

Universidade Federal do Ceará
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Vegetal

*Uso de papaína bruta de mamão verde (Carica papaya L)
integral como amaciante de carne*

Alda Verônica Souza Livera

N.Cham. T 574.192 L761u

Autor: Livera, Alda Verônica Sousa.

Título: Uso da papaína bruta de mamão



1343904

Ac. 48087

BCT

FORTALEZA
2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA VEGETAL

*Uso de papaína bruta de mamão verde (*Carica papaya* L.) integral como
amaciante de carne*

ALDA VERÔNICA SOUZA LIVERA
Tese submetida à Coordenação da Pós-
Graduação em Bioquímica Vegetal,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor.



FORTALEZA
2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L761u Livera, Alda Verônica Souza.
 Uso de papaína bruta de mamão verde (*Carica papaya* L.) integral como amaciante de carne / Alda Verônica Souza Livera. – 2000.
 85 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2000.
 Orientação: Profa. Dra. Ana Cecília Goes Horta.
 Coorientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.
1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese será permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Alda Verônica Souza Livera

Dissertação aprovada em 28/03/2000, pela comissão examinadora:

Profa. Ana Cecília Goes Horta
Orientadora

Prof. Renato de Azevedo Moreira
Co-Orientador

Profa. Ana Lúcia Pontes Freitas
Examinadora

Profa. Nonete Barbosa Guerra
Examinadora

Profa. Francisca Martins Bion
Examinadora

*"Que importa que ao chegar eu nem pareça pássaro!
Que importa que ao chegar venha me rebentando, caindo aos
pedaços, sem prumo e sem beleza!
Fundamental é cumprir a missão e cumpri-la até o fim!..."*

Dom Helder Câmara

Apresentação

Este livro é dedicado a quem ama a literatura e a quem ama a vida. É uma homenagem a todos aqueles que, ao longo dos anos, me acompanharam em minhas viagens e em minhas pesquisas. É também uma homenagem a todos aqueles que, apesar das dificuldades, continuam a acreditar na importância da cultura e da arte para a sociedade. Este livro é dedicado a todos aqueles que, apesar das dificuldades, continuam a acreditar na importância da cultura e da arte para a sociedade.

*A Oscar meu grande companheiro.
A Pedro pela felicidade de sua existência.
A Arcanjo e Isabel por minha ausência.*

Agradecimentos

À **Profa. Ana Cecília Goes Horta** e ao **Prof. Renato de Azevedo Moreira**, pela orientação, confiança e apoio constantes.

À **Profa. Nonete Barbosa Guerra**, pelo estímulo e colaboração preciosos para realização deste trabalho.

À **Profa. Silvana Magalhães Salgado**, pelo apoio e auxílio nas determinações analíticas.

À **Profa. Zelyta Pinheiro de Faro**, pelo auxílio na elaboração do *abstract* e sugestões no trabalho.

A **Sandra Regina Maia**, pelo apoio e sugestões.

A **Paulo Roberto Salomão David**, pela colaboração na editoração de gráficos e figuras.

A **Norma Lúcia Marinho Antunes**, pelo apoio nos ensaios biológicos.

A **Sebastião Camilo de Melo Filho**, pela colaboração nas análises físico-químicas.

A **André Luís Coelho**, **Fábia Maria Barroso da Silva** e **Exedito Rogildo Cordeiro Carlos**, pela colaboração nos ensaios com eletroforese.

Ao **Sr. José Paulino Ventura Ramos**, pelo monitoramento dos animais utilizados neste trabalho.

Aos estagiários **Rosa Guerra**, **Márcia Ribeiro** e **George Cavalcante**, pela colaboração nos experimentos.

A amiga **Maria Lassaleth Moraes Araruna**, pelo apoio constante.

Aos **amigos** do LEAAL (Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos) do Departamento de Nutrição da UFPE, pelo carinho e estímulo.

Aos **professores e amigos** do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Vegetal da UFC.

Agradeço ainda aos órgãos e instituições apresentados a seguir, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao **LEAAL** (Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio técnico-financeiro.

Ao **Laboratório de Nutrição Experimental** do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pela realização dos ensaios biológicos.

Ao **Biotério de Criação** do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pelos animais utilizados nos ensaios biológicos.

Ao **Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados II** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pela realização de ensaios.

À **UECE** (Universidade Estadual do Ceará).

À **UFPE** (Universidade Federal de Pernambuco).

À **UFC** (Universidade Federal do Ceará).

À **FACEPE** (Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco).

À **FUNCAP** (Fundação Cearense de Apoio a Ciência e Tecnologia).

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

À **CAPES** (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Sumário

	pág.
<i>Lista de figuras</i>	ix
<i>Lista de tabelas</i>	x
<i>Lista de abreviaturas e definições</i>	xi
<i>Resumo</i>	xii
<i>Abstract</i>	xiii
1-Introdução	1
2-Revisão da literatura	4
2.1- Aspectos agronômicos do mamão	4
2.2- Papaína	6
2.3- Produção de papaína e similares	10
2.4- Aplicação industrial da papaína	12
2.5- Bioquímica da carne	15
2.6- Técnicas para amaciamento de carne	22
3-Objetivos	28
4-Material e métodos	29
4.1-Materiais	29
4.1.1- <u>Material vegetal</u>	29
4.1.2- <u>Embalagens</u>	29
4.1.3- <u>Carne bovina</u>	30
4.1.4- <u>Animais</u>	30
4.1.5- <u>Amaciante comercial</u>	30
4.1.6- <u>Dietas</u>	30
4.1.7- <u>Equipamentos e instalações</u>	30
4.1.8- <u>Reagentes</u>	32
4.2-Métodos	32
4.2.1- <u>Elaboração do amaciante</u>	32
4.2.2- <u>Estabelecimento das condições de secagem</u>	32

4.2.3- <u>Análise do produto</u>	34
4.2.4- <u>Elaboração das dietas</u>	34
4.2.5- <u>Determinações analíticas</u>	34
a) Proteína solúvel	34
b) Atividade enzimática	35
c) Frações protéicas	36
d) Teor de umidade	37
e) Teor de proteína	38
f) Teor de lipídios	38
g) Teor de cinzas	39
h) Teor de carboidratos	39
4.2.6- <u>Ensaio biológico</u>	39
a) DA (digestibilidade aparente)	40
b) CEA (coeficiente de eficiência alimentar)	40
c) CEP (coeficiente de eficiência protéica)	40
d) RPF (retenção protéica final)	41
4.2.7- <u>Análise sensorial</u>	41
4.2.8- <u>Estudo de vida útil</u>	42
4.2.9- <u>Análise estatística</u>	42
<i>5-Resultados e discussão</i>	44
5.1-Determinação do tempo de secagem	44
5.2-Obtenção do amaciante experimental	45
5.3-Atividade proteolítica do amaciante experimental	46
5.4-Ensaio biológico	50
5.5-Avaliação sensorial	53
<i>6-Resumo dos resultados</i>	59
<i>7-Conclusões</i>	60
<i>8-Referências bibliográficas</i>	61

Lista de figuras

	Pág.
FIGURA 1 - Estrutura tridimensional da papaína	8
FIGURA 2 - Estrutura do tecido muscular	19
FIGURA 3 - Fluxograma de elaboração de amaciante de carne à base de mamão verde integral	33
FIGURA 4 - Ficha de análise sensorial	43
FIGURA 5 - Curva de secagem do amaciante à base de mamão verde integral	44
FIGURA 6 - Vida útil do amaciante de carne à base de mamão verde integral	47
FIGURA 7 - Bandas protéicas dos amaciantes e de carnes amaciadas analisadas por SDS-PAGE	49
FIGURA 8 - Ganho de peso de ratos alimentados com carne bovina (chã-de-fora) tratada com diferentes amaciantes	50
FIGURA 9- Qualidade sensorial da carne bovina (bifes de chã de fora) tratada com diferentes amaciantes	55
FIGURA 10- Preferência de textura em bifes de chã de fora tratados com amaciante teste	55
FIGURA 11- Preferência de cor e "flavor" em bifes de chã de tratados com diferentes amaciantes	56
FIGURA 12- Preferência de textura em bifes de chã de fora tratados com diferentes amaciantes	56
FIGURA 13- Preferência de cor e "flavor" em bifes de chã de fora tratados com amaciante comercial	56

Lista de tabelas

	Pág.
TABELA I - Comparação das estruturas primárias de cisteínas proteínas vegetais e animais	7
TABELA II - Derivados do trigo x tipo de farinha desejado	14
TABELA III - Proteínas miofibrilares do músculo esquelético	21
TABELA IV - Relação temperatura x tempo para maturação da carne bovina	23
TABELA V - Composição das dietas	31
TABELA VI - Teor de umidade e rendimento médio da produção de amaciante de carne à base de mamão verde integral	46
TABELA VII - Atividade proteolítica dos amaciantes	47
TABELA VIII - Valor biológico da carne bovina (bifes de chã de fora) tratada com diferentes amaciantes	50
TABELA IX - Análise sensorial da carne bovina (bifes de chã de fora) tratada com diferentes amaciantes.	53

Lista de abreviaturas e definições

- AC- Amaciante comercial
- AE- Amaciante experimental
- AIN-93G- Dieta estabelecida pelo American Institute of Nutrition Rodents para ratos em fase de gestação, lactação e crescimento.
- AS- Sem amaciante
- CEA- Coeficiente de eficácia alimentar
- CEP- Coeficiente de eficácia protéica
- DA- Digestibilidade aparente
- EB- Extrato bruto
- EC- Código internacional da enzima
- EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético
- HPLC- Cromatografia líquida de alta performance
- IgE- Imunoglobulina E
- N- Nitrogênio
- NDPCal%- Calorias líquidas das proteínas dietéticas em percentual
- NPU- Utilização protéica líquida
- PPO- Polifenoloxidase
- RPF- Retenção protéica final
- SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
- TCA- Ácido tricloroacético
- VCT- Valor calórico total
- VFC- Resfriamento muito rápido

Resumo

Considerando o alto desperdício da produção de mamão, bem como o seu valor econômico, este trabalho teve como objetivo elaborar um amaciante de carnes à base de mamão verde integral. O amaciante foi produzido a partir de mamões verdes (*Carica papaya* L.), obedecendo as seguintes etapas: coleta e transporte dos frutos, lavagem e sanitização, pesagem, eliminação de resíduos, trituração, secagem, pulverização, pesagem e acondicionamento. Foi avaliado o seu efeito sobre o valor biológico da carne bovina, bem como sua estabilidade e aceitabilidade. As análises aplicadas ao produto foram físico-químicas (rendimento, umidade, atividade enzimática, proteína solúvel), biológicas (DA, CEA, CEP e RPF) e sensoriais (escala hedônica para textura, cor e flavor), utilizando como controle amaciante comercial à base de papaína. Com uma temperatura de 55°C, o melhor tempo de secagem para obtenção do amaciante foi 22 h. Com rendimento de 8,06%, o produto final apresentou 11,46% de umidade e atividade enzimática similar a encontrada para o amaciante comercial. Durante o armazenamento, houve um declínio da atividade enzimática de 27,44% e 56,10%, aos 90 e 120 dias respectivamente. Em valores absolutos, a carne tratada com o amaciante experimental apresentou melhor textura, cor e flavor que as demais. Quanto a interferência do amaciante sobre o valor biológico da carne os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos empregados. Os resultados indicam a viabilidade de fabricação do amaciante à base de mamão verde integral, cuja ação sobre a carne resulta em melhor aceitabilidade, sem comprometer o seu valor biológico.

Abstract

Considering the high waste of papaya crop, and also its economic value this paper aimed to elaborate a meat smoother, from immature papaya (*Carica papaya* L.). The product was obtained according to this sequence of operations: harvesting, transport of fruits, washing and sanitization, weighting, waste discard, trituration, drying, pulverization, weighting and packing. The effects of the product on meat nutritive value, and also its stability and acceptability were evaluated. The product was analysed according to physicochemical determinations (humidity, yield, enzymatic activity, soluble protein), biologicals (DA, CEA, CEP, RPF) and sensorials (hedonic scale to texture color and flavor) using a commercial tenderizer based on papain as reference. At 55°C the best drying results were obtained after 22 h. The final product presented an income of 8.06%, with 11,46% of humidity, and enzymatic activity similar to reference. During storage occurred a decrease on enzymatic activity of 27,44% and of 56,10%, at 90 and 120 days respectively. Meat treated with the experimental smoother presented better texture, color and flavor than the others. Considering the effect of the papaya tenderizer on biologic value of meat the results showed no significative differences between the treatments. The results indicate the viability of the immature papaya smoother whose action on meat results in better acceptability without damage on its biologic value.

1-Introdução

O mamão (*Carica papaya*), tendo sido encontrado aqui pelos portugueses, é possivelmente originário da América, onde também são registradas outras espécies, tais como *C. candamarensis*, *C. pentagonia* e *C. peltata*. Tem uma produção amplamente difundida, devido principalmente ao interesse pelo fruto e pela obtenção da papaína (FAO, 1990). O Brasil é responsável por 35,4% da produção mundial, estando também entre os maiores exportadores, ao lado de países como o México, Malásia, com 5.693 toneladas e 4,7 milhões de dólares em 1996 (FAO, 1998; SILVA, 1998).

Estima-se uma perda mundial superior a 40% da safra, variando em diferentes países (KAYS, 1991), sendo mais crítica em regiões não desenvolvidas, a exemplo da Zona da Mata de Pernambuco, na qual os frutos disponíveis são de qualidade insatisfatória, em decorrência da ausência de tecnologias adequadas para cultivo e de práticas pós-colheita. Dados do IBGE (1996) confirmam este quadro para 1995, ao informarem que a produção agrícola brasileira foi de 1.224.407 mil frutos, numa área destinada a colheita de 34.128 ha, gerando um rendimento médio de 37.186 frutos/ha. Ao considerar a Região Nordeste, esta produtividade cai para 32.309 frutos/ha, atingindo níveis muito baixos no Estado de Pernambuco, 9.737 frutos/ha.

A produção agrícola da Região é destinada basicamente ao comércio dos frutos "in natura", o que contribui para um maior desperdício. O emprego do mamão como matéria-prima para suco, doce, néctar, compota, entre outros, é restrito a estabelecimentos cuja tecnologia empregada é de pequena escala e, conseqüentemente, de pouco significado econômico. A produção de papaína, cujo comércio é mais rentável, inexistente, possivelmente por requerer um aparato industrial e melhores técnicas de manejo para obtenção tradicional, na forma semi ou purificada.

Mundialmente, apenas cerca de vinte enzimas são comercializadas para fins industriais, em volume significativo. Há registros de que 59% das enzimas empregadas na indústria são proteases, das quais 31% são proteases alcalinas, onde se insere a papaína. Valores mais exatos são de difícil análise, pois sob a denominação de enzimas

se comercializa enzima purificada, parcialmente purificada, extrato bruto e inclusive, substratos fermentados. A papaína, disponível no mercado desde a década de 50, tem sua produção estimada em cem toneladas anuais (WISEMAN, 1991).

Há uma grande demanda por papaína, em função de sua vasta aplicabilidade e pela segurança de manuseio e custo, quando comparada a outras proteases como a ficina e a bromelina (BROCKLEHURST *et al.*, 1981; POUTER e CAYGILL, 1985; TUCKER e WOODS, 1995; ETEHERINGTON e BARDSLEY, 1995; BOM, 1997). No que diz respeito à segurança, é importante ressaltar casos individuais de alergia a essa protease, que restringem sua manipulação e consumo (BUSH e HEFLE, 1996; DIEZ-GOMEZ *et al.*, 1999). Na indústria farmacêutica é clássico o seu emprego como digestivo para pacientes com enfermidade gástrica ou pancreática. Registra-se também a papaína como base de cosméticos destinados a limpeza e tratamento de pele. Na produção de ração animal, tendo como matéria-prima concentrados protéicos, aplica-se a protease para aumento do índice de nitrogênio. Entretanto, o seu maior uso refere-se a indústria de alimentos e bebidas. Por exemplo, na elaboração de pães e outros derivados do trigo, utiliza-se papaína: quando a hidrólise parcial do glúten é desejada para obtenção de maior extensibilidade e elasticidade da massa; para potencializar a atividade da maltose e favorecer o trabalho mecânico (POULTER e CAYGILL, 1985; FAO, 1990; FENNEMA, 1992). Em bebidas, principalmente cerveja, o emprego da papaína evita a turbidez causada pelo frio, resultante da complexação polifenol/proteína. Sua aplicação também é desejável para melhorar a extração de óleos e proteínas animais ou vegetais (ETEHERINGTON e BARDSLEY, 1995).

Seu maior mercado é o de amaciamento de carne bovina, prática bastante antiga. O primeiro registro sobre o uso de papaína em tecnologia de alimentos na América é um relato do navegador Hernán Cortéz, que se refere ao fato de índios mexicanos envolverem a carne com folhas de mamoeiro durante a noite para o consumo no dia seguinte (HEBBEL e MONTI, 1982). A textura (maciez/dureza) é citada na literatura como o fator que mais contribui para a aceitação dos diferentes tipos de carne pelos consumidores. Dentre os diversos fatores que podem influenciar esta característica, destacam-se os genético, idade, peso, tipo de músculo, condições de pré-preparo e método de cocção (CASEI, 1992; RISVIK, 1994).

O rebanho bovino brasileiro, predominantemente de Nelore, apresenta diferenças marcantes em comparação com outras raças, destacando-se idade do abate e gordura de cobertura da carcaça, que interferem na maciez da carne. O sistema extensivo de criação e engorda, também concorre para aumentar a idade de abate do animal, chegando a dobrar em relação a outros países, como os Estados Unidos da América. Outro fato relevante é que muitos frigoríficos não utilizam práticas pós-morte, a exemplo da maturação. Como consequência, boa parte da carne produzida no país é de qualidade inferior (TAKAHASHI, 1991).

Além do uso tradicional de frutos e folhas ricos em enzimas proteolíticas, a exemplo do mamão, abacaxi e figo, atualmente são empregadas proteases comerciais para amaciante de carne em escala industrial e doméstica. O mercado dispõe de produtos formulados principalmente à base de papaína, incluindo sal e outros condimentos, que atuam eficientemente na textura, mas possuem componentes de "flavor" muitas vezes indesejáveis por serem distintos do hábito local.

Neste contexto, a produção de um amaciante de carne, utilizando o mamão verde integral como matéria-prima, constitui-se uma alternativa viável do ponto de vista tecnológico, econômico e de incentivo à produção regional.

2-Revisão da literatura

2.1- Aspectos agronômicos do mamão

O mamão (*Carica papaya* L) pertence a família *Caricaceae*, que possui quatro gêneros e trinta e uma espécies, dentre elas *C. pubescens*, *C. manioica*, *C. stipulata*. É uma planta perene de curto intervalo de vida. O fruto, tipicamente climatérico, apresenta crescimento sigmóide duplo. Sua forma típica varia de ovalar a arredondada, com casca delgada e polpa branda e succulenta, com coloração também variável, do amarelo pálido ao vermelho. O centro do fruto é oco e apresenta sementes negras. O número de sementes por frutos depende da variedade, podendo apresentar desde poucas sementes a mais de mil unidades. Em sua anatomia, verifica-se por microscopia a presença de dutos lactíferos no pericarpo. O peso do fruto pode ser inferior a 500g ou maior que 2000g, seu sabor também não é uniforme, dependendo da variedade do *C. papaya* analisada (POULTER e CAYGILL, 1985; FAO, 1990; SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993).

A porção comestível, correspondente à polpa, é constituída basicamente por água (88,8%) e açúcares livres (12,2%) com teor de amido insignificante. Muitas variedades são boas fontes de provitamina A (10,93 µg) e ácido ascórbico (84,00 mg) (FAO, 1990).

O mamoeiro floresce e frutifica em nove meses nos trópicos. Nesta espécie, existem três formas sexuais de plantas, pistiladas, estaminadas e andromonóicas. Os indivíduos pistilados e estaminados não respondem a mudanças climáticas, como resultado apenas os andromonóicos, sexualmente ambivalentes, formam flores femininas, masculinas e hermafroditas, em diferentes proporções, segundo a estação climática. A variação sexual descrita, somada à capacidade de formar híbridos com outras espécies permite a geração de novas combinações e aumenta as variedades (VEGA, 1992).

As variedades de *C. papaya* mais cultivadas pertencem aos grupos Solo e Formosa. Do primeiro grupo fazem parte as cultivares Sunrise Solo e Improved Sunrise Solo line 72-12, do segundo destacam-se as cultivares Tainung 1 e Tainung 2. A cultivar Sunrise Solo também é conhecida como Havaí ou Papaya, com uma produtividade de 40 t/ha é a mais plantada no Brasil, pela preferência local e de mercado internacional, considerando o tamanho médio de seu fruto (500 g). A cultivar Tainung 1 conhecida como Formosa se caracteriza por frutos com maior tamanho (1000 g) e sua produtividade é de 60 t/ha. Dados do IBGE (1998) demonstram que os maiores produtores do país são a Bahia, com 714.266 frutos em uma área plantada de 21.408 ha, seguido do Espírito Santo, com 352.095 frutos em 5.259 ha, e do Pará, com 62.723 frutos em 1.602 ha.

Uma alta produtividade é possível quando cultivo do mamão ocorre em regiões tropicais com índice pluviométrico mínimo de 1200 mm/ano e temperaturas diurnas entre 21 e 33°C. Em situações de temperatura mais elevada e solos arenosos o requerimento de água é de 2000 mm/ano, sendo recomendável a irrigação. (Poulter e Caygill, 1985; Seymour, Taylor e Tucker, 1993).

Em regiões africanas próximas ao Equador, verificou-se que altitudes acima de 1000 m são mais favoráveis ao cultivo de mamão destinado à obtenção de látex. O tipo de cultivar também influencia no volume de produção do látex, sendo a variedade Solo a mais adequada nestas condições (POULTER e CAYGILL, 1985).

Segundo Carvalho (1976), os mamoeiros hermafroditas e os femininos têm maior produtividade de látex que as plantas com flores unicamente masculinas. Este autor ressalta que, podendo ser obtido de folha, pecíolo, caule e fruto, o látex é mais abundante neste último, principalmente quando imaturo. Com o amadurecimento do fruto, declina a atividade proteolítica e os dutos lactíferos se esgotam. Poulter e Caygill (1985) citam que as melhores variedades para coleta de látex são a Red Panamá, Florida, Richbourg e Ineac 329. Entretanto o cultivo predominante da variedade Solo se justifica pela produção do fruto destinado ao comércio "in natura". Este autor ressalta ainda que a literatura disponível reporta o peso do látex colhido, sem considerar o teor de enzima.

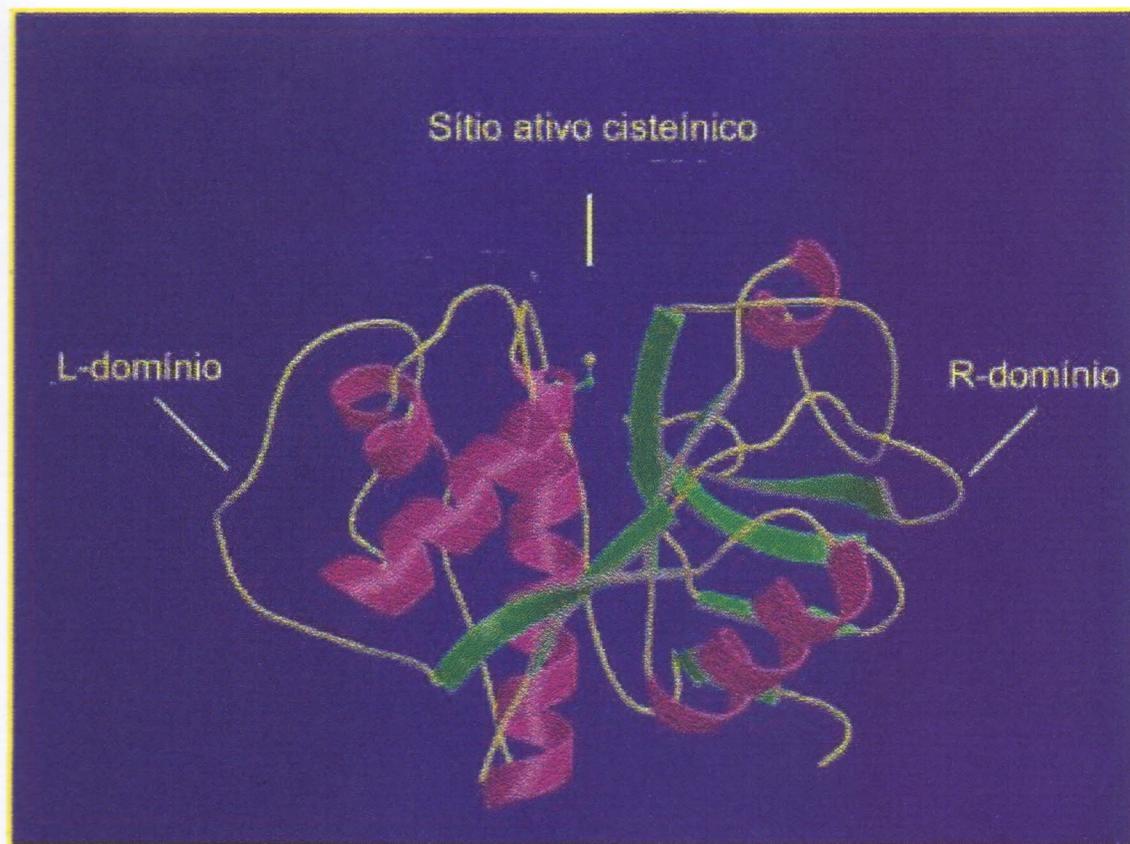
Quando o plantio do mamão se destina à coleta de látex, o controle de enfermidades (em geral causadas por nematóides, vírus e fungos) deve ser muito cauteloso para evitar, por exemplo, a contaminação do produto com fungicidas (POULTER e CAYGILL, 1985).

2.2- Papaína

Papaína é o nome genérico comercial atribuído ao conjunto de proteases brutas contidas no látex do mamão. Este conjunto compreende enzimas proteolíticas básicas cisteínicas termoestáveis: a papaína propriamente dita, EC 3.4.22.2, as quimopapainas A e B, EC 3.4.22.6, a caricaína - anteriormente conhecida como papaia proteinase Ω (III)- e a papaia proteinase IV, todas com pI superior a 8,75. No látex também são encontradas outras enzimas como a celulase, EC 3.2.1.4, lisozima, EC 3.2.1.17 e glutamina ciclotransferase (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993).

Dentre as enzimas citadas, a papaína é a mais estudada, em função de sua aplicação industrial, estabilidade e facilidade de extração. Sua cadeia polipeptídica possui 212 resíduos de aminoácidos (Tabela I) e o seu peso molecular é de 23,35 kDa.

Disponível comercialmente desde os anos 50, em 1966, a papaína foi a segunda enzima a ter sua estrutura tridimensional determinada por difração de raio-X (DRENTH, JANSONIUS e WOLTHERS, 1967). O resíduo essencial é a cisteína 25, formando pontes dissulfeto com outras seis cisteínas. No outro lado do sítio ativo de cisteína, estão presentes a serina e o triptófano. Na quimiopapaína, esta serina é substituída por glutamina. Em ambas enzimas, são encontradas asparagina e alanina próximas ao resíduo de histidina (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993). A histidina 159 forma o par tiolatoimidazol com a cisteína 25, o que facilita a interação enzima substrato. Esta estrutura de sítio catalítico (Figura 1) é similar para todas as cisteínas proteinases, inclusive catepsinas de mamíferos. A identidade da papaína com a catepsina S bovina é de 41% (WIEDERANDERS *et al*, 1991).



Fonte: Prolysis, 2000.

FIGURA 1 - Estrutura tridimensional da papaína (EC 3.4.22.2).

Segundo Butle *et al.* (1989), a papaia proteinase IV corresponde a aproximadamente 30% das proteínas do látex obtido em "spray dryer" e apresenta-se imunologicamente distinta das outras três proteases do mamão. Esta enzima exibe também propriedades distintas, mostra, por exemplo, atividade frente a substratos protéicos na presença de tiol. Entretanto a hidrólise da caseína é limitada, resultando em diferentes peptídios quando comparada a papaína. Outra diferença é observada quando sua ação não é inibida pelo emprego da cistatina de galinha, inibidor clássico de proteinases cisteínicas. Sua seqüência de aminoácidos mostra um elevado grau de identidade com a caricapapaína (81%), quimopapaína (70%) e papaína (67%), contudo, verifica-se a substituição de alguns resíduos conservados nas outras cisteínas proteinases. Estas substituições podem justificar a distinta especificidade da papaia proteinase IV (RITONJA *et al.*, 1989).

Nessas proteases o resíduo de cisteína 25 é facilmente oxidado, resultando em inibição da atividade enzimática. Esta situação é rapidamente revertida com a formação de ponte dissulfeto, por adição de tiol ou outro agente redutor com potencial redox mais negativo, a exemplo do ascorbato (ETEHERINGTON E BARDSLEY, 1995).

No próprio látex há presença de um peptídeo de baixo peso molecular, o inibidor de papaína, que se conjuga mais fortemente em pH superior a 5,5, que é o da polpa de algumas cultivares (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993). Usualmente a inibição dessa protease ocorre por exposição ao ar e a metais pesados (cobre, ferro etc), que atuam sobre o grupo sulfidril do sítio ativo, bem como por fotoxidação do triptófano através da luz ultravioleta (POUTER e CAYGILL, 1985).

Durante o armazenamento do látex desidratado, adição de açúcares, particularmente sacarose, NaCl e de anti-coagulante reduz a atividade proteolítica, em decorrência da mudança de pH. Por outro lado, na presença de tetrionato de sódio, ascorbato, EDTA e bissulfito de sódio a atividade proteolítica é preservada (ORTIZ *et al.*, 1980; ESPIN E ISLAN, 1996).

A procaricapaina é a forma de expressão natural da caricapaina. Este zimógeno possui uma pró-região inibitória representada pela adição de um aminoácido 106 N-terminal. A pró-região forma um domínio globular que se liga ao domínio C-terminal da caricapaina madura. Contém ainda, uma cadeia polipeptídica linear que ocupa a região de encaixe do substrato e está conectada ao N-terminal da caricapaina. A ativação da enzima requer, portanto, a dissociação do pró-domínio e clivagem da cadeia polipeptídica linear da pró-região (GROVES *et al.*, 1996).

Outras espécies de *Carica* também possuem proteases. Por exemplo, Baeza, Correa e Salas (1990) obtiveram látex *C. cadamarcensis* L com elevada atividade proteolítica, porem capaz de causar inflamações na cavidade oral quando consumido. Por eletroforese em gel de poliacrilamida, visualizaram duas bandas principais com mobilidade distinta das encontradas para as enzimas do *C. papaya*.

O papel dessas proteases no fruto não está completamente elucidado. Sugere-se uma ação contra insetos e fungos, tomando como exemplo o fato do suco digestivo de insetos predadores poderem converter a propapaína em enzima ativa. (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993).

2.3- Produção de papaína e similares

No processo empregado para obtenção de papaína, a coleta do látex é efetuada por incisões longitudinais, inferiores a 3 mm de profundidade, de forma a não causar sua contaminação pelo suco do fruto, nem modificações no sabor da polpa. Para facilitar o escoamento do látex, esta atividade é exercida em horários com temperatura mais amena, uma vez que a velocidade de solidificação do látex é dependente da temperatura (POULTER e CAYGILL, 1985).

O padrão de sangria é bastante variável por sofrer influência de diversos fatores como as condições climáticas, idade da planta, tamanho e grau de maturação do fruto etc. Madrigal *et al.* (1980) realizaram uma investigação detalhada sobre este tema e concluíram como adequada a realização de três incisões por fruto imaturo, com quatro dias de intervalo entre as coletas. Afirmam ainda que a sangria de frutos jovens pode não ser recomendada quando o mamão também é comercialmente importante, pois esta prática acelera o amadurecimento e reduz a produção de frutos.

Burdick (1957) propôs um método interessante para produção de papaína, que não tem sido adotado. Consiste na plantação de alta densidade de mamoeiros, 100.000 pés/ha, com crescimento até 1 m de altura. As plantas são colhidas por corte acima do nível do solo, podendo ser regeneradas ou haver um novo plantio. O material é picado e prensado para obtenção da enzima.

O látex coletado deve ser rapidamente processado, pois o contato prolongado com o ar afeta sua vida útil. Ele é filtrado como tal ou dissolvido em água, adicionado ou não de estabilizante, por exemplo metabissulfito de sódio. Em seguida é desidratado entre 50 e 55°C, geralmente em secadores de cabine. Há grande perda de atividade

proteolítica, escurecimento e crescimento microbiano em látex seco sob o sol. A secagem por "spray-dryied" é mais utilizada para látex parcialmente purificado e a liofilização para enzima pura. O isolamento e purificação das enzimas do látex é feito por centrifugação, filtração em solução aquosa ou água/glicerol, e principalmente, por precipitação com sais ou etanol (ORTIZ *et al.*, 1980; POULTER e CAYGILL, 1985, ESPIN e ISLAM, 1996).

A papaína deve ser acondicionada e armazenada de forma a garantir baixas temperaturas, ausência de luz, de ar e de umidade. Temperaturas de 25 a 37°C reduzem a atividade proteolítica em 16% (DHAWALIKAR e PANDIT, 1982).

A biotecnologia vem sendo empregada na obtenção de papaína. A enzima produzida por transferência genética para *Escherichia coli* é imunologicamente reconhecida como papaína, com pró-regiões recombinantes apresentando cerca de 73% de identidade seqüencial (COHEN, FLUHARTY e DIHEL, 1990; TAYLOR *et al.*, 1995).

Hebbel e Monti (1982), listam recomendações para o trabalho com microrganismos, destacando-se entre elas algumas orientações no intuito de evitar produção de esporos ou metabólitos indesejáveis: as enzimas devem ser oriundas de microrganismos não patógenos ao homem e aos animais; deve se assegurar de estudos sobre toxicidade, ação carcinogênica, teratogênica e mutagênica; a introdução de novas variedades de cultivo deve seguir normas similares às exigidas para admissão de novos medicamentos; os cultivos devem ser isentos de antibióticos com ação terapêutica.

Uma outra protease vegetal é a ficina, obtida de diferentes espécies do gênero *Ficus*, a partir de frutos verdes. A bromelina também bastante conhecida, provem da polpa e do caule do abacaxi - *Ananas comosus*. Ambas exigem cuidados similares ao processamento de papaína. A literatura cita outras proteases, como a actinidina do kiwi, a pinguinaína da bromélia pinguim, proteinases da pera, proteinases do gravatá (MELO, 1980; LEWIS e LUH, 1988; ROWAN, BUTTLE e BARRETT, 1990; ROMANELLI, TORRES-QUEIROZ e CERON, 1994).

Também são obtidas proteases de tecidos animais, como a quimotripsina e a tripsina, e de microorganismos, dentre eles *Aspergillus*, *Mucor* e *Bacillus*. São extraídas por ruptura dos tecidos, utilizando métodos químicos: álcalis, detergentes, choque osmótico, EDTA combinado a lisozima etc. Pode se optar pelo emprego de métodos físicos tais como choque térmico, sonicação, trituração ou agitação com abrasivos (WISEMAN, 1991).

Para o isolamento e purificação dessas enzimas diferentes métodos podem ser utilizados: concentração por precipitação, ultrafiltração ou liofilização; cromatografia de filtração em gel, troca iônica, afinidade e interação hidrofóbica; HPLC; eletroforese; cromatofocalização etc. (WISEMAN, 1991).

2.4- Aplicação industrial da papaína

As enzimas são consumidas diariamente como constituintes naturais de alimentos frescos e fermentados. Embora muitos trabalhos tenham sido realizados sobre o tema, a sua presença como ingrediente intencional ou coadjuvante de processos industriais ainda é limitada e deve cumprir as exigências de inocuidade e pureza requeridas pela FAO/OMS, principalmente quando disponível na forma de pó concentrado.

Por serem proteínas, podem desencadear respostas imunológicas indesejáveis, cujo risco é maior para manipuladores, que trabalham com concentrados enzimáticos, do que para o consumidor final (HEBBEL e MONTI, 1982, TUCKER e WOODS, 1995). Há registros de asma ocupacional em trabalhadores da indústria de papaína e casos individuais de alergia ao mamão e à carne amaciada, confirmados pela sensibilidade mediada por IgE (BUSH e HEFLE, 1996).

O aspecto toxicológico se torna relevante quando são utilizadas enzimas microbianas. A obtenção de enzimas exige tratamentos térmicos suaves para manutenção de sua atividade, portanto, as temperaturas empregadas não são suficientes para destruição de toxinas formadas naturalmente durante o cultivo dos microrganismo

ou por contaminação com patógenos (HEBBEL e MONTI, 1982, TUCKER e WOODS, 1995).

Um outro risco advém da possibilidade da enzima permanecer ativa no trato gastrointestinal humano, promovendo danos. A este respeito, excetuando-se a atividade residual de proteases bacterianas em alimentos assados ao forno e da papaína na cerveja, não há evidências significativas para as demais enzimas adicionadas aos alimentos (HEBBEL e MONTI, 1982, TUCKER e WOODS, 1995).

O desenvolvimento tecnológico permitiu aumentar a produção de enzimas e conseqüentemente, tornar o seu preço mais atrativo para a indústria. Os benefícios comerciais, advindos do seu emprego, podem ser resultantes de uma maior padronização do processo, melhoria na conversão da matéria prima, benefícios ambientais, entre outros. Dentre as vantagens tecnológicas tem-se a qualidade do produto, superior ao tradicionalmente elaborado, agilidade do processamento, geração de novos produtos e ampliação da oferta daqueles de reduzida obtenção natural.

Na produção de alimentos derivados do trigo, o uso dessa enzima se relaciona, sobretudo, com a adequação da qualidade da farinha disponível ao produto desejado (Tabela II). A proteólise interfere nas propriedades reológicas do glúten- polímero formado basicamente por glutenina e gliadina - apresentando uma relação direta com o binômio concentração/tempo. As principais mudanças se manifestam sobre a viscoelasticidade, capacidade de retenção de gases e propriedades térmicas. O emprego desta enzima deve ser muito bem controlado para evitar lise excessiva. Sua ação é mais severa que a da bromelina e da ficina, logo o seu uso é mais seguro na elaboração de wafers, bolos e crackers. Entretanto, sua atividade pode ser limitada pela presença de concentrações significativas de inibidor de papaína em algumas farinhas (HAMER, 1995).

Não obstante, os benéficos efeitos da adição dessa enzima a cervejas, promovendo a redução da relação açúcares fermentáveis/ nitrogênio total, resultando em cervejas de boa qualidade e excelente propriedade espumante (CARRILLO E LOPEZ, 1996) e evitando a complexação polifenol/carboidrato/ proteína, indesejável por se

manifestar como turbidez da refrigeração (ETEHERINGTON e BARDSLEY, 1995), a sua aplicabilidade nesta área industrial é discutível face aos registros de atividade proteolítica no produto final (HEBBEL e MONTI, 1982).

Tabela II - Derivados do trigo x tipo de farinha desejado.

PRODUTO	PROTEÍNA NA FARINHA (%)	QUALIDADE DA FARINHA
Pão branco	11-12	Meio forte
Pão integral	14-16	Forte
Biscoito	8-10	Fraca, trigo brando
Cracker	9-10	Média
Bolo	7-9	Muito fraca
Massa	12-14	Meio forte, trigo <i>durum</i>
"Noodles"	9-10	Boa, trigo brando

Fonte: Hamer, 1995.

Os derivados de frutos e hortaliças constituem um campo promissor para o emprego de papaína. O uso de proteases em substituição à métodos tradicionais de inibição do escurecimento enzimático, tais como adição de sulfito e modificação do substrato, tem sido avaliado por diversos pesquisadores. Labuza, Lillemo e Taoukis (1992) verificaram que a ficina e a papaína são tão efetivas quanto o sulfito na inibição do escurecimento em batata e maçã, sendo mais significativo o efeito da papaína sobre o último alimento. Este efeito é atribuído à ligação ou hidrólise de sítios específicos da PPO (polifenoloxidase) responsáveis pelo escurecimento. As diferenças quantitativas detectadas na ação das enzimas testes poderiam ser atribuídas às variações na estrutura e seqüência das moléculas de proteinases e de PPO. A interação entre proteína inibidor de batata e papaína não foi observada por Ockerman, Harnsawas e Yetim (1993).

Em alguns sucos, a exemplo do tomate, a consistência e turbidez promovidas pela presença de pectina são desejáveis. Entretanto, a própria matéria-prima possui pectinesterases que ao atuarem sobre a pectina, fluidificam e clarificam o suco. Para

evitar esta ocorrência o produto deve ser pasteurizado e adicionado de estabilizadores, dentre eles a papaína que atua aumentando o desdobramento do pectato de cálcio (HEBBEL e MONTI, 1982).

Foi estudado por Diaz *et al.* (1997), o efeito de três proteases - papaína de *C. papaya*, aspartil proteinase de *Aspergillus oryzae* e pronase E de *Streptomyces griseus* sobre a proteólise e qualidade sensorial de lingüiça fermentada desidratada. Por eletroforese, SDS-PAGE, observou-se que a hidrólise de proteínas de alto peso molecular, sarcoplasmáticas e miofibrilares, foi maior em salsichas nas quais foram adicionadas enzimas, especialmente de papaína. Durante a maturação, foi registrado um aumento da formação de tiramina e histamina, cujos teores devem ser observados para que não ocorram respostas orgânicas indesejáveis no homem.

A aplicação de papaína em carnes visa, predominantemente, a melhoria da textura. Sua ação, similar a das catepsinas do animal, é efetiva sobre as miofibrilas. Logo, os resultados são mais evidentes quando a causa da dureza da carne não depende do tecido conjuntivo, por exemplo, em situações de encurtamento pelo frio ou tempo insuficiente de maturação, além do aspecto genético. A sua escolha em detrimento da bromelina e ficina, que têm boa atividade catalítica frente ao colágeno, deve-se ao custo, segurança e difusão de conhecimentos.

Essa enzima também pode ser empregada em outras áreas da indústria de alimentos, dentre elas a de hidrolisados protéicos à base de pescado, cereais, soja, proteínas lácteas etc. Nestes produtos a ação de proteases, diferentemente da hidrólise em meio ácido, não destrói certos aminoácidos, como o triptófano, nem promove racemização (HEBBEL e MONTI, 1982).

2.5- Bioquímica da carne

A carne magra contém aproximadamente 75% de água, 18% de proteínas, 3% de gorduras, 3% de constituintes solúveis não protéicos, além de vitaminas do

complexo B, glicídios e sais minerais como elementos complementares (LAWRIE, 1985).

A água desempenha um importante papel na sua qualidade, principalmente na suculência, maciez, cor e "flavor". Por sua vez, a proteína é relevante, não só pela sua quantidade, mas também devido a seu valor nutritivo devido à boa digestibilidade e presença de aminoácidos essenciais (OLSON, 1989).

A gordura é o constituinte que apresenta maior variação, 0,7 a 28,7% nos bovinos adultos, 8,0 a 55,0 % nos suínos e 4,0 a 39,0% nos ovinos. Em decorrência, tem-se a flutuação da proporção da proteína e demais constituintes encontrados na carne. O teor de umidade, por exemplo, que via de regra é mais elevado nos músculos que desenvolvem maior atividade, mantém uma relação inversa com o teor de gordura. Com relação ao sexo e idade, constata-se que os machos possuem menor proporção de gordura intramuscular que as fêmeas, sendo esta proporção maior nos animais castrados do que nos não castrados e que os animais jovens são menos predispostos ao acúmulo de gordura subcutânea e intramuscular. Excetuando a água, os demais parâmetros aumentam com a idade (LAWRIE, 1985, PARDI *et al.*, 1995).

O interesse pelos lipídios da carne é devido ao seu valor energético, presença de ácidos graxos essenciais, vitaminas lipossolúveis e fosfolipídio. Acresça-se a estes dados, a influência que os lipídios exercem sobre as características organolépticas, especialmente sobre a textura e "flavor" (CASEY, 1992). Este constituinte é tido como fator limitante à boa aceitação de carnes provenientes de animais jovens (KASTNER E FELÍCIO, 1980).

Neste contexto, torna-se incorreto determinar a qualidade da carne sem considerar os aspectos relativos a preferência do consumidor. Esta preferência é representada pelo "flavor", cor, textura e suculência da carne. Destes atributos, segundo Jeremiah e Murray (1984), a textura é o que mais contribui para aceitação, pós-cozção dos diferentes tipos de carne. Essa textura é determinada pela genética, idade, sexo, tipo de músculo, condições de pré-preparo e método de cozção (Jeremiah, 1978). Cross (1994) sugeriu que a variabilidade na dureza de um músculo não é tão significativa na

carne suína, ovina e bovina jovens, quanto em bovinos adultos, nos quais estas características dependem do colágeno e do encurtamento das fibras musculares no período pós-abate.

O colágeno é o constituinte principal do tecido conjuntivo juntamente com a elastina. Suas moléculas se unem nas extremidades e adjacências, formando fibrilas. Seu monômero é uma proteína cilíndrica com aproximadamente 2.800 Å de longitude e 14-15 Å de diâmetro. Possui uma estrutura de superhélice com três cadeias polipeptídicas, cada uma com peso molecular de 100 kDa. São conhecidas 19 tipos genéticos de colágeno na natureza, destes pelo menos as formas polimórficas I, III, IV e V podem influenciar na qualidade da carne. As cadeias peptídicas são unidas entre si por pontes de hidrogênio, sendo exceção o tipo III, que apresenta pontes dissulfeto intramoleculares no peptídeo não helicoidal carboxiterminal. O tipo IV também se destaca por sua complexidade (PARDI *et al.*, 1995; SHIMOKOMAKI *et al.*, 1991; PIHLAJANIEMI e REHN, 1995). A estrutura do colágeno se diferencia da α -hélice típica devido ao teor elevado de hidroxiprolina e prolina. Um outro destaque na sua composição aminoacídica é a presença de hidroxilisina. A glicina por sua vez, representa quase um terço do total de resíduos, sua distribuição é uniforme, ocupando cada terceira posição ao longo de quase toda molécula, exceto nos primeiros 14 resíduos da extremidade N-terminal e os 10 últimos da extremidade C-terminal, formando então os telopeptídios (FENNEMA, 1992; PARDI *et al.*, 1995).

Nas cadeias polipeptídicas do colágeno ocorrem oxidações da prolina e da lisina a suas formas hidroxiladas, hidroxiprolina e hidroxilisina. Outra ocorrência é a formação de Δ -semialdeídos α -aminoalifáticos, resultantes da oxidação da lisina e da hidroxilisina intermediada pela lisiloxidase. Estes compostos participam das ligações cruzadas intra e intermoleculares do colágeno e, como consequência, reduzem sua solubilidade. Com o avanço da idade do animal ou atividade física excessiva a carne se torna menos tenra, em decorrência do aumento das referidas ligações, bem como pela mudança destas ligações cruzadas para uma forma madura ou não redutível, estável, cuja natureza não está completamente elucidada, mas tem-se como exemplo a formação de piridinolina que se origina da associação das cetoaminas (BAILEY, 1989; BAILEY e LIGHT, 1989). Em pescado o fenômeno é diferente, apesar dos peixes em idade mais

avançada possuírem um maior teor de colágeno, este é débil, com poucos enlaces cruzados (FENNEMA, 1992).

As collagenases naturalmente encontradas nos animais quebram apenas uma ligação de cada cadeia peptídica da molécula e têm baixa atividade frente ao colágeno nativo. Quando estas enzimas são de origem microbiana, a degradação promovida é efetiva em toda a proteína. Proteinases distintas das collagenases atuam na região telopeptídica podendo reverter o enlace cruzado, desnaturam o colágeno, tornando-o acessível à ação das collagenases. A participação das collagenases no amaciamento pós-morte ainda não é fato concluído (FENNEMA, 1992; WIKLUND *et al.*, 1997).

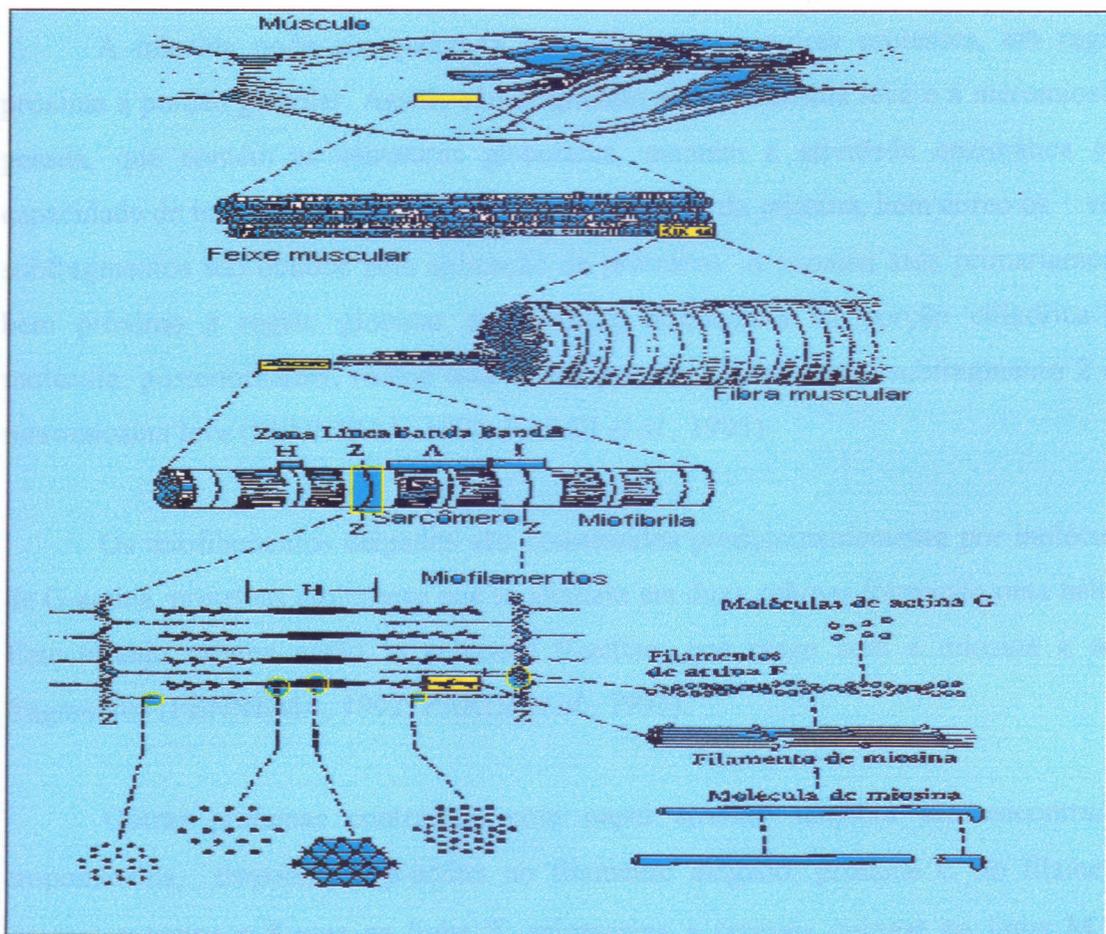
A elastina é uma proteína fibrosa e resistente, que difere dos demais constituintes do tecido conjuntivo pela constituição físico-química e propriedades. Apresenta elevado conteúdo de glicina e prolina e maior proporção de valina e alanina que o colágeno. O seu teor de hidroxiprolina é de 1 a 2% da molécula. Sua contribuição para a dureza da carne é significativa, apesar de representar apenas 0,5% do total de tecido conjuntivo existente no músculo. Alguns músculos são exceção, a exemplo do semi-membranoso, no qual a contribuição da elastina é de 37% (LAWRIE, 1985).

O elevado conteúdo de aminoácidos apolares, junto às ligações da desmosina, tornam a elastina extremamente insolúvel e resistente à maioria das enzimas do trato digestório. Porém é hidrolisada pela elastase pancreática e pela papaína (PARDI *et al.*, 1995).

A organização do tecido muscular (Figura 02) é bem mais complexa que a do tecido conjuntivo, suas proteínas são classificadas como sarcoplasmáticas e escleroproteínas ou miofibrilares. No primeiro grupo estão inseridas, dentre outras substâncias, miogênio, mioglobulina, mioglobina e hemoglobina, sendo estas duas últimas responsáveis pela coloração típica da carne vermelha (FENNEMA, 1992; PARDI *et al.*, 1995).

As miofibrilas são estruturas cilíndricas longas e delgadas, com diâmetro de 1 - 2 nm, orientadas no sentido longitudinal da fibra muscular. Nelas são observados

filamentos finos e filamentos grossos. A organização paralela das bandas das miofibrilas geram um aspecto estriado, com alternância de faixas claras e escuras. Sob microscopia de polarização, a faixa escura, denominada banda A, é anisotrópica, enquanto a faixa clara, banda I, é isotrópica. Na porção central da banda A, evidencia-se uma zona mais clara, a banda H, que com freqüência apresenta em seu centro uma linha M mais escura. No centro de cada banda I, há uma linha transversal escura chamada linha Z. A unidade funcional do tecido é o sarcômero, localizado entre duas linhas Z subjacentes (FENNEMA, 1992; PARDI *et al.*, 1995).



Fonte: Pardi *et al.*, 1995

FIGURA 2 - Representação diagramática da estrutura do músculo.

O constituinte básico dos filamentos grossos é a miosina, proteína com peso molecular de 470 kDa, constituída de duas cadeias polipeptídicas idênticas de alto conteúdo de estrutura α -helicoidal, formando surperhélice. A molécula possui duas cabeças globulares N-terminal, responsáveis por sua atividade enzimática (ATPase) e por sua capacidade de interagir com a actina. Cada cabeça globular está associada a duas "cadeias leves" distintas, alcalina e DTNB -obtida pelo tratamento com C5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico. A perda da primeira cadeia leva à redução da atividade enzimática da miosina (FENNEMA, 1992; PARDI *et al.*, 1995).

A miosina pode ser quebrada pela tripsina, ou outras proteases, em região próxima a porção globular. Assim, são originadas a meromiosina leve e a meromiosina pesada, que contém as estruturas globulares, mantém a atividade enzimática e a capacidade de interagir com a actina. Estes fragmentos da miosina, bem como os seus subfragmentos são obtidos pela aplicação de proteases. A papaína atua primariamente bem próximo à região globular da miosina, liberando-a da porção cilíndrica da molécula; posteriormente, rompe esta última porção, produzindo o subfragmento 2 e a meromiosina leve (FENNEMA, 1992; PARDI *et al.*, 1995).

Os miofilamentos delgados são constituídos predominantemente por moléculas de G-actina, proteínas globulares que se alinham em duas colunas formando uma hélice. Este arranjo origina então, o polímero F-actina, que reage com a miosina e seus fragmentos (FENNEMA, 1992; PARDI *et al.*, 1995).

Outras proteínas contrácteis com papel auxiliar também são encontradas: tropomiosina, troponina e β -actina no filamento delgado; proteína C no filamento grosso; α -actina e Z-nina na linha Z; miomesina e creatina quinase na linha M etc (Tabela III).

Cada filamento grosso possui cerca de 400 moléculas de miosina que se polarizam, unindo cabeça contra cauda em duas direções. Esta polaridade permite a contração. Quando os íons Ca^{++} estão no interior do retículo sarcoplasmático, a presença de ATP e Mg^{++} não induz a atividade ATPásica da miosina, o músculo se encontra em repouso. Em resposta a um estímulo elétrico nervoso, o retículo sarcoplasmático cede

íons Ca^{++} , com um umbral de 10^{-7} M, a atividade enzimática da miosina é ativada, produzindo a hidrólise do ATP e a contração muscular, devida à interação momentânea miosina/actina. O retículo sarcoplasmático recupera o cálcio e o músculo retorna à condição de relaxamento. Este ciclo é contínuo, desde que haja estímulo e energia (PARDI *et al.*, 1995; LEHNINGER, NELSON e COX, 1993).

TABELA III - Proteínas miofibrilares do músculo esquelético

Proteínas	Localização
<i>Proteínas contráteis</i>	
Miosina	Banda A
Actina	Banda I
<i>Proteínas reguladoras</i>	
Maior	
Troponina	Banda I
Tropomiosina	Banda I
Menor	
Proteína M	Banda A
Proteína C	Banda A
Proteína H	Banda A
Proteína F	Banda A
Proteína I	Banda A
Proteína X	Banda A
Actina B	Extremidade da actina
Actina Y	Banda I
<i>Filamentos intermediários</i>	
Desmina	Periferia das miofibrilas
Vimentina	Entre linhas Z
<i>Filamento</i>	
Conectina	Junção A-I
<i>Constituinte disco Z</i>	
α -actina	Disco Z
Proteína Z	Disco Z
Proteína 34 K	Disco Z
Z-nina	Disco Z
ABP	Disco Z
<i>Outras proteínas</i>	
Vinculina	Sarcolema
Nebulina	Banda A
Paratropomiosina	Junções A-I

Fonte: Pardi *et al.*, 1995.

Logo após o abate do animal, os músculos ainda são elásticos e contráteis, respondem à tração e aos estímulos elétricos. Estas propriedades perduram enquanto houver ATP nos tecidos, evitando a formação permanente e conseqüente rigidez da actomiosina. Quando suas reservas de energia se esgotam, instala-se o "rigor mortis". Nesta condição a qualidade da carne é inferior. Dentro de determinados limites há uma relação entre a contração das miofibrilas e o grau de maciez da carne, mais significativa do que o efeito da quantidade/qualidade do colágeno sobre a maciez da carne. Faz-se necessário aguardar a maturação da carne, que compreende especialmente a resolução do rigor e alterações bioquímicas de "flavor" (KASTNER E FELÍCIO, 1980).

Um dos fenômenos mais importantes no tecido muscular pós-morte é a diminuição do pH, resultante principalmente do acúmulo de lactato e H^+ , obtidos na respiração anaeróbia. A glicólise sob condições naturais, termina quando o pH inicialmente de 7,4, alcança cerca de 5,5, que é o ponto isoelétrico da miosina. Além desta ação direta, a mudança de pH promove a resolução da rigidez muscular por ser favorável à atividade de proteases cisteínicas endógenas, as calpaínas e catepsinas. O elevado teor de cálcio no sarcoplasma também estimula as proteases. Para alguns autores ainda é discutível a ação destas enzimas, por serem lipossomais, pela presença de inibidores fisiológicos endógenos, as cistatinas, e ainda pelo número de substratos possivelmente envolvidos na resolução do rigor (PARDI *et al.*, 1995; KOOHMARAIE, 1996; GIL e SARRAGA, 1997, WIKLUND *et al.*, 1997).

2.6- Técnicas para amaciamento de carne

No intuito de melhorar a qualidade da carne são aplicadas diversas tecnologias, que compreendem mudanças genéticas para melhoramento de raças, práticas de alimentação e manejo, cuidados anteriores ao sacrifício, condições de maturação, sistema de amaciamento, formas de cocção etc.

Com relação às condições de maturação, o método tradicional de pendura da carcaça pelo tendão de Aquiles, mantém os músculos em posição contraída durante o

estabelecimento do "rigor mortis", resultando em carne menos tenra quando comparado à suspensão da carcaça pelo orifício obturador do coxal - pélvis, com exceção do corte denominado comercialmente de filé (*M. psoasmajor*). Esta segunda técnica acarreta algumas desvantagens tais como a deformação da carcaça e das peças, necessidade de maior espaço lateral e pé-direito mais baixo nas câmaras de armazenamento (KASTNER e FELÍCIO, 1980, TAKAHASHI, 1991).

Especial atenção deve ser dada à relação tempo/temperatura capaz de prover a maturação da carne, de modo a evitar alterações químicas e microbiológicas responsáveis pela deterioração ou formação de constituintes indesejáveis. A Tabela IV é uma sugestão de condições favoráveis à maturação natural da carne bovina (MELO, 1980).

Tabela IV - Relação temperatura x tempo para maturação da carne bovina.

TEMPERATURA (° C)	TEMPO
0,0 a 2,0	2 a 3 semanas
7,2	5 a 6 dias
12,7	3 a 4 dias
20,0	2 dias

Fonte: Melo, 1980.

Avaliando outros sistemas de emprego do frio como o VFC- resfriamento muito rápido- onde a carne alcança -1°C em 5 horas pós-morte, Joseph (1996) não encontrou melhorias significativas sobre a qualidade da carne, discordando dos resultados obtidos por Jaime *et al* (1993) que evidenciaram uma melhor textura. Ainda sobre o tema, McGeehin, Sheridan e Butler (1999) ao avaliarem o resfriamento ultra rápido, -20°C em 3,5 horas, verificaram o amaciamento da carne e uma menor perda de peso por evaporação. Estas divergências encontradas na literatura podem ser explicadas pela heterogeneidade de processos, principalmente quanto a definição do tempo pós-abate para início da aplicação do frio e das temperaturas limites.

Resultados têm sido satisfatórios, com uma técnica alternativa de maturação que consiste em embalagem à vácuo com armazenamento a baixas temperaturas aplicados aos cortes comerciais. O mecanismo de ação específico é desconhecido, embora sugira a associação com proteólise e atividade bacteriana (TAKAHASHI, 1991).

Um outro recurso disponível para o amaciamento da carne é a passagem de uma corrente elétrica pela carcaça, recomendável apenas no início da fase "post mortem", isto é na primeira hora após o abate, uma vez que o sistema perde a eficiência com a instalação do rigor. Sua primeira patente industrial data de 1951 (TAKAHASHI, 1991), entretanto um real interesse pelo seu emprego em larga escala ocorreu apenas no início dos anos 60, quando Locker e Hagyard (1963) elucidaram o indesejável encurtamento das fibras musculares pelo frio, em animais recém abatidos. Em seguida, tornou-se comum em diversos países o emprego da corrente elétrica, mesmo sem um maior conhecimento científico quanto ao melhor sistema de aplicação, havendo inclusive contradições quanto ao seu efeito. A literatura mostra grande variabilidade combinações empregadas para a estimulação elétrica da carcaça: voltagem, amperagem, frequência, tempo de aplicação e duração do estímulo, e características dos pulsos (KASTNER e FELÍCIO, 1980).

O estímulo elétrico ao causar danos à membrana celular e fragmentação das fibras musculares e do tecido conjuntivo, pode promover o abrandamento da carne. Hirschler e Sams (1998), por exemplo, demonstraram a efetividade do estímulo elétrico em escala comercial. Feijo e Muller (1994), por sua vez, verificaram que o estímulo elétrico de baixa voltagem não afetou a qualidade da carne, tendo como parâmetros a maciez, suculência, palatabilidade, força de cisalhamento e comprimento do sarcômero. Segundo Takahashi (1991), a grande variabilidade da temperatura do músculo após a estimulação, constitui um complicador, tornando difícil o controle da glicólise e da proteólise.

Outra técnica empregada para a melhoria da qualidade da carne é o amaciamento mecânico. A eficiência desta técnica é dependente da velocidade e do número de passagens através da máquina. O seu efeito é observado na ruptura das miofibrilas e do tecido conjuntivo. Para sua aplicação são necessários cuidados para evitar exudação

excessiva e contaminação microbiana, neste sentido os resultados são mais favoráveis quando o amaciamento é realizado próximo ao momento de cocção (KASTNER e FELÍCIO, 1980)

Considerando a relação entre cálcio e contração/relaxamento muscular, observou-se que a injeção de cloreto de cálcio pós rigor, um dia após sua aplicação, reduziu a força de cisalhamento, alcançando uma maciez máxima aos 14 dias (WEHEELER, KOOHMARAIE e SHACKELFORD, 1997). Os polifosfatos também demonstraram ser eficazes no aumento da maciez e suculência, por melhorar a retenção de água (SHEARD *et al.*, 1999).

Marinar a carne é também uma tecnologia aplicada para o amaciamento. A acidificação do músculo utiliza o ácido acético ou láctico até 0,15 M, para atingir um pH final não inferior a 5. A ultrapassagem deste limite, apesar de se obter uma carne mais tenra, modifica o sabor, que se torna mais ácido, quando percebido sensorialmente (SEUSS e MARTIN, 1991; HASHIM, MCWATTERS e HUNG, 1999). Oreskovich *et al.* (1992), ao realizarem observações ultraestruturais, identificaram que as estruturas da linha Z, linha M e filamentos delgados estavam visíveis e levemente fragmentadas, em carne marinada a pH 5,38.

O amaciamento de carne por enzimas proteolíticas depende da natureza da enzima empregada, da sua concentração, técnica de aplicação etc. Os métodos empregados são a pulverização da peça de carne, imersão em solução enzimática ou aplicação por aerossol, sistema de injeções múltiplas musculares ou injeção direta no sistema circulatório ainda funcionando.

O principal critério para escolha do método é a uniformidade da distribuição de enzimas nos tecidos, pois sua retenção na superfície da carne resulta em peça com o interior pouco brando e o exterior sobre-amolecido. Para minimizar este problema a forma e o volume da carne devem ser considerados. A associação com a perfuração mecânica é uma alternativa, pois favorece a dispersão das proteases (MELO, 1980).

Bernholdt (1975) relata bons resultados para aplicação de enzimas por agulhas múltiplas, não obstante o surgimento de áreas extremamente amolecidas nos locais perfurados pelas agulhas. Também cita o êxito da aplicação por aerossol antecedida de perfurações múltiplas, que favoreceu a atomização das proteases dentro dos tecidos.

O amaciamento da carcaça inteira por aplicação de solução de proteases na jugular do animal vivo, apresenta resultados superiores às injeções logo após o abate, face a uma melhor distribuição das enzimas. Entretanto, para um bom produto final é necessário cumprir alguns critérios: as enzimas só podem ser utilizadas em sua forma inibida, com ativação ao chegar ao músculo; a concentração aplicada depende da idade do animal e de suas condições fisiológicas; o tempo entre aplicação e abate deve ser até 30 minutos (SMITH *et al.*, 1973; MELO, 1980; RADHAKRIHMAN e RAMAMURTHI, 1987). Por sua vez, Mendiratta e Panda (1995) verificaram um efeito sinergista entre a injeção de proteases no pré-abate de aves e a aplicação de pressão no período pós-rigor.

Melo (1980) encontrou diferenças no poder de amaciamento por uso de proteases vegetais em função do músculo estudado. A papaína foi mais eficiente sobre os músculos dianteiros, o *Infraspinatus* e o *Supraspinatus*, enquanto a bromelina obteve melhor resultado sobre o *Semimembranosus*. Uma solução de papaína e bromelina 4:1 também foi testada e sua ação foi mais efetiva frente ao *Longissimus dorsi*.

Um outro diferencial entre essas enzimas é a temperatura de ação e inativação. A atividade ótima da papaína geralmente é obtida entre 60 e 85°C, superior à temperatura normalmente encontrada no interior de grandes peças de carne cozida - 65 a 75°C - possibilitando a continuidade da ação proteolítica, resultando em produto demasiadamente macio. A ficina tem atividade máxima entre 30 e 50°C, sendo inativada próximo a 65°C e a bromelina entre 30 e 60°C (TAKAHASHI, 1992).

O conhecimento da relação entre o teor de fibra muscular e de tecido conjuntivo é relevante, uma vez que as proteases atuam diferentemente nestes tecidos. A bromelina atua efetivamente sobre o colágeno, a papaína tem ação satisfatória sobre a fibra muscular e a elastina, enquanto que a ficina promove elevada hidrólise sobre estas três

frações do músculo (TAKAHASHI, 1992). Entretanto, a maior resistência térmica da papaína favorece a sua atividade frente ao tecido conjuntivo, pois o colágeno é desnaturado durante a cocção, o que permite um maior grau de proteólise (SHIMOKOMAKI, 1974).

No que diz respeito ao pH ótimo, a variação encontrada na literatura é resultante não apenas ao tipo de enzima, como também ao tipo de substrato teste, além da própria faixa de pH analisada. Considerando a papaína, quando o substrato é caseína e albumina do ovo o pH ótimo corresponde a 7,0. Na análise de sua ação sobre carne bovina, com o pH próximo àquele naturalmente obtido no pós-rigor, isto é 5 a 6, encontra-se como ideal o pH 5,5 (MELO, 1980).

3-Objetivos

Geral

- Obter papaína bruta de mamão verde integral para uso como amaciante de carnes, com vistas a reduzir o desperdício dos frutos resultantes do desbaste e excedente de produção.

Específicos

- Estabelecer um processo de elaboração de amaciante de carnes à base de mamão verde integral.
- Avaliar o efeito do amaciante desenvolvido sobre o valor biológico da carne bovina.
- Avaliar a estabilidade e aceitabilidade do produto obtido.

4-Materiais e métodos

4.1-Materiais

4.1.1-Material vegetal

Para elaboração do amaciante foram utilizados mamões verdes (*Carica papaya* L.), cultivar Sunrise Solo, também conhecida como Havaí, correspondentes ao estágio de desenvolvimento imaturo, no qual se realiza o desbaste da plantação para melhoria da qualidade dos frutos remanescentes. Os frutos constituíram dois lotes, o lote A foi coletado em plantio da Zona da Mata de Pernambuco e o lote B foi adquirido na CEASA-PE.

4.1.2-Embalagens

Para o estudo da vida útil do produto, foram utilizadas embalagens de vidro com tampas plásticas rosqueáveis.

4.1.3-Carne bovina

Empregou-se para testes sensoriais e ensaios biológicos o corte de carne bovina denominado chã-de-fora (*Musculus biceps femoris*), adquirido no comércio local.

4.1.4-Animais

Foram utilizados 56 ratos machos (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da

Universidade Federal de Pernambuco, após o desmame aos 21 dias de idade, com peso médio de 48,3g, distribuídos em 4 grupos de acordo com as dietas.

4.1.5-Amaciante comercial

Foi utilizado como padrão comercial o Amaciante de Carnes com Tempero marca Maggi, Nestlé, para comparação com a papaína bruta obtida de mamão verde integral.

4.1.6-Dietas

Foram utilizadas 4 dietas, tabela V, baseadas na AIN-93G para rato (REEVES *et al.*, 1993): **SA**- incluindo carne sem amaciante, com 1% m/m de NaCl; **AC**- incluindo carne com 2% m/m de amaciante comercial* , **AE**- incluindo carne com 1% m/m NaCl e 0,86% m/m de amaciante de carne experimental** e **AP**- dieta aprotéica.

A fonte protéica da dieta foi carne bovina (chã de fora), com ou sem amaciante de acordo com os grupos acima especificados. Para confecção semanal das dietas, no Laboratório de Nutrição Experimental (Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco), utilizou-se também óleo de milho, pré-mix de vitaminas e minerais da Rhoester, L-metionina, L-cistina e bitartarato de colina da Vetec, celulose microcristalina da Rhoester e amido de milho da Refinações de Milho do Brasil.

4.1.7-Equipamentos e instalações

Foram utilizadas instalações e equipamentos do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados II (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará), Laboratório de Experimentação e Análise de

* A proporção de sal especificada pelo fabricante é de 50%.

** Valor calculado, considerando a atividade enzimática específica do lote de amaciante utilizado

Tabela V- Composição das dietas

Constituintes	Quant (g)	Nutrientes (g%)						
		Proteína	Glicídio	Lipídio	Vitamina	Minerais	Fibra	Kcal
Dieta SA								
Carne	14,15	9,65	0,31	1,47		0,70		
Óleo	6,00			6,00				
Amido	69,80	0,69	61,31	0,14		0,10		
Fibra	5,00						5,00	
Mistura vitamínica	1,00				1,00			
Mistura salínica	3,50					3,50		
Bitartarato de colina	0,25							
L-cistina + L-metionina	0,30							
Total	100,00	10,34	61,62	7,61	1,00	4,30	5,00	356,33
NDPCal%	8,12							
Dieta AC								
Carne	13,80	9,68	0,01	1,12		0,81		
Óleo	6,00			6,00				
Amido	70,15	0,70	61,62	0,14		0,10		
Fibra	5,00						5,00	
Mistura vitamínica	1,00				1,00			
Mistura salínica	3,50					3,50		
Bitartarato de colina	0,25							
L-cistina + L-metionina	0,30							
Total	100,00	10,38	61,63	7,26	1,00	4,41	5,00	353,38
NDPCal%	8,22							
Dieta AE								
Carne	13,36	9,65	0,14	1,85		0,71		
Óleo	6,00			6,00				
Amido	70,59	0,70	62,01	0,14		0,10		
Fibra	5,00						5,00	
Mistura vitamínica	1,00				1,00			
Mistura salínica	3,50					3,50		
Bitartarato de colina	0,25							
L-cistina + L-metionina	0,30							
Total	100,00	10,35	62,15	7,99	1,00	4,31	5,00	361,91
NDPCal%	8,01							
Dieta AP								
Óleo	6,00			6,00				
Amido	83,95	0,84	73,74	0,17		0,12		
Fibra	5,00						5,00	
Mistura vitamínica	1,00				1,00			
Mistura salínica	3,50					3,50		
Bitartarato de colina	0,25							
L-cistina + L-metionina	0,30							
Total	100,00	0,84	73,74	6,17	1,00	3,62	5,00	353,85

Alimentos - LEAAL, Biotério de Criação e Laboratório de Nutrição Experimental (Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco). Os equipamentos utilizados foram: aparelho de Soxhlet (Fanem), balança analítica (Mettler), balança semi-analítica (Marte), banho-maria (Evlab), centrífuga refrigerada (Janetzki), deionizador de água (Permutation), destilador de água (Fanem), digestor e destilador de Kjeldahl Kjeltec Sistem (Tecator), espectrofotômetro (Varian), estufa de esterilização e secagem (Fanem), fogão (Semer), kit para eletroforese, mufla (Solo), multiprocessador (Walita), refrigerador (Consul), secador de ar quente tipo armário (Luferco).

4.1.7-Reagentes

Para as determinações analíticas foram utilizados os seguintes reagentes: ácido acético, ácido bórico, ácido cítrico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, acrilamida, beta-mercaptoetanol, caseína, catalisador -selênio e óxido de mercúrio, cisteína, carbonato de sódio, fosfato de sódio dibásico, formaldeído, nitrato de prata, tiosulfato de sódio, sacarose, indicador misto amoniacal e papaína (Merck); *kit* analítico Proteínas Totais (Labtest Diagnóstica); éter etílico, metanol, hidróxido de sódio e tampão fosfato 0,01M, pH 7,0 (Vetec).

4.2-Métodos

4.2.1-Elaboração do amaciante

A produção do amaciante seguiu o fluxograma descrito na figura 3.

4.2.2-Estabelecimento das condições de secagem

Baseado na temperatura ótima para secagem de látex de mamão, descrita na literatura (Poulter e Caygill, 1985), um ensaio prévio para o estabelecimento das

condições de secagem foi realizado considerando tempo de secagem, em função da umidade do produto (vide item 4.2.3 - umidade obtida por gravimetria, a 105°C - AOAC, 1995). O resultado foi expresso em curvas de secagem.

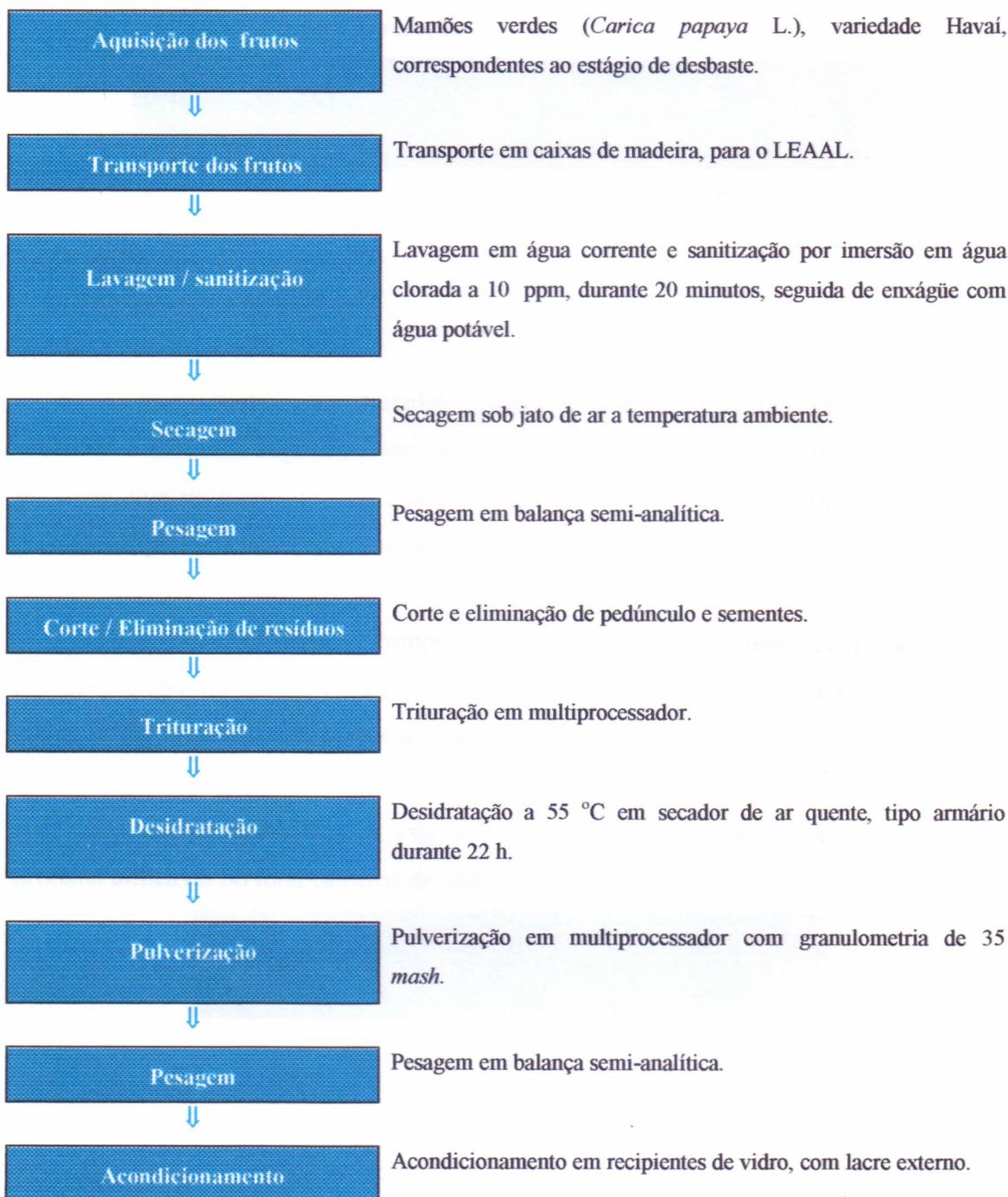


FIGURA 3 - Fluxograma de elaboração de amaciante de carne à base de mamão verde integral.

4.2.3-Análise do produto

Distintos parâmetros físico-químicos foram utilizados para análise do amaciante produzido: umidade, proteína solúvel, atividade enzimática, e Eletroforese em gel de poli-acrilamida, segundo técnicas descritas no item 4.2.5, além do rendimento do produto, onde foi considerada a relação:

$$\text{rendimento} = \frac{\text{peso do produto pulverizado}}{\text{peso da matéria prima}} \times 100$$

4.2.4-Elaboração das dietas

As porções de carne, tratadas segundo o item 4.1.6, foram secas em estufa ventilada a 45°C e, a seguir, pulverizadas em moinho para a obtenção de farinhas, com granulometria de 0,56 mm, nas quais foram realizadas as determinações de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos (item 4.2.5).

Uma vez conhecida a composição centesimal das farinhas de carne, estas, juntamente com os demais constituintes preconizados pela AIN-93G para rato (Reeves *et al.*, 1993), foram utilizadas na elaboração das dietas apresentadas na tabela V.

Os valores de NDPCal%, expressos na tabela 05, representam a quantidade de proteína utilizável no total calórico da dieta, e foram medidos pelo cálculo seguinte:

$$\text{NDPCal\%} = \frac{\text{calorias das proteínas} \times \text{NPU}^*}{\text{VCT}}$$

(*) utilizou-se o fator 0,7

4.2.5-Determinações analíticas

a) Proteína solúvel

A proteína solúvel foi determinada pelo método do microbiureto (Bailey, 1967), com leitura a 545 nm, tendo SBA como padrão, utilizando o *kit* analítico Proteínas Totais, Labtest Diagnóstica. Foi seguida a orientação do fabricante: 4 g da amostra foram homogeneizados em 30 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, em banho de gelo; o EB obtido foi filtrado em papel. O branco foi preparado com 0,05 mL de água destilada e 2,50 mL da solução de biureto (hidróxido de sódio, tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre e iodeto de potássio); o padrão foi obtido com 0,05 mL da solução padrão (4 g proteína/100mL) e 2,50 mL da solução de biureto; os testes foram realizados com 0,05 mL da amostra e 2,50 mL da solução de biureto. Agitou bem e após 15 minutos, fez-se a leitura a 545 nm.

Para obtenção dos resultados, foi adotado o seguinte cálculo:

$$\text{Proteína mg/mL} = \frac{\text{absorbância do teste} \times 4}{\text{absorbância do padrão} \times 100}$$

b) Atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática foi considerada a atividade da papaína determinada no extrato bruto (EB), seguindo o método espectrofotométrico de Kunitz (1947): 4 g da amostra foram homogeneizados em 30 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, em banho de gelo. Após filtração em gaze, 0,1 mL do extrato bruto foi adicionado a 5,0 mL de solução de caseína a 1%, contendo 0,1 mL de cisteína 5×10^{-3} M. Para determinação da atividade enzimática específica, foram adicionados em diferentes tubos, 5 mL de solução de TCA a 5%, gelada, após 10, 11, 12, 12, 14 e 15 minutos de incubação a 35 °C. Após a centrifugação a 3000 rpm e filtração em papel, foram procedidas as leituras de absorbância a 275 nm. Para os cálculos foram considerados os teores de proteína solúvel.

Na expressão dos resultados de atividade enzimática foram consideradas:

atividade total = μmol de tirosina liberada/min/mL do EB

atividade específica = atividade total / mg proteína / mL do EB

c) Frações protéicas

A metodologia para eletroforese foi adaptada de Laemmli (1970), usando-se um sistema descontínuo dissociante em placa vertical. A concentração de acrilamida foi de 12,5 % no gel de separação e 3% no gel de empacotamento.

As amostras pulverizadas (amaciante comercial, amaciante experimental, carne sem amaciante, carne com amaciante comercial e carne com amaciante experimental) foram dissolvidas na proporção de 5 mg/mL, em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo SDS a 2% e beta-mercaptoetanol a 1%. A solução foi colocada na estufa a 110° C por 10 minutos, quando foi adicionada sacarose (concentração final de 10%). Foram aplicadas alíquotas de 10 μl em cada poço, e a corrida foi realizada por cerca de 2 horas em amperagem fixa (20 mA).

As bandas protéicas foram reveladas com reagente de prata seguindo a metodologia descrita por Blun, Beier e Gross (1987). Esta metodologia de revelação consiste de dez passos descritos abaixo.

1. Durante uma hora o gel foi posto em contato com solução contendo metanol 50% + ácido acético 12% + 0,5ml de formaldeído/litro de solução, para fixação das proteínas.
2. A solução fixadora foi removida com três lavagens sucessivas do gel em solução de etanol a 50%, cada lavagem teve a duração de vinte minutos.
3. O gel recebeu um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio na concentração de 0,2g/L, por um minuto.
4. O gel foi lavado com água destilada por três vezes consecutivas, cada lavagem teve a duração de vinte segundos.

5. O gel foi impregnado por imersão numa solução contendo nitrato de prata – 0,2g/100mL de solução + formaldeído - 75µL/100mL de solução, durante vinte minutos.
6. O gel foi lavado com água destilada por duas vezes consecutivas, com duração de vinte segundos cada lavagem.
7. A revelação das bandas protéicas ocorreu por imersão, durante dez minutos, do gel numa solução contendo carbonato de sódio – 6g/100mL de solução + formaldeído - 50µL/100mL de solução + 20mL da solução utilizada no pré-tratamento (passo 3).
8. O gel foi lavado com água destilada por duas vezes consecutivas, com duração de vinte segundos cada lavagem.
9. A interrupção da revelação foi realizada com imersão do gel em uma solução contendo metanol 50% + ácido acético 12%, durante dez minutos.
10. O gel foi lavado com metanol a 50%, a frio, durante 20 minutos.

d) Teor de umidade

O teor de umidade foi obtido por gravimetria em estufa a 105°C (AOAC, 1995), cuja seqüência de procedimentos compreendeu: foram tomados 2 g da amostra, previamente triturada, com granulometria para peneira Tyler 35, e postos em cápsula de porcelana previamente seca em estufa a 105°C e tarada; o conjunto (cápsula e amostra) foi aquecido em estufa 105 ±1°C por 2 horas e resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente; em seguida foi pesado; as operações anteriores foram repetidas até que a diferença entre duas pesagens consecutivas se apresentou inferior a 0,05%.

Para obtenção dos resultados, o seguinte cálculo foi empregado:

$$\text{umidade g/100g} = \frac{(P1 - P2)}{(P1 - P0)} \times 100$$

Onde:

PO = peso da cápsula

P1 = peso do conjunto antes da secagem

P2 = peso do conjunto depois da secagem

e) Teor de proteína

Na determinação de proteínas totais, foi empregado o método de Kjeldahl, com o fator de conversão 6,25 para o conteúdo de nitrogênio total (AOAC, 1995): foi pesado 1 g da amostra e posto em tubo de Kjeldahl; foram adicionados 7 mL de ácido sulfúrico concentrado, na presença de 1 g catalisador (mistura de selênio e óxido de mercúrio), sendo acoplado ao digestor até a mostra se apresentar límpida. Em seguida, o tubo de Kjeldahl foi posto no suporte do destilador, onde foram adicionados 40 mL de água destilada e de hidróxido de sódio a 40%. O destilado foi recebido em erlenmyer contendo 20 mL de ácido bórico a 3% com 5 gotas de indicador misto amoniacal; quando, então, foi realizada a titulação com ácido clorídrico 0,1N até cor rósea.

Foi empregado o seguinte cálculo:

$$\text{proteína g/100g} = \frac{1,4008 \times 6,25 \times V \times F \times 100}{PA}$$

Onde:

V = volume gasto de HCl 0,1N

F = fator do HCl 0,1N

PA = peso da amostra

f) Teor de lipídios

O teor de lipídios foi obtido por gravimetria, pelo método de Soxhlet, utilizando éter etílico como solvente, de acordo com AOAC, 1995: foram tomados 2 g da amostra em cartucho de papel xaroposo, o qual foi colocado no cartucho metálico e em seguida o cartucho foi para a câmara de Soxhlet acoplada ao balão, onde passou por sinfonações sucessivas de éter por 4 horas. Em seguida, foi aguardada a evaporação do éter no balão. O balão com o extrato etéreo retido foi levado à estufa a 100° C por 3 horas. O balão foi mantido em dessecador até esfriar, sendo pesado em seguida; o balão foi posto novamente em estufa a 100° C por 1 hora; após, foi mantido em dessecador até esfriar, sendo pesado em seguida. Os dois últimos procedimentos foram repetidos até obtenção de peso constante.

Para obtenção dos resultados, o seguinte cálculo foi empregado:

$$\text{lipídios g/100g} = \frac{\text{peso do extrato etéreo}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

g) Teor de cinzas

O resíduo mineral fixo, isto é, as cinzas foram determinadas gravimetricamente (AOAC, 1995): 5 g da amostra, previamente triturada para passar em peneira Tyler 35, foram postos na cápsula, previamente incinerada; em seguida, foram queimados em bico de bunsen até não liberarem mais fumaça. A amostra foi, então, levada à mufla a 550 ± 1 °C por 4 horas; logo após, foi mantida em dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo pesada em seguida. Foram repetidas as duas últimas as operações até a diferença entre duas pesagens consecutivas ser inferior a 0,05%.

Para obtenção dos resultados, foi adotado o seguinte cálculo:

$$\text{cinzas g/100g} = \frac{\text{peso das cinzas}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

h) Teor de carboidratos

Os carboidratos totais foram calculados por diferença:

$$\text{Carboidratos g/100g} = 100 - (\text{umidade} + \text{proteínas} + \text{lipídios} + \text{cinzas})$$

4.2.6-Ensaio biológicos

Os ratos ficaram em gaiolas individuais com água e alimentação *ad libitum*, à temperatura de 23 ± 1 °C, com ciclo fotoperiódico de 12 horas. Divididos em grupos SA, AC, AE e AP, de acordo com as dietas (item 4.1.6), estes animais foram

submetidos aos ensaios para determinação da DA (digestibilidade aparente), do CEA (coeficiente de eficiência alimentar), do CEP (coeficiente de eficiência protéica) e do RPF (retenção protéica final), de acordo com Pellett e Young, 1980.

a) DA(digestibilidade aparente)

Na determinação da DA foram avaliados os grupos SA, AC, AE. Para obtenção dos dados, as fezes foram coletadas e armazenadas regularmente, com registro de peso, para de terminação de nitrogênio fecal, segundo a técnica descrita para proteínas totais. Foram também registradas a ração ingerida e a ração rejeitada para cálculo da ração consumida e conseqüentemente do nitrogênio ingerido. Após 28 dias o experimento foi encerrado.

Para o seu cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$DA = \frac{\text{nitrogênio ingerido} - \text{nitrogênio fecal}}{\text{nitrogênio ingerido}} \times 100$$

b) CEA (coeficiente de eficiência alimentar)

Foram avaliados os grupos SA, AC, AE. O peso inicial dos animais foi registrado. Ao final de cada período (7 dias) foram registradas a ração ingerida, a ração rejeitada e o peso do rato. Após 28 dias o experimento foi encerrado.

O CEA para cada animal foi obtido por:

$$CEA = \frac{\text{peso ganho}}{\text{ração ingerida}}$$

c) CEP (coeficiente de eficiência protéica)

Foram avaliados os grupos **SA**, **AC**, **AE**. Similarmente ao CEA, o peso inicial dos animais foi registrado, assim como ao final de cada período (7 dias) foram registradas a ração ingerida, a ração rejeitada e o peso do rato. A partir do cálculo da ração ingerida foi estimada a proteína ingerida. Após 28 dias o experimento foi encerrado.

O CEP para cada animal foi obtido por:

$$\text{CEP} = \frac{\text{peso ganho}}{\text{proteína ingerida}}$$

d) RPF (retenção protéica final)

Para determinação do RPF foram avaliados os grupos **SA**, **AC**, **AE** e incluído o grupo **AP**. Foram registrados peso inicial dos animais, a ração ingerida, a ração rejeitada e o peso dos ratos durante 10 dias.

O RPF para cada animal foi obtido por:

$$\text{RPF} = \frac{\text{peso ganho do grupo problema} + \text{perda de peso do grupo aprotéico}}{\text{proteína ingerida}}$$

4.2.7-Análise sensorial

A carne bovina (chã-de-fora), cortada transversalmente ao sentido das fibras musculares, em bifés de aproximadamente 0,5 cm, teve seu pré-preparo de acordo com o grupo amostral: **SA**- sem amaciante: com 1% m/m NaCl; **AC**- com 2% m/m de amaciante comercial* **AE**- com 1% m/m NaCl e 0,86% m/m de amaciante de carne experimental**.

* A proporção de sal especificada pelo fabricante é de 50%.

** Valor calculado, considerando a atividade enzimática específica do lote de amaciante empregado

O amaciante e/ou o sal foram pulverizados , uniformemente, sobre a superfície dos bifês. Após 30 minutos, a temperatura ambiente, os bifês foram submetidos à fritura, sob condições idênticas de tempo e temperatura ($150 \pm 3^{\circ}\text{C}$ / 6 minutos). Em seguida, um painel, constituído por oito juizes treinados, os comparou através de teste discriminativo para textura, além da cor e flavor (considerados como “outros aspectos”), com ênfase para o primeiro atributo, utilizando a ficha apresentada na figura 4 (ANZALDUA-MORALES, 1994). Foram realizadas sessões distintas para estabelecer comparações entre AS e AE, AC e AE.

4.2.8-Estudo de vida útil

Para estudo da vida de prateleira, as amostras devidamente acondicionadas, foram armazenadas em local fresco e seco, protegido da luz, a temperatura ambiente (25°C), e avaliadas, periodicamente, quanto a atividade enzimática (metodologia descrita no item 4.2.5): ao tempo zero de sua obtenção; aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias após sua obtenção.

4.2.9-Análise estatística

Os dados paramétricos foram submetidos a ANOVA, seguida do Teste de Tukey, enquanto que aos dados não paramétricos se aplicou o Teste U de Mann Whitney. O nível de significância adotado correspondeu a 5%.

Essas análises foram realizadas pelo programa *SPSS for Windows-1995*.

Análise sensorial	
Amostra: Amaciante de carne	
Nome do provador: _____	Data _____
Por favor, responda as seguintes perguntas.	
1. Quanto a textura das amostras que você está recebendo:	
_____ em relação a _____ é:	
() muito melhor	
() melhor	
() pouco melhor	
() igual	
() pouco inferior	
() inferior	
() muito inferior	
Por quê? _____	
2. Considerando as demais características sensoriais (cor e flavor):	
_____ em relação a _____ é:	
() muito melhor	
() melhor	
() pouco melhor	
() igual	
() pouco inferior	
() inferior	
() muito inferior	
Por quê? _____	
Obrigada!	

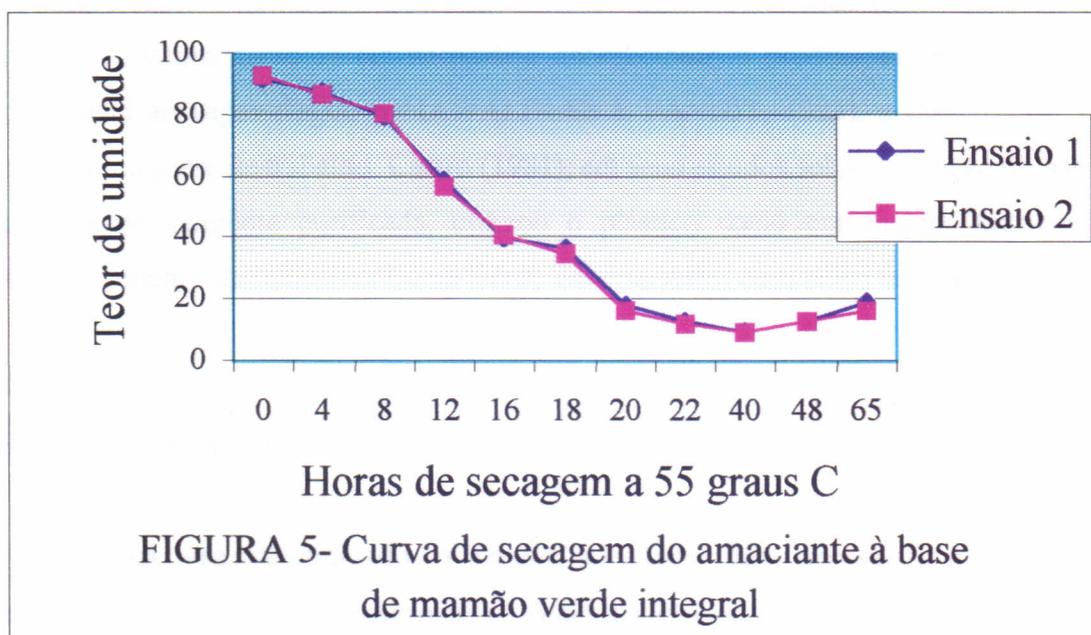
FIGURA 4 - Ficha para análise sensorial

5-Resultados e discussão

5.1-Determinação do tempo de secagem

Considerando 55°C como a temperatura de secagem de papaína recomendada por diversos autores, citados por Poulter e Caygill (1985), foram estabelecidas curvas de secagem no intuito de identificar o tempo adequado para desidratação do mamão triturado, como parte do processo de obtenção do amaciante.

A Figura 5 demonstra que a maior redução no teor de umidade foi alcançada após 40 horas, entretanto não houve diferença significativa quando comparada a 22 horas de permanência em estufa. Um menor tempo de secagem tem como vantagens redução no custo de produção, representado pela economia de energia e rapidez da linha de processamento, e maior segurança na proteção da enzima.



Quanto a esse segundo aspecto, sabe-se que um dos fatores limitantes da desidratação tradicional do látex sob o sol é o tempo de exposição, que resulta em oxidação da papaína, escurecimento e alteração do "flavor", além de favorecer o

desenvolvimento microbiano (MELO, 1980; POULTER e CAYGILL, 1985). O resíduo de histidina, essencial para a atividade enzimática, é sensível à luz ultravioleta. A redução do poder proteolítico também é resultante da oxidação do resíduo de cisteína 25 (ORTIZ *et al*, 1980; WIEDERANDERS *et al*, 1991; SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993).

É importante ressaltar que o tempo de secagem encontrado para o amaciante teste é superior ao empregado na produção de papaína bruta, relatado na literatura. Sobre este aspecto devem ser consideradas algumas variáveis como diferenças intrínsecas da matéria-prima (mamão integral x látex), temperatura empregada, tipo de secagem (ao sol, secador de tambor, secador de cabine, "spray dryeir", tratamentos químicos etc.), umidade final, entre outros. Por exemplo, Ortiz *et al* (1980) encontrou como adequada a secagem por 6 horas a 50-55°C, utilizando secador de ar corrente (fluxo 210 cm s⁻¹), para obtenção de papaína bruta com 6 ± 2% de umidade.

Nas curvas de secagem (Figura 5) se observa uma elevação no conteúdo de água após 48 horas, que pode ser atribuída à higroscopicidade do material desidratado. Este fenômeno ocorre de forma similar no látex em pó e na papaína. Como consequência, para o armazenamento se faz necessário acondicionar o produto em embalagem não permeável ao vapor d'água (DHAWALIKAR E PANDIT, 1982), a exemplo do vidro adotado no presente trabalho. Castro (1981), em seus estudos sobre produção de papaína bruta e parcialmente purificada, utilizou o plástico como embalagem, entretanto o armazenamento das amostras foi realizado em ambientes com baixa umidade relativa.

5.2- Obtenção do amaciante experimental

Uma vez determinado o tempo adequado para secagem, procedeu-se a elaboração do amaciante experimental. A umidade final do produto, correspondente a uma média de 11,46% (Tabela VI), encontrou-se um pouco acima dos valores citados o látex desidratado, em geral 8 a 10% (ORTIZ *et al*, 1980; POULTER E CAYGILL, 1985). Esta diferença pode ser explicada pelo fato da matéria fluida permitir uma maior desidratação sob condições similares de processo (FELLOWS, 1994). A diferença entre

os lotes pode ter sido influenciada pelo estado da matéria-prima (lote A colhido na plantação e lote B adquirido na CEASA).

TABELA VI - Teor de umidade e rendimento médio da produção de amaciante de carne à base de mamão verde integral

	UMIDADE (g%)	RENDIMENTO (%)
Lote A	10,80	7,94
Lote B	12,11	8,17
χ	11,46	8,06

Pelo fato da matéria-prima consistir em mamão verde, não se considerou adequado fazer comparações de rendimento com o látex, pois a forma de uso seria distinta. Considerando o consumidor final, pretende-se que o primeiro esteja pronto para aplicação direta na carne, enquanto que o outro se destina à purificação e/ou formulações.

Uma interpretação desses dados pode ser feita pela associação com valor agregado: 1,5 kg de mamão verde produz 120 g de amaciante teste, o preço da embalagem de 120 g de amaciante comercial é 7 vezes maior que o da matéria-prima utilizada na elaboração do amaciante teste. É evidente que esta relação não está considerando outros elementos de custo tais como equipamentos, energia e mão-de-obra; por outro lado o mamão verde de desbaste não tem de fato valor comercial e é inevitável na produção de mamão com qualidade para o comércio *in natura*.

5.3- Atividade proteolítica do amaciante experimental

A atividade da papaína foi o parâmetro de qualidade aplicado ao produto imediatamente após sua obtenção e durante o seu armazenamento (Tabela VII e Figura 6). O amaciante experimental obteve resultado de atividade total superior ao amaciante comercial, entretanto ao se considerar a atividade específica, não houve diferença

estatística. Entretanto, os valores encontrados para o AE apresentaram um coeficiente de variação intra grupo superior a 10%, o que é esperado em produto natural, cujo critério de seleção da matéria-prima foi exclusivamente visual.

TABELA VII -Valores médios de atividade proteolítica dos amaciantes.

AMACIANTES		ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EB	ATIVIDADE ESPECÍFICA	PERDA DE ATIVIDADE (%)
• Comercial		2,27	1,68	-
• Experimental	0 dia	3,12	1,64	-
	15 dias	3,20	1,68	0,00
	30 dias	3,12	1,64	0,00
	45 dias	2,98	1,57	4,27
	60 dias	3,13	1,65	0,00
	90 dias	2,26	1,19	27,44
	120 dias	1,37	0,72	56,10

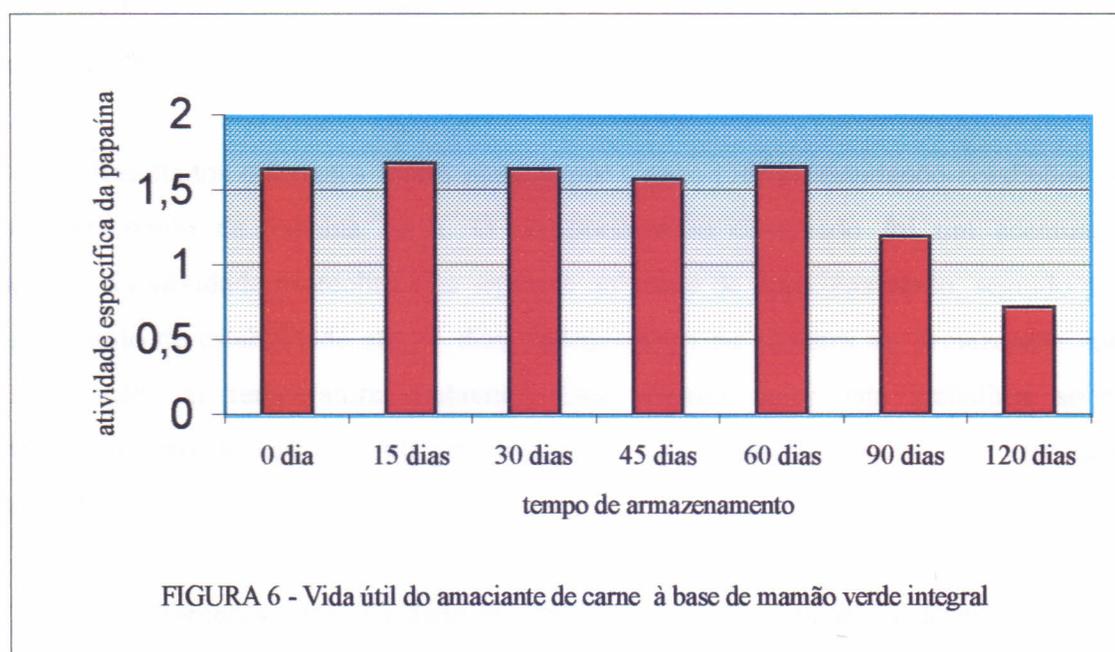


FIGURA 6 - Vida útil do amaciante de carne à base de mamão verde integral

A esse respeito, sabe-se que os métodos não invasivos para seleção de frutos apresenta como principal vantagem o fato de não causar perdas de amostra, porém traz alguns riscos indesejáveis, entre eles uma possível variação nos parâmetros físico-químicos para matérias-primas de similar aparência (KAYS, 1991). A decisão pelo primeiro tipo de seleção na presente pesquisa baseou-se na condição real de eliminação de frutos pelos produtores, para melhoria dos remanescentes.

Os valores para atividade de papaína são bastante variáveis na literatura. Dentre as principais causas desta variação podem ser citadas a não uniformidade do processo de obtenção da enzima e seu grau de pureza, bem como o método analítico empregado. Quanto a este último aspecto, Ortiz *et al.* (1980) destacam a boa reprodutibilidade de métodos fundamentados na leitura de peptídeos solúveis em TCA provenientes da hidrólise da caseína, onde se enquadra o método espectrofotométrico de Kunitz (1947), empregado na presente pesquisa.

Nas Tabela VII e Figura 6 também se verificou que a vida útil do produto seria inferior a 90 dias, pois a perda de atividade (27,44 %) neste período foi significativa. O efeito sobre a carne seria inferior e sua correção passaria por um aumento na quantidade de amaciante recomenda quando atingido este período, o que seria negativo em termos comerciais. O prazo de validade do EC é geralmente de um ano para embalagem fechada e três meses após aberta.

Resultados diferentes foram obtidos por Castro (1981), estudando condições de armazenamento da papaína bruta. O comportamento observado foi um acentuado declínio da atividade proteolítica na segunda quinzena de armazenamento, seguido por um período de estabilidade até 75 dias, independente da amostra ser armazenada sob refrigeração ou temperatura ambiente. Este mesmo autor cita trabalhos sobre armazenamento de látex em pó por dois anos, com variações mínimas da atividade proteolítica.

As diferenças para atividade enzimática no período inicial de armazenamento podem ser atribuídas ao fato do amaciante experimental ter sido submetido a um maior tempo de secagem, no qual provavelmente ocorreram as alterações citadas por Ortiz *et*

al. (1980), comuns às primeiras horas de armazenamento: oxidação, autoproteólise e inibição por compostos endógenos. Estes autores também relatam um subsequente aumento da atividade proteolítica por transformação do precursor em enzima ativa e ação de ativadores inespecíficos de proteases do látex.

Quanto aos distintos limites de vida de prateleira dos amaciantes AC e AE, estes também podem ser atribuídos aos fatores acima descritos, somados a distintas formas da enzima; presença de inibidores e ativadores endógenos ou adicionados; interação outros constituintes; atividade de água etc. (WISEMAN, 1991; OCKERMAN, HARNSAWAS e YETIM, 1993; ALARCON-ROJO e DRANSFIELD, 1995; BAKER *et al*, 1996).

A Figura 7 também permite uma avaliação da atividade proteásica, baseada nas bandas protéicas em carnes tratadas com os diferentes amaciantes. Nela foi observada a similaridade das bandas protéicas de carnes tratadas com ambos amaciantes. Logo, apesar do amaciante experimental ser diferente do comercial, pois não houve nenhuma purificação, foi evidenciada a ação da papaína promovendo uma degradação parcial de proteínas da carne.

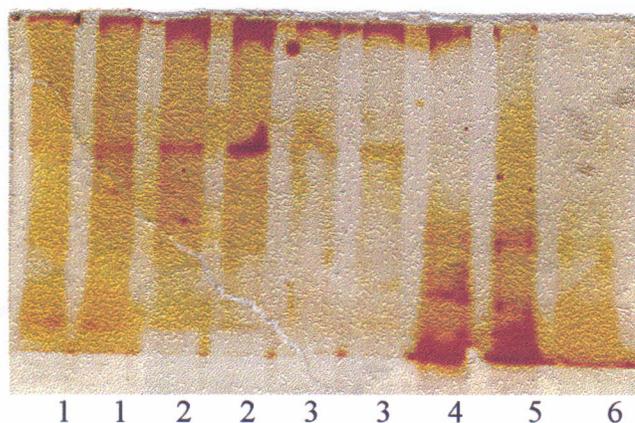


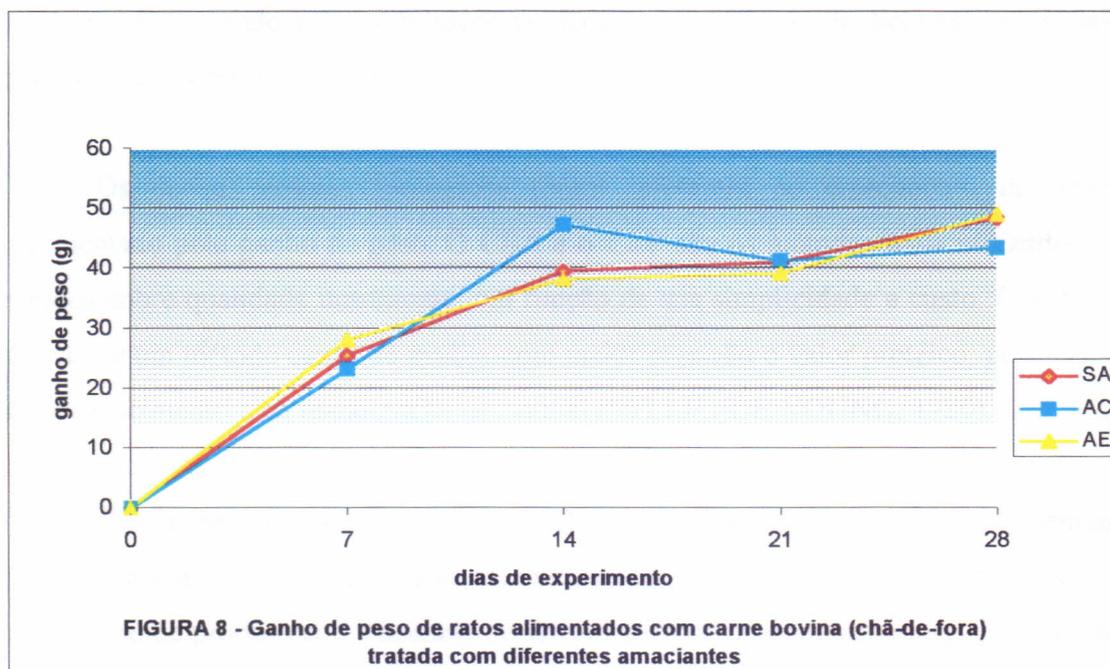
FIGURA 7 – Bandas protéicas dos amaciantes e de carnes amaciadas analisadas por SDS -PAGE. Onde: 1= carne com amaciante experimental, 2= carne com amaciante comercial, 3= carne sem amaciante, 4= amaciante experimental lote B, 5= amaciante experimental lote A e 6= amaciante comercial.

5.4- Ensaios biológicos

Os dados apresentados na Tabela VIII e na Figura 8 são referentes aos ensaios biológicos realizados para verificar a possibilidade de interferência dos amaciantes sobre o valor nutritivo da carne.

TABELA VIII - Valor biológico da carne bovina (chã-de-fora) tratada com diferentes amaciantes

DIETA	DA	CEA	CEP	RPF
Sem amaciante	90,0% ± 2,7	0,40 ± 0,04	3,76 ± 0,44	3,87 ± 0,4
Com amaciante comercial	89,5% ± 2,1	0,36 ± 0,04	3,50 ± 0,41	3,76 ± 0,7
Com amaciante experimental	88,5% ± 4,2	0,36 ± 0,03	3,47 ± 0,31	3,86 ± 0,3



Não houve diferença estatisticamente significativa entre a DA dos grupos estudados (Tabela VIII), logo a prévia ação de proteases nos grupos AC e AE,

confirmada na Figura 7, não modificou a resposta biológica, o que pode ser explicado pelo fato da carne ser um alimento naturalmente com elevada digestibilidade.

A digestibilidade de todos os grupos foi inferior a encontrada na literatura para carne bovina, cujos valores médios correspondem a 99% (FAO,1970). Entretanto, há variações no ensaio biológico e no tipo de músculo empregado, cujo teor de conjuntivo pode influenciar fortemente. Um outro dado importante é digestibilidade avaliada: aparente (DA) ou verdadeira. Para cálculo desta última, considera-se o nitrogênio fecal metabólico, logo o numerador da equação passa a ser relativamente maior: N ingerido - (N fecal - N fecal metabólico).

Ferreira (1991) citou críticas de diferentes autores a respeito do uso de grupo de animais com dieta aprotéica para determinação do N fecal metabólico e discorreu também sobre o cálculo desse parâmetro através de regressão linear, considerando ingestão protéica \times nitrogênio fecal, cujos resultados seriam mais exatos do que os obtidos com a dieta aprotéica. Ambos os métodos resultaram em digestibilidade superior à DA, sendo a digestibilidade verdadeira por inclusão de dieta aprotéica maior que a calculada por regressão.

Os demais ensaios biológicos foram referentes ao crescimento do animal representado pelo ganho de peso. O CEA e o CEP são os métodos mais utilizados nos estudos sobre qualidade nutricional, em função de sua simplicidade e custo. O RPF por sua vez, é um método capaz de avaliar com maior precisão o valor protéico, pois baseia-se no crescimento e na manutenção do animal (PELLETT E YOUNG, 1980).

Conforme demonstrado na Tabela VIII, os resultados destes ensaios também não divergiram entre si, de forma estatisticamente significativa, de onde se depreende que, tratando-se de produto com ausência de fatores tóxicos ou antinutricionais importantes, capazes de comprometerem o metabolismo protéico, a composição aminoacídica da alimentação é fator preponderante. Portanto estes resultados são diferentes dos esperados para leguminosas, cujo valor biológico é melhorado pela ação de proteases, a exemplo do *Phaseolous vulgaris* tratado com papaína (CZARNECKI, GUJSKA E KHAN, 1993).

Considerando os resultados para DA acima citados, mais uma vez confirmou-se como inócua a ação da papaína sobre a qualidade protéica da carne destinada a dieta de animais sadios. Por outro lado esta resposta é desejável pois indica a destruição térmica da enzima, que poderia promover enfermidades ou comprometer o sistema digestivo e conseqüentemente, o aproveitamento biológico das proteínas da dieta, à exemplo do que ocorre por uso inadequado de proteases medicamentosas (HERBELL e MONTI, 1982, BUSH e HEFLE, 1996).

Essa destruição parece contraditória aos dados da literatura, dada a termoestabilidade da papaína, que é superior à temperatura de desnaturação das proteínas da carne (TAKAHASHI, 1991, SUMNER *et al*, 1993). Contudo, possivelmente a forma de apresentação da carne, em bifes com espessura de 0,5 cm, e a cocção em óleo, ou seja, fritura, permitiram uma elevada temperatura por toda a carne.

Entretanto, diferentemente da DA, resultados do CEA, CEP e RPF foram superiores à média dos trabalhos citados pela FAO (1970), possivelmente pelas razões anteriormente expressas.

A curva de ganho de peso dos animais (Figura 8), construída com a média de peso ganho dos animais a cada semana, também não apresentou diferenças estatisticamente significante entre os grupos estudados, ressaltando dietas com qualidade similar.

Os valores ligeiramente mais baixos encontrados para o grupo AC na primeira etapa do experimento podem ser atribuídos ao fato deste grupo ter iniciado os ensaios com peso médio inferior e talvez, pelo menor consumo de dieta neste período, relativo a preferências gustativas, superadas com a adaptação ao produto, como se observa no maior ganho de peso aos 14 dias. Este último fato é uma ocorrência possível em experimentos biológicos cujos parâmetros dependem da quantidade de alimento ingerida, pois esta é influenciada pelas características organolépticas das dietas ofertadas (PELLETT e YOUNG, 1980).

5.5- Análise sensorial

A Tabela IX retratou uma análise estatística dos dados sensoriais. Nela foi observado que apenas a textura na comparação sem amaciante x com amaciante à base de mamão verde integral, apresentou diferença significativa, mais uma vez, confirmando ação da papaína do AE. Para esta comparação, as médias de cor e flavor foram aproximadamente iguais, portanto, não significativas.

Apesar da supremacia em valores absolutos, o fato das melhores médias para a carne amaciada com mamão verde integral, quando comparada à carne com amaciante comercial, não resultarem em diferenças estatísticas significativas pode ser atribuído à dispersão das notas atribuídas pelos juizes do painel (variações de 1 a 6, 2 a 6 e 2 a 7), provavelmente pela não uniformidade da distribuição de enzimas nos tecidos, uma vez que a aplicação foi manual (MELO, 1980).

TABELA IX - Análise sensorial da carne bovina (chã-de-fora) tratada com diferentes amaciantes.

COMPARAÇÕES	ATRIBUTOS*			
	TEXTURA		COR E "FLAVOR"	
	Notas	Médias	Notas	Médias
Sem amaciante x	1 a 3	(2,6)	2 a 6	(4,1)
Com amaciante à base de mamão verde integral	7 a 5	(5,4)	2 a 6	(3,9)
Mann Whitney p<0,05	<i>significante</i>		<i>não significante</i>	
Com amaciante comercial x	2 a 6	(3,4)	1 a 6	(2,6)
Com amaciante à base de mamão verde integral	2 a 6	(4,6)	2 a 7	(5,4)
Mann Whitney p<0,05	<i>não significante</i>		<i>não significante</i>	

Nota: (*)Em escala crescente de 1 a 7, onde 4 corresponde a igual.

A análise sensorial permitiu traçar o perfil subjetivo da carne bovina submetida aos diferentes amaciantes apresentado na Figura 9. Nesta figura, observou-se que em valores absolutos, a carne AE apresentou melhor textura, cor e flavor que as demais.

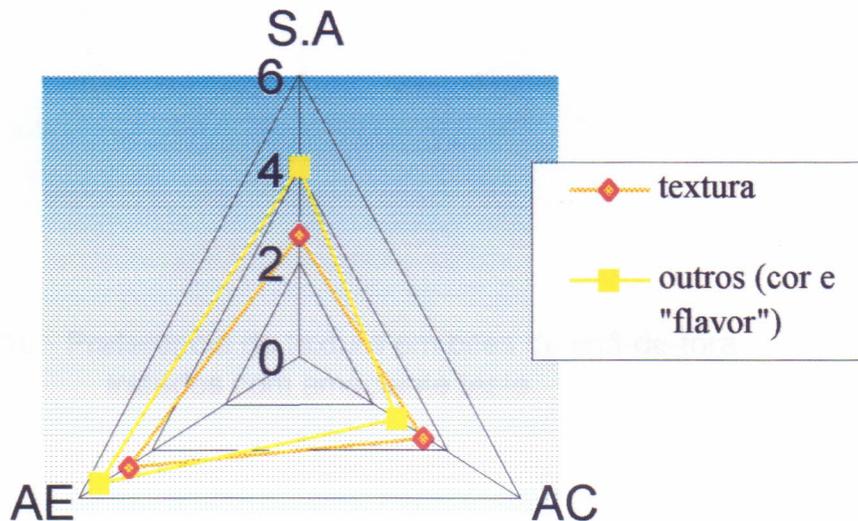


FIGURA 9 - Qualidade sensorial da carne bovina (chã-de-fora) tratada com diferentes amaciantes

As menores notas para textura da carne SA confirmaram a efetividade da ação proteolítica dos amaciantes utilizados. A superioridade do AE sobre o AC para textura pode ser atribuído a uma maior suculência no produto provavelmente por interação de outros constituintes do mamão com a carne, uma vez que a uma proteólise foi similar conforme a visualização das bandas protéicas das carnes amaciadas, analisadas por SDS -PAGE (Figura 7).

Aplicando-se um corte nas notas no valor 4, pelo fato deste, em ordem crescente, corresponder a "igual" na escala hedônica empregada para as notas atribuídas pelos provadores, foram traçados os gráficos relativos a preferência ou aceitabilidade dos produtos em função dos tratamentos empregados à carne (Figuras 10, 11, 12 e 13).

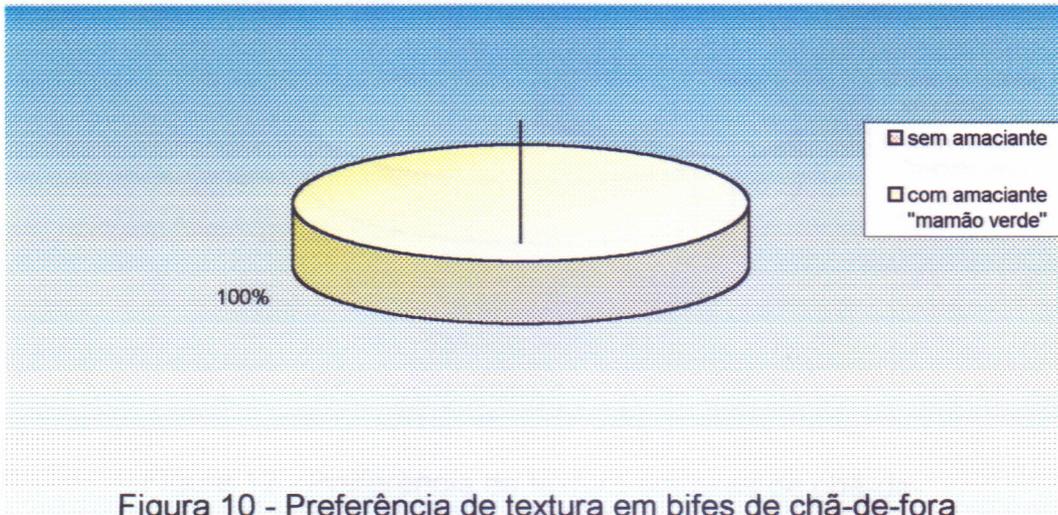


Figura 10 - Preferência de textura em bifes de chã-de-fora tratados com amaciante teste

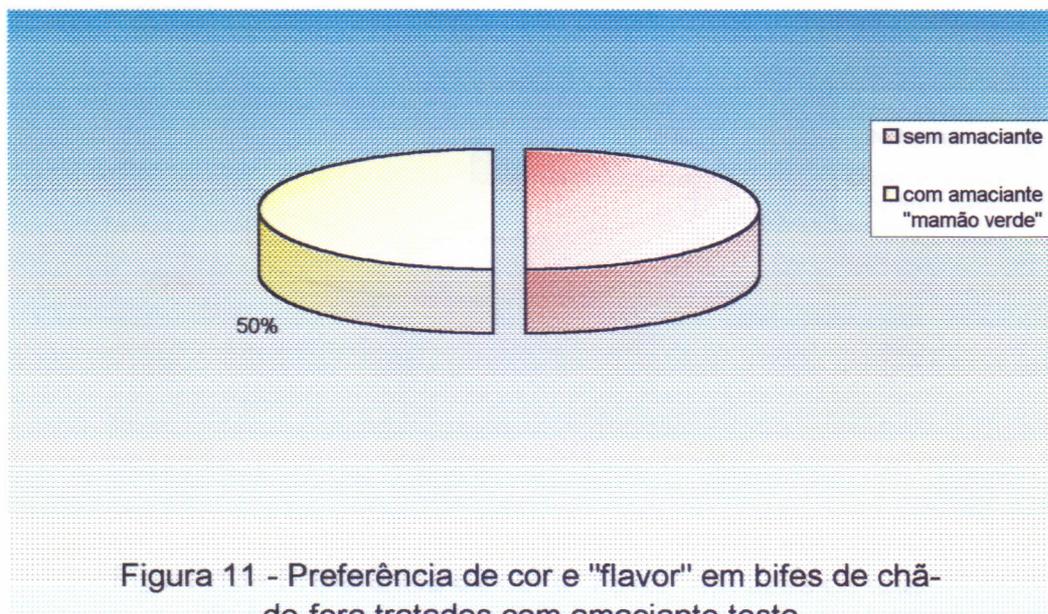


Figura 11 - Preferência de cor e "flavor" em bifes de chã-de-fora tratados com amaciante teste

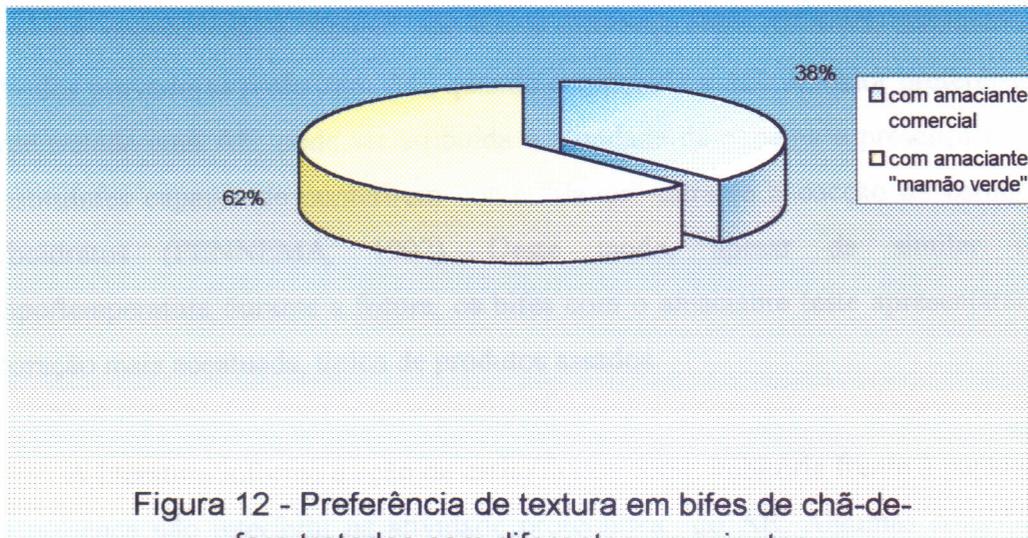


Figura 12 - Preferência de textura em bifes de chã-de-fora tratados com diferentes amaciantes

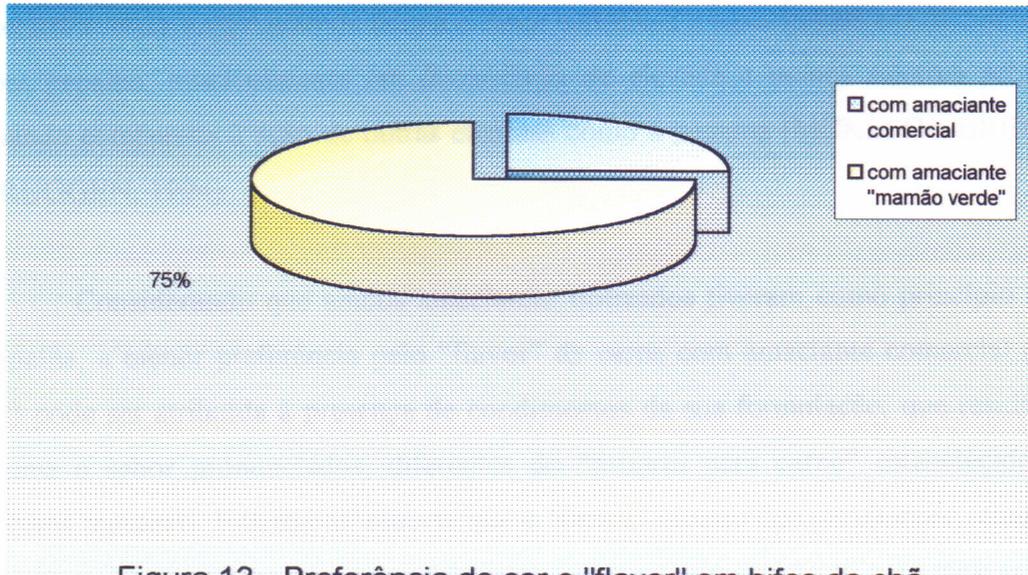


Figura 13 - Preferência de cor e "flavor" em bifes de chã-de-fora tratados com diferentes amaciantes

Como consequência, foi possível verificar os seguintes resultados de aceitabilidade: quanto a textura AE foi melhor que AC e nenhum provador preferiu a carne AS; quanto a cor e "flavor": não houve diferença entre AE e AS, enquanto apenas 25% dos provadores preferiram AC, quando comparada a AE. A maior preferência pela carne tratada com AE, pode ser atribuída à atividade da papaína e presença de outros constituintes capazes de conferirem cor e "flavor" durante a cocção da carne, como carboidratos (FENNEMA, 1992). Deste modo, apesar da similar relação tempo/temperatura durante a fritura, os bifes com o amaciante teste apresentaram uma coloração mais acentuada, típica de produtos assados.

A literatura informa a ação de carboidratos como inibitória frente à papaína, mas sua presença não interferiu na atividade proteolítica do AE. Algumas considerações podem ser feitas, dentre elas o tipo de carboidrato presente, pois é conhecido efetivamente o efeito inibitório da sacarose e este não é o carboidrato predominante no mamão verde (KAYS, 1991; ORTIZ *et al.*, 1980; ESPIN e ISLAN, 1996).

O bom desempenho de "flavor" para o AE foi bastante positivo, visto que a literatura relata surgimento de aroma e sabor estranhos e indesejáveis em carnes tratadas com papaína, possivelmente em decorrência de elevada e menos seletiva proteólise, quando comparada à ação de outras enzimas como a papaína (MCKEITH, BREWER e BRUGGEN, 1994).

Considerando que ambos amaciantes utilizados tiveram como princípio ativo a papaína, a menor preferência pelo "flavor" da carne com amaciante comercial (Figura 13) pode ser atribuída à presença de condimentos da sua formulação, que resultam em aroma e sabor pronunciados, diferentes do "próprio para carne" estabelecido pelos hábitos regionais. Entretanto, sabe-se que o "flavor" intenso dos amaciantes comerciais é bem aceito em outros grupos populacionais e provavelmente é útil para mascarar "off-flavor", caso seja produzido pela papaína.

Sabe-se que as respostas sensoriais são decisivas na elaboração de alimentos e ingredientes alimentícios, pois na escolha do consumidor isto é o fator mais importante quando comparados produtos no mesmo patamar de competitividade.

Sob esse aspecto, os resultados obtidos com o AE são promissores, em um mercado consumidor que valoriza a maciez da carne. Esta característica pode ser facilmente observada em função do valor comercial dos cortes de carne bovina, onde as carnes de primeira têm um preço mais elevado que as demais e nelas se destaca o filé (músculos *psoas major*, *psoas minor*, ilíaco e quadrado lombar), cuja qualidade é representada pela extrema maciez em relação aos outros cortes (KASTNER e FELÍCIO, 1980; PARDI *et al.*, 1995).

Entretanto, uma leitura global dos dados obtidos nesta pesquisa demonstra que o amaciante experimental necessita de ajustes tecnológicos para que sua composição e principalmente sua atividade proteolítica tenha o mínimo de variabilidade, de forma a garantir maior vida de prateleira e similar ação enzimática.

Nesse sentido, possivelmente pode ser adotada uma seleção de matéria-prima mais rigorosa, considerando estudos que retratem a relação idade do fruto \times rendimento em amaciante \times atividade enzimática. Também podem ser adicionados de agentes ativadores ou protetores da atividade proteolítica, conhecidamente eficazes sobre proteases cisteínicas, como sulfitos, tetratoato de sódio, ascorbato e EDTA. Estes estudos devem estar associados ao acondicionamento do produto sob vácuo ou gás inerte (ORTIZ *et al.*, 1980; ESPIN e ISLAN, 1996).

Uma outra alternativa pode estar no estabelecimento de formulações para melhor facilidade de uso, visto que é possível uma interação negativa com alguns condimentos. Para tanto, evidentemente, deve ser considerado o hábito alimentar da clientela a que se destina.

Os ensaios sobre melhoria do amaciante experimental não devem se esgotar na obtenção do produto em si, nem estudos de vida de prateleira, mas considerar ainda a sua melhor técnica de aplicação, julgando a forma e o tempo de aplicação, bem como a apresentação da carne (ORTIZ *et al.*, 1980; TAKAHASHI, 1991; ESPIN e ISLAN, 1996).

6-Resumo dos resultados

Quanto a produção de amaciante de carne à base de mamão verde integral, tendo como padrão de referência o amaciante comercial, correspondendo a uma formulação à base de papaína, o presente trabalho verificou os resultados seguintes.

- O tempo ideal de secagem do amaciante de carne à base de mamão verde integral foi de 22 horas a 55°C.
- O rendimento do produto correspondeu a 8,6%, com um teor de umidade médio de 11,46 g%.
- A atividade proteolítica do amaciante experimental foi similar ao amaciante comercial, considerando a atividade específica da papaína e as frações protéicas visualizadas por SDS-PAGE.
- A vida útil do produto do amaciante de carne à base de mamão verde integral foi inferior a 90 dias.
- O uso de amaciante não interferiu sobre o valor biológico da carne, considerando DA, CEA, CEP, RPF e ganho de peso dos animais.
- Em valores absolutos, a carne tratada com o amaciante experimental apresentou melhor textura, cor e flavor, quando comparada a carne sem amaciante e carne com amaciante comercial. Porém, estatisticamente este fato não foi significativo.
- Houve uma menor preferência pelo “flavor” da carne tratada com amaciante comercial.

7- Conclusões

Nas condições em que esta pesquisa foi implementada, os resultados obtidos permitem afirmar que é viável a fabricação do amaciante à base de mamão verde integral, cuja ação sobre a carne resulta em melhor aceitabilidade, sem comprometer o valor biológico da mesma.

Entretanto, faz-se necessária a realização de estudos complementares que permitam uma aumento de vida útil do produto, bem como o desenvolvimento de formulações que minimizem a variação da atividade proteolítica, para que possam ser estabelecidos padrões de identidade e qualidade do amaciante.

8-Referências bibliográficas

- ALARCON-ROJO, A. D.; DRANSFIELD, E. Alteration of post-mortem ageing in beef by addition of enzymes inhibitors and activators. **Meat science**, 41 (2): 163-178, 1995.
- ANZALDUA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza: Acribia, 1994. 198p.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. Washington: Association Official of Analytical Chemistry, 1995. 1018 p.
- BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS C. Proteolytic enzymes in *Carica cadamarcensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 51 (1): 1-9, 1990.
- BAILEY, A. J. The chemistry of collagens cross-links and their role in meat texture. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE. 42. **Proceedings**. American Meat Science Association, 1989. n. 1-14, p. 127-135.
- BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. London: Elsevier Applied Science, 1989. P.355.
- BAILEY, J. L. **Techniques in protein chemistry**. London: Elsevier, 1967, p. 294.
- BAKER, K. C.; TAYLOR, M. A. J.; CUMMINGS, N. J.; TUÑÓN, M. A.; WORBOYS, K. A.; CONNERTON, I. F. Autocatalytic processing of pro-papaya proteinase IV is prevented by crowding of the active-site cleft. **Protein Engineering**, 9 (6): 525-529, 1996.
- BERNHOLDT, H. F. Meat and other proteinaceous foods. In: REED, G. **Enzymes in food processing**. 2 ed. New York: Academic Press, 1975. p. 473-492.

- BLUN, R.; BEIER, H.; GROSS, J.K. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA. *Gels electrophoresis*, (8): 93-99, 1987.
- BOM, E.P.S. Enzimas na indústria de alimentos. In: RODRIGUEZ-AMAIA, D.B.; PASTORE, G.M. (eds.). **Ciências de alimentos: avanços e perspectivas na América Latina**. Campinas, Fundação Cargill, 1997.
- BROCKLEHURST, K.; BAINES, B.S.; KIERSTAN, M.P.J. Papain and other constituents of *Carica papaya* L. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, 5: 262-335, 1981.
- BURDICK, E. M. New processes proposed to make U.S. papaya an industrially useful crop. **Chemurgie Digest**, 7 (4-6): 12, 1957.
- BUSH, R. K.; HEFLE, S. L. Food allergens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36 (suppl.): s119-s163, 1996.
- BUTLE, D.J.; KEMBHAVI, A. A.; SHARP, S. L.; SHUT, R. E., RICH, D. H.; BARRETT, A. J. Affinity purification of the novel cysteine proteinase papaya proteinase IV, and papain from papaya latex. **Biochemical Journal**, 261 (2): 469-476, 1989.
- CARRILLO, R.; LOPEZ, N. Pilot scale evaluation of the use of papain in maceration of malt for beer. **Alimentária**, 273: 93-95, 1996.
- CARVALHO, G. M. **Obtenção de papaína**. Salvador: CEPED/SUDENE, 1976. 118 p.
- CASEY, N.H. Goat meat in human nutrition. INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 5, New Delhi. PRE-CONFERENCE. **Proceedings**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research, 1992. v. 2-2, p.581-598.
- CASTRO, I. R. Studies on papain production. **NSDB Technology Journal**, 6(2): 61-66, 1981.

- COHEN, L. W.; FLUHARTY, C.; DIHEL, L. C. Synthesis of papain in *Scherichia coli*. **Gene**, 88 (2): 263-267, 1990.
- CROSS. H. R. Características Organolépticas de la Carne. In: PRICE, J. F., SCHWELGRT, B.S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. 2. ed Zaragoza: Acribia, 1994. 577p. p.279-297.
- CZARNECKI, Z.; GUJSKA, E.; KHAN, K. Extrusion of pinto bean protein fraction pretreated with papain and cellulase enzymes. **Journal of Food Science**, 58 (2): 395-398, 1993.
- DHAWALIKAR, H. S.; PANDIT, M. W. Stability studies on papain under varing time and temperature of storage. **Research and Industry Indian**, 27 (1): 22-26, 1982.
- DIAZ, O.; FERNANDEZ, M.; GARCIA DE FERNANDO, G. D.; HOZ, L. de la; ORDENEZ, J. A. Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected exogenous proteases. **Meat Science**, 46 (1): 115-128, 1997.
- DIEZ-GOMEZ, M. L., QUIRCE, S. CUEVAS, M., SANCHEZ-FERNANDES, C., BAZ, G., MORADIELOS, F. J., MARTINEZ, A. Fruit pollen latex croos reactivity: implication of profilin. **Allergy**, 54 (9): 951-961, 1999.
- DRENTH, J., JANSONIUS, J. N., WOLTHERS, B. G. The crystal estrutura of papain II. A threedimensional Fourier synthesis at 4,5 °A resolution. **Journal of Molecular Biology**, 24: 449-457, 1967.
- ESPIN, N. F.; ISLAM, M. N. Stabilization of papain from papaya peels. In: IFT ANNUAL MEETING, 1996. **Abstracts**. Institute of Food Technologists -USA, 1996, p. 15.
- ETEHERINGTON, D. J., BARDSLEY, R. G. Enzymes in the meat industry. In:TUCKER, G. A., WOODS, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2 ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. 319 p. p. 144-189.

- FAO. Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. **FAO - Estudios sobre Nutrición**. N 24 . Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1970. 285 p.
- FAO. Utilization de alimentos tropicales: frutos y hojas. **Estudio FAO Alimentación y Nutrición**, 47/7. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1990. 62 p.
- FAO. Statistical databases. <http://www.fao.org>. 1998
- FEIJO, G. L. D.; MULLER, L. Effects of low-voltage electrical stimulation on beef quality. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 29 (12): 1987-1994, 1994.
- FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de alimentos: principios y prácticas**. Zaragoza: Acribia, 1994. 549 p.
- FENNEMA, O.R. **Introducción a la ciencia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 1095 p.
- FERREIRA, H. da S. **Utilização de proteínas na desnutrição induzida pela dieta básica regional, associada à esquistossomose mansônica em camundongos**. Tese Mestrado. Fortaleza: Universidade Federal de Pernambuco, 1991. 100 p.
- GIL, M.; SARRAGA, C. Isolation and characteristics of a porcine muscle cysteine proteinase inhibitory fraction. **Food Biotechnology**, 11 (1): 59-71, 1997.
- GROVES, M. R.; TAYLOR, M. A. J.; SCOTT, M.; CUMMINGS, N.J.; PICKERSGILL, R. W.; JENKINS, J. A. The prosequence of procaricain forms an α -helical domain that prevents access to the substrate binding cleft. **Structure**, 4 (10): 1193-1203, 1996.

- HAMER, R. J. Enzymes in the baking industry. In: TUCKER, G. A., WOODS, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2 ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. 319 p. 190-222.
- HASHIM, I. B.; MCWATTERS, K. H.; HUNG, Y. C. Marination method and honey level affect physical and sensory characteristics of roasted chicken. **Journal of Food Science**, 64 (1): 163-166, 1999.
- HEBBEL, H. S.; MONTE, I. P. **Las enzimas en los alimentos: su importancia en la química y la tecnología de los alimentos**. Santiago: Fundación Chile, 1982. 93 p.
- HIRSCHLER, E. M.; SAMS, A. R. The influence of comercial-scale eletrical stimulation on tenderness, breest meat yield, and production costs. **Journal Applied Poultry Research**, 7 (1): 99-103, 1998.
- IBGE. **Produção agrícola brasileira-1995: área destinada à colheita, área colhida, quantidade rendimento médio e valor da produção do mamão, segundo as grandes regiões e as unidades da federação**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1996.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola - LSPA/IBGE. <http://www.sidra.ibge.gov.br>. 1998.
- JAIME, I.; BELTRAN, J. A.; CENE, P.; RONCALES, P. Rapid chilling of light lamb carcasses results in meat as tender as that obtained using conventional conditionig practices. **Sciences des Aliments**, 13: 89-96, 1993.
- JEREMIAH, L. E. A review of factors affecting meat quality. **Technical Bulletin 1**, Res., Branch, Agriculture Canada, p. 42-54, 1978.
- JEREMIAH, L. E.; MURRAY, A. C. The influence of anatomical location within the longissimus dorsi muscle tenderness and on the concentration and on the concentration and solubility of intramuscular collagenon. **Journal of Animal Science**, 64: 1045-1047, 1984.

JOSEPH, R. L. Vary fast chilling of beef and tenderness - A report from na EU concerted action. **Meat Science**, 43 (s): s217-s227, 1996.

KAYS, S. J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: AVI, 1991. 532 p.

KASTNER, C. L.; FELÍCIO, P. E. de. Tratamentos que influem na maciez da carne bovina no período pós-abate. **Boletim Técnico do Centro de Tecnologia da carne**, 5: 31-64, 1980.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, 43 (s): S193-S201, 1996.

KUNITZ, M. Crystalline trypsin inhibitor. II General properties. **Journal Gen. Physiology**, 30: 295-310, 1947.

LABUZA, T. P.; LILLEMO, J. H.; TAOUKIS, P. S. Die hemmung von polyphenoloxidasen durch proteolytische enzyme. **Fluessinges Obst**, 59 (1): 15-20, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-5, 1970.

LAWRIE, R. A. **Meat science**. 4. ed. New York: Applied Science Publisher, 1985. 456 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 2 ed. New York: Worth Publishers, 1993. 1013 p.

LEWIS, D. A.; LUH, B. S. Application of actinidina from kiwifruit to meat tenderization and characterization of beef muscle protein hidrolisis. **Journal of Food Biochemistry**, 12 (13): 147-158, 1988.

- LOCKER, R. H.; HAGYARD, C. J. A cold shortening effect in beef muscle. **Journal of Science Food and Agriculture**, 14: 787-793, 1963.
- MADRIGAL, L.; ORTIZ, A.; COOKE, R.D.; FERNANDEZ, R. The dependence of crude papain yields on different collection ("tapping") procedures for papaya latex. **Journal of Science Food and Agriculture**. 31: 279-285, 1980.
- McGEEHIN, B.; SHERIDAN, J. J.; BUTLER, F. Further investigations on the ultra rapid chilling of lamb carcasses. **Journal of Muscle Foods**, 10 (1): 1-16, 1999.
- MCKEITH, F. K.; BREWER, M.S.; BRUGGEN, K.A. Effects of enzyme applications on sensory, chemical and processing characteristics of beef steaks and roast. **Journal of Muscle Foods**, 5: 149-164, 1994.
- MELO, E. C. do A. e . **Ação de algumas enzimas proteolíticas vegetais no amaciamento do músculo bovino**. Tese Mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1980. 80 p.
- MENDIRATTA, S.K.; PANDA, P.C. Synergetic effect of pressure and enzyme treatment for tenderization of spent hen meat. **Journal of Food Science and Technology**, 32(1): 50-52, 1995.
- OCKERMAN, W. H.; HARNSAWAS, S.; YETIM, H. Inhibition of papain in meat by potato protein or ascorbic acid. **Journal of Food Science**, 58 (6): 1265-1268, 1993.
- OSLON, D. G. Princípios de química cárnica. In: RUST, R. E., OROZO, A. S. **Cursilo teorico/Prático de tecnologia cárnica**, Iowa: State Universty, 1989. p. 1-10.
- ORESKOVICH, D. C.; BECHTEL, P. J.; MCKEITH, F. K.; NOVAKOFSKI, N.; BASGALL, E. J. Marinade pH affects textural properties of beef. **Journal of Food Science**, 57 (2): 305-311, 1992.

- ORTIZ, N. A.; MADRIGAL, S. L.; FERNANDEZ, H. R.; COOKE, R. D. The storage and drying characteristics of papaya (*Carica papaya* L.) latex. **Journal of the Science of Food and agriculture**, 31 (5): 510-514, 1980.
- PARDI, M. C., SANTOS, I. J., SOUZA, E. R., PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. v. 1. Goiânia: EDUFF, UFG, 1995. 586 p.
- PELLETTE, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokio: The United Nations University, 1980. The United Nations University, World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin, Supplement 4, 154 p.
- PIHLAJANIEMI, T.; REHN, M. Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and type XI e XVIII. **Progress in Nucleic Acid Research**, 50: 225-262, 1995.
- POULTER, N. H., CAYGILL, J. C. Production and utilization of papain - a proteolytic enzyme from *Carica papaya* L. **Journal of Tropical Science**, 25: 123-137, 1985.
- PROLYSIS 2000. http://www.imb-jena.de/ImgLibPDB/9pap/9pap_moreau_1.jpeg
- RADHAKRIHNNAN, K.T; RAMAMURTHI, R. Effect of antemortem treatment with papain on organoleptic changes in mutton. **Cheiron**, 16(6): 261-262, 1987.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, 123 (10): 1939-1951, 1993.
- RISVIK, E. Sensory properties and preferences. **Meat Science**, Barking, 36: 67-77, 1994.
- RITONJA, A.; BUTTLE, D. J.; RAWLINGS, N. D.; TURK, V.; BARRETT, A. J. **FEBS Letters**, 258 (1): 109-112, 1989.

ROMANELLI, P. F.; TORRES-QUEIROZ, E. L. M.; CERON, C. R. Caracterização preliminar da enzima proteolítica do gravatá (*Bromélia faustosa*). **Boletim da SBCTA**, 28 (2): 120-133, 1994.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**, 266 (3): 869-875, 1990.

SEUSS, I.; MARTIN, M. Composition and sensory properties of beef - influence of marination in food acids. **Fleischwirtschaft**, 71 (11): 1269, 1991.

SEYMOUR, G. B., TAYLOR, J. E., TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London, Chapman & Hall, 1993. 454 p.

SHEARD, P. R.; NUTE, G. R.; RICHARDSON, R. I.; PARRY, A.; TAYLOR, A. A. Injection of water and polyphosphate into pork to improve juiciness and tenderness after cooking. **Meat Science**, 51 (4): 371-376, 1999.

SHIMOKOMAKI, M. Amaciamento de carne - ação de enzimas proteolíticos sobre o colágeno de músculos e tendões de boi. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29: 23-24, 1974.

SHIMOKOMAKI, M.; WRIGHT, D. W.; IRWIN, M. H.; MAYNE, R.; VAN DER REST, M. Cross-links in cartilage fibers. In: BRAZILIAN CONGRESS ON PROTEIN. 1. Editora UNICAMP, 1991. P. 432-442.

SILVA, S. F. **Desidratação osmótica do mamão formosa**. Dissertação de Mestrado. PPGEQ-UFRN, 73 p., 1998.

SMITH, G. C.; WEST, R. L.; REA, R. H.; CARPENTER, Z. L. Increasing the tenderness of bullock beef by use ante-mortem enzyme injection. **Journal of Food Science**, 38: 182-183, 1973.

SUMNER, I. G.; HARRIS, G. W.; TAYLOR, M. A. J.; PICKERSGILL, R. W.; OWEN, A. J.; GOODENOUGH, P. W. Factors effecting the thermostability of

cysteine proteinases from *Carica papaya*. **European Journal of Biochemistry**, 214: 129-134, 1993.

TAKAHASHI, G. Técnicas para melhorar a qualidade da carne: fatores "post-mortem". **Revista Nacional da Carne**, 184: 27-31, 1991.

TAYLOR, M. A. J.; BAKER, K. C.; BRIGGS, G. S.; CONNERTON, I. F.; CUMMINGS, N. J.; PRATT, K. A.; REVELL, D.F.; FREEDMAN, R. B.; GOODNOUGH, P. W. Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. **Protein Engineering**, 8 (1): 59-62, 1995.

TUCKER, G. A., WOODS, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2 ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. 319 p.

VEGA, I. S. Frutales andinos. In: BERMEJO, J. E. H.; LEON, J. **Cultivos marginados: outra perspectiva da 1942**. Colección FAO: producción y protección vegetal, no 26. Roma: FAO, 1992. 339 p. p.179-189.

WEHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Effect of postmortem injection time and postinjection aging time on the calcium-activated tenderization process in beef. **Journal of Animal Science**, 75 (10): 2652-2660, 1997.

WIEDERANDERS, B.; BROEMME, D.; KIRSCHKE, H.; KALKKINEN, N.; RINNE, A.; PAQUETTE, T.; TOOTHMAN, P. Primary structure of bovine cathepsin S. Comparison to cathepsins L, H, B and papain. **FEBS Letters**, 286 (1/2): 189-192, 1991.

WIKLUND, E.; BARNIER, V. M. H.; SMULDERS, F. J. M.; LUNDSTROM, K.; MALMFORS, G. Proteolysis and tenderization in reindeer (*rangifer tarandus tarandus* L.) bull *Longissimus thoracis* muscle of varying ultimate pH. **Meat Science**, 46 (1): 33-43, 1997.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991.
444p.