaard and Jørgensen 2010). Moreover, liquid losses might also directly result in economic losses (Barroso *et al.* 1998).

Phosphate agents are used in the seafood industry to prevent these changes in frozen and cooked products. The mechanism of action of phosphates is based on the ionization of protein molecules, which increases the interaction between protein and water molecules due to increased pH and ionic strength, and reduces the interactions among the proteins (Martin *et al.* 2002; Ünal *et al.* 2006; Erdogdu *et al.* 2007; Damodaran *et al.* 2008). Sodium tripolyphosphate (STP) is the most commonly used additive for these purposes (Erdogdu *et al.* 2004). The amount of phosphates is regulated by legislation. The *Codex Alimentarius* tolerates a percentage of phosphates in the final product of the 1% (Codex, 2011). The concentration of this additive more commonly used by seafood industry varies 2-6%, which result in approximately 0.5% of residual phosphate (Gonçalves and Ribeiro 2008). The effects of phosphates in increasing water-binding capacity of muscles to control the loss of natural muscle juices, reduce the susceptibility to freeze burn, decrease the cook and thaw drip losses, improve the textural properties, and stabilize the color of fish products have been reported in several studies (Lampila 1992; Erdogdu *et al.* 2004; Erdogdu *et al.* 2007; Gonçalves and Ribeiro 2008; Gonçalves and Ribeiro 2009). However, the effects of phosphates are also dependent on the application methodology and its concentration (Erdogdu *et al.* 2007). Injection, curing, spraying, and dipping are a few of methods used to expose products to STP (Ünal *et al.* 2006). The fish industry seeks to use this additive in order to optimize production and obtain better quality products. Therefore, studies to identify the ideal phosphate concentration and contact time required for quality production in the frozen shrimp industry are important.

Low-field nuclear magnetic resonance (LF ^1H NMR) spectroscopy is based on the measurement of transverse water proton relaxation and can be used to detect changes in properties of foods that occur during frozen storage or processing (Andersen and Rinnan 2002; Martinez *et al.* 2003). Several studies have reported that the NMR relaxation is a rapid, non-invasive, and non-destructive method of determining the distribution of water pools with different relaxation time rates in food (Ruan and Chen 1998; Arana 2012).

The objectives of this study were to conduct a comprehensive investigation of the relationship between the quality of shrimp, after thawing and cooking, and the use of different treatments with polyphosphate using physicochemical analytical methods and Low-Field Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. The quality-related parameters that were

measured to assess information about the distribution of water in the muscle were cook loss, moisture, pH, color, texture, and LF ^1H NMR.

MATERIALS AND METHODS

Raw Material and Experimental Design

The marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) used in the study were caught on the coast of Rio de Janeiro, Brazil, (22°51'S and 42°03'W), and maintained on ice until manual peeling and head removal. The shrimps were weighed, divided in eight groups (each containing 5-kg of shrimp), and submitted to the different treatments and controls. The treatments varied in STP (Nutrifos BR®) concentration (5 or 2%) and dipping time (120 min, 60 min, or 1 min). The immersion for 1 min is characterized as the glazing method, which is commonly used in the frozen foodstuffs industry. The immersion of previously frozen shrimp in polyphosphate solution or water without polyphosphate at 1 ± 0.5 °C was performed according to the methodology described by Gonçalves and Ribeiro (2009). The control treatments were performed in triplicates with immersion in water without STP or glazing without the additive. The water and solutions were maintained at 2 ± 1 °C in all treatments and controls. After immersion, the shrimps were drained for 1 min and quickly frozen; samples were stored at -18 °C.

All samples were frozen subsequently to the treatments (except in the glazing treatment) which consisted of: (1) 5%120, immersion in a solution of 5% STP for 120 min; (2) 5%60, immersion in a solution of 5% STP for 60 min; (3) 2%120, immersion in a solution of 2% STP for 120 min; (4) 2%60, immersion in a solution of 2% STP for 60 min; (5) GZ5%, glazing in a solution of 5% STP for 1 minute. The performed controls were: (6) C120, immersion in water for 120 min; (7) C60, immersion in water for 60 min; (8) GZC, glazing in water for 1 minute.

Analysis

After stored frozen, the samples were thawed at 4 ± 1 °C for 24 h (Gonçalves and Ribeiro 2008) and cooked in boiling water (100 °C) for exactly 2 min as described by Di Turi *et al.* (2005). All samples were drained and weighed at room temperature (25 °C) before and after cooking. Thirty samples were analyzed from each group, and the following parameters

were evaluated: moisture, pH, color, texture, and Low-Field Nuclear Magnetic Resonance (LF ^1H NMR).

Cooking losses, Moisture, and pH

The cooking loss was calculated as the percent in weight differences between the raw and cooked shrimp based on the raw weight. The shrimps were weighed raw and cooked. For weighing after the cooking were left at room temperature (25 °C) for 10 min after thermal processing.

The moisture content was analyzed by Infrared Dryer (ID) (Mettler-Toledo GmbH® Model LJ16, Greifensee, Switzerland), which involves the penetration of heat into the sample. These measurements were performed using 5 ± 0.1 g of triturated shrimp muscles.

The pH measurements were performed using a pH electrode connected a to pH-meter (Digimed® Model DM-32, São Paulo, Brazil), immersing the electrode in a suspension made by mixing 5 g of minced shrimp and 50 mL of distilled water.

Color and Texture

The color parameters (L^* , a^* , b^*) were measured by a Minolta type CR-400 colorimeter (Konika Minolta®, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. The instrument records the L^* (lightness—intensity of white color), a^* (redness—intensity of red color), and b^* (yellowness—intensity of yellow color) values. The values reported in this study represented the averages of triplicate measurements taken at two or three different measuring points in the flesh side of the fillet, depending on its size.

Textural properties were determined using a Texture Analyzer (MODEL TA-XT plus, Stable Micro Systems®, Godalming, Surrey, United Kingdom), at room temperature (25 °C), and 10 min after cooking. The sample was placed on the base-plate and compressed two times by a platen attached to the drive system. The holding time between the two compressions was 5 s. The texture analyzer was equipped with a 75 mm diameter rounded head probe and a 5 kN load cell. The cross speed was set at 0.80 mm/s and the post test speed at 10.00 mm/s; a 100 g constant force was applied. In order to protect the sample from cracking, the compression was limited to 50% of the sample's height based on data obtained in preliminary trials. Measurements were taken in 30 individuals from each group and hardness, springiness, and cohesiveness were calculated according to the method of Bourne (1978, 2002) and

Tsironi *et al.* (2009). For this analysis were selected shrimp of similar size (weight and dimensions).

Low Field Nuclear Magnetic Resonance

The study of the relaxation times using low field ^1H NMR was performed on portions of 15 g of shrimp placed inside cylindrical glass tubes (50-mm diameter). The measurements of the transverse relaxation time (T_2) relaxation times were performed on a Maran Benchtop Pulsed NMR analyzer (MARAN DXR 2, Oxford Instruments®, Osney Mead, Oxford, United Kingdom) operating at 13 MHz. The T_2 was measured at 25 ± 1 °C using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) with 12 scans, 2048 points, 3.5 seconds between scans, and 300 μs between pulses of 90° and 180° (Carr and Purcell 1954; Meiboom and Gill 1958). The LF-NMR relaxation curve was fitted to a multi-exponential curve with the RI-WINFIT software (version 2.5, Oxford instruments®). The bi-exponential fitting analysis of the T_2 relaxation data was performed by fitting the absolute value of the CPMG, where T_{21} and T_{22} were the relaxation components, and A_{21} and A_{22} were the corresponding amplitudes.

Data analysis

One-way analysis of variance with repeated measurements was used to identify differences between quality parameters (cook loss, moisture, pH, color, and texture) and the NMR data (T_{21} and T_{22}) in response to the different treatments with sodium tripolyphosphate (5P120 x 5P60 x 2P120 x 2P60 x GZP x GZC x C120 x C60). Pearson correlations were used to examine the relationship between each quality parameters and the NMR data. Additional post-hoc tests with Bonferroni adjustment were performed when a significant F was detected. The Dunnett's C test for pairwise comparisons was performed when unequal group variances were identified. The assumptions of homogeneity of variances and sphericity were examined with the Levene and Mauchly tests, respectively. The Greenhouse-Geisser adjustment was made when the assumption of sphericity was violated. Statistical significance was set at the 0.01 level of confidence. All analyses were performed with a commercially available statistical package (SPSS Inc., Version 17.0 Chicago, Illinois).

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of STP on cooking loss, moisture, and pH in thawed and cooked shrimp

The results on the observed changes in cooking loss, moisture, and pH in thawed and cooked shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with solutions containing different concentrations of STP (5 and 2%) during different times (120, 60 and 1 min), and controls are shown in the Table 1.

TABLE 1.

COOKING LOSS, MOISTURE, AND PH IN THAWED AND COOKED SHRIMP, DIPPED IN DIFFERENT CONCENTRATION OF SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE (STP) DURING DIFFERENT TIMES (TREATMENTS) AND DIPPED IN WATER WITHOUT POLYPHOSPHATE (CONTROLS)

STP Concentration Dipping time	Treatments					Controls		
	5% 120 min	5% 60 min	2% 120 min	2% 60 min	Glazing 5% 1 min*	--- 120 min	--- 60 min	Glazing --- 1 min*
Cooking losses (%)	18.5±0.5 ^a (17.9-19.7)	19.4±0.6 ^a (17.3-20.9)	22.9±0.4 ^b (21.9-24.6)	24.8±0.6 ^b (24.0-26.7)	23.0±0.6 ^b (22.1-23.9)	38.6±0.9 ^c (37.1-40.9)	37.1±0.8 ^c (36.0-38.6)	38.5±0.9 ^c (35.9-40.7)
Moisture (%)	80.6±0.4 ^a (80.0-81.4)	80.4±0.3 ^a (80.0-81.2)	78.4±0.5 ^b (77.6-79.2)	78.5±0.3 ^b (77.4-79.5)	78.3±0.7 ^b (77.0-79.1)	73.4±0.6 ^c (72.2-74.6)	72.6±0.5 ^c (71.7-73.8)	73.±0.6 ^c (72.0-74.9)
pH	7.3±0.1 ^a (7.0-7.4)	7.2±0.1 ^a (7.1-7.3)	7.1±0.1 ^a (7.0-7.3)	6.9±0.1 ^b (6.8-7.2)	6.9±0.2 ^b (6.3-7.4)	6.7±0.2 ^c (6.0-6.9)	6.7±0.1 ^c (6.4-6.9)	6.7±0.2 ^c (6.0-6.9)

Values are means ± standard deviation, minimum and maximum values

^{a, b, c, d} Different letters in the lines indicate significant difference ($p < 0.01$) within each treatment (ANOVA).

--- Solution without polyphosphate.

* Glazing process performed prior to freezing Gonçalves and Ribeiro (2009).

The smallest yield loss (cooking loss) and highest average moisture content after cooking were observed in shrimps immersed in 5% STP solution for 120 and 60 min ($p < 0.01$). The immersion over 120 or 60 min, in solutions with the same concentration, did not present different results; thus, it was concluded that the shortest time (60 min) was enough for an efficient additive action. However, shrimps treated in 5% STP solution during 1 min (glazing) presented similar yield than samples treated with a smaller amount of additive (2%) during longer times (120 and 60 min) ($p < 0.01$). Therefore, it was observed that longer immersion times (120 and 60 min) in solutions with lower STP concentration (2%) instead of solutions with higher additive content (5%) at the glazing stage, resulted in the same liquid holding rate. Similar results were observed by Ünal *et al.* 2006, who when assessing the diffusion rate of this additive in protein foods, observed that samples immersed in 6% STP

solutions during 20 min presented the same STP average concentration as samples immersed in 2% STP solution for 30 min. It is relevant to point out that treatment with STP involves a period of diffusion of the additive into the tissue (Erdogdu *et al.* 2007). The pH results also showed the influence of the contact time with STP solutions; the pH of the samples treated with 5% STP solutions for 60 and 120 min and samples treated with 2% STP solutions for 120 min were similar and significantly higher than in others samples. Samples immersed for 60 min in 2% solutions and for 1 min in 5% solutions of STP presented similar results ($p>0.01$). The pH increase in the muscle causes proteins to move away from their isoelectric points (pI) and results in an increased net negative charge and consequently increased electrostatic repulsion between protein molecules. This repulsion favors an increase in the number of water molecules retained between the proteins; however, this is not the sole mechanism of action of phosphates influencing water holding and yield after fish cooking (Lampila 1992; Gonçalves *et al.* 2008). The chelation of metal ions and dissociation of the actomyosin complex also result in increased muscle water holding capacity (Damodaran *et al.* 2008). The control samples presented significantly lower moisture and pH results and higher weight loss after cooking than samples treated with STP. The results of the control samples did not vary with different immersion times.

Effects of STP on the color and texture of thawed and cooked shrimp

The color and texture results in shrimp samples treated with different STP concentrations during different contact times are shown in Table 2. There were no lightness differences (L^* values) among the analyzed groups ($p>0.01$). However, the control samples presented higher a^* and b^* values (red and yellow) than the samples treated with STP ($p<0.01$). Samples treated with the 5% STP solution presented significantly lower a^* and b^* values compared to the samples treated with 2%, except the shrimps submitted to glazing with STP. The color of the samples submitted to glazing (immersion in 5% STP for 1 min) was similar to the color of the samples immersed in 2% STP. The immersion times (120 or 60 min) did not influence the intensity of the a^* and b^* values in the treatments with 5% and 2% of STP.

The market value of shrimp is predominately based on the visual appearance of their body color. Thus, the appearance of the product and the resulting quality implications play a significant role in maintaining high consumer acceptance (Bono *et al.* 2012). The increase in the intensity of the red or yellow color during cooking is caused by muscle protein

denaturation and release of the carotenoid pigment bound to the proteins (carotenoproteins) (Latscha 1989; Niamnuy *et al.* 2008). In this context, the polyphosphate additive acts as a color stabilizer during cooking by decreasing the levels of protein denaturation.

TABLE 2.

COLOR AND TEXTURE OF THAWED AND COOKED SHRIMPS, DIPPED IN DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE (STP) DURING DIFFERENT TIMES (TREATMENTS), AND DIPPED IN WATER WITHOUT POLYPHOSPHATE (CONTROLS)

STP Concentration Dipping time	Treatments					Controls		
	5% 120 min	5% 60 min	2% 120 min	2% 60 min	Glazing 5% 1 min *	--- 120 min	--- 60 min	Glazing --- 1min *
Color								
L*	63.6±1.1 ^a (61.2-65.2)	62.8±0.8 ^a (61.3-64.5)	61.8±0.6 ^a (60.9-62.9)	63.9±0.6 ^a (63.2-65.2)	63.4±0.9 ^a (61.1-65.0)	63.1±1.1 ^a (61.3-65.1)	64.1±0.6 ^a (63.5-65.2)	63.4±0.5 ^a (62.1-64.3)
a*	16.9±1.8 ^a (14.1-19.9)	18.2±0.7 ^a (16.8-19.4)	19.7±0.6 ^b (18.2-20.9)	19.9±0.6 ^b (19.4-20.9)	19.7±0.8 ^b (16.8-20.9)	21.7±0.9 ^c (20.2-23.3)	21.9±0.5 ^c (20.8-22.5)	21.1±0.6 ^c (20.0-21.8)
b*	16.9±1.5 ^a (15.4-17.9)	16.9±0.5 ^a (16.1-18.1)	17.7±0.5 ^b (16.9-18.4)	17.7±0.7 ^b (17.1-19.6)	17.4±0.8 ^b (16.1-18.9)	20.1±0.6 ^c (18.3-21.0)	20.3±0.3 ^c (19.7-20.8)	20.0±0.5 ^c (18.3-21.0)
Texture								
Hardness (N)	74.9±14.2 ^a (55.0-105.0)	74.3±12.6 ^a (55.0-98.0)	94.9±13.4 ^b (90.0-140.0)	110.9±16.0 ^b (80.0-144.0)	101.6±14.1 ^b (98.1-136.0)	135.7±52.2 ^{c,d} (86.0-342.0)	142.5±30.7 ^d (91.0-233.0)	138.7±49.6 ^{c,d} (58.0-272.0)
Springiness	0.550±0.061 ^a (0.497-0.730)	0.536±0.046 ^a (0.445-0.648)	0.533±0.042 ^a (0.422-0.621)	0.509±0.066 ^a (0.421-0.614)	0.529±0.077 ^a (0.499-0.678)	0.402±0.040 ^b (0.344-0.489)	0.399±0.042 ^b (0.354-0.481)	0.411±0.045 ^b (0.334-0.489)
Cohesiveness	0.381±0.054 ^a (0.290-0.503)	0.383±0.059 ^a (0.293-0.542)	0.400±0.045 ^a (0.330-0.528)	0.399±0.057 ^a (0.307-0.548)	0.395±0.061 ^a (0.291-0.535)	0.435±0.038 ^b (0.385-0.540)	0.456±0.033 ^b (0.393-0.508)	0.477±0.055 ^b (0.370-0.571)

Values are means ± standard deviation, minimum and maximum values

^{a, b, c, d} Different letters in the lines indicate significant difference ($p < 0.01$) within each treatment (ANOVA).

--- Solution without polyphosphate.

* Glazing process performed prior to freezing Gonçalves and Ribeiro (2009).

Texture is another important parameter in shrimp quality. The texture data showed that shrimps immersed in 5% STP solution for 60 or 120 min presented lower hardness values ($p < 0.01$) than in the other treatments with STP. No differences were observed among the samples from the other treatments ($p > 0.01$). The samples in the control groups presented lower tenderness than in the treatment groups regardless of the concentration of STP or contact time used ($p < 0.01$). Heating causes enhanced protein denaturation inducing loss of liquid and shortening of the myofibrillar space. The results showed that the action of the polyphosphate was efficient in reducing this alteration, probably by inhibiting the aggregation of the protein matrix. This results in higher water retention in the myofibrillar spaces and, thus, in a lower hardness.

The concentration of STP (2 and 5%) and immersion times (1, 60 and 120 min) used had no influence on the results displaying changes in the values of cohesiveness and elasticity ($p > 0.01$). The samples became less cohesive and more springy after the treatments using STP compared to the control samples ($p < 0.01$). Similar results were reported by Erdogdu *et al.* 2007, who showed that the hardness and cohesiveness of meat products decreased, and springiness increased, when using STP. This occurs because STP decreases the protein-protein interaction and increases the solubility of myofibrillar proteins subsequently increasing the water holding capacity, which decreases the cohesion and increases the elasticity of the muscle tissue.

Effects of STP on the measurements of the T_2 relaxation times by LF ^1H NMR

The LF ^1H NMR relaxation time method was used to investigate water mobility and distribution in the muscle tissue. The bi-exponential fitting of the transverse relaxation data (T_2) resulted in the observation of two water populations in all samples: a faster relaxation time (T_{21}) and a slower relaxation time (T_{22}). The protons' relaxation times (T_{21} and T_{22}) in shrimps (after thawing and cooking) submitted to different treatments with STP and the controls without STP were compared (Table 3).

TABLE 3.

TRANSVERSAL RELAXATION TIMES (LF ^1H NMR) T_{21} AND T_{22} IN THAWED AND COOKED SHRIMPS, DIPPED IN DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE (STP) DURING DIFFERENT TIMES (TREATMENTS) AND DIPPED IN WATER WITHOUT POLYPHOSPHATE (CONTROLS)

STP Concentration Dipping time	Treatments					Controls		
	5% 120 min	5% 60 min	2% 120 min	2% 60 min	Glazing 5% 1 min*	--- 120 min	--- 60 min	Glazing --- 1min*
T_{21} (ms)	47.5±1.7 ^a (45.8-52.1)	43.7±2.2 ^a (41.0-47.1)	37.3±0.9 ^b (36.0-39.1)	38.6±1.3 ^b (37.0-42.4)	36.6±2.9 ^b (32.6-39.9)	29.9±1.6 ^c (27.1-32.3)	24.3±0.8 ^c (21.8-25.5)	30.4±1.2 ^c (28.1-34.4)
T_{22} (ms)	120.6±6.3 ^a (112.1-133.6)	102.5±6.7 ^b (91.3-114.2)	109.35±6.12 ^b (100.7-118.5)	108.5±11.5 ^b (90.4-141.1)	89.3±5.8 ^c (76.4-99.6)	83.9±6.3 ^{c,d} (72.6-97.2)	70.9±7.1 ^d (56.2-83.8)	63.3±24.7 ^d (42.1-96.6)

Values are means ± standard deviation, minimum and maximum values

^{a, b, c, d} Different letters in the lines indicate significant difference ($p < 0.01$) within each treatment (ANOVA).

--- Solution without polyphosphate.

* Glazing process performed prior to freezing Gonçalves and Ribeiro (2009).

Studies of LF ^1H RMN in muscle tissues showed that the relaxation times, T_{21} and T_{22} , are associated with water within muscle proteins in highly organized structures (bound water or intra-myofibrillar) and outside the myofibrils (free water or extra-myofibrillar), respectively (Bertram and Andersen 2004, 2007). Data on transverse relaxation are considered sensitive indicators of changes in protein structure (Lambelet *et al.* 1989; Erikson *et al.* 2004). In the present study, the use of STP significantly influenced the relaxation times in the samples.

T_{21} (faster relaxation time) was shorter in the control samples (24-30 ms) than in samples treated with STP (36-47 ms) indicating that the water mobility was smaller in the controls compared to the treated samples. Significant differences of T_{21} values were also observed among the other treatments. The use of 5% STP for 60 or 120 min resulted in greater water proportion with faster relaxation (T_{21}) (between 43 - 47 ms) when compared to the other treated samples (36 - 37 ms).

There was no difference between the results from the LF NMR and physicochemical data (yield, moisture, color, and hardness after cooking) between the groups treated with 2% STP (60 and 120 min) and 5% STP for 1 min (glazing) ($p > 0.01$). Higher values of slower relaxation time (T_{22}) were observed in the samples immersed in STP than in the control samples ($p < 0.01$).

The data on transverse relaxation reflected the changes that shrimp suffer, after thawing and cooking, when submitted with STP treatments. These alterations were shown as an increase in the relaxation times T_{21} (smaller water mobility) and T_{22} (greater water mobility) in the NMR analyses. Changes in water distribution, as forecasted by the NMR

technique, are caused by modifications in the muscle fibers, which consequently affects water mobility within the tissues. The mechanism of action of STP reflects an increased separation between myofibrils and thus, induces muscle swelling and water diffusion in intra and extra-cellular spaces (Gonçalves *et al.* 2008; Gonçalves and Ribeiro 2009).

No information regarding the effect of STP concentrations and contact times on the relaxation time, in thawed and cooked shrimps (*Litopenaeus vannamei*), has been reported. Nevertheless, a study conducted by Aursand *et al.* (2009) using a different matrix and salt observed that cod fillets immersed in brine also presented increased T_{21} and T_{22} relaxation times. Gudjónsdóttir *et al.* (2011) observed greater relaxation time (T_{21}) in shrimps immersed in water with NaCl for a longer time. These results were attributed to myofibrils swelling induced by the NaCl that caused water diffusion into the muscle fibers. This salt, as the polyphosphate, enhances protein electrostatic repulsion increasing myofibrillar spacing (Offer and Trinick 1983; Damodaran *et al.* 2008).

A correlation analysis was performed on all samples to further investigate the correlations between the changes in water distribution and physicochemical variables. Significant correlations were identified between T_{21} , moisture, and yield after cooking (Fig. 1. and 2.).

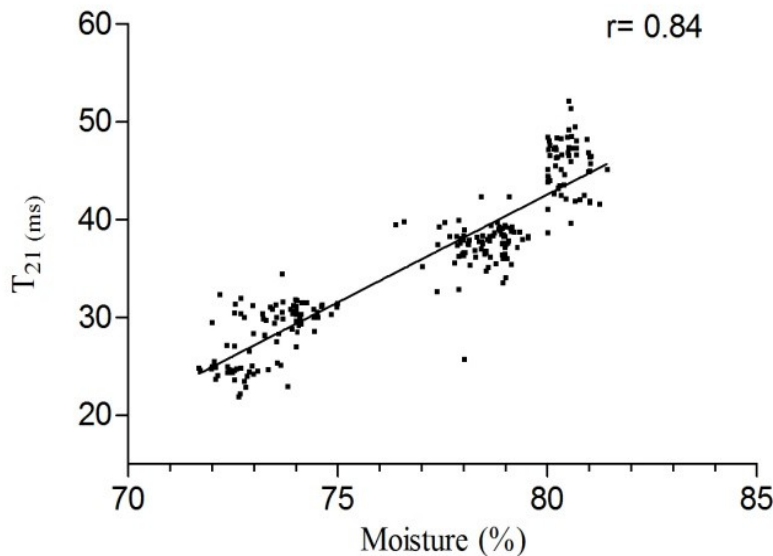


FIG. 1. CORRELATIONS BETWEEN THE TRANSVERSAL RELAXATION TIME (T_{21}) AND MOISTURE IN THAWED AND COOKED SHRIMPS

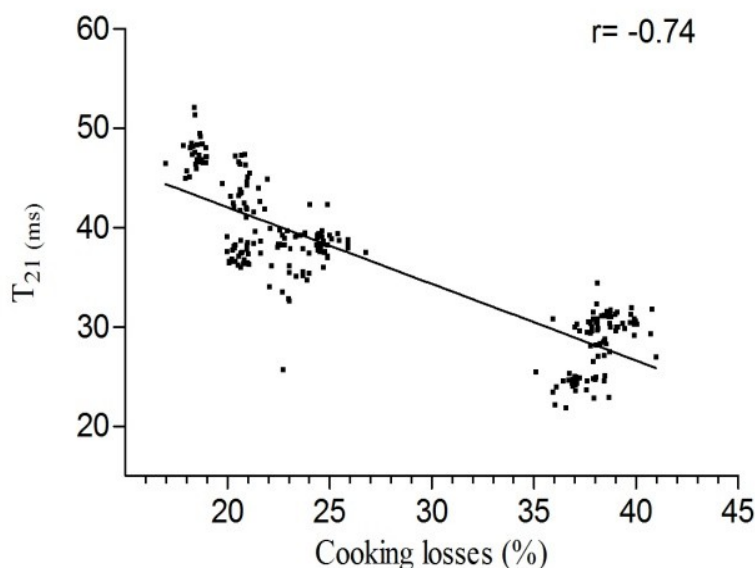


FIG. 2. CORRELATIONS BETWEEN THE TRANSVERSAL RELAXATION TIME (T_{21}) AND COOKING LOSSES IN THAWED AND COOKED SHRIMPS

Longer relaxation times were associated with an increase in moisture, which reflects greater water mobility in the tissue. Shorter T_{21} values were associated with yield loss. These correlations were also shown by Aursand *et al.* (2008) in brined fish and by Gudjónsdóttir *et al.* (2011) in shrimp immersed in brine.

CONCLUSIONS

The physicochemical parameters and relaxations times (LF NMR) in thawed and cooked shrimps were affected by STP concentrations and dipping times. Pronounced changes in the T_{21} and T_{22} relaxation data were observed during the different treatments with polyphosphate revealing changes in water properties. Bi-exponential fitting of the transverse relaxation (T_2) data revealed two water populations in all samples, T_{21} and T_{22} , corresponding to relaxation times of 24-47 ms and 63-120 ms respectively. The LF ^1H NMR data indicated that the T_2 relaxation is a sensitive tool in the investigation of water mobility and distribution within the muscle structure from thawed and cooked shrimps dipped in different concentrations of sodium tripolyphosphate. These results can be used for further optimization processing cooked shrimp with polyphosphate.

REFERENCES

- ANDERSEN, C.M. and RINNAN, A. 2002. Distribution of water in fresh cod, Food Sci. Technol./LWT. 35, 687-696.
- ARANA, J.I. 2012. Textural Properties of foods (Eds.). In *Physical Properties of foods: Novel measurement techniques and applications* (J.I. Arana, eds.) pp. 406-407, CCR Press Taylor & Francis Group, New York.
- AURSAND, I.G., GALLART-JORNET L., ERIKSON U. L. F, AXELSON D. E. and RUSTAD, T. 2008. Water Distribution in Brine Salted Cod (*Gadus morhua*) and Salmon (*Salmo salar*): A Low-Field ^1H NMR Study. J. Agricult. Food Chem. 56, 6252–6260.
- AURSAND, I.G., VELIYULIN, E., BÖCKER, U., OFSTAD, R., RUSTAD, T. and ERIKSON, U. 2009. Water and salt distribution in Atlantic salmon (*Salmo salar*) studied by low-field ^1H NMR, ^1H and ^{23}Na MRI and light microscopy: Effects of raw material quality and brine salting. J. Agric. Food Chem. 57, 46–54.
- BARROSO, M., CARECHE, M. and BORDERIAS, A.J. 1998. Trends in Food Science & Technology. Food Sci.Technol. 9(6), 223-229.
- BERTRAM, H.C. and ANDERSEN, H. J. 2004. Applications of NMR in Meat Science. Review Article. Annual Reports on NMR Spectroscopy. 53, 157-202.
- BERTRAM, H.C. and ANDERSEN, H. J. 2007. NMR and the water-holding issue of pork. J. Anim. Breed. Genet. 124, 35–42.
- BONO, G., GAI, F., PEIRETTI, P.G., BADALUCCO, C., BRUGIAPAGLIA, A., SIRAGUSA, G. and PALMEGIANO, G.B. 2012. Chemical and nutritional characterisation of the Central Mediterranean Giant red shrimp (*Aristaeomorpha foliacea*): Influence of trophic and geographical factors on flesh quality. Food Chem. 130, 104–110.
- BOURNE, M.C. 1978. Texture profile analysis. Food Technol. 32 (7),62–66.
- BOURNE, M.C. 2002. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, pp.1-33, Academic Press, London, U.K.
- BURGAARD, M.G. and JØRGENSEN B.M. 2010. Effect of Temperature on Quality-Related Changes in Cod (*Gadus morhua*) During Short- and Long-Term Frozen Storage. J. Aquat. Food Prod. Technol. 19, 249–263.
- CARR, H.Y. and PURCELL, E.M. 1954. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. Am. J. Physiol. 94, 630–638.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K.L. and FENNEMA, O.R. 2008. *Fennema's Food Chemistry*, 4th ed., pp. 179-260, Boca Raton: CRC Press, NY.
- DI TURI, L., RAGNI, M., VICENTI, A., MELODIA, L. and VONGHIA, G. 2005. Meat quality of Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*): Preliminary evaluation. Ital J Anim Sci. 4, 615–617.

- ERDOGDU, F., BALABAN, M.O., OTWELL, W. S. and GARRIDO, L. 2004 Cook-related yield loss for pacific white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. *J. Food Eng.* 64, 297-300.
- ERDOGDU, B. S., ERDOGDU, F., and EKIZ I. H. 2007. Influence of Sodium Tripolyphosphate treatment and cooking time on cook losses and textural properties of red meats. *J. Food Process Eng.* 30, 685–700.
- ERIKSON, U., VELIYULIN, E., SINGSTAD, T.E., AURSAND, M. 2004. Salting and desalting of fresh and frozen-thawed cod (*Gadus morhua*) fillets: a comparative study using ²³Na MRI, low-field ¹H NMR, and physicochemical analytical methods. *J. Food Sci.* 69, 107–114.
- GONÇALVES, A.A., RECH, B.T., RODRIGUES, P.M. and PUCCI, D.M.T. 2008. Quality evaluation of frozen seafood (*Genypterus brasiliensis*, *Prionotus punctatus*, *Pleoticus muelleri* and *Perna perna*) previously treated with phosphates. *Pan-American J. Aquat. Sci.* 3, 248-258.
- GONÇALVES, A.A. and RIBEIRO, J.L.D. 2008. Optimization of the freezing process of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) previously treated with phosphates. *Int. J. Refrig.* 31, 1134–1144.
- GONÇALVES, A. A. and RIBEIRO, J. L. D. 2009. Effects of phosphate treatment on quality of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) processed with cryomechanical freezing. *Food Sci. Technol./LWT.* 42, 1435–1438.
- GUDJÓNSDÓTTIR, M., JÓNSSON, Á., BERGSSON, A.B., ARASON, S. and RUSTAD T. 2011. Shrimp Processing Assessed by Low Field Nuclear Magnetic Resonance, Near Infrared Spectroscopy, and Physicochemical Measurements: The Effect of Polyphosphate Content and Length of Prebrining on Shrimp Muscle. *J. Food Sci.* 76, E357-E367.
- LAMPILA, L. E. 1992. Functions and uses of phosphates in the seafood industry. *J. Aquat. Food Product Technol.* 1, 29–41.
- LAMBELET, P., BERROCAL, R. and DUCRET F. 1989. Low resolution NMR spectroscopy: a tool to study protein denaturation. I. Application to diamagnetic whey proteins. *J. Dairy Res.* 56, 211–22.
- LATSCHA, T. 1989. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture, Aquacop Ifremer Actes de Colleeue*, 9, 319–325.
- MARTIN, F.F., COFRADES, S., CARBALLO, J. and COLMENERO, F. J. 2002. Salt and phosphate effects on the gelling process of pressure/heat treated pork batters. *Meat Sci.* 61, 15–23.
- MARTINEZ, I., AURSAND, M., ERIKSON, U., SINGSTAD, T. E., VELIYULIN, E. and VAN DER ZWAAG, C. 2003. Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 489–498.

- MEIBOOM, S. and GILL, D. 1958. Modified spin-echo method for measuring nuclear times. *Rev. Sci. Instr.* 29, 688–691.
- NIAMNUY, C., SAKAMON, D. and SOMCHART, S. 2008. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. *J. Food Eng.* 87,591–600.
- OFFER, G. and TRINICK, J. 1983. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.* 8, 245– 281.
- RUAN, R.R., & CHEN, P.L. 1998. *Water in foods and biological materials: A nuclear magnetic resonance approach*, 298p, Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania.
- SCHNEE, R. 2004. *Budenheim phosphates for seafood processing*, pp.11, Chemische Fabrik Budenheim, Germany.
- TSIRONI, T., DERMESONLOUGLOU, E., GIANNAKOURE, M. and TAOUKIS, P. 2009. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *Food Sci. Technol./LWT.* 42, 664–671.
- ÜNAL, B.S., ERDOĞDU, F. and EKİZ, H.I. 2006. Effect of temperature on phosphate diffusion in meats. *J. Food Eng.* 76, 119–127.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Carlos Chagas Filho Foundation for the Support of Research in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (process numbers E-26/111.196/2011 and E-26/111.933/2011). C.S.C. and R.O.R.R. were supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), respectively.

3.3 ARTIGO 3: APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE BAIXO CAMPO DE PRÓTONS DE ^1H PARA AVALIAR A MOBILIDADE DA ÁGUA DURANTE O ARMAZENAMENTO DE PESCADO SALGADO (*Sardinella brasiliensis*) (Será enviado para publicação)

APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN ^1H) DE BAIXO CAMPO PARA AVALIAR A MOBILIDADE DA ÁGUA DURANTE O ARMAZENAMENTO DE PESCADO SALGADO (*Sardinella brasiliensis*)

Carla da Silva Carneiro^{1*}, Eliane Teixeira Mársico¹, Roberta de Oliveira Resende Ribeiro¹, Carlos Adam Conte Júnior¹, Sérgio Borges Mano¹, Caio Julio Cesar Augusto², Edgar Francisco Oliveira de Jesus³

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Vital Brasil Filho 64, 24230-340, Niterói, RJ, Brasil

² Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil

³ Laboratório de Instrumentação Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 68509, 21941-972, Rio de Janeiro, Brasil

*Autor para correspondência. Tel.: +55 21 2629 9545; fax: +55 21 2629 9541. E-mail: carlavet.s@gmail.com.

Resumo

No presente estudo buscou investigar da mobilidade da água em músculo de sardinhas salgadas (salga úmida) (*Sardinella brasiliensis*) em diferentes dias de armazenamento através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo (^1H). O ajuste dos dados de relaxação (T_2) transversal obtidos revelou três componentes: T_{2b} , com tempo de relaxação entre 11,2 e 17,5 ms, T_{21} , variando entre 35,3 e 44,7 ms e T_{22} , com tempos de relaxação no intervalo de 161,7 a 256,5 ms. Modificações na qualidade do pescado salgado foram evidenciadas durante o armazenamento através dos resultados de análises físico-químicas convencionais. Estreita correlação foi evidenciada entre a indicação de qualidade (bom, regular e ruim) obtida através dos parâmetros físico-químicos

analisados (prova da cocção, presença de amônia e gás sulfídrico) e os dados de relaxação (RMN) ($p < 0,05$). Mudanças na mobilidade da água induzidas pela degradação que ocorre durante o armazenamento do pescado salgado resultaram em alterações observadas nos valores dos componentes de relaxação transversal de RMN. Estes resultados estão relacionados principalmente com a degradação proteica, que ocorre durante a estocagem do produto, alterando a dinâmica e a organização das moléculas de água.

Palavras-chave: Ressonância magnética nuclear de baixo campo, pescado salgado, armazenamento, tempos de relaxação.

Abstract

The present study investigated the water mobility in muscle salted sardines (salting) (*Sardinella brasiliensis*) on different days of storage by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF NMR ^1H). The exponential fitting of the transverse relaxation (T_2) data revealed three components: T_{2b} , with a relaxation time of 11.2 to 17.5 ms, T_{21} , ranging from 35.3 to 44.7 ms and T_{22} , with relaxation times in the range of 161.7 to 256.5 ms. Changes in quality of salted fish were observed during storage by results of conventional physical-chemical analyzes. Close correlation was observed between the indication of quality (good, fair and poor) obtained through the physicochemical parameters analyzed (cooking test, the ammonia and hydrogen sulfide presence) and the data of relaxation (NMR) ($p < 0.05$). Change in water mobility-induced degradation which occurs during storage of salted fish resulted in changes in component values observed transverse relaxation NMR. These results relate primarily to protein degradation that occurs during storage of the product, altering the dynamics and organization of water molecules.

Keywords: Low-field nuclear magnetic resonance, salt fish, storage, relaxation time.

Introdução

O pescado submetido ao processo de salga possui um prazo de validade mais extenso quando comparado ao pescado fresco, embora, também está susceptível a deterioração durante o armazenamento, apesar do armazenamento.

As alterações físico-químicas e enzimáticas de deterioração que ocorrem durante o armazenamento, afetam a estrutura proteica e, desta forma, interferem diretamente na mobilidade da água presente no alimento (interação água-proteína) (ORDÓÑEZ et al., 2005; GONÇALVES et al., 2008).

A água é o principal componente quantitativo e qualitativo das matrizes alimentares, incluindo o pescado. Este componente possui influência direta sobre os atributos de qualidade desta matriz e sobre a estabilidade durante o armazenamento (LAKSHMANAN et al., 2007; DAMODARAN et al., 2010). O conteúdo de água presente nos músculos do pescado pode ser separado em grupos diferentes de acordo com a mobilidade e a ligação das moléculas de água com a estrutura muscular (ANDERSEN; RINNAN, 2002). Portanto não é apenas a quantidade total de água que é importante para a caracterização do produto, mas também o seu estado e mobilidade (AURSAND et al., 2008). Sendo assim, ressalta-se a importância do desenvolvimento de estudos sobre a distribuição da água na estrutura muscular, quando se deseja obter dados sobre a estabilidade durante armazenamento.

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo tem sido largamente utilizada para obter uma visão mais aprofundada sobre o comportamento das moléculas de água presentes em tecidos musculares (GUDJÓNSDÓTTIR; ARASON; RUSTAD, 2011). A RMN pode medir o relaxamento dos prótons de hidrogênio e, portanto, pode ser utilizada para investigar mudanças na mobilidade da água no músculo do pescado, durante o armazenamento (RUAN et al., 2001; MARTINEZ et al., 2003; AURSAND et al., 2008; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011).

Núcleos dotados de momento magnético, quando colocados em um campo magnético estático, tendem a se alinhar com o campo entrando em precessão. Após a aplicação de pulsos eletromagnéticos eles entram em ressonância e quando o pulso é removido eles voltam a seu estado de equilíbrio em momentos diferentes, dependendo de sua vizinhança. A partir daí obtêm-se os tempos de relaxação. Na RMN de baixo campo a relaxação dos prótons (^1H) é descrita por tempos de relaxação constantes T_1 (Longitudinal) e T_2 (Transversal). As medições de T_2 são consideradas como melhores indicadores da mobilidade de moléculas em material sólido (AURSAND et al., 2008).

Estudos têm indicado que os resultados de T_2 , obtidos através da espectroscopia de prótons (^1H) por RNM de baixo campo, podem ser

correlacionados com três distintas populações ou com três distintos compartimentos de água no músculo: água fortemente ligada; água ligada ou de hidratação e uma terceira correspondente a água livre ou fracamente ligada (COPE, 1969; FINCH et al., 1971; RUAN & CHEN, 2001; AURSAND et al., 2008; GUDJÓNSDÓTTIR et al., 2011). No caso da água fortemente ligada, esta se encontra intimamente unida às proteínas e tem mobilidade reduzida, não podendo se deslocar facilmente para outros compartimentos. Na RMN de baixo campo a água fortemente ligada possui um tempo de relaxação relatado de 1-10 ms, sendo designada por alguns autores como T_{2b} (BERTRAM; PURSLOW; ANDERSEN, 2002). A água de hidratação ou ligada é denominada T_{21} , e é a mais afetada pelo processamento e deterioração, possuindo um tempo de relaxação de 40-80 ms (BERTRAM et al., 2009; ANDERSEN, 2007). O terceiro compartimento corresponde a água livre, com tempo de relaxação mais lento, T_{22} , num intervalo de 100-400 ms (BERTRAM; PURSLOW; ANDERSEN, 2002). A água ligada ou de hidratação e a água livre correspondem a cerca de 90% da água encontrada nas carnes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Assim sendo, a RMN de baixo campo tem sido utilizada para estudar “*in situ*” as possíveis alterações que ocorrem na distribuição de água em alimentos durante o armazenamento e processamento (AURSAND et al., 2008). Com a utilização da técnica descrita acima é possível avaliar, a força iônica da água ligada aos componentes do alimento. Desta forma, pode-se inferir sobre diversos atributos sensoriais e físico-químicos de qualidade, verificando se a água presente no alimento possui interação mais forte ou mais fraca com seus componentes. Utilizando as medidas dos tempos de relaxação T_2 e seus componentes, diferentes populações de água foram definidas em pescado salgado, defumado, fresco e congelado (ERIKSON et al., 2004; JENSEN et al., 2005; LAKSHMANAN et al., 2007; AURSAND et al., 2008; AURSAND et al., 2009; GUDJÓNSDÓTTIR; ARASON: RUSTAD, 2011; CARNEIRO et al., 2013).

Neste contexto, o presente artigo objetivou-se investigar da mobilidade da água em músculo de sardinhas salgadas (salga úmida) (*Sardinella brasiliensis*) em diferentes dias de armazenamento através de medições da relaxação transversal por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo (^1H) correlacionando os dados de RMN com os obtidos de análises físico-químicas convencionais que indicam a qualidade do produto.

Material e Métodos

Para este estudo foram utilizadas amostras de sardinha evisceradas e descabeçadas (*Sardinella brasiliensis*), processadas por salga úmida. Cerca de 3 kg de amostras foram adquiridos em uma empresa processadora de pescado salgado no Estado do Paraná/Brasil. Após a obtenção, o pescado foi separado em porções musculares através de secções transversais na região medial do corpo. Deste modo foram obtidas porções musculares de cerca de 3x5 cm contendo 12 gramas cada, que foram acondicionadas em embalagens de polietileno. Trinta amostras de 12g cada foram utilizadas para a realização das análises por RMN de baixo campo e o restante para as análises físico-químicas de cocção, amônia, gás sulfídrico (H₂S) e histamina. Estas análises físico-químicas foram realizadas também com o objetivo de acompanhar as etapas de degradação do pescado. Os intervalos estabelecidos para a realização dos procedimentos analíticos por RMN variaram de acordo com as alterações nos padrões de deterioração observadas nos resultados analíticos físico-químicos obtidos semanalmente. Sendo assim, os dias das análises por RMN a partir dos resultados obtidos nas análises físico-químicas convencionais foram: 15°, 40°, 83°, 114° e 143° dia de estocagem a partir da data de fabricação. Como a análise por RMN não é destrutiva, as medidas foram realizadas em cada dia com três repetições autênticas para cada uma das 30 amostras (n=30). Para as metodologias físico-químicas convencionais, foram analisadas três amostras por semana, totalizando o uso de 57 amostras nos 143 dias de experimento. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (25±5°C), durante todo período de análise. A seguir, é apresentado um desenho experimental (Figura1).

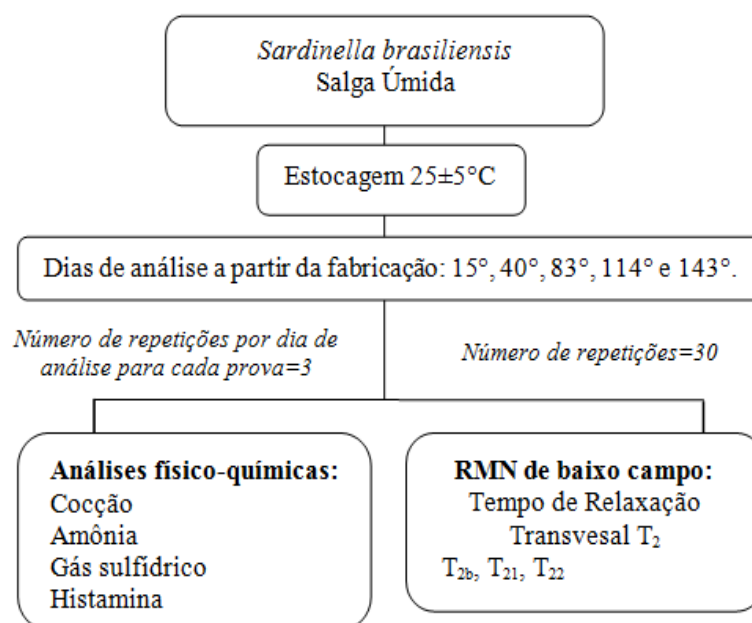


Fig. 1 Desenho Experimental

A prova de amônia seguiu a metodologia descrita por Bartels (1971) e a detecção semi-quantitativa de histamina foi realizada de acordo com metodologia descrita por Shultz; Chang; Bjeldanes (1976), as demais análises seguiram metodologia descrita em Instrução Normativa Brasileira (BRASIL, 2011). A separação das amostras e os procedimentos físico-químicos foram realizados no Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). De acordo com os resultados observados nos testes físico-químicos qualitativos de cocção, amônia e gás sulfídrico, no decorrer do tempo de armazenamento as amostras foram classificadas em os padrões de qualidade bom, regular e ruim. As medidas por RMN foram realizadas no Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza (CCMN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em instrumento MARAN DXR 2® (Oxford Instruments), com frequência de trabalho de 13 MHz. Para aquisição dos espectros utilizou-se 12 gramas de amostras, que foram inseridas em um cilindro de vidro com 50 mm e mantidas a temperatura controlada ($25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$). As amostras permaneceram por uma hora a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ antes das medidas. O tempo de relaxamento transversal (T_2) foi medido com uma sequência de pulsos CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) (CARR; PURCELL, 1954; MEIBOOM; GILL, 1958), com 12 varreduras, 2048 pontos, 3,5 segundo entre as varreduras, 300 μs entre pulsos de

90° e 180°. A curva de relaxação de RMN foi ajustada como uma curva multiexponencial com o software RI WINFIT® (versão 2.5, Oxford instrumentos), indicando que três exponenciais foram necessários para descrever o sistema, resultando na obtenção dos componentes T_{2b} , T_{21} e T_{22} . Todas as medidas foram realizadas com três repetições autênticas para cada amostra. As amostras foram analisadas nos dias 0, 40, 83, 114, 143.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do pacote estatístico SPSS® (versão 17.0, Chicago, Illinois, EUA) e do programa GraphPad Prism® (versão 5.0, California, EUA).

Resultados e Discussão

Os valores obtidos para os componentes de relaxação podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Dados de relaxação transversal obtidos por RMN ^1H de baixo campo (T_{2b} , T_{21} e T_{22}) em amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), processadas por salga úmida durante o armazenamento nos dias 15, 40, 83, 114, 143.

RMN Relaxação Transversal Tempo (T_2)	Dia 15	Dia 40	Dia 83	Dia 114	Dia 143
T_{2b} (ms)	$17,5 \pm 1,2^a$ (15,8-20,4)	$14,6 \pm 0,5^b$ (13,3-15,7)	$13,2 \pm 0,5^b$ (12,4-14,6)	$11,5 \pm 0,1^b$ (11,2-11,8)	$11,2 \pm 0,1^b$ (11,0-11,5)
T_{21} (ms)	$35,3 \pm 0,8^a$ (34,0-36,8)	$39,7 \pm 0,8^a$ (38,1-42,1)	$42,8 \pm 6,0^b$ (41,6-44,2)	$44,7 \pm 12^b$ (43,0-48,1)	$44,7 \pm 6,0^b$ (43,7-46,1)
T_{22} (ms)	$161,7 \pm 2,8a$ (161,7-175,1)	$171,9 \pm 11,4b$ (140,0-189,6)	$246,4 \pm 16,5c$ (242,5-248,6)	$249,3 \pm 6,7 c$ (247,3-250,5)	$256,5 \pm 1,6d$ (252,5-258,9)

a, b, c, d Diferentes letras subscritas entre as linhas indicam diferença significantes entre os resultados ($p < 0.05$) (ANOVA).

Estes resultados são esperados tendo em vista à modificação na estrutura proteica e a liberação da água. Durante a decomposição do pescado, ocorrem alterações na textura devido à dinâmica da água do músculo, e acentuada perda de firmeza da carne (GONÇALVES, 2011). Os tempos de relaxação mais rápidos (T_{2b} e T_{21}) relacionam-se com a água localizada no interior das estruturas proteicas organizadas e, o mais longo (T_{22}) representa a água no espaço entre as miofibrilas

(extracelular), que pode ser perdido com maior facilidade, mobilizado primeiramente por gotejamento ou exsudação (ERIKSON et al., 2004; BERTRAM et al., 2007). Assim, no presente estudo os dados da população T_{2b} (11,2 a 17,5 ms) e T_{21} (35,3 a 44,7 ms) são atribuídos a água localizada no interior de estruturas de proteínas organizadas, como sugerido por outros autores citados anteriormente, enquanto que T_{22} (161,7 a 256,5 ms) reflete a água a ser liberada para o espaço entre feixes de fibras do pescado (exsudado).

O comportamento multi-exponencial de T_2 , também é relatado em outros estudos e, neste caso sugere-se que o mesmo relaciona-se a divisão espacial ou anatômica da água nos tecidos, divisão esta, que designa a água em populações (BERTRAM; ANDERSEN; KARLSSON, 2001). De acordo com estes autores, T_{22} está diretamente relacionado à população de água no espaço extracelular. Observando-se os dados obtidos no presente estudo, verificou-se que com o passar do tempo de armazenamento, houve um aumento significativo no valor do componente T_{22} , embora entre os dias 83 e 114, a variação neste parâmetro não tenha sido significativa ($p < 0,05$). Em contrapartida, os dados de T_{2b} e T_{21} apresentaram menor variação. Os dados de T_{2b} variaram significativamente entre o dia 15 e o dia 40 e o tempo de relaxação T_{21} apresentou mudança significativa entre os dias 40 e 83 ($p < 0,05$).

Estudos em carne vermelha e pescado utilizando a técnica de RMN, demonstraram a distribuição de água em diferentes compartimentos na estrutura muscular, sendo que a maioria relata ter detectado duas ou três populações (AURSAND et al., 2009; BERTRAM; ANDERSEN, 2007; BERTRAM; MEYER; ANDERSEN, 2009). Bertram et al. (2001) analisando carne suína por RMN de baixo campo, identificaram três diferentes populações de água: uma fortemente ligada às proteínas do músculo, uma segunda presa dentro da estrutura miofibrilar, e uma terceira correspondente à água fora da estrutura miofibrilar ou mesmo fora das células musculares.

Aursand et al. (2008) demonstraram que os valores obtidos através do T_2 (RMN) podem ser considerados como uma alternativa de abordagem para a rápida detecção de mudanças de textura em bacalhau. Erikson et al. (2004) demonstraram que os tempos de relaxamento dos prótons 1H obtidos através da RMN podem ser utilizados como ferramentas úteis para avaliar operações de processamento do pescado como a distribuição da água em peixes salgados, afirmando que o método

rápido de RMN tem potencial para ser utilizado em conjunto ou até mesmo para substituir os métodos tradicionais relacionados com a análise do pescado. Estes autores relatam terem encontrado durante a salga do pescado, duas populações de água, com tempos de relaxação de 46 a 69 ms (T_{21}) e entre 117-127 ms (T_{22}), com valores variando de acordo com a etapa de processamento. Gudjónsdóttir; Arason; Rustad (2011), observaram em bacalhau salgado, tempos de relaxação T_{21} variando entre 38,2ms e 85,9 e T_{22} entre 85,5 e 196,4ms, que se alteravam de acordo com o método de salga e com a atmosfera de armazenamento. No presente estudo as variáveis de salga e a atmosfera da embalagem não foram avaliadas, avaliou-se o tempo de armazenamento que demonstrou induzir diferenças significativas entre os tempos de relaxação. Ressalta-se que as diferenças observadas entre os tempos de relaxação, citadas por diferentes autores, são provavelmente devido a, diferenças nos parâmetros de RMN empregados, diferenças na temperatura das amostras e principalmente as diferenças entre as matrizes (BERTRAM et al., 2001).

A variação dos valores de T_2 , divididos em suas frações, evidencia uma mudança no parâmetro de qualidade do produto. Observamos que as variações de T_{2b} , T_{21} e de T_{22} ocorrem principalmente entre a fabricação e o quadragésimo e/ou octogésimo terceiros dias de estocagem. No 143º dia a pescado salgado já não se apresentava próprio para consumo. A variação de T_{22} permanece de um modo geral, com tendência ascendente até o último dia de teste. É importante registrar que as variações nos valores das componentes de T_2 ocorreram provavelmente por uma contração do tecido muscular. Isso pode ser evidenciado pela redução do valor de T_{2b} que está associado à parcela de água intracelular, um discreto aumento do valor de T_{21} , que é uma população de água miofibrilar, e uma grande variação de T_{22} , que é a água livre, extracelular e por isso mais livre com a contração. É importante também verificar que a quantidade de líquido de cada grupo não variou o que pode ser concluído da análise dos dados da **Tabela 2** que apresenta os valores percentuais de cada população durante a estocagem.

Tabela 2. Variação da população de T_{2b} , T_{21} e T_{22} durante a estocagem por RMN ^1H de baixo campo em amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), processadas por salga úmida durante o armazenamento nos dias 15, 40, 83, 114, 143.

	T_{2b} (ms)	T_{21} (ms)	T_{22} (ms)
15° Dia	53,9%	34,4%	11,8%
40° Dia	51,8%	36,9%	11,3%
83° Dia	51,8%	35,2 %	13,0%
114° Dia	51,6%	35,1%	13,3%
143° Dia	53,1%	34,4%	12,5%

A explicação para as alterações nos parâmetros de RMN encontrados pauta-se na intensidade das alterações físico-químicas e enzimáticas nos diferentes dias de armazenamento. Estas alterações induzem a modificações na estrutura tridimensional de proteínas nas diferentes fases de deterioração (OFFER; KNIGHT, 1988; SGARBIERI, 1996), ressaltando-se que, a conformação espacial proteica influencia na localização e na mobilidade da água através de mudanças no espaço e/ou condições estruturais da carne, o que pode ser evidenciado pela correlação positiva entre os valores de T_{21} e T_{22} com o resultado dos testes físico-químicos realizados durante o período de estocagem. As correlações podem ser observadas nas figuras 2 e 3.

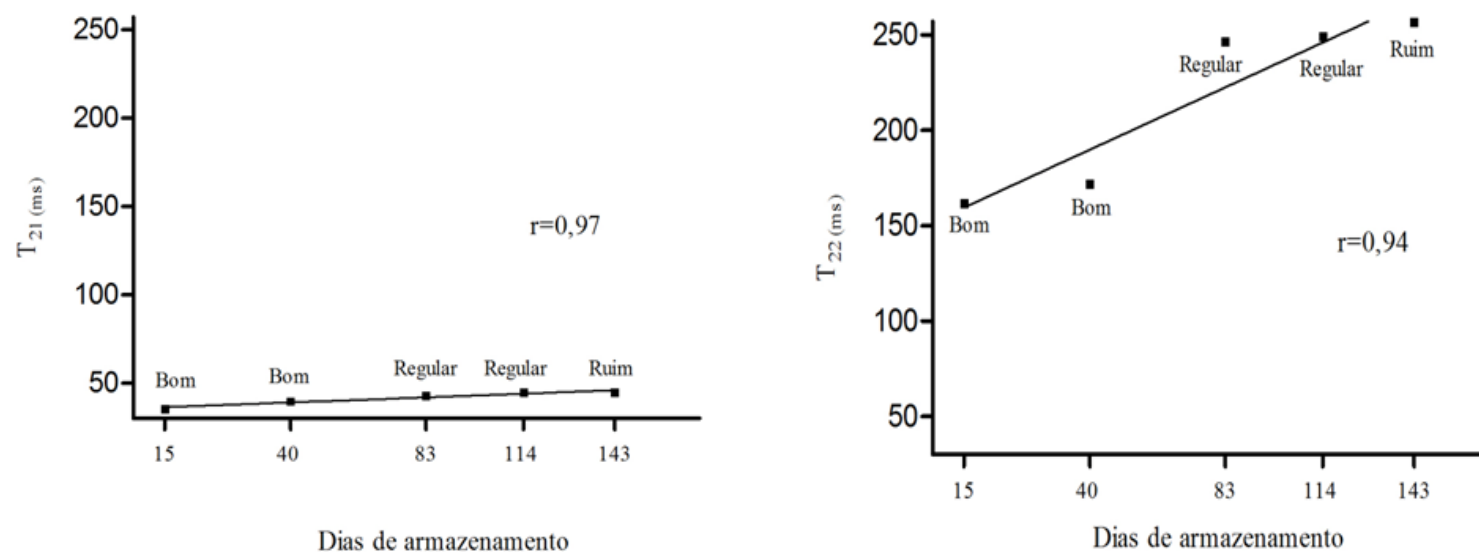


Fig. 2 Correlação entre os valores médios de T_{21} e T_{22} e os padrões de qualidade (bom, regular e ruim) observados de acordo com os resultados dos testes físico-químicos (cocção, amônia e gás sulfídrico) no decorrer do tempo de armazenamento em dias.

Durante o armazenamento ocorrem processos de desnaturação e degradação da fração proteica que aumentam a disponibilidade de aminoácidos livres na matriz. Estes aminoácidos por ação enzimática são descarboxilados podem formar aminas biogênicas, dentre elas a histamina. A produção de histamina não foi expressiva no pescado salgado ao 143° dia de estocagem, indicando o efeito do sal na inibição do crescimento de determinados microrganismos descarboxilase positivos, formadores desta amina.

Durante o armazenamento ocorrem processos de desnaturação e degradação da fração proteica que aumentam a disponibilidade de aminoácidos livres na matriz. Com relação à histamina, destaca-se que deterioração microbiana pode ser acompanhada pelo aumento da produção de enzimas descarboxilases que atuarão na produção deste metabólito através da descarboxilação desses aminoácidos livres, principalmente. Assim sendo, a quantificação desta amina pode ser empregada como parâmetro ou critério de qualidade, pois, poderá refletir o grau de deterioração de determinados produtos alimentícios (GLÓRIA, 2005; NYCHAS et al., 2008; TAO et al., 2011). Porém, no presente estudo, o teor de histamina formado no pescado salgado durante a estocagem (143 dias), mesmo em um estágio avançado de deterioração, não ultrapassou 400mg/Kg, limite máximo estabelecido pela legislação europeia para este tipo de produto (CE, 2005). A partir do 83° dia de estocagem o teor de histamina detectado na sardinha salgada foi de 20 a 50mg/Kg e, no 143° dia, foi de 50 a 100 mg/Kg. Estes resultados corroboram com os obtidos por outros autores para pescado salgado. Mársico et al. (2009), analisando amostras de peixe salgado (*Gadus morhua*) obtidas em mercados varejistas com diferentes tempos de armazenamento, detectaram a presença de histamina em apenas 1 amostra, com teor entre 20 e 50mg/Kg. Pombo et al. (2012) ao analisarem sardinhas anchovadas (*S. brasiliensis*) durante processamento tecnológico e validade comercial detectaram teor máximo de histamina de 34mg/Kg, mesmo em um período maior de estocagem (300° dia de análise). Estes autores relatam que crescimento dos principais gêneros de microrganismos relacionados com a formação de histamina foi inibido pelo elevado percentual de cloretos.

A alta concentração de cloreto de sódio (NaCl) influencia o metabolismo bacteriano e concentrações de 3,5 a 5,5% deste sal podem inibir a formação de histamina (HENRY; KOEHLER, 1986; POMBO et al., 2012). Sabe-se que na família *Enterobacteriaceae* encontram-se as principais bactérias responsáveis pela

formação desta amina (LEHANE; OLLEY, 2000), porém outras bactérias produtoras de descarboxilases, como *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Halococcus* spp. e o *Tetragenococcus* spp., também podem contribuir para a formação deste metabólito neste tipo de alimento (GIRAFFA, 2002; NAHLA et al., 2005; KUDA et al., 2006). Ressalta-se também que, o Brasil não possui legislação específica para a histamina como critério de qualidade em pescado submetido ao processo de salga.

Conclusão

A partir dos dados obtidos destaca-se a viabilidade da aplicação da espectroscopia de prótons (^1H) por RNM de baixo campo como ferramenta para análise e controle de qualidade do pescado, visto a elevada correlação entre as análise de RMN e físico-químicas convencionais. Quanto à histamina, detecção desta amina biogênica não foi uma boa indicadora do estágio de qualidade do pescado salgado, visto seu baixo teor mesmo em um estágio de deterioração avançado. Corroborar-se assim, com a afirmação de que o crescimento de parte das bactérias caracterizadas como formadoras de histamina é inibido pelo teor de sal presente no pescado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) processo número PNPD 2905/2011 e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), processos números E-26/112.620/2012 e E-26/103.003/2012.

Referências Bibliográficas:

- ANDERSEN, C. M.; RINNAN, A. Distribution of Water in Fresh Cod. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 687-696, 2002.
- AURSAND, I. G.; GALLART-JORNET, L.; ERIKSON, U.; AXELSON D.E. AND RUSTAD, T. Water distribution in brine salted cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*): A low-Field ^1H NMR study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.6252- 6260, 2008.

AURSAND, I. G.; VELIYULIN, E.; BÖCKER, U.; OFSTAD, R.; RUSTAD, T.; ERIKSON, U. Water and salt distribution in Atlantic salmon (*Salmo salar*) studied by low-field ^1H NMR, ^1H and ^{23}Na MRI and light microscopy: Effects of raw material quality and brine salting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 46–54, 2009.

AURSAND, I. G.; GALLART-JORNET L.; ERIKSON U.L.F; AXELSON D.E. E RUSTAD, T. Water Distribution in Brine Salted Cod (*Gadus morhua*) and Salmon (*Salmo salar*): A Low-Field ^1H NMR Study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.56, p.6252–6260, 2008.

BARTELS, H. Inspeção veterinária de La carne. *Medios auxiliares de diagnóstico en la inspección de carnes*. Zaragoza: Acribia, 1971. 494p.

BERTRAM, H. C.; ANDERSEN, H. J.; KARLSSON, A. H. Comparative study of low-field NMR relaxation measurements and two traditional methods in the determination of water holding capacity of pork. *Meat Science*, v.57, p. 125-132, 2001.

BERTRAM, H. C.; KARLSSON, A. H.; RASMUSSEN, M.; PEDERSEN, O.D.; DØNTRUP, S.; ANDERSEN, H. J. Origin of multiexponential T_2 relaxation in muscle myowater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3092–3100, 2001.

BERTRAM, H. C.; PURSLOW, P.; ANDERSEN, H. J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 824–829, 2002.

BERTRAM, H. C.; ANDERSEN, H. J. NMR and the water-holding issue of pork. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124, 35–42, 2007.

BERTRAM, H. C.; MEYER, R. L.; ANDERSEN, H. J. A look at NMR relaxometry applications in meat science—Recent advances in coupling NMR relaxometry with spectroscopic, thermodynamic, microscopic and sensory measurements. In M. Gudjónsdóttir, P. Belton, & G. Webb (Eds.), *Magnetic resonance in food science: Changes in a changing world* (p. 241–250). Cambridge, UK: RSC Publishing, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185 de 13 de Maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 25 de 2 de Junho de 2011. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos Para Controle de Pescado e Seus Derivados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2011.

CARNEIRO, C. S.; MÁRSICO, E. T.; RIBEIRO, O. R.R.; CONTE JÚNIOR, C. A.; ALVARES, T. S.; DE JESUS, E. F. O. Studies of the effect of sodium tripolyphosphate on frozen shrimp by physicochemical analytical methods and Low

Field Nuclear Magnetic Resonance (LF ^1H NMR). *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, p. 401-407, 2013.

CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *American Journal of Physiology*, 94, 630–638.

CE (Comunidade Europeia). Regulamento (CE) N° 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005. Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. J O União Europeia. L338. 2005.

COPE, F. W. Nuclear magnetic resonance evidence using D_2O for structured water in muscle and brain. *Biophysical Journal*, v.9, p. 303–319, 1969.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. *Química de Alimentos de Fennema*. 4. Ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2010. 900p.

ERIKSON, U.; VELIYULIN, E.; SINGSTAD, T. E.; AURSAND, M. Salting and desalting of fresh and frozen-thawed cod (*Gadus morhua*) fillets: a comparative study using ^{23}Na MRI, low-field ^1H NMR, and physicochemical analytical methods. *Journal of Food Science*, 69, 107–114, 2004.

FINCH, E. D.; HARMON, J. D. MULLER, B. H. Pulsed NMR measurements of the diffusion constant of water in muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 147, 299–310, 1971.

GIRAFFA, G. *Enterococci* from foods. FEMS Microbiology. v 26, p.163-171, 2002.

GONÇALVES, A. A. *Tecnologia do Pescado*. Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação. São Paulo: Editora Atheneu. 2011. 608p.

GONÇALVES, A. A.; RECH, B.T.; RODRIGUES, P. M.; PUCCI, D. M. T. Quality evaluation of frozen seafood (*Genypterus brasiliensis*, *Prionotus punctatus*, *Pleoticus muelleri* and *Perna perna*) previously treated with phosphates. *Pan-American Journal of Aquatic Science*, v.3, p.248-258, 2008.

GLÓRIA, M.B.A. Bioactive Amines. In: Hui, H.; Nollet, L.L. *Handbook of Food Science*. New York: Taylor & Francis, 2005.

GUDJÓNSDÓTTIR M.; ARASON, S.; RUSTAD, T. The effects of pre-salting methods on water distribution and protein denaturation of dry salted and rehydrated cod – A low-field NMR study. *Journal of Food Engineering*, v.104, p. 23-29, 2011.

GUDJÓNSDÓTTIR M.; LAUZON H. L.; MAGNÚSSON, H.; SVEINSDÓTTIR, K.; ARASON, S.; MARTINSDÓTTIR, E.; RUSTAD, T. Low field Nuclear Magnetic Resonance on the effect of salt and modified atmosphere packaging on cod (*Gadus morhua*) during superchilled storage. *Food Research International*, v. 44, p. 241–249, 2011.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends of Food Science and Technology*, v. 5, p. 42-48, 1994.

HENRY, K. D.; KOEHLER, P. E. Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. *Journal of Food Protection*. v. 49, p.423-427, 1986.

KUDA, T.; MIHARA, T.; YANO, T. Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. *Food Control*. v. 18, P. 677–681, 2007.

JENSEN, K. N.; JØRGENSEN, B. M.; NIELSEN, H. H.; NIELSEN, J. Water distribution and mobility in herring muscle in relation to lipid content, season, fishing ground and biological parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.85, p.1259–1267, 2005.

LAKSHMANAN, R.; PARKINSON, J. A.; PIGGOTT, J. R. High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). *LWT-Food Science Technology*, v. 40, p.544–555, 2007.

Lehane, L.; Olley, J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. v. 58, p. 1-37, 2000.

Martinez, I., Aursand, M., Erikson, U., Singstad, T. E., Veliyulin, E. and Van Der Zwaag, C. Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends Food Science Technology*, v.14, p. 489–498, 2003.

MÁRSICO, E. T.; SILVA, C. BARREIRA, V. B.; SANTOS, S. P. Parâmetros físico-químicos de qualidade de peixe salgado e seco (bacalhau) comercializado em mercados varejistas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 68, n. 3, p. 406-410, 2009.

NAHLA, T. K.; HASSEN, E. L. S. M. F. Histamine and histamine producing bacteria in some local and importes fish and their public Elath significance. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*. v. 1, n. 4, p. 329-336, 2005.

NYCHAS, G. J.E; SKANDAMIS, P.N.; TASSO, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.P. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, Barking, v.78, p. 77–89, 2008.

OFFER, G.; KNIGHT, P. The Structural Basis of Water-Holding in Meat. In: LAWRIE, R. *Meat Science*. Oxford: Pergamon Press, 1988.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M. D. S. *Tecnología de alimentos: Alimentos de Origen Animal*. Porto Alegre:Artmed, 2005. 279 p.

POMBO, C. R.; FRANCO, R. M.; MÁRSICO, E. T. Caracterização do processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) anchovadas. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 19, n. 1, p. 26-31, 2012.

POMBO, C. R.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; GUIMARÃES, C. F. M.; CRUZ, A. M. P.; PARDI, H. Salted and fermented fish processes evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 44, p. 2100-2105. 2009.

RUAN, R. R.; CHEN, P. L. Nuclear Magnetic Resonance Techniques and Their Application in Food Quality Analysis. In: GUNASEKARAN, S. *Nondestructive Food Evaluation: Techniques to Analyze Properties and Quality*. New York: Ed. Marcel Dekker, 2001.

SCHUTZ, D. E.; CHANG, G. W.; BJELDANES, L. F. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. v.59, n.6, p. 1224-1225, 1976.

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

TAO, Z.; SATO, M.; ZHANG, H.; YAMAGUCHI, T.; NAKANO, T. A survey of histamine content in seafood sold in markets of nine countries. *Food Control*, v. 22, p.430-432, 2011.

THORARINSDOTTIR, K. A., ARASON, S., SIGURGISLADOTTIR, S., VALSDOTTIR, T., TORNBERG, E. Effects of different pre-salting methods on protein aggregation during heavy salting of cod fillets. *Food Chemistry*, v. 124, n.1, p.7–14, 2011.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo (^1H) pode fornecer valiosas informações sobre o comportamento da água no sistema muscular de matrizes alimentares submetidas a processamentos tecnológicos como a adição de aditivos umectantes e durante a estocagem. Este estudo fornece dados preliminares que podem ser ampliados para uma variedade de produtos de origem animal, sugerindo dados relevantes para a tecnologia de alimentos.

O presente trabalho teve como matrizes de eleição camarão tratado com polifosfato e sardinha salgada e, o método analítico de escolha (RMN), possibilitou a observação de mudanças no comportamento da água no tecido muscular das amostras analisadas. A RMN também demonstrou correlação com diferentes propriedades físico-químicas do pescado, tais como pH, capacidade de retenção de água, cor, textura e grau de deterioração. Sendo assim, a RMN de baixo campo demonstrou ser uma ferramenta analiticamente importante, capaz auxiliar na compreensão da mobilidade de água nas amostras estudadas.

Os resultados obtidos com as análises dos camarões também forneceram informações para as boas práticas de fabricação e para a otimização do processo industrial de adição de polifosfato em pescado. Os dados sobre a influência do tempo de contato e a concentração de aditivo utilizada na qualidade do produto, fomentam o uso adequado de polifosfatos nesta matriz, antes e após o congelamento.

Em se tratando do uso da técnica, tipo de produto analisado e processamento do mesmo, este trabalho se destaca trazendo novos dados. Observa-se também a importância da realização futura de novos estudos, relacionando os parâmetros de RMN com as alterações estruturais (proteicas) que ocorrem nos tecidos. Desta forma, reitera-se a contribuição para uma melhor caracterização dos dados obtidos e para possíveis aplicações da técnica em questão em linhas de produção, como alternativa, em detrimento de técnicas analíticas destrutivas e demoradas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C. M.; RINNAN, A. Distribution of Water in Fresh Cod. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 35, p. 687-696, 2002.

AURSAND, I.G.; GALLART-JORNET L.; ERIKSON U.L.F; AXELSON D.E.; RUSTAD, T. Water Distribution in Brine Salted Cod (*Gadus morhua*) and Salmon (*Salmo salar*): A Low-Field ^1H NMR Study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 56, p. 6252–6260, 2008.

AURSAND, I. G.; VELIYULIN, E.; BÖCKER, U.; OFSTAD, R.; RUSTAD, T.; ERIKSON, U. Water and salt distribution in Atlantic salmon (*Salmo salar*) studied by low-field ^1H NMR, ^1H and ^{23}Na MRI and light microscopy: Effects of raw material quality and brine salting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 46–54, 2009.

AZEREDO, R.B. V.; COLNAGO, L.A. Análise quantitativa pela técnica de RMN em estado-estacionário. In: ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, 7., 1999, Angra dos Reis. *Resumos...* Rio de Janeiro: AUREMN, 1999. p. 119-120. Disponível em: <[http://www.prodemb.cnptia.embrapa.br/busca.jsp?baseDados=PRODEMB&unidade=TODAS&fraseBusca="AZEREDO, R. B. V. de, COLNAGO, L. A." em AUT&posicaoRegistro=1&formFiltroAction=N&view=7444](http://www.prodemb.cnptia.embrapa.br/busca.jsp?baseDados=PRODEMB&unidade=TODAS&fraseBusca=)>. Acesso em: 27 ago. 2012.

BASTOS, J. R. Processamento e conservação do pescado. Programa de Cooperação Governamental. Documento de Campo, nº9, 1989. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB486P/AB486P07.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

BELTON, P. S. Can nuclear magnetic resonance give useful information about the state of water in foodstuffs? *Agricultural and Food Chemistry*, v. 2, p. 179–209, 1990.

BELTON, P.S. *Resonance in Food Science: Latest Developments*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003.

BERTRAM, H.C. et al. Continuous distribution analysis of T2 relaxation in meats an approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Science*, v.60, p. 279–285, 2002a.

BERTRAM, H.C.; PURSLOW, P.; ANDERSEN, H.J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, p.824–829. 2002.

BERTRAM, H. C.; ANDERSEN, H. J. NMR and the water-holding issue of pork. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 124, p. 35–42, 2007.

BERTRAM, H. C.; ANDERSEN, H. J. Applications of NMR in Meat Science. Review Article Annual Reports on *NMR Spectroscopy*, v. 53, p. 157-202, 2004.

BLOCH, F.; HANSEN, W.W.; PACKARD, M. Nuclear induction. *Physical Review*, v. 69, p.127, 1946.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Circular DIPOA nº009. 2003. Comunica que dentre outros aspectos, "O tripolifosfato de sódio não deve ser utilizado antes do congelamento. A aplicação deste aditivo somente será autorizada na água de superfície, de acordo com as instruções contidas na Circular DIPOA no. 13/70". CIRCULAR/GAB/DIPOA/SDA Nº 009, 12/11/03.

_____. Ministério da Saúde. Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº4 de 24 novembro de 1988. Aprova a revisão das tabelas I,III,IV,V, referentes a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I,II,III,IV e VII, todos do Decreto nº55.871 de 26 de março de 1965. Aditivos intencionais em alimentos. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 19 dez. 1988.* Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf>. Acesso em 23 Ago 2012.

CFIA. Canadian Food Inspection Agency, Animal Products Directorate, Fish, Seafood and Production. List of Permitted Additives in Fish and Fish Products, 2007. Disponível em: <http://active.inspection.gc.ca/eng/anima/fispoi/product/additi/fispoiadd_dbe.asp>. Acesso em 24 ago 2012.

CODEX. Codex STAN 166-1989. CODEX standard for quick frozen fish sticks (fish fingers), fish portions and fish fillets - breaded or in batter. Adotado em 1989, Revisto em 1995 e 2004 e Alterado em 2011. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do?key=&cat=&type=&doctext=PHOSPHATE&hitcount=10&com_txt=&titletext=&qlang=EN&hitfrom=20>. Acesso em 25 ago 2012.

COULTATE, T.P. Alimentos a Química de Seus Componentes. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004.368p.

COPE, F.W. Nuclear magnetic resonance evidence using D2O for structured water in muscle and brain. *Journal of Biophysical*, v. 9, p. 303-319, 1969.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L; FENNEMA, O.R. Química de Alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2010. 900p.

ERDOGDU, F.; BALABAN, M.O.; OTWELL, W.S.; GARRIDO, L. Cook-related yield loss for pacific white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. *Journal of Food Engineering*, v. 64, p. 297-300, 2004.

FELLOWS, P.J. Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FLANTRIN, J.L. História da alimentação. 2 ed. São Paulo: Editora Liberdade, 1998. 885p.

GAVA, A.J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações. São Paulo: Nobel, 2008. 509p.

GONCALVES, A.A.; RIBEIRO, J.L.D. Do phosphates improve the seafood quality? reality and legislation. *Pan-American Journal of Aquatic Science*, v. 3, n.3, p. 237–247, 2008a.

_____. Optimization of the freezing process of red shrimp *Pleoticus muelleri* previously treated with phosphates. *International Journal of Refrigeration*, v.31, p.1134–1144, 2008b.

GONÇALVES, A.A.; RECH, B.T.; RODRIGUES, P.M.; PUCCI, D.M.T. Quality evaluation of frozen seafood (*Genypterus brasiliensis*, *Prionotus punctatus*, *Pleoticus muelleri* and *Perna perna*) previously treated with phosphates. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v.3, n.3, p. 248-258, 2008.

GONÇALVES, A.A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011. 608p.

GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, métodos e aplicações. Coimbra : Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. 1012p.

GUDJÓNSDÓTTIR M.; LAUZON H.L.; MAGNÚSSON, H.; SVEINSDÓTTIR, K.; ARASON, S.; MARTINSDÓTTIR, E.; RUSTAD, T. Low field Nuclear Magnetic Resonance on the effect of salt and modified atmosphere packaging on cod (*Gadus morhua*) during superchilled storage. *Food Research International*, v. 44, p. 241–249, 2011a.

GUDJÓNSDÓTTIR, M.; JÓNSSON, Á.; BERGSSON, A.B.; ARASON, S.; RUSTAD T. Shrimp Processing Assessed by Low Field Nuclear Magnetic Resonance, Near Infrared Spectroscopy, and Physicochemical Measurements—The Effect of Polyphosphate Content and Length of Prebrining on Shrimp Muscle. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 4, p.E357-E367, 2011b.

GUNASEKARAN, S. Non destrutive Food Evaluation: Techniques to analyses properties and quality. New York: M. Dekker, 2001.

JENSEN, KN.; JØRGENSEN, BM. Effect of storage conditions on differential scanning calorimetry profiles from thawed cod muscle. *LWT-Food Science Technology*, v. 36, p.807–812, 2003.

LAKSHMANAN, R.; PARKINSON, J.A.; PIGGOTT, J.R. High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). *LWT-Food Science Technology*, v. 40, p.544–555, 2007.

NETO, M.P.; NAKAMURA, V.Y. Uso de phosphates em frutos do mar. *Revista Nacional da Carne*, n.320, p. 110-113, 2003.

OFFER, G.; KNIGHT, P. The Structural Basis of Water-Holding in Meat. In: LAWRIE, R. *Meat Science*. Oxford: Pergamon Press, 1988.

OGAWA, M. Tecnologia do pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E.L. (Eds). *Manual de Pesca. Ciência e Tecnologia do Pescado*. São Paulo: Varela, 1999. p.291-299.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J.A.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. Tecnologia de alimentos - Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PANEPUCCI, H.; TANNÚS, A. Magnetic Resonance Imaging. In: COLNAGO, L. A.; CRUVINEL, P. E. *Advances in Agricultural Tomography*. São Carlos: Embrapa Agricultural Instrumentation, 2000. p. 57-76.

PRESTES, R.A. COLNAGO, L.A.; FORATO, L.A.; VIZZOTO, L.; NOVOTNY, E.H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. *Analytica Chimica Acta*, v. 596, p. 325-329, 2007.

PURCELL, E.M.; TORREY, H.C.; POUND, R.V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*, n.69, p.37-38, 1946.

RUAN, R.R.; CHEN, P.L. Water in foods and biological materials. A nuclear magnetic resonance approach. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998.

RUAN, R.R.; CHEN, P.L. Nuclear Magnetic Resonance Techniques and Their Application in Food Quality Analysis. In: GUNASEKARAN, S. *Nondestructive Food Evaluation: Techniques to Analyze Properties and Quality*. New York: Ed. Marcel Dekker, 2001.

SCHUBRING, R.; MEYER, C.; SCHLÜTER, O.; BOGUSLAWSKI, S.; KNORR, D. Impact of high pressure assisted thawing on the quality of fillets from various fish species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.4, n.3, p. 257-267, 2003.

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

THORARINSDOTTIR, K. A.; GUDMUNDSDOTTIR, G.; ARASON, S.; THORKESSON, G.; KRISTBERGSSON, K. Effects of added salt, phosphates and proteins on the chemical and physicochemical characteristics of frozen cod (*Gadus morhua*) fillets. *Journal of Food Science*, v.69, n.4, p.144 –152, 2004.

TOLDRÁ, F. Muscle Foods: water, structure and Functionality. *Food Science Technology International*, v.9, n.3, p. 173-177, 2003.

TSIRONI, T.; DERMESONLOUGLOU, E.; GIANNAKOURE, M.; TAOUKIS, P. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *LWT-Food Science Technology*, v. 42, p.664–671, 2009.

TURAN, H.. KAYA, Y.; ERKOYUNCU, I. Effects of glazing, packaging and phosphate treatments on drip loss in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during frozen storage. Turkish. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.3, p.105-109, 2003.

ÜNAL, S.B.; ERDOĞDU, F.; EKİZ, H. I. Effect of temperature on phosphate diffusion in meats. *Journal of Food Engineering*, v.76, p.119-127, 2006.

USDA United States U.S. Department of Agriculture. National Organic Program. Sodium Phosphates Processing. National Organic Standards Board Technical Advisory Panel Review, 2001. Disponível em: <http://www.ams.usda.gov/nop/nationalist/TA_PReviews/sodiumphosphates.pdf> Acesso em 24 ago 2012.

APÊNDICES

6.1 FIGURAS RELATIVAS À ETAPA EXPERIMENTAL



Figura 1. Pesagem e separação das amostras de camarão (*Litopneaus vannamei*) para posterior etapa de tratamento com tripolifosfato de sódio (STP).

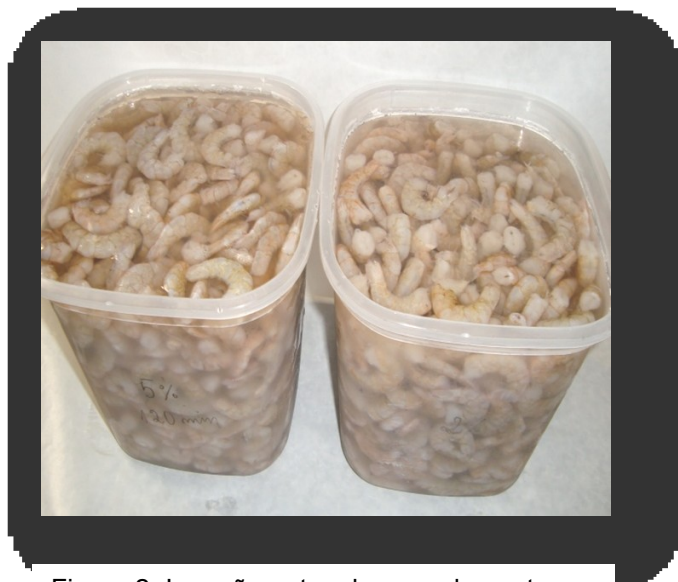


Figura 2. Imersão antes do congelamento em soluções contendo diferentes concentrações de TPS por diferentes períodos de tempo.



Figura 3. Preparo das amostras de camarão para etapa de congelamento.



Figura 4. Separação das amostras para posteriores análises físico-químicas e análises por RMN.



Figura 5. Amostras de peixe saiaú – saiaú úmida (*Sardinella brasiliensis*).



Figura 6. Equipamento de RMN, MARAN DXR 2® (Oxford Instruments).

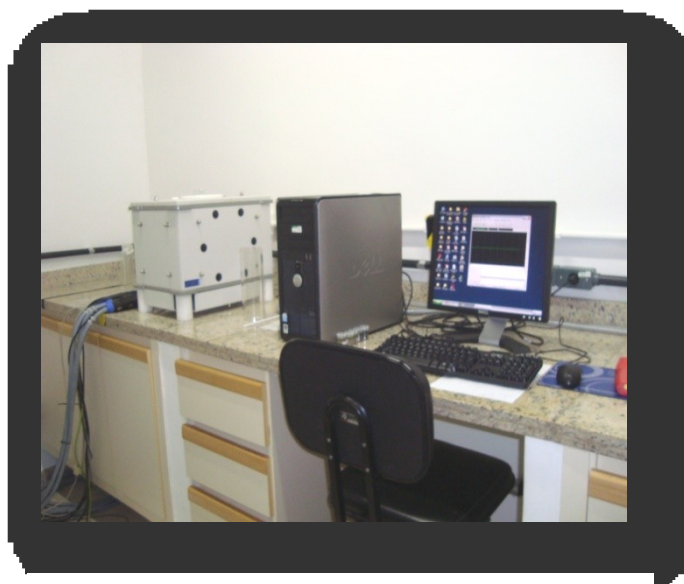


Figura 7. Equipamento de RMN, MARAN DXR 2® (Oxford Instruments).

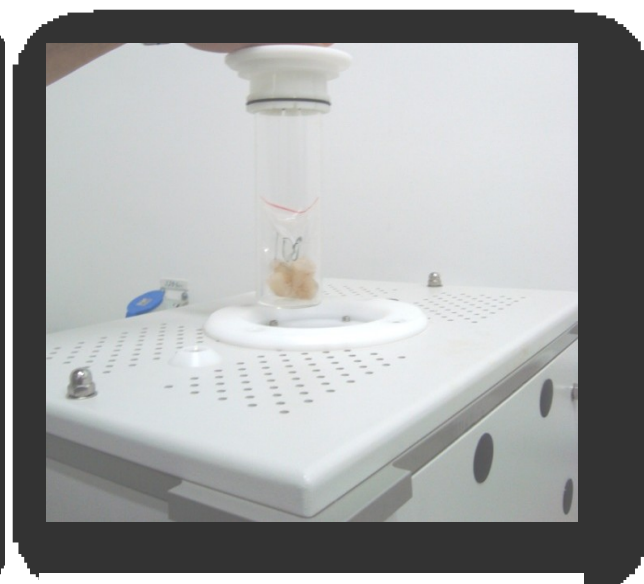


Figura 8. Cilindro de vidro para colocação das amostras em equipamento de RMN, MARAN DXR 2® (Oxford Instruments).