



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617628-3 A2**



(22) Data de Depósito: 18/10/2006
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)

(51) *Int.Cl.:*
A23L 1/328 2006.01
A23B 4/027 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA PREPARAR OS OVOS OVULADOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM IGUARIAS REFINADAS E OVOS OVULADOS PREPARADOS PELA UTILIZAÇÃO DO DITO MÉTODO**

(30) Prioridade Unionista: 19/10/2005 DE 102005050723.9

(73) Titular(es): Stiftung Alfred-Wegener-Institut Für Polar-und Meeresforschung

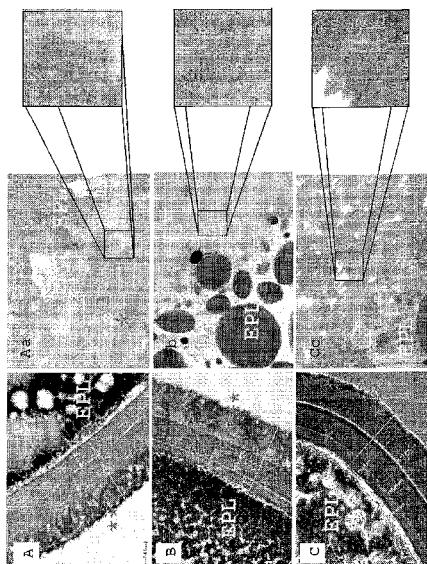
(72) Inventor(es): Angela Köhler-Günther

(74) Procurador(es): Trench, Rossi e Watanabe

(86) Pedido Internacional: PCT DE2006001867 de 18/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/045233 de 26/04/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PREPARAR OS OVOS OVULADOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM IGUARIAS REFINADAS E OVOS OVULADOS PREPARADOS PELA UTILIZAÇÃO DO DITO MÉTODO. Problemas no armazenamento de caviar e outros produtos de ova de peixe são o crescimento de bactérias existentes e a cristalização de moléculas de tirosina. Um problema significativo é matar as fêmeas para obter caviar, porque até agora somente os ovos imaturos têm estabilidade suficiente para conservação e armazenamento. No método de acordo com a presente invenção, os ovos recém colhidos são tratados exogenamente com uma molécula de transdução de sinal, por exemplo, peróxido de hidrogênio. A ovoperoxidase de enzima é deste modo ativada, o que inicia a formação e endurecimento de uma película extracelular. O tratamento dos ovos ovulados por uma molécula que se apresenta naturalmente na célula do ovo e é de outro modo formada no metabolismo de célula normal a fim de prevenir polispermia facilita uma possibilidade de tratamento completamente a salvo de acordo com os requisitos legais alimentares que é geralmente reconhecido como seguro para endurecimento dos ovos ovulados. O grau de endurecimento pode ser ajustado pela duração do tratamento. Os ovos endurecidos, cujo endurecimento artificial pode ser examinado por uma estrutura específica sob um microscópio eletrônico, podem ser mais bem preservados e armazenados. O método pode ser usado tanto para ovos maduros quanto imaturos, já que o método também tem uma ação bacteriana, prevenindo uma cristalização de tirosina.





PI0617628-3

MÉTODO PARA PREPARAR OS OVOS OVULADOS DE ANIMAIS AQUÁ-
TICOS EM IGUARIAS REFINADAS E OVOS OVULADOS PREPARADOS
PELA UTILIZAÇÃO DO DITO MÉTODO

Descrição

5 Refere-se a presente invenção a um método
para o processamento de ovos ovulados de animais aquá-
ticos em delicadas iguarias, tendo uma colheita dos o-
vos ovulados sem intervenção prejudicial no animal a-
quático e uma preservação, e aos ovos ovulados de ani-
10 mais aquáticos processados em iguarias delicadas medi-
ante utilização do método.

Os ovos processados, sempre não-
fertilizados de vários animais aquáticos foram enalte-
cidos por algum tempo como uma delicada iguaria na so-
15 ciedade abastada e são cada vez mais consumidos. Os
ovos de peixe imaturos (em vários estágios) que ainda
não foram postos naturalmente, são chamados de ova. A
ova pode, teoricamente, originar-se de qualquer peixe
feminino (ou animal aquático), cujos ovos não são tóxi-
20 cos. Isto também inclui o baiacu, o fugu que é até
mesmo altamente tóxico com preparação apropriada. O
chamado "caviar real" ou "caviar russo" é produzido a
partir da ova do esturjão. Estabelece-se aqui diferen-
ciação entre o caviar de ossietra, de esturjão branco e
25 de beluca. Além do esturjão selvagem, o esturjão cul-
tivado também já foi usado para obter-se caviar. A ova
de lumpfish, um peixe semelhante a bacalhau, e do aren-
que é usada para produzir o substituto de caviar ("ca-

viar alemão"). O "caviar islandês" é produzido da ova do capelin. O caviar de truta é obtido a partir de truta, e o caviar de salmão que tem uma cor avermelhada é produzido a partir de salmão. Além disso, também se
5 obtém ova a partir de ouriços-do-mar. Finalmente, os anfíbios, tais como sapos que se reproduzem pondo ovos, também serão incluídos nos animais aquáticos citados neste contexto. A ova normalmente é salgada, às vezes também defumada. A ova defumada é produzida a partir
10 da ova localizada no envoltório intacto por defumação quente. Origina-se tipicamente de bacalhau e da pesca-da polaca. A ova de lagosta, lagostim grande, e outros crustáceos, bem como também a laranja ova colorida de vieira, é chamada de "corail".

15 Além do valor da alta satisfação, o caviar tem também outras propriedades valiosas. O caviar é rico em proteínas (25 a 30%), com uma alta proporção de aminoácidos essenciais. Porém, com 16% gordura, não é uma comida magra. O caviar contém as vitaminas D, E,
20 B12, e niacina, bem como os minerais de iodo e sódio. Além disso, ele é dotado de uma alta proporção de colesterol bom.

O caviar atualmente disponível no mercado é a ova tratada (limpa, salgada) que é obtida no estado
25 imaturo a partir dos ovários de peixe feminino porque neste caso os ovos imaturos têm estabilidade suficiente para as etapas de tratamento adicionais. Desta forma, para se obter caviar da melhor qualidade, os ovos são

colhidos na atualidade antes deles terem alcançado a maturidade máxima (fase de ovulação).

Um problema mais significativo na produção de caviar é acima de tudo a obtenção dos ovos. O problema de matar animais femininos para obter-se caviar (por exemplo, de esturjão) existe tanto com a captura inculta, quanto com a cultura aquática (aproximadamente 2500 toneladas/ano mundial). Durante séculos constituiu-se um método padrão matar os animais antes de remover os ovos para obter-se caviar e ova a partir de várias espécies de peixe. Um argumento principal exterminar os indivíduos femininos é, por exemplo, no esturjão, de que os ovos são colhidos no estado imaturo antes de alcançarem a fase de ovulação natural, porque os ovos que amadureceram ao máximo no corpo do animal fêmea até a ovulação, sendo assim capazes de ser fertilizados, são excessivamente macios. Estes ovos maduros iriam estourar quando da preservação através do sal (cloreto de sódio) só e em combinação com bórax e iriam conservar-se unidos na forma de uma polpa enlodada não comestível. No decorrer da ovulação, isto é, a expulsão do ovo dos folículos do ovário, o ovo sofre mudanças naturais (amolecimento da membrana de ovo para a fertilização iminente por meio de esperma), que restringem o seu uso direto como caviar. Além disso, há efeitos osmóticos que ocorrem depois no decorrer da salgadura. Experiências conhecidas a partir da técnica anterior que usa caviar de esturjão mirim suavemente

salgado que foi produzido para propósitos de teste a partir de ovos ovulados (amadurecidos) e não-ovulados (imaturos), mostrou que os ovos maduros já estouraram ao contacto da luz e liquefazem-se em uma massa gordu-
5 rosa, pastosa. Porém, não foram detectáveis diferenças de paladar significativas.

Esta prática de extermínio junto com a pesca excessiva predatória resultou na ameaça de extinção para os cardumes naturais de aproximadamente 30 espécies diferentes de esturjão. Na Rússia, foi desenvolvid
10 o um método novo pelo qual a ova imatura pode ser obtida sem precisar matar o peixe. Um tipo de "secção cesariana" múltipla é realizado sob anestesia nos ovários, os ovos imaturos são expelidos, e as incisões são
15 novamente fechadas. Quando estas incisões são curadas, os peixes podem ser libertados novamente ou podem ser mantidos em estações de criação para posterior remoção de caviar. Porém, a taxa de mortalidade para este método bastante complexo que esforça o peixe muito forte-
20 mente, ainda é superior a 40%. Além disso, este procedimento é proibido de acordo com o código de proteção animal alemão.

Foram iniciados dispendiosos programas reabastecimento mundial. Os esturjões são sexualmente
25 amadurecidos pela primeira vez no ambiente natural durante de 8-12 anos; em cultura aquática mais cedo de 2-4 anos na dependência do tipo de esturjão. Foram libertadas várias espécies de esturjão de cultura aquática

no contexto silvestre dentro do quadro de programas de restauração com sucesso variado, para poupar as espécies ameaçadas de extinção. Embora os animais fêmeas permaneçam vivos para cultivo e os ovos sejam obtidos por despojamento, o problema de matar os animais fêmeas ainda persiste pelas razões supracitadas para a produção de caviar em cultura aquática.

Entretanto, altas perdas comerciais também devem ser consideradas para o cultivo de larvas e de peixinhos para cultura aquática e por razões de formação de estoque, porque as fêmeas exibem desempenho de reprodutivo significativamente melhorado com o aumento da idade.

O seu processo depois da colheita é essencial para a qualidade do caviar. Salgadura moderada torna-o mais suscetível de armazenamento. O caviar de alta qualidade é salgado somente o suficiente conforme requerido para a capacidade de armazenamento limitado. Um caviar identificado por "malossol" pode ter um conteúdo de sal de no máximo 2,8 a 4%. O gosto natural é amplamente retido em caviar de malossol. Além de caviar de malossol, há também o caviar salgado, capaz de ser armazenado durante longo tempo, o qual é misturado com aproximadamente 10-12% sal de cozinha. O caviar fresco é muito sensível à temperatura e, assim, difícil de armazenar e de servir. A forma tradicional de acondicionamento é a lata hermética, revestida internamente somente para caviar salgado, mas não aquecido. O cavi-

ar pasteurizado tornado armazenável por breve aquecimento a 60°C é vendido em boiões de boca rosqueada e latas de anel de puxar e é armazenável sem abrir durante um ano.

5 Um problema no armazenamento de caviar fresco é o crescimento de bactérias existentes, resultando em desperdício mais rápido do produto. Porém, na pasteurização o caviar perde granulação e paladar devido ao tratamento com calor. Um problema adicional no
10 armazenamento de caviar e de outros produtos de ova é a cristalização de moléculas de tirosina que são armazenadas nos ovos como aminoácidos não-essenciais. O produto se torna invendável devido a esta cristalização. Além disso, existe também um problema na velocidade de
15 processamento da ova obtida. Até este ponto, não podem decorrer mais do que 10 minutos entre a colheita dos ovos provenientes da fêmea e a decantação do caviar em latas, caso contrário os ovos estragam-se.

20 Porém, é absolutamente necessário para cada etapa do processamento (preservação, pasteurização, *inter alia*) depois da colheita dos ovos que os ovos colhidos sobrevivam sem estourar, porque o estouro dos ovos resulta em uma perda de qualidade irreversível e
25 assim na inutilização do produto.

Técnica anterior

Um método por produzir ovas de arenque acondicionadas é conhecido a partir de **JP 60091934A** no

qual a ova de arenque colhida que foi recolhida na fase imatura das fêmeas do arenque previamente sacrificadas é tratada com anti-bactérias utilizando-se uma solução feita de peróxido de hidrogênio e sal depois de uma
5 preservação que utiliza sal para solidificação da ova. A concentração do peróxido de hidrogênio usada pode ser reduzida por remoção de sangue imediata da ova de arenque colhida o que resulta em uma melhoria de gosto da ova de arenque. Depois do tratamento de peróxido de
10 hidrogênio e sal, realiza-se um tratamento de enzimico mediante utilização de catalase para remover o peróxido de hidrogênio de oxi-radical. A remoção imediata do sangue ainda não coagulado só pode acontecer diretamente depois de ser sacrificado o peixe ou logo antes do
15 descongelamento do peixe, que foi congelado diretamente depois de morto. Entretanto, uma vez que a remoção imediata no peixe recém-abatido só pode ser executada com grande esforço, tipicamente os peixes são primeiramente congelados, o que por sua vez resulta em uma per-
20 da de qualidade.

Além disso, é conhecido a partir da técnica anterior que a aplicação de ácido de tânico é um agente comprovado em cultura aquática na obtenção de peixes de procriação. Os ovos fertilizados são trata-
25 ram usando-se uma solução de ácido tânico para remover a camada de gel pegajosa. Os ovos podem ser deste modo melhor desinfetados durante a procriação, e pode ser reduzida a infestação de fungos e de bactérias durante

a incubação do ovo. Este tratamento é padrão para várias espécies de peixes, tais como perca do mar, inclusive esturjão (cf. publicação I por Mizuno *et al.*: "Elimination of adhesiveness in the eggs of shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus* using kaolin treatment to achieve high hatching rate in environment with a high iron concentration", *Aquaculture* 242 (2004) pp. 713-726). O ácido tânico, um polifenol, é a forma comercial do tanino. A sua estrutura está baseada em ésteres de glicose de ácido de gálico. O ácido tânico é usado como um agente de coloração de madeira e encontra-se naturalmente presente em árvores tais como carvalho, noqueira, mogno e sequóia como um retardador de fogo. Também pode ser deduzido da publicação I (Figura 5) que uma pressão de ovo mais alta até ao estouro pode ser alcançada por um tratamento que usa ácido tânico. Porém, é sabido que a membrana do ovo enrijece como borracha devido ao tratamento com ácido tânico e, assim, não é mais satisfatória para o consumo.

A partir da **RU 2 126 218 C1** é conhecido um método para tingidura, no qual a ova ovulada que tem uma coloração natural fraca, em particular também de espécies de peixes "de qualidade mais baixa" do que o esturjão, é tingida e salgada em duas etapas com um intervalo de pelo menos 0,5 hora. Na primeira etapa adicionam-se 2/3 do pigmento diretamente à ova, e na segunda etapa introduz-se o componente restante do pigmento em conjunto com uma emulsão de lipídio-proteína

em uma quantidade de 5 a 10% em relação à massa da ova. A salgadura é executada antes da segunda etapa de tingidura. Não fica assim excluído neste método que a ova ovulada estourará durante a salgadura seguinte depois da adição da tintura na primeira etapa. A emulsão de lipídio-proteína é aplicada depois da salgadura e é usada para tingidura estável e melhorar os aspectos organolépticos e propriedades de proteção de radiação da ova.

10 A partir da RU 2 232 523 C2 é conhecido um método para produzir caviar granular de ova de esturjão ovulada, a partir da qual a presente invenção procede como a técnica anterior mais próxima. Para este propósito, os ovos ovulados colhidos são tratados primeiro em uma solução aquosa 1,5-2% quente de um preservativo, para prepará-los para uma pasteurização subsequente a temperaturas de 65-70°C. Além do fato de que todo o procedimento de aquecimento influencia significativamente o gosto da ova, quando são usados ovos ovulados forem usados, que são conhecidos como sendo dotados de uma membrana de ovo muito macia, não é garantido de forma segura que eles suportarão o tratamento seguinte que usa preservativos sem estourar. Até mesmo uma pequena proporção de ovos estourados piora a qualidade do caviar significativamente, porque os ovos estourados só podem ser removidos com dificuldade. Porém, o fato que os animais nem têm que ser sacrificados nem tratados através de cirurgia estressante para a colheita, é de

vantagem especial forem usados se ovos ovulados.

De acordo com as descobertas e as tecnologias de processamento da técnica anterior, supõe-se atualmente que aquele caviar de valor pleno não pode ser
5 produzido a partir de ovos de esturjão (ovulados) maduros, porque os ovos maturados naturalmente são excessivamente macios como um resultado da fertilização esperada e estouram imediatamente ao contacto com o sal ou outros preservativos. Os métodos citados para obtenção
10 de caviar a partir de ova ovulada não proporcionam resultados satisfatórios.

Exposição do Objetivo

Conseqüentemente, um método de acordo com as espécies será especificado como o objetivo da presente invenção, que processa os ovos ovulados recém colhidos a partir do animal aquático vivo de uma maneira
15 tal que eles podem ser processados mais adiante sem perda de qualidade, em particular sem estourar, em delicadas iguarias de valor pleno, e alcançar assim uma
20 qualidade comerciável e competitiva. Em particular, uma sensibilidade mais baixa dos ovos durante o processamento e capacidade de armazenamento significativamente mais longo mesmo sem métodos de preservação fortes são alcançados pelo método. Além disso, o método é pa-
25 ra ser aplicável facilmente e com custo-efetivo e concebido de forma que também é suscetível de ser detectado no produto acabado.

A obtenção do objeto de acordo com a presente invenção encontra-se exposta na reivindicação de processo e compreende as seguintes etapas de método:

- 5 • colheita dos ovos ovulados sem intervenção prejudicial no animal aquático,
- tratamento exógeno dos ovos ovulados recém colhidos, em uma solução aquosa com adição de pelo menos uma molécula de transdução de sinal que também ocorre naturalmente na célula de
10 ovo para estabilização fisiológica da membrana de ovo por ativação de ovoperoxidase e subsequente
- preservação

Estão expostos refinamentos vantajosos do
15 método nas reivindicações dependentes e expostos em maiores detalhes em seguida com relação à presente invenção. Além disso, está exposto na reivindicação de produto que os ovos ovulados processados de acordo com o método de acordo com a presente invenção são dotados
20 de uma película externa extracelular endurecida que tem cordões de proteína reticulada e moléculas de tirosina incorporadas irreversivelmente. Uma estrutura molecular deste tipo não acontece naturalmente em ovos não-fertilizados. Um produto artificialmente produzido de
25 acordo com este tipo não existiu até agora na técnica anterior.

No método de acordo com a presente invenção, os ovos ovulados, isto é, os ovos plenamente madu-

ros para fertilização (desovados), são colhidos a partir dos animais aquáticos em repouso, predominantemente esturjão, por descarga natural dos ovos ovulados a partir da abertura do corpo e simples desova. A carga de
5 tensão para os animais é deste modo reduzida ao mínimo e dificilmente os submete a esforço. Os ovos ovulados recém colhidos são tratados exogenamente antes da preservação mediante utilização de uma molécula de transdução de sinal que também ocorre naturalmente na célula
10 do ovo. A ovoperoxidase de enzima é deste modo ativada, o que inicia a formação e endurecimento de uma pele extracelular externa e, assim, uma estabilização fisiológica da membrana do ovo. Conseqüentemente, o título "OVOHARD" pode ser usado como um nome memorável para o
15 método de endurecimento de acordo com a presente invenção. Uma possibilidade de tratamento absolutamente inofensiva que é irrepreensível na lei sobre alimentos, para endurecer os ovos foi encontrada mediante o tratamento dos ovos ovulados usando-se pelo menos uma molé-
20 cula que também ocorre naturalmente na célula do ovo, que é de outro modo formada somente em baixas concentrações no metabolismo da célula normal. Um endurecimento posterior iniciado artificialmente dos ovos é obtido usando-se o método de acordo com a presente invenção por aplicação simples de uma substância natural que
25 faz os ovos ovulados significativamente menos sensíveis a tratamento posterior, acima de tudo durante a preservação e decantação, mas também durante o armazenamento

e recondicionamento. Uma outra vantagem deste endurecimento posterior artificial é a melhor capacidade de armazenamento e, assim, comercialização dos ovos obtidos, porque a ocorrência de cristais de tirosina durante armazenamento é evitada. Devido à ativação da ovo-peroxidase, ocorre a reticulação dos cordões de proteína e a incorporação irreversível de tirosina em uma membrana impenetrável e, assim, é evitada a formação de cristais. Além disso, o tratamento tem um efeito bactericida pelo qual a capacidade de armazenamento do produto é prolongada significativamente.

O método de acordo com a presente invenção compreende um tratamento externo dos ovos ovulados recém colhidos utilizando-se pelo menos uma molécula que também se apresenta naturalmente na célula do ovo, que exerce uma função chave na cadeia de transdução de sinal, que inicia o endurecimento da membrana em uma fertilização natural. Isto refere-se com particularidade aos íons de cálcio (Ca^{++}), que fluem em uma onda pelo ovo depois de um estímulo exógeno e resulta em ativação enzimática. Além disso, existe pelo menos uma outra molécula fundamental. Esta é a molécula formada pela oxidase dependente de NADPH, peroxidase de hidrogênio H_2O_2 . A peroxidase de hidrogênio inicia a formação natural, ocasionada endogenamente, de uma membrana de fertilização sólida em torno do ovo em concentrações micromolares extremamente pequenas. Os íons de cálcio (Ca^{++}) existem na célula de ovo não fertilizado nos

chamados depósitos de cálcio, o mitocôndria e o retículo endoplásmico, mas também pode entrar na célula fluindo a partir do lado de fora por intermédio de receptores específicos. Enzimas são libertadas a partir dos depósitos celulares internos nos quais elas são armazenadas de forma inativa, por esta onda de cálcio. Estas enzimas (por exemplo, glicose-6-fosfato-deidrogenase) por sua vez produzem NADPH. NADPH refere-se à forma fosforilada de NADH, significativa em anabolismo, que é o resultado de NAD (adenina-dinucleotídeo de nicotinamida) por adição de um íon de hidreto. A oxidase de NADPH produz peróxido de hidrogênio que é por sua vez o substrato para ovoperoxidase, a qual é responsável pelo endurecimento da membrana de ovo.

Na natureza, o ovo ovulado, não-fertilizado, encontra-se em um estado dormente antes de ser bombardeado através de esperma múltiplo durante a fertilização natural. Todo o esperma com exceção do que se funde com o ovo deve ser retido. Durante a fertilização natural, a membrana de ovo é endurecida segundos depois da penetração do esperma para prevenir uma fertilização múltipla através de esperma múltiplo (polispermia, com a exceção de baixa fertilização múltipla que resulta em múltiplos nascimentos em um único-ovo) que é fatal para o embrião. O embrião resultante executa esta tarefa formando um pele externa extracelular dentro de segundos, a qual é impenetrável a esperma adicional. Além disso, o embrião é protegido contra da-

no mecânico e toxinas. A enzima fundamental para este procedimento é a ovoperoxidase que está pronta em granulação (grânulos corticais) debaixo da membrana de ovo em uma posição de espera. No momento da fertilização, a seqüência de reação descrita anteriormente é colocada em funcionamento. Devido à ovoperoxidase produzida, cordões de proteína reticulados por quinase de tirosina, que estimula o procedimento, tirosina é incorporada irreversivelmente em uma membrana de extracelular impenetrável, a qual protege o embrião. Este mecanismo é distribuído por todo o reino animal de invertebrados, tais como ouriços-do-mar e vertebrados tais como peixes, camundongos, e seres humanos para proteger os embriões (cf., por exemplo, **publicação II** por La Fleur et al.: "Searching ovoperoxidase: oocyte specific member of a heme dependent peroxidase superfamily that functions to stop polyspermy", *Mechanisms of Development* 70 (1998), pp. 77-89 e **publicação III** por Wessel et al.: "The Biology of Cortical Granules" *Int. Rev. Cytol.* 209 (2001), pp. 117-206).

Na **publicação IV**: "Conformational Control of Ovoperoxidase Catalysis in the Sea Urchin fertilization Membrane" por T.L. Deits et al. (*Journal of Biological Chemistry*, Vol. 261, No.26, Issue of September 15, pp. 12159-12165, 1966) e **publicação V** "Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks" por Ch.A. Forster et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 74, No.11,

pp. 4214-4218, October 1977, Biochemistry) foi estabelecido fundamentalmente pela primeira vez a utilização de métodos cromatográficos que e como acontecem a reticulação de tirosina e endurecimento da membrana. Além disso, análise mostrou a tirosina (resíduo) desempenha um papel importante no processo de endurecimento. Foi descoberto através de inibidores específicos de oxidasas que o (ovo) peroxidase aparentemente desempenha uma função biológica importante na reticulação da tirosina e, assim, no endurecimento da membrana.

Com base no fenômeno de biologia de célula descrito anteriormente, no método de acordo com a presente invenção, foi desenvolvida a aplicação exógena de pelo menos uma molécula de transdução de sinal também ocorre naturalmente na célula de ovo para endurecer a membrana de ovo sem o uso de esperma. As moléculas de transdução de sinal podem ser preferivelmente o peróxido de hidrogênio oxi-radical H_2O_2 ou uma solução de cloreto de cálcio $CaCl_2$ para proporcionar íons de cálcio. Um uso em comum de ambas as moléculas de transdução de sinal é possível, porque simula estreitamente o procedimento natural do endurecimento da membrana de ovo, e deste modo é possível a concepção de produto individual, em particular com relação ao grau de dureza dos ovos tratados, na dependência da estratégia de comercialização. A aplicação exógena e a penetração das moléculas de transdução de sinal fornecidas artificialmente no ovo ovulado não-fertilizado de acordo com a

presente invenção simulam a cascata de transdução de sinais de fertilização natural, e uma pele externa extracelular sólida das formas de ovo ovulado não-fertilizado.

5 O endurecimento uniforme de todos os ovos alcançado pelo método de acordo com a presente invenção aumenta com a duração do tratamento de 1 minuto a 20 minutos. Assim, o grau de dureza pode ser ajustado individualmente por intermédio da duração de tratamento.

10 Em contraste, a concentração fornecida das moléculas de transdução de sinal, que ocorre também naturalmente na célula de ovo, exibe o efeito mais forte no grau de endurecimento sob concentrações mais baixas, (cf. Figura 5 C para H_2O_2). Isto é plausível, porque as concentrações naturais das moléculas de transdução de sinal na

15 células também operam na gama nanomolar e gama micromolar. O tratamento dos ovos recém colhidos utilizando-se o método de acordo com a presente invenção pode ser realizado de forma especialmente vantajosa em um banho

20 de água que utiliza uma adição de 0,01% - 0,02% de peroxide de hidrogênio e/ou íons de cálcio na forma de cloreto de cálcio $CaCl_2$ durante cinco minutos. As moléculas de transdução de sinal podem ser usadas tanto individualmente, quanto em combinação.

25 Depois da colheita, os ovos ovulados não-fertilizados a serem processados podem ser primeiro lavados em solução salina de cocção fisiológica antes do contacto com água, para prevenir aderência prematura e

alongamento do tempo de processamento dos ovos frescos. A etapa de lavagem ocorre preferivelmente sob condições estéreis. Os ovos lavados estéreis são então simplesmente vazados em um banho correspondente que tem as

5 concentrações específicas de peróxido de hidrogênio e/ou cloreto de cálcio determinadas no desenvolvimento de método e peneirados fora depois de vencimento do tempo atuante. A presente invenção refere-se, deste modo, a um método muito simples, rápido e também ainda

10 de custo efetivo. A baixa concentração das substâncias químicas usadas também é vantajosa neste caso, o qual somente requer a quantidade necessária menor absoluta, que por sua vez também tem um efeito positivo no gosto dos ovos ovulados tratados. O peróxido de hidrogênio

15 decompõe-se na água e oxigênio e é então sem gosto. Cálcio está presente em todas as células de animais e plantas e somente proporciona um gosto um pouco calcário sob concentrações muito altas as quais, porém, não são usadas na presente invenção.

20 O método de acordo com a presente invenção é usado fundamentalmente nos ovos ovulados (desovados) não-fertilizados, do animal aquático particular. Naturalmente, é preferida a colheita a partir de um animal aquático vivo, de maneira a pôr em risco as suas espécies.

25 Entretanto, também é possível a extração a partir do animal aquático abatido ou morto. A vantagem neste caso é que os ovos provenientes de captura silvestre ou também de cultura aquática, mesmo se tiverem

progredido em maturidade até ao estágio de ovulação, podem ser ainda assim processados. Atualmente, a ova que já está na fase de ovulação é retirada sem utilizar na indústria de processamento, o que resulta em uma
5 perda econômica significativa. Por um lado, a ova proveniente de animais aquáticos mortos por outras razões (tais como consumo) pode ser usada; por outro lado, animais aquáticos já não precisam mais ser sacrificados para nada se for constatado que eles são ovos que já
10 estão na fase de ovulação (até agora, estes ovos eram descartados sem utilizar). O método de acordo com a presente invenção também impede, através da intercalação de tirosina estável, reticulada, na membrana de ovo solidificada, a sua cristalização durante o armazenamento, pelo que se consegue o melhoramento significativo
15 do produto e freqüentemente até recuperação do produto. Além disso, o método de acordo com a presente invenção é dotado de propriedades bactericidas, propriedades anti-sépticas pelas quais a capacidade de armazenamento dos ovos ovulados por si e das iguarias finas produzidas a partir dos mesmos são melhoradas de forma
20 significativa.

Porém, a vantagem principal do método de acordo com a presente invenção é a de que, pela primeira
25 vez, é possível processar os ovos ovulados amadurecidos de peixes e outros animais aquáticos como caviar na fase de ovulação. Os ovos são coletados por despojamento, mas eles também podem ser obtidos mecanicamen-

te ou usando-se um dispositivo de bomba, de forma que os animais femininos permaneçam vivos. Além de preservar a linhagem das espécies em extinção, observa-se também uma vantagem na preservação de fêmeas capazes de
5 reprodução, pelo que se alcança uma vantagem econômica significativa para cultura aquática. Ao prolongar o estágio de propagação várias vezes, a quantidade de ovas obtidas e o sucesso de reprodução (taxa de embriões viáveis) aumentam significativamente.

10 O método de acordo com a presente invenção pode ser aplicado facilmente e sem problemas para qualquer tipo de ovo de animais que vivem dentro e na água e pode contribuir assim também para preservar espécies de animais raras. Naturalmente, ele proporciona uma
15 vantagem econômica especial na produção de caviar a partir de ovas de esturjão e na produção de corail a partir de ovos de lagosta. Além disso, a preservação segura dos ovos, por exemplo, utilizando-se cloreto de sódio ou bórax, é possibilitada pelo endurecimento dos
20 ovos ovulados colhidos executado pela aplicação do método de acordo com a presente invenção. Também é possível defumar os ovos sem problemas. Em qualquer caso não tem mais de se tratar com ovos estourados, o que aumenta significativamente a qualidade do produto. A-
25 lém disso, caviar pode ser produzido em vários graus de dureza pelas variações do tempos/concentrações de tratamento e em combinação com sal e/ou bórax e assim seja conformado aos requisitos de paladar organoléptico do

círculo particular de consumidores.

Os ovos ovulados obtidos são alterados de forma significativa com relação à morfologia da membrana de ovo endurecida pela aplicação do método de acordo com a presente invenção. Em particular, uma pele externa extracelular dotada de cordões de proteína reticulada e moléculas de tirosina endurecida incorporada irreversivelmente pode ser fácil e claramente identificada por aquele versado na técnica com o auxílio de microscopia luminosa e, em detalhes, usando microscopia eletrônica. Esta aparência não ocorre em ovos naturais de animais aquáticos, tratados convencionalmente. Uma célula de ovo endurecida sempre pode acontecer apenas com relação a fertilização completada e, assim, com a presença de pelo menos um espermatozoide na célula de ovo fertilizada. A aplicação do método de acordo com a presente invenção pode ser, deste modo, detectada inequivocamente no produto não-fertilizado, acabado.

Concretizações exemplificativas

São expostas em seguida concretizações do método para o processamento dos ovos de animais aquáticos na forma de iguarias finas de acordo com a presente invenção em maiores detalhes em seguida com base nas figuras.

A Figura 1 mostra o procedimento de endurecimento natural em ovos de ouriço-do-mar.

A Figura 2 mostra a análise de microscopia

de passagem de tempo para a produção de NADPH na aplicação do método de acordo com o presente invenção.

A Figura 3a mostra um ovo ovulado sem tratar do ouriço-do-mar.

5 A Figura 3b mostra um ovo ovulado tratado do ouriço-do-mar.

A Figura 4A mostra imagens de seções ultrafinas através da membrana de ovo de um ovo de esturjão ovulado sem tratar.

10 A Figura 4B mostra imagens de seções ultrafinas através da membrana de ovo de um ovo de esturjão ovulado sem tratar depois de um tratamento que usa cloreto de cálcio.

A Figura 4C mostra imagens de seções ultrafinas através da membrana de ovo de um ovo de esturjão ovulado sem tratar depois de um tratamento que usa peróxido de hidrogênio.

15 As Figuras 5A,B mostram diagramas das proporções dos componentes de membrana na espessura total da membrana em % de ovos de esturjão imaturos (caviar) tratados de acordo com a presente invenção; e

20 As Figuras 5C,D mostram diagramas das proporções dos componentes de membrana na espessura total da membrana em % de ovos de esturjão ovulados tratados de acordo com a presente invenção.

25 A Figura 1 mostra a fertilização natural de ovos de ouriço-do-mar e a formação de uma membrana

de fertilização extracelular. A imagem esquerda mostra o ovo não-fertilizado em ampliação de 200x. A imagem da direita mostra o ovo fertilizado em ampliação idêntica que tem a membrana de fertilização endurecida (seta). Os traços pequenos mostram o esperma atacando.

o método de acordo com a presente invenção foi testado nos ovos vivos de ouriços-do-mar (*Psammechinus miliaris*) e nos ovos do esturjão siberiano (*Acipenser baerii*). Foram monitorados os resultados do endurecimento de ovos ovulada *in vivo* com base em medições das atividades enzimáticas e morfologia de ovos de ouriço-do-mar e ovos de esturjão

Como previamente exposto, a ativação da deidrogenase de glicose-6-fosfato de enzima, que ocorre em segundos, para produzir a redução NADPH equivalente para produção de H₂O₂ como o substrato para ovoperoxidase constitui o gatilho inicial para endurecimento de ovo da membrana de ovo. A elevação da atividade de G6PDH poderá ser medida nos ovos vivos sob a influência do estímulo exógeno. O método de sal de tetrazólio de acordo com Van Noorden e com Fredericks (1992) foi transferido para as células vivas como uma evidência. O NADPH que surge na reação do substrato reduz o sal de tetrazólio (TNBT) quantitativamente para poder formar um produto de reação de cor castanha, o formazan. A formação do produto de reação é detectada a tempo com o auxílio de medições de absorção em um comprimento de onda de 585 nm.

A Figura 2 mostra a microscopia de passagem de tempo (formação de imagem utilizando-se Zeiss Axiovert, Axiocam, Software de KS300, Software de Axi-
5 ovision) de produção de NADPH em ovos de ouriço-do-mar vivis. A seta mostra a aplicação do estímulo exógeno (H_2O_2 1% em água de mar). As duas curvas de absorção superiores na região cortical (limite de ovo) e no citoplasma (interior de ovo) mostram uma elevação significativa durante o tempo em segundos depois da aplicação.
10 ção. Um controle foi executado sem estímulo exógeno. As duas curvas de absorção mais baixas para a região cortical e o citoplasma não mostram nenhuma mudança depois da aplicação. As máscaras de medição (medição macro) para a microscopia estão ilustradas nas duas ima-
15 gens mais baixas na Figura 2. A imagem esquerda mostra a máscara em forma de anel para a região cortical, a imagem da direita mostra a máscara de medição circular para o citoplasma. A atividade de enzima é mais alta na região cortical abaixo da membrana de ovo, porque é
20 aqui que demanda a de NADPH mais alta para o consumo de H_2O_2 . Uma curva idêntica para a ativação de enzima foi observada para a ovoperoxidase depois da aplicação de H_2O_2 .

A Figura 3a mostra um ovo ovulado não-
25 tratado do ouriço-do-mar sem membrana protetora (amplificação de 400 x). Os grânulos corticais ficam distribuídos de forma solta na superfície do ovo e estão cobertos somente por uma fina camada de vitelina

que não é reconhecível em microscopia de luz. A Figura 3b mostra um ovo tratado utilizando-se o método de acordo com a presente invenção que tem uma membrana protetora claramente formada (seta, ampliação de 400 x). A detecção é realizada por meio de ensaios histológicos de seções finas de material de ovo fixo (4% formaldeído de Bakers, embutindo em Epon para TEM, com a coloração usando toluidina azul), antes e depois do tratamento utilizando-se agente de endurecimento exógeno de acordo com a presente invenção.

Experiências extensas em ovos colhidos do esturjão (*Acipenser baerii*) mostraram que o método desenvolvido em ovos de ouriço-do-mar pode ser transferido diretamente e proporciona o resultado desejado. A preservação que utiliza sal de cozinha e bórax que foi realizada depois do endurecimento dos ovos e também as experiências de vida de prateleira durante mais de 12 meses mostraram que os ovos permanecem estáveis.

As Figuras 4A até C mostram imagens microscópicas de luz de seções de criostato coloridas por H&E, imagens de microscópio eletrônico de seções ultrafinas de ovos do esturjão fixadas por GA e ósmio e embutidas em Epon. As imagens mostram as mudanças de membrana de ovos ovulados do esturjão por um tratamento de acordo com a presente invenção.

A Figura 4 mostra que uma imagem de microscopia de luz de uma seção através de um ovo de esturjão ovulado sem tratamento de acordo com a presente

invenção. O envelope (linha cheia) que encerra o plasma de ovo (EPL) dos ovos de esturjão compreende várias camadas de membrana. A membrana recôndita é identificada por uma estrela (*), a membrana externa (membrana de fertilização) é identificada por meio de três estrelas (***)
5 A Figura 4Aa mostra imagens de um microscópio eletrônico em ampliação de 3000 x na área da membrana recôndita (*) e um detalhe a partir da mesma em ampliação de 12.000 x que tem feixes de fibra de tirosina soltos.
10

A Figura 4B mostra um ovo de esturjão ovulado tratado mediante utilização de 115 mg/l de cloreto de cálcio de acordo com a presente invenção. A Figura 4Bb mostra uma imagem de microscópio eletrônico em ampliação de 3000 x e um detalhe em ampliação de 12.000 x
15 que têm uma compactação por reticulação de tirosina. A Figura 4C mostra um ovo de esturjão ovulado que foi tratado utilizando-se 0,01% de peróxido de hidrogênio. A Figura 4Cc mostra um microscópio eletrônico que registra uma ampliação de 3000 x e um detalhe em ampliação de 12.000 x que tem uma compactação em cordões por reticulação de tirosina.
20

Pode ser observado claramente a partir da comparação das Figuras 4A (sem tratar), 4B (tratado usando cloreto de cálcio), 4C (tratado usando peróxido de hidrogênio) que pelo tratamento de acordo com a presente invenção, a membrana recôndita (*) de ovos de esturjão ovulados diminui em diâmetro e é compactada
25

por reticulação de tirosina, enquanto a membrana externa (***) aumenta de diâmetro, mas também se torna mais densa. A compactação resulta no endurecimento desejado da membrana de ovo. O grau de endurecimento
5 pode ser ajustado através de medição dos aditivos exógenos com relação ao tipo, quantidade, e duração.

Figuras 5A...D mostram vários diagramas das medições das proporções dos componentes de membrana na espessura total da membrana em % no caviar atualmente
10 disponível comercialmente proveniente de ovos imaturos (Figura 5A, 5B) e em ovos ovulados (Figura 5C, 5D) depois do tratamento de acordo com a presente invenção utilizando-se peróxido de hidrogênio ou cloreto de cálcio. As Figuras 5A e 5C mostram um tratamento que usa
15 peróxido de hidrogênio H_2O_2 (tratamento 0: sem tratar, tratamento 1: 0,01% solução, tratamento 2: 0,02% solução, tratamento 3: 0,05% solução, tratamento 4: 0,1% solução); as Figuras 5B e 5D mostram um tratamento utilizando-se cloreto de cálcio usando $CaCl_2$ (tratamento
20 0: sem tratar, tratamento 1:115 mg/l, tratamento 2: 123 mg/l, tratamento 3:130 mg/l com 1 = por litro de solução). Isto significa que a medição dos íons de cálcio na gama micromolar contém significativamente mais íons de cálcio que em água potável normal e água de torneira.
25 ra. A membrana de fertilização é identificada por "FM" que, sem fertilização, resulta somente através de tratamento de acordo com a presente invenção, a membrana interna é identificada por "IM".

Pode ser observado claramente que em um tratamento de caviar atualmente disponível comercialmente, isto é, de ovos imaturos, de acordo com as Figuras 5A e 5B, nenhuma mudança pertinente resulta na espessura da membrana, enquanto a mudança das proporções de espessura de membrana interna para a membrana de fertilização produzida que ocasiona endurecimento no tratamento de ovos ovulados de acordo com a presente invenção de acordo com Figuras 5C e 5D é significativa.

5

10 As médias de 50 medições de cada uma membrana interna (IM) e membrana de fertilização externa (FM) encontram-se ilustradas com a distribuição de valores no intervalo de segurança dos 25%-75% quartos e os valores mínimo e máximo.

REIVINDICAÇÕES

1 - Método para processar os ovos ovulados de animais aquáticos em iguarias delicadas,

caracterizado pelo fato de compreender as seguintes e-

5 etapas de método:

- colheita dos ovos ovulados sem intervenção prejudicial no animal aquático,

- tratamento exógeno dos ovos ovulados recém colhidos, em uma solução aquosa com adição de
10 pelo menos uma molécula de transdução de sinal que também ocorre naturalmente na célula de ovo para estabilização fisiológica da membrana de ovo por ativação de ovoperoxidase e subsequente

- 15 • preservação.

2 - Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por**

um tratamento exógeno de ovos ovulados usando peróxido de hidrogênio como a molécula de transdução notável.

20 3 - Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado por** um tratamento exógeno dos ovos ovulados usando cloreto de cálcio como a molécula de transdução de sinal.

25 4 - Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizado por** um tratamento exógeno dos ovos ovulados usando um banho de água que utiliza uma solução aquosa que tem uma adição de 0,01; 0,02; 0,05; ou 0,1% de peróxido de hidrogênio.

5 - Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** um tratamento exógeno dos ovos ovulados em um banho de água que usa uma solução aquosa que é dotada de uma adição de 0,01% de peróxido de hidrogênio durante 1 a 5 minutos, sendo o tempo de tratamento fixo como uma função do endurecimento desejado dos ovos ovulados tratados.

6 - Método, de acordo com uma das reivindicações 2 a 5, **caracterizado por** um tratamento exógeno dos ovos ovulados em um banho de água que usa uma solução aquosa dotada de uma adição de 115 mg/l, 123 mg/l, ou 130 mg/l de cloreto de cálcio.

7 - Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** um tratamento exógeno dos ovos ovulados em um banho de água que utiliza uma solução aquosa que tem uma adição de 115 mg/l de cloreto de cálcio de durante 10 a 20 minutos, sendo o tempo de tratamento fixado como uma função da dureza desejada dos ovos ovulados tratados.

8 - Método, de acordo com uma das reivindicações 4 a 7, **caracterizado por** um tratamento combinado dos ovos ovulados em um banho de água que utiliza uma solução aquosa que tem uma adição de peróxido de hidrogênio e cloreto de cálcio durante 1 a 20 minutos, sendo o tempo de tratamento fixado como uma função da dureza desejada dos ovos de ovulados tratados

9 - Método, de acordo com uma das reivindicações 1 por 8, **caracterizado pela** lavagem dos ovos

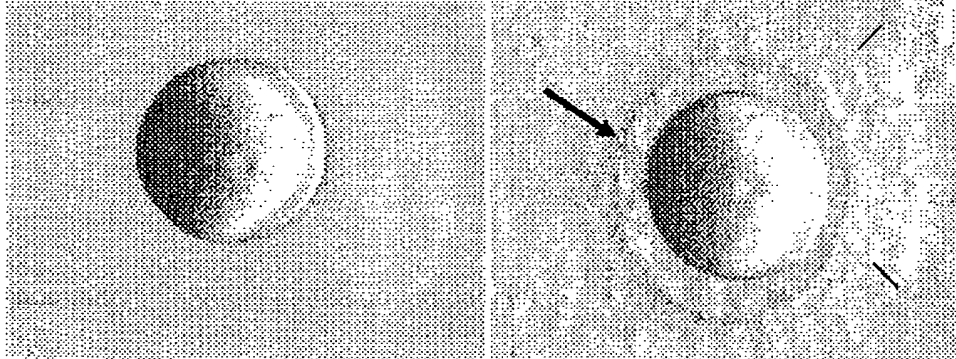
ovulados em solução de célula de cocção fisiológica sob condições estéreis antes do tratamento endógeno.

10 - Método, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado por** colher os ovos ovulados a partir de animais aquáticos vivos.

11 - Método, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado por** colher os ovos ovulados a partir de peixes naturais e de crustáceos.

12 - Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado por** que se colhem os ovos ovulados de esturjão como um peixe comestível para produzir caviar real.

13 - Ovos ovulados de animais aquáticos processados em iguarias finas utilizando-se o método de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizados por** uma pele externa extracelular endurecida que tem cordões de proteínas reticuladas e moléculas de tirosina incorporados irreversivelmente sem um estado de fertilização.



Técnica anterior

Fig.1

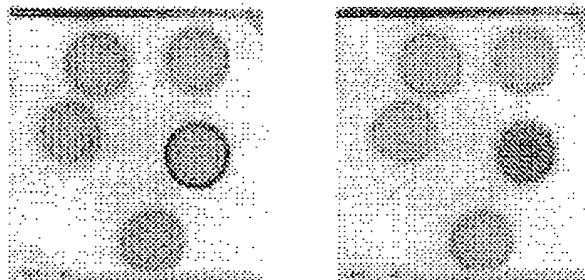
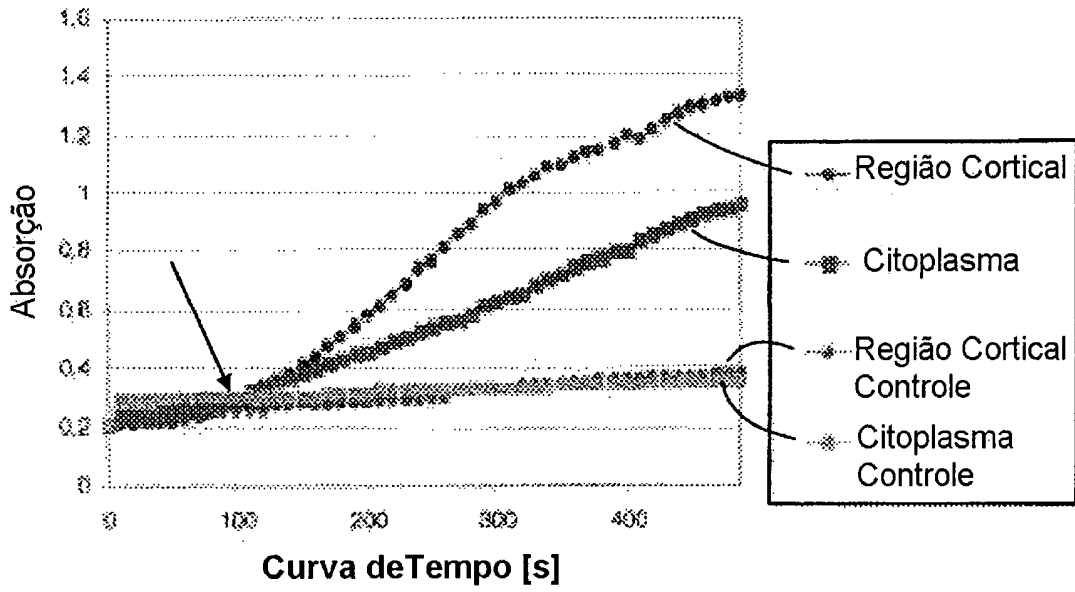


Fig.2

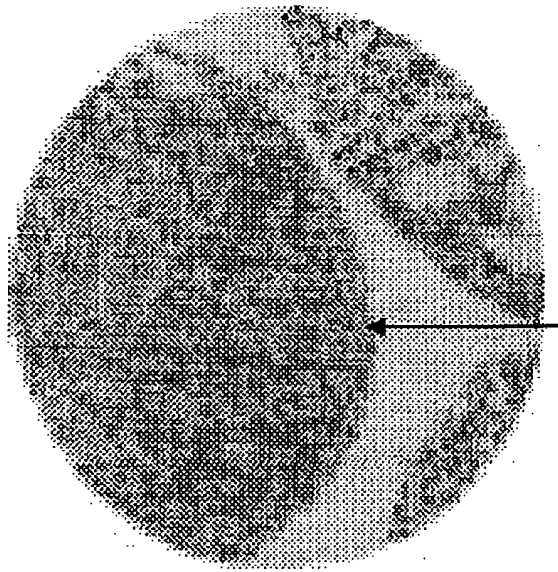


Fig.3a

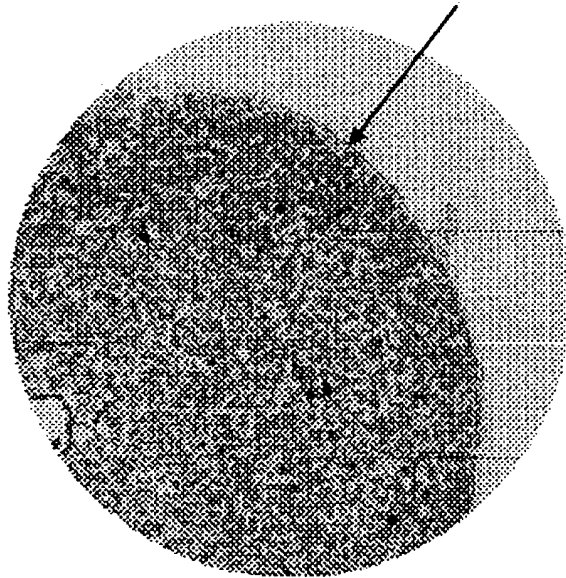


Fig.3b

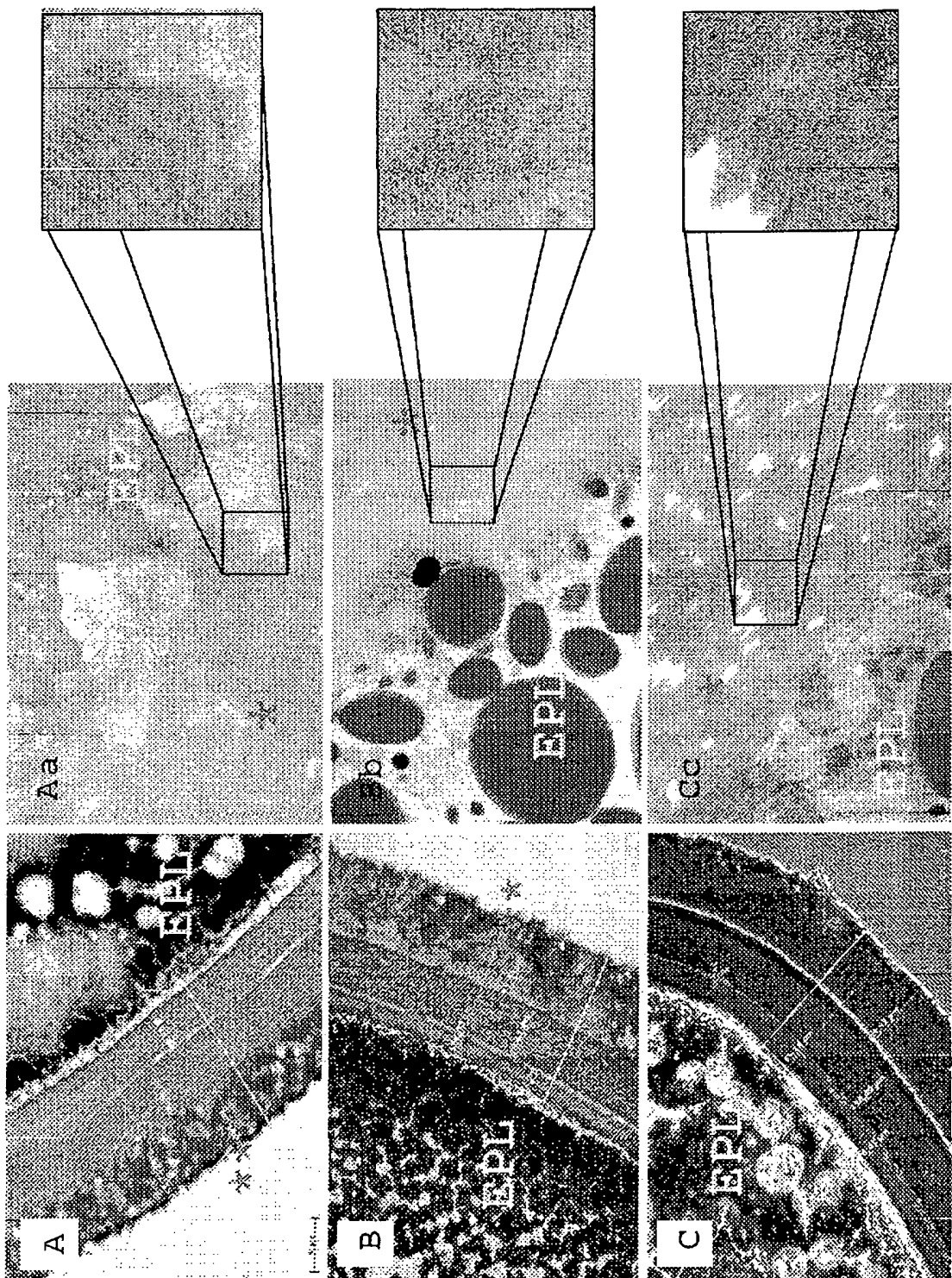


Fig.4

Proporção dos componentes da membrana na espessura total da membrana em %
em caviar depois de tratamento usando H₂O₂

Mediano; Caixa 25%-75%; Pelo: Min-Max

FM="Membrana de Fertilização", IM="Membrana Interna"

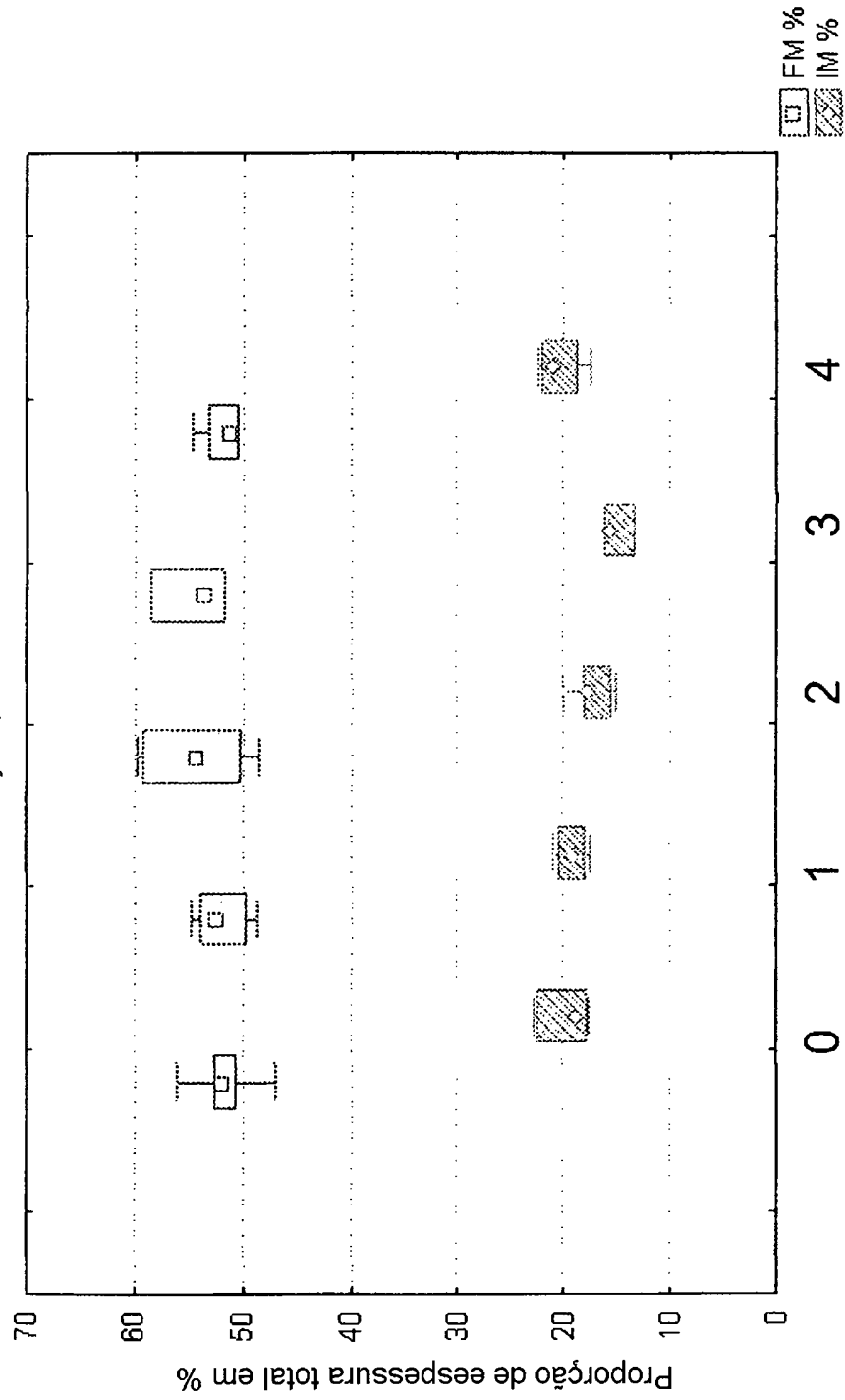
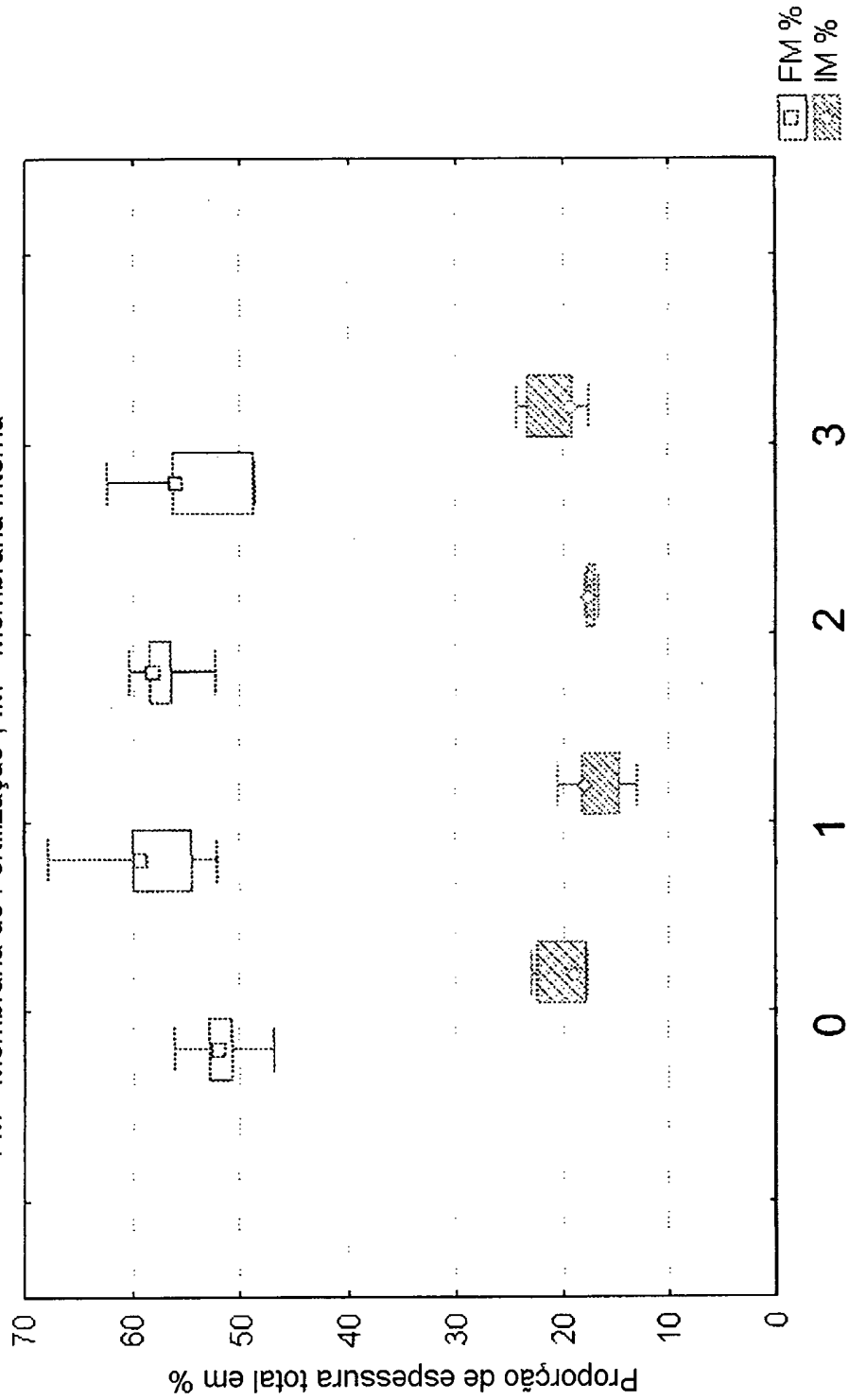


Fig.5A

0 = sem tratar, 1= 0,01%, 2= 0.02%, 3= 0,05%, 4= 0,1%

Proporção dos componentes de membrana na espessura total da membrana em %
 no caviar depois de tratamento usando CaCl_2
 Mediano; Caixa 25%-75%; Pelo: Min-Max

FM="Membrana de Fertilização", IM="Membrana Interna"

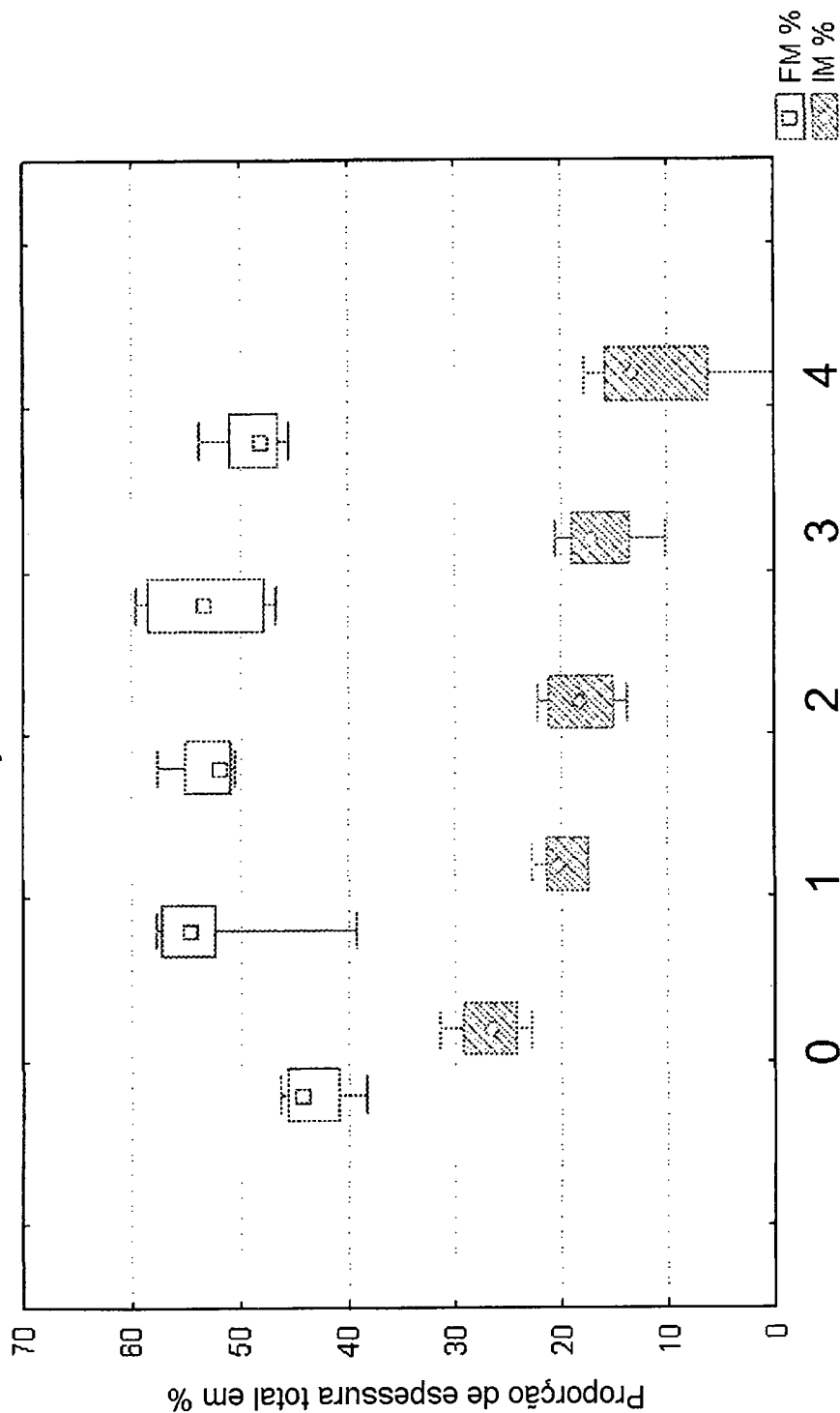


0= 0mg/L, 1= 115mg/L, 2= 123mg/L, 3= 130mg/L

Fig.5B

Proporção dos componentes da membrana na espessura total da membrana em %
em ovos ovulados depois de tratamento usando H₂O₂

Mediano; Caixa 25%-75%; Pelo: Min-Max
FM="Membrana de Fertilização, IM="Membrana Interna"



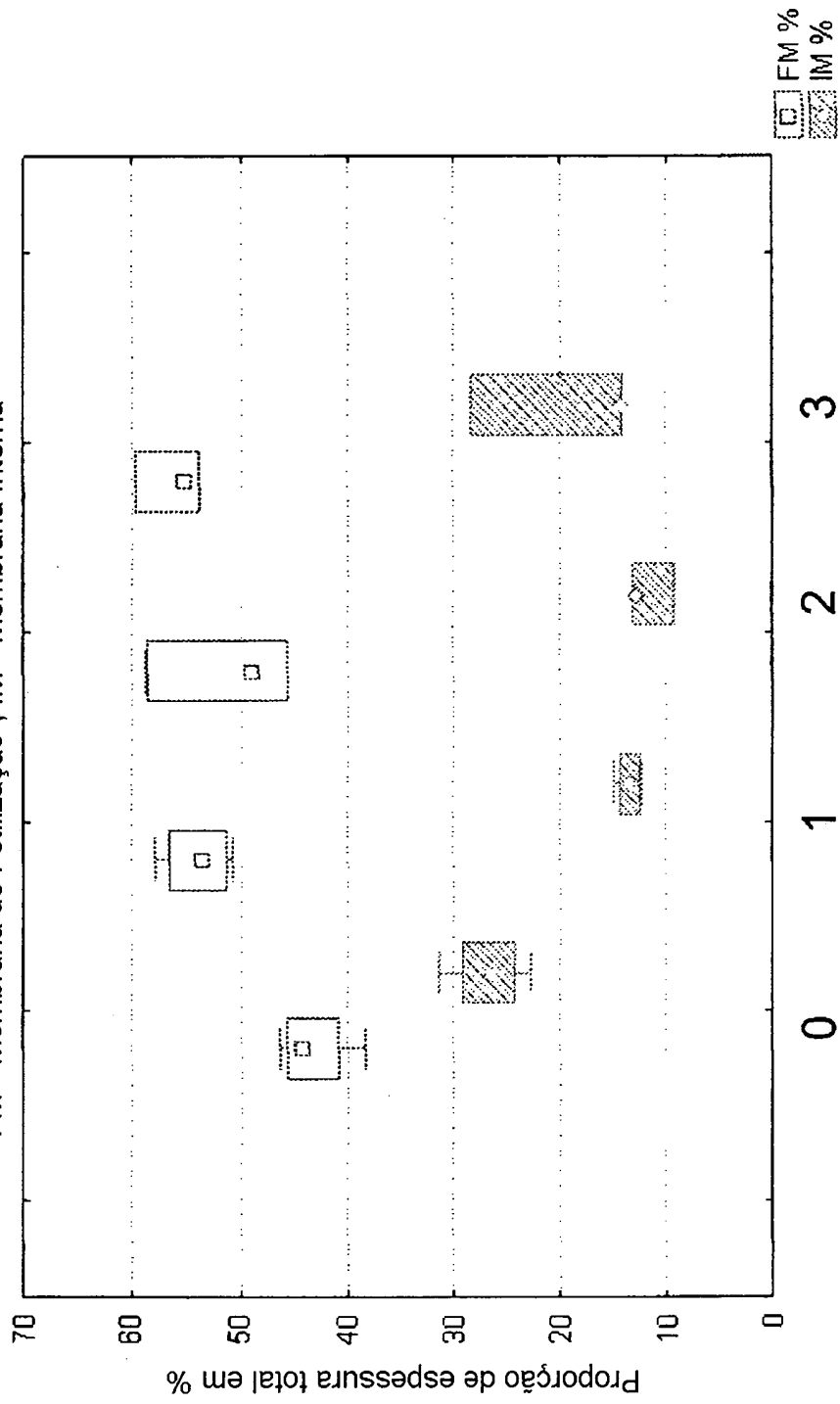
0 = sem tratar, 1 = 0,01%, 2 = 0,02%, 3 = 0,05%, 4 = 0,1%

Fig.5C

Proporção de componentes da membrana na espessura total da membrana em %
em ovos ovulados depois de tratamento usando CaCl_2

Mediano; Caixa 25%-75%; Pelo: Min-Max

FM="Membrana de Fertilização", IM="Membrana Interna"



0 = sem tratar, 1 = 115mg/L, 2 = 123mg/L, 3 = 130mg/L

Fig.5D

RESUMOMÉTODO PARA PREPARAR OS OVOS OVULADOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM IGUARIAS REFINADAS E OVOS OVULADOS PREPARADOS PELA UTILIZAÇÃO DO DITO MÉTODO

5 Problemas no armazenamento de caviar e outros produtos de ova de peixe são o crescimento de bactérias existentes e a cristalização de moléculas de tirosina. Um problema significativo é matar as fêmeas para obter caviar, porque até agora somente os ovos imaturos têm estabilidade suficiente para conservação e
10 armazenamento. No método de acordo com a presente invenção, os ovos recém colhidos são tratados exogenamente com uma molécula de transdução de sinal, por exemplo, peróxido de hidrogênio. A ovoperoxidase de enzima
15 é deste modo ativada, o que inicia a formação e endurecimento de uma película extracelular. O tratamento dos ovos ovulados por uma molécula que se apresenta naturalmente na célula do ovo e é de outro modo formada no metabolismo de célula normal a fim de prevenir polispermia facilita uma possibilidade de tratamento completamente a salvo - de acordo com os requisitos legais alimentares - que é geralmente reconhecido como seguro para endurecimento dos ovos ovulados. O grau de endurecimento pode ser ajustado pela duração do tratamento.
20 Os ovos endurecidos, cujo endurecimento artificial pode ser examinado por uma estrutura específica sob um microscópio eletrônico, podem ser mais bem preservados e armazenados. O método pode ser usado tanto para ovos

maduros quanto imaturos, já que o método também tem uma ação bacteriana, prevenindo uma cristalização de tirosina.