

AÇÃO DE ALGUMAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS VEGETAIS NO
AMACIAMENTO DE MÚSCULOS BOVINOS

POR

EVANDRO CAMPOS DO AMARAL E MELO

Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de "Mestre em Tecnologia de Alimentos".

FORTALEZA / CEARÁ

SETEMBRO/1980

DECLARAÇÃO DO AUTOR

Esta tese faz parte dos requisitos exigidos pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Reprodução parcial permitida exclusivamente com referência da fonte e autor.

Evandro Campos do Amaral e Melo

Aprovada em 31 de outubro de 1980.

Prof. Carlos Brunet Martins - PhD
Orientador

Prof. Geraldo Arraes Maia - PhD

Prof. José de Anchieta Moura Fé - PhD

Prof. José Tarcisio Sampaio Pimenta - MS

Prof. Humberto Ferreira Oriá - MS

A

meus pais (in memoriam)

À minha esposa TEREZINHA
e aos meus filhos DJALMA
e SUZANA
DEDICO este trabalho.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar seus sinceros agradecimentos à Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE) e ao Banco do Nordeste do Brasil S.A. (BNB), pela oportunidade e apoio financeiro à realização do Curso de Mestrado.

Ao Dr. Carlos Brunet Martins, pelas facilidades oferecidas à execução desta pesquisa, pela orientação técnica e amizade.

Aos Profs. Geraldo Arraes Maia, José de Anchieta Moura Fé, José Tarcísio Sampaio Pimenta e Humberto Ferreira Oriá, pelas sugestões, esclarecimentos e revisão dos originais.

Aos Drs. Luciano Flávio Frota de Holanda, Milton Moreira de Souza e Hermano Souto Nóbrega, pelo estímulo, confiança e amizade.

Aos Profs. José Jackson de Albuquerque, Vera Augusta Nepomuceno e Margarida Miranda, dos Departamentos de Estatística e de Biologia do Centro de Ciências da UFC, pela orientação e participação nas partes relativas às suas especialidades.

Aos meus irmãos e amigos pelo constante apoio e solidariedade dedicados nos momentos mais difíceis.

Ao Frigorífico BOIADA, em Fortaleza, pela cessão da matéria prima e das suas instalações.

Aos professores, colegas e funcionários técnicos e administrativos do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UFC, pelo estímulo, colaboração e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

S U M Á R I O

	PÁGINA
<u>LISTA DE TABELAS</u>	vii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	ix
<u>RESUMO</u>	x
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	3
2.1 - Aspectos gerais	3
2.2 - Maciez	4
2.3 - Estrutura muscular	5
2.4 - Fatores "antemortem"	10
2.5 - Fatores "post-mortem"	14
2.6 - Cocção	19
2.7 - Amaciamento enzimático	20
3 - <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	29
3.1 - Materiais	29
3.1.1.- Matéria prima	29
3.1.2 - Enzimas	29
3.1.3 - Substratos artificiais	30
3.2 - Métodos	30
3.2.1 - Determinação da atividade proteolítica das enzimas, usando-se a caseína como substrato	30
3.2.2 - Determinação da atividade proteolítica das enzimas, usando-se a hemoglobina como subs trato	31
3.2.3 - Experimentos tecnológicos	32
3.2.3.1 - Preparo da amostra	32

Continuação:

	PÁGINA
3.2.3.2 - Aplicação da solução enzimática.	33
3.2.3.3 - Técnica de cocção.....	33
3.2.3.4 - Medição da tenrura	33
3.2.3.4.1- Por processo mecânico	33
3.2.3.4.2- P/observ. histológica	34
3.2.3.4.3- Por análise sensorial	37
4 - <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	38
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	47
6 - <u>ABSTRACT</u>	48
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	73

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA</u>		<u>PÁGINA</u>
1	Atividade enzimática da bromelina "BIOBRAS", sobre a caseína, em diferentes temperaturas e pH 5,5-6,0	49
2	Atividade enzimática da bromelina "MERCK", sobre a caseína, em diferentes temperaturas e pH 5,5-6,0 .	50
3	Atividade enzimática da papaina "CEPED", sobre a caseína, em diferentes temperaturas e pH 5,5-6,0 .	51
4	Atividade enzimática da papaina "MERCK", sobre a caseína, em diferentes temperaturas e pH 5,5-6,0 .	52
5	Ação hidrolítica de diversas concentrações de bromelina "BIOBRAS" sobre a caseína, à temperatura de 35°C e pH 5,5-6,0	53
6	Ação hidrolítica de diversas concentrações de bromelina "MERCK" sobre a caseína, à temperatura de 35°C e pH 5,5-6,0	54
7	Ação hidrolítica de diversas concentrações de papaina "MERCK" sobre a caseína, à temperatura de 35°C e pH 5,5-6,0	55
8	Ação hidrolítica de diversas concentrações de bromelina "BIOBRAS", sobre a hemoglobina, à temperatura de 35°C e pH 5,5-6,0	56
9	Ação hidrolítica de diversas concentrações de bromelina "MERCK", sobre a hemoglobina, à temperatura de 35°C e pH 5,5-6,0	57
10	Ação hidrolítica de diversas concentrações de papaina "MERCK", sobre a hemoglobina, à temperatura de 35°C e pH 5,5-6,0	58

Continuação:

TABELA

PÁGINA

11	Resultado da análise sensorial, realizada através do teste de ordenação (*), por um painel de 10 <u>pro</u> vadores, do "Longissimus dorsi"	59
12	Medição mecânica da maciez alcançada pelos <u>diver</u> sos músculos, após submetidos a diferentes <u>prepara</u> ções enzimáticas	60
13	Percentagem de eficiência da aplicação de soluções enzimáticas sobre os músculos estudados	63

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>PÁGINA</u>
1	Atividade das enzimas sobre a caseína em um pH entre 5,5 e 6,0, submetidas a diferentes temperaturas	64
2	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações de bromelina "BIOBRAS" sobre a caseína, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	65
3	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações de bromelina "MERCK" sobre a caseína, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	66
4	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações de papaina "MERCK" sobre a caseína, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	67
5	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações de bromelina "BIOBRAS" sobre a hemoglobina, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0..	68
6	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações de bromelina "MERCK" sobre a hemoglobina, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	69
7	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações da papaina "MERCK" sobre a hemoglobina, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	70
8	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações enzimáticas sobre a caseína, à uma temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	71
9	Variação da absorvância, em função de diferentes concentrações enzimáticas sobre a hemoglobina, à temperatura de 35°C e pH entre 5,5 e 6,0	72

RESUMO

Este trabalho visou medir a atividade das enzimas proteolíticas de origem vegetal - papaina e bromelina - sobre substratos artificiais, bem como sua atuação sobre músculos bovinos localizados tanto na parte dianteira, como na traseira do animal.

O estudo visando medir o poder de hidrólise das citadas enzimas sobre a caseína e a hemoglobina, a 35°C, demonstrou ser a bromelina MERCK a de maior eficiência. De um modo geral, todas as enzimas apresentaram maior poder específico sobre a hemoglobina que sobre a caseína.

A atuação das mencionadas proteínas sobre os músculos, foi determinada através de três parâmetros distintos: análise sensorial, medição mecânica e observação histológica. No primeiro deles, constatou-se uma diferença significativa a nível de 5% entre a amostra-controle e todas as demais amostras; dentre essas, constatou-se a esse mesmo nível, (P 0,05), que sobre o Longissimus dorsi as soluções de bromelina/papaina 3:2, papaina e de bromelina foram as mais efetivas.

Através da medição mecânica, observou-se que a papaina, isoladamente, foi mais eficiente sobre o Infraspinatus e o Supraspinatus nos percentuais de 35,75 e 20,44%; sobre o Semimembranosus a solução mais ativa foi a de bromelina, no percentual de 27,45%. Por sua vez, o Longissimus dorsi demonstrou ser mais sensível à ação da solução de papaina/bromelina 4:1, em 44,35%.

Sob o ponto de vista histológico, constatou-se com bastante evidência, alterações estruturais nas amostras-experimento, tanto a nível das fibro-células musculares, quanto dos elementos conjuntivos. Esses resultados confirmaram, outrossim, que o efeito

da papaina parece ser mais efetivo nos Infraspinatus, Semimembranosus e Supraspinatus que em relação ao Longissimus dorsi.

Os parâmetros estudados neste trabalho, apresentaram resultados convergentes, que confirmam a adequabilidade da aplicação de enzimas proteolíticas para a melhoria qualitativa da carne que ora é ofertada pelo mercado.

I - INTRODUÇÃO

Em função de sua composição química, rica em proteínas de alta qualidade, vitaminas do complexo B, gorduras, certos minerais indispensáveis ao metabolismo e à sua palatabilidade, a carne é considerada um dos alimentos mais importantes, sob o ponto de vista energético e nutricional. Estas características têm despertado um crescente interesse dos pesquisadores da área, levando-os a procederem estudos mais profundos,

Os estudos, além de visarem o aumento da oferta, pela melhoria dos padrões genéticos do rebanho e/ou das técnicas de manejo, objetivam também atingir os fatores limitantes determinados pelos consumidores, progressivamente mais exigentes quanto à qualidade da carne, face aos preços elevados pela qual ela é oferecida ao mercado.

Dentre as várias espécies animais utilizados na produção de carne, a bovina é indiscutivelmente a de maior importância e conômica, razão pela qual a maioria dos trabalhos está devotada a esta espécie.

Fundamentalmente, duas áreas são perseguidas nesses trabalhos: aumento da produção e processamento.

A primeira área, exige uma substancial demanda de tempo e de recursos, enquanto que a de processamento, pode oferecer resultados mais rápidos, pois busca a melhoria da qualidade do material já existente.

O Brasil atualmente dispõe de um rebanho bovino calculado em aproximadamente 110 milhões de cabeças (19). Entretanto uma grande parte desta população é constituída de animais de baixo padrão genético. Esta característica, aliada às insuficientes práticas de alimentação, carente estado sanitário e inadequado manejo,

justificam as reduzidas taxas de natalidade, de sobrevivência e de desfrute, assim como os longos períodos que são necessários para que os animais atinjam pesos economicamente ideais para o seu abate.

A baixa qualidade do nosso rebanho - especialmente no Nordeste - é um fator preponderante na composição dos custos de produção desse alimento. Tendo em vista este aspecto do problema, nas condições estruturais exigem que se introduzam procedimentos de beneficiamento que, ao invés de incidirem gravosamente no preço de venda da carne, permitam diminuí-los, seja pela eliminação parcial dos valores intrínsecos entre os músculos dianteiros e traseiros, seja pela redução dos custos operacionais entre o período que se inicia no abate e termina com o alcance da plena maturação.

Um desses procedimentos, já utilizados em larga escala nos países tecnicamente mais desenvolvidos, é a aplicação de enzimas proteolíticas na tenrificação das carnes. Considerando que as pesquisas brasileiras nessa área são praticamente inexistentes, principalmente na parte relativa ao seu processamento, este trabalho pretende oferecer alguma contribuição para o estabelecimento dessa tecnologia.

Os objetivos básicos da pesquisa podem ser resumidos em dois itens igualmente importantes:

- avaliar o efeito amaciador das enzimas proteolíticas de origem vegetal - papaina e bromelina - sobre determinados músculos bovinos;
- medir a eficiência da aplicação de combinações destas enzimas na tentativa de estabelecer uma composição com máxima capacidade amaciadora.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Aspectos Gerais

A ciência da carne, de acordo com FORREST et alii (11), é um amplo campo de pesquisas onde é estudado basicamente o músculo e outros tecidos animais, que são utilizados como alimento, não se limitando todavia, ao entendimento das funções específicas dos tecidos. Segundo o mesmo autor, esta ciência abrange todos os aspectos da pecuária e industrialização da carne, começando pela sua produção e terminando com a preparação final para o consumo.

Dentre as inúmeras etapas de desenvolvimento e processamento que o tecido animal experimenta, antes de estar em condições para ser utilizado como alimento, um dos mais importantes é sem dúvida o período necessário à sua maturação. Neste período ocorre a transformação do músculo em carne. Esta diferenciação é bem estabelecida por LAWRIE (28), ao afirmar que, embora a natureza química e estrutural da carne relembre a do músculo de que procede, elas se diferenciam entre si, devido aos processos bioquímicos e biofísicos que ocorrem no músculo, a partir da morte biológica do animal.

Segundo SAWYER (47), a composição da carne varia consideravelmente entre tipos e cortes, bem como se ela é fresca ou processada. Os valores médios dos seus componentes, adotados, pela maioria dos estudiosos, são os seguintes: proteína: 17%; gordura: 20%; umidade: 62%; e cinzas: 1%. Seu valor calórico equivale a 250 Cal/100g.

YUDKIN (60), considera que um dos fatores que contribui decisivamente para a grande preferência da carne bovina pelos consumidores, é a sua alta palatabilidade, a qual é distinta entre os diversos músculos e função dos seus teores de gordura.

É a palatabilidade que determina a conceituação de nobreza dos músculos bovinos, a qual é estabelecida por alguns parâmetros eleitos pelos consumidores como importantes. Estes parâmetros são a maciez, a suculência, a cor, o "flavor" e o aroma, conforme MARTINS (31). Embora todos estes fatores sejam de relevância, a maciez é a característica de maior importância, afirmam JOSEPH & CONNOLLY (20).

2.2 - Maciez

A maciez é definida por BERNHOLDT (01), como a qualidade da carne cozida, identificada pela fácil mastigabilidade, sem a perda da textura desejável. Segundo este mesmo autor, os fatores que influenciam na ocorrência de uma maior ou menor maciez, não estão totalmente compreendidos, apesar das inúmeras pesquisas que se realizam neste campo.

De acordo com BRATZLER (02), os muitos fatores que determinam aquela característica podem ser divididos em dois grupos distintos: os fatores "antemortem" e os fatores "post-mortem". Entre os primeiros estão incluídos: as características genéticas, os aspectos fisiológicos e as práticas de alimentação e manejo. Os fatores "post-mortem" a serem considerados são: o tempo e a temperatura de armazenamento, os métodos de corte e preparo, a adição de agentes amaciantes e a técnica de cocção.

A esses fatores, LAWRIE (28) ainda acrescenta: manipulação antes do sacrifício (ocasionando perda de umidade e de glicogênio); operação de abate (insensibilização e sangramento); consequências gerais da parada circulatória; e maturação (desnaturação das proteínas, proteólise e outras alterações químicas).

Os eventos "antemortem" são indispensáveis à obtenção de uma carne de alta qualidade, a qual é definida por BRISKEY & KAUFFMAN (04) como o produto comestível que é atraente na aparência, apetitoso, nutritivo e palatável após a cocção. A capacidade dos músculos de reterem estas características, é influenciada diretamen

te pela idade do animal, sexo, estado nutricional e linhagem genética afirmam ainda os supra-mencionados pesquisadores.

Observações de NEWBOLD & HARRIS (37) evidenciaram que a maciez da carne é variável, e que isto ocorre em músculos correspondentes da mesma ou diferentes espécies, o que corrobora as conclusões de BRISKEY & KAUFFMAN (04) acima referidas.

2.3 - Estrutura Muscular

O corpo dos mamíferos está constituído basicamente de quatro tipos de tecidos fundamentais: epiteliais, conjuntivos, nervosos e musculares. (CASSENS, 06).

Entre os tecidos musculares, a variedade estriado esquelético entra predominantemente na constituição das carnes, juntamente com pequenas quantidades de tecido conjuntivo e mínimas porções de tecido nervoso do sistema de enervação periférica. Assim, os músculos estriados esqueléticos e o tecido conjuntivo propriamente dito, podem ser referidos como elementos estruturais básicos daquilo que no conceito técnico denominamos "carne".

No músculo esquelético, as fibrocélulas musculares estão organizadas em conjuntos de feixes alongados, dispostos paralelamente e em sentido longitudinal ao músculo. Este é revestido externamente por uma nítida membrana conjuntiva, o epimísio. Do epimísio partem delgados septos conjuntivos que se dirigem para o interior da massa muscular, subdividindo-a em pequenos compartimentos, sendo tais septos denominados de perimísio. Cada fibrocélula, por sua vez, é envolvida por uma finíssima malha de fibras e células conjuntivas que formam o endomísio. Esta configuração detalhada do músculo foi apresentada por JUNQUEIRA e CARNEIRO (21)

A disposição do tecido conjuntivo permite certa liberdade de movimento entre os conjuntos de fibras musculares, além de assegurar a penetração dos vasos sanguíneos e nervos entre os septos,

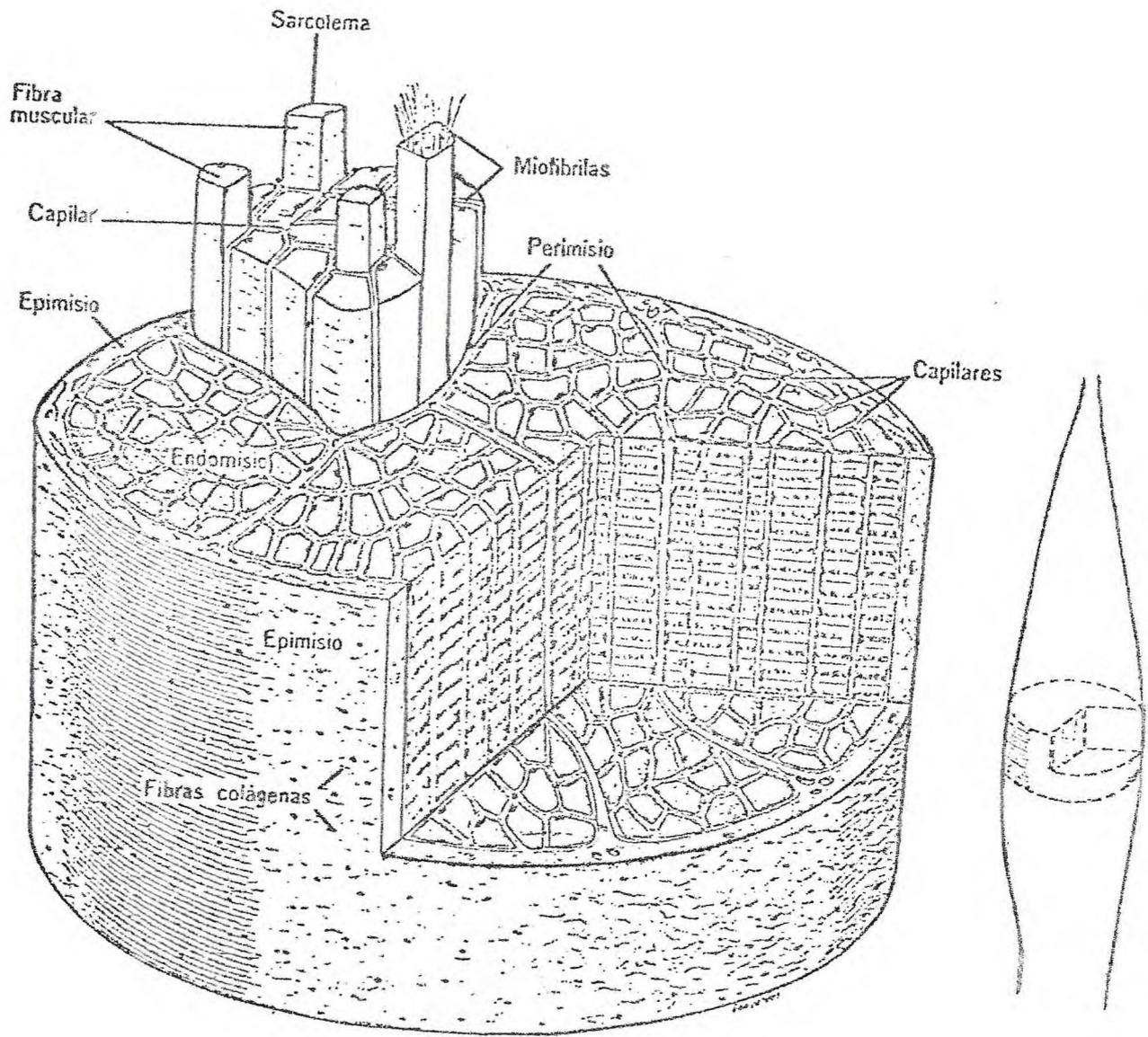
onde se estabelece uma rica rede capilar paralela às fibras, disposição essa, essencial aos movimentos e trocas metabólicas (Esquema I).

Cada fibrocélula muscular é envolvida pela membrana celular - sarcolema - e seu citoplasma - sarcoplasma - é preenchido essencialmente por finíssimas fibrilas paralelas - as miofibrilas-. Estes componentes possuem estruturas cilíndricas com diâmetro de 1 a 2 μ m, dispostas longitudinalmente à fibra muscular. As fibras musculares, geralmente muito longas, possuem vários núcleos, dispostos excentricamente e acoplados ao sarcolema.

JUNQUEIRA e CARNEIRO (21) observaram que, ao microscópio óptico, aparecem estriações transversais ao longo das miofibrilas, em face da alternância de faixas claras e escuras. Ao microscópio de polarização, a faixa escura é anisotrópica, recebendo a denominação de Banda A, que tem ao centro, uma estreita região clara, ou semibanda H. A faixa clara é isotrópica, recebendo a denominação de Banda I. No centro desta, existe uma linha transversal escura, a linha "Z". O espaço compreendido entre duas linhas "Z", constitui o sarcômero, estrutura que se repete em grande número ao longo das miofibrilas, constituindo a unidade anatômica e funcional do músculo estriado.

Ao microscópio eletrônico observa-se uma ultra-estrutura bastante complexa indicando que as bandas e interbandas claras e escuras, caracterizadas por regiões mais ou menos eletrodensas, devem-se a existência de filamentos proteicos, finos e espessos, organizados e dispostos paralelamente, de maneira a facilitar deslizamentos entre si no ato da contração e descontração muscular (Esquemas I e II).

Análises bioquímicas indicam que as miofibrilas do músculo esquelético estão constituídos por, pelo menos, quatro tipos de proteínas principais, organizadas em complexos arranjos molecu



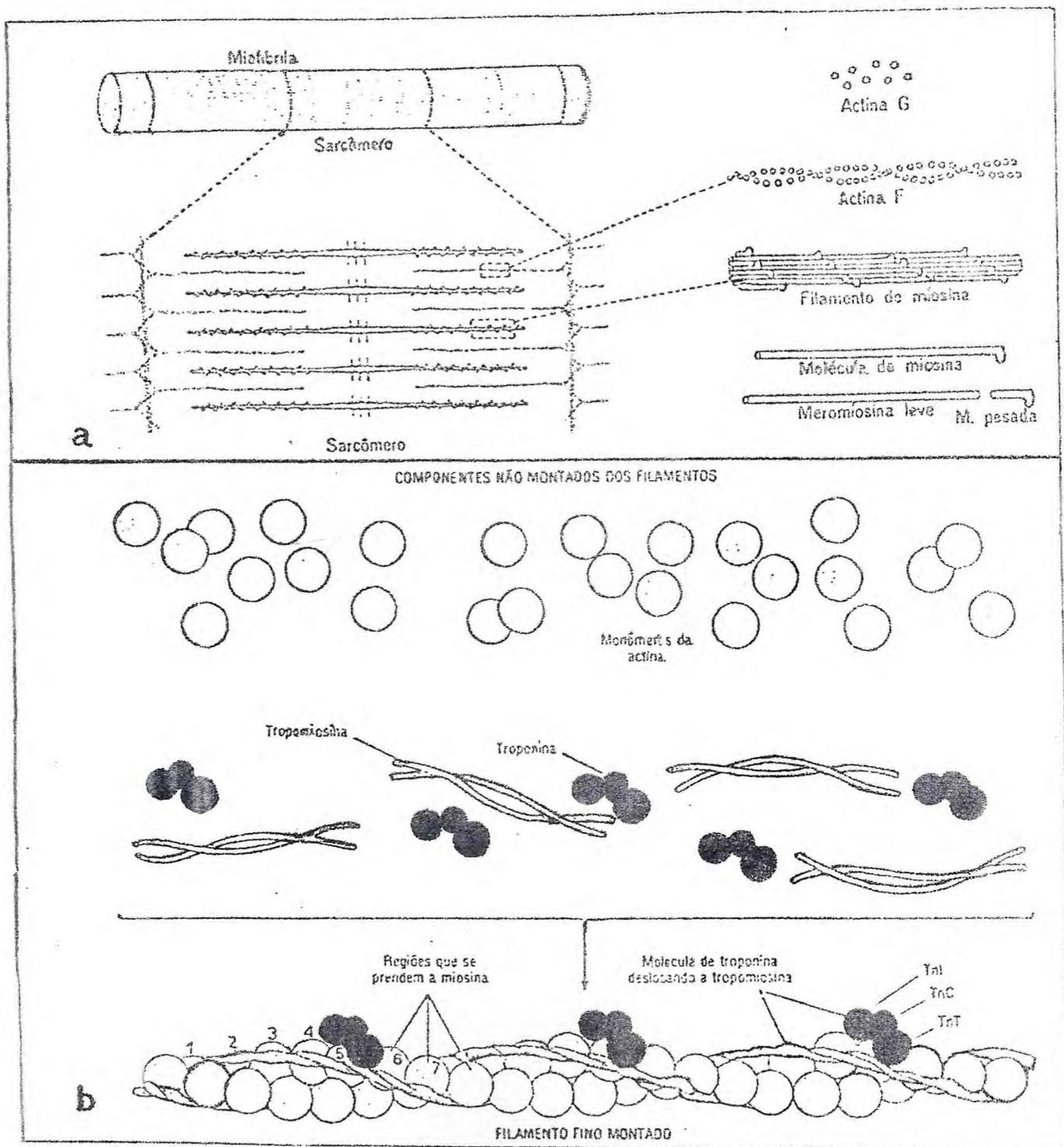
ESQUEMA 1 - Desenho esquemático tridimensional de uma secção de músculo estriado, mostrando maiores detalhes sobre a disposição e estruturação dos elementos constituintes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 21).

lares: a miosina, formada de moléculas alongadas, grandes e complexas, em forma de bastão em cajado, constituída de duas subunidades que podem ser isoladas: a meromiosina leve e a meromiosina pesada. Esta última, presente na porção terminal em cajado, tem forte atividade atpásica, sendo o local de ligação com a actina; a actina tem moléculas longas e fibrosas (actina F), formadas por 2 cadeias de monômeros globulares (actina G), torcidas uma contra a outra. Cada monômero de actina G, contém uma região ativa de contacto com a miosina; a tropomiosina, formada por moléculas longas contendo cadeias de polipeptídeos em forma de - d - hélice, agindo principalmente como suporte para as moléculas de actina e miosina, sendo uma componente de linha "Z". A outra proteína, mais recentemente evidenciada é a troponina, formada por 3 subunidades (TnT, TnC e TnI), de polipeptídeos globosos, dispostos entre os filamentos de actina F e miosina. Esta proteína tem função importante no mecanismo da contração muscular, atuando como um autêntico "gatilho", asseguram JUNQUEIRA E CARNEIRO (21). O esquema II apresentado à página posterior, fornece mais detalhes do acima descrito.

É provável que a constituição proteica dos músculos seja bem mais complexa, principalmente levando-se em conta os aspectos dinâmicos da contração muscular. A presença de um outro complexo proteico, a - d - actinina, foi identificado por EBASHI (09) como um constituinte normal do músculo contraído.

Terminações nervosas ao longo do sarcolema das fibras musculares, exercem o estímulo necessário à despolarização da membrana, desencadeando arranjos e rearranjos moleculares ao nível dos filamentos proteicos, finos e espessos, que deslizam entre si, de acordo com a "teoria dos filamentos interdigitados deslizantes" exposta por JUNQUEIRA E CARNEIRO (21).

O tecido conjuntivo é representado principalmente por fibras colágenas, elásticas e reticulares, além de diversos tipos



ESQUEMA 2 - a) Apresentação tridimensional de uma miofibrila, destacando a disposição dos filamentos proteicos e estrutura molecular desses elementos do sarcômero.

b) Acima, componentes não montados dos filamentos finos. Abaixo, montagem esquematizada dos elementos proteicos (actina, tropomiosina e troponina). Quando o músculo é estimulado, a troponina altera a sua forma, afundando a tropomiosina no seu sulco liberando na actina F, os centros de atividade que se combinam com os da miosina, nos filamentos grossos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 21).

celulares com predominância de fibroblastos e escassa quantidade de substância fundamental amorfa constituída de complexos de mucopolisacarídeos, proteínas e lipídios dispersos em líquido intersticial (21).

A maioria dos autores acredita que a dureza da carne está diretamente relacionada com a quantidade de tecido conjuntivo que cada músculo possui (01,02,04,38,42,43, entre outros).

2.4 - Fatores Antemortem

Em trabalho publicado em 1975, PROST et alii (43) comentaram a respeito da importância do tecido conjuntivo para a dureza da carne. Afirmam haver opiniões contraditórias entre os pesquisadores, pois enquanto alguns defendem a influência da idade sobre a quantidade de tecido conjuntivo, outros preferem concluir não haver nenhuma interrelação.

Com respeito ao sexo, os mesmos autores (43) também constataram opiniões divergentes. Alguns deles afirmam haver maior conteúdo de tecido conjuntivo nos animais machos do que nas fêmeas, embora não significativo. Outros, entretanto, não encontraram dados que os possam levar a adotar idêntica conclusão.

Pesquisa desenvolvida por PROST et alii (43) visando estudar a influência do fator idade, permitiu fossem anotadas as seguintes observações: os bezerros possuem maior quantidade de tecido conjuntivo que outros animais com maior faixa de idade, porém em apenas 3 (três) tipos de músculos. Erectores spinae, Infraspinatus e Biceps femoris. Para os demais músculos, as diferenças, quando existiam, não eram significativas. Os mesmos autores também comprovaram uma maior quantidade de tecido conjuntivo nos animais machos.

Estudando o efeito do sexo, peso e raça, sobre a maciez da carne, PURCHAS (44) chegou às seguintes conclusões: 1 - mesmo

entre animais de alta linhagem, há diferenças significativas entre os músculos, principalmente em relação ao Longissimus dorsi; 2 - o peso do animal não tem qualquer influência sobre aquela característica; 3 - os animais castrados possuem carne mais tenra do que os demais do mesmo sexo, sendo que esta diferença se acentua com a maturação. Explicação sobre esta conclusão de PURCHAS (44), é dada em trabalho de KELLAWAY et alii (24), onde afirmam haver uma maior circulação de testosterona nos animais castrados e no de WEISSMAN & THOMAS (55), no qual mostram ter este hormônio, um efeito lábil sobre as membranas lisossomais. Convém considerar as informações e mitidas por WHITAKER (56), de que o lisossoma é o compartimento da célula animal onde estão armazenadas as enzimas proteolíticas denominadas catepsinas.

Outro parâmetro considerado por PROST et alii (43), é com relação ao grau de qualidade da carcaça. Observaram eles que, à medida que as carcaças vão tendo menor qualificação, os percentuais de tecido conjuntivo vão aumentando, exceção feita ao músculo Psoas major.

Segundo a United States Department of Agricultural (USDA), in DAVIS et alii (08), a carcaça bovina pode ter a seguinte classificação "Prime", "Choice", "Good", "Standard", "Comercial", "Utility" e "Cutter". Os principais fatores que determinam a classificação das carcaças nas categorias acima referidas, são o grau de marmorização e a maturidade do animal.

Os graus de marmorização são expressos por uma escala estabelecida pela "Federal Meat Grading Specifications" (FMGS), assim discriminados decrescentemente: abundante, moderadamente abundante, levemente abundante, moderado, modesto, pequeno, leve, traços, praticamente ausente e ausente. (MAXWELL et alii 33). A medição é realizada no músculo "Longissimus dorsi", ao nível da se

ção transversal entre a 12ª e 13ª costela.

O outro parâmetro, a maturidade, é conceituada dentro de 5 (cinco) níveis distintos, especificados a seguir: A - de 9 a 30 meses; B - de 31 a 48 meses e C,D,E - acima de 48 meses. Dentro do nível A, são inseridos 3 sub-níveis A^- , A e A^+ , considerando-se as faixas de idade de 9 - 16 meses, 16-23 meses e 23-30 meses, respectivamente. Assim sendo, animais com um mesmo grau de marmorização podem ser classificados diferentemente, segundo a idade (DAVIS et alii, 08).

Pesquisa realizada com 3.182 carcaças de novilhas, com grau de maturidade A, na qual foram considerados 6 fatores de qualidade: marmorização, conformação, cor, textura da carne, firmeza e textura da marmorização, por MAXWELL et alii - (33), demonstrou através de análise estatística, que 71% da variação qualitativa foi devida ao grau de marmorização. A conformação e a cor obtiveram 1% e os demais fatores não tiveram qualquer significação.

Estudos de WALTER et alii (53), mostraram o comportamento de 72 carcaças, que representavam 3 níveis de maturidade (A, B e E) e 6 graus de marmorização (moderadamente abundante, levemente abundante, moderado, pequeno, traços e praticamente ausente). O músculo escolhido para o experimento foi o Longissimus dorsi e foram realizadas determinações físicas (tenderometer) e organolépticas. Os resultados demonstraram que o grau de marmorização não exerceu qualquer efeito significativo sobre o "flavor", a maciez e a succulência. Entretanto, a maturidade avançada, acarretava decréscimo nos índices das duas últimas características.

A influência da raça sobre o grau de marmorização foi pesquisada por MULLER et alii (36), que analisaram 67 carcaças com diferentes níveis de maturidade (C,D e E). As raças observadas foram a Angus e a Hereford (inglesas), a Zebu (indiana) e as Holstein

e Jersey (americanas). Os resultados indicaram que as raças ingle sas possuíam maiores graus de marmorização, como também maior macie z, que as demais raças estudadas.

Investigando a influência da marmorização e da maturida de sobre a palatabilidade, cor e propriedades químicas do Longissí- mus dorsi, em diferentes períodos de maturação (2 e 14 dias), TUMA et alii (52) considerando que os graus de marmorização foram classi ficados como "pequeno" e "levemente abundante" e que os níveis de i dade foram de 18, 42 e 90 meses, chegaram às seguintes conclusões: 1 - a maciez decresce significativamente com o avanço da idade; 2 - a carne com o grau de marmorização "levemente abundante" apresentou se mais tenra que a do grau "pequeno"; 3 - a composição química não sofre alteração com a maturidade; 4 - o efeito da maturação por 14 dias, varia com a idade do animal e o grau de marmorização e 5 - a cor varia com a idade do animal, tendo a carne a tendência de tor nar-se vermelha-escuro, à medida que os níveis de idade aumentaram.

DAVIS et alii (08) estudaram 80 "steaks" de carne sele cionadas com base nas diferenças de maciez, em carcaças de conheci dos graus USDA ("US-Choice"-maturidade A, n=20; "US Choice"-maturi- dade B, n=10; "US Good"-maturidade A, n=20; "US Good"-maturidade B, n=10 e "US Comercial"-maturidade C, n=20). Eles concluíram que as variáveis que mais contribuíram para a variação da maciez foram: ín dice de fragmentação, o comprimento do sarcômero, as percentagens de umidade intramuscular e do colágeno solúvel estão diretamente rela cionados com a maturidade e o grau de marmorização.

Considerando que a velocidade do resfriamento do múscu lo determina o comprimento do sarcômero, pelo efeito do "cold shor tening", PEARSON (40), e que este fator é relevante à maciez final da carne, pode-se depreender que a marmorização pode atuar como um agente retardador da transmissão de temperatura, através dos teci dos do músculo, razão porque os "steaks" de maiores graus de marmo

rização foram mais tenros que os demais.

Com o objetivo de determinar a influência da maturidade e da marmorização sobre a palatabilidade, BREIDENSTEIN et alii(03) pesquisaram 60 animais fêmeas. O universo foi dividido em 3 grupos de maturidade (A, B e C) e 4 níveis de marmorização (leve, moderado, levemente abundante e abundante). Os resultados encontrados indicaram que a idade não tem efeito sobre a suculência e o "flavor", porém a marmorização influencia diretamente estes fatores.

2.5 - Fatores Post-Mortem

Argumenta BERNHOLDT (01) que, apesar das fibras musculares e do tecido conjuntivo terem sua importância nos eventos para o estabelecimento da maciez da carne, os efeitos da formação e da resolução do "rigor mortis" e da autólise, também devem ser levados em consideração, apesar deles carecerem de melhor entendimento sob o ponto de vista bioquímico.

De acordo com PEARSON (40), os eventos "post-mortem" começam a ocorrer tão logo o animal é abatido e são ocasionados pela inabilidade dos tecidos de sintetizarem ou remover os metabólitos que surgem após a morte fisiológica. Segundo esse mesmo autor, as alterações "post-mortem" no músculo, são reações químicas envolvendo os compostos fosfatados de alta energia e seus mecanismos de síntese e degradação. Com a suspensão da atividade respiratória, as células, anaerobicamente, oxidam parcialmente a glucose, convertendo-a em ácido láctico. No animal vivo, o ácido láctico se difunde pelos tecidos e então é removido pelo sistema circulatório.

O pH "antemortem" do músculo animal é de aproximadamente 7,4 (PEARSON, 40). Entretanto, após o abate, a produção de ácido láctico faz com que o pH decresça até alcançar, na fase final, aproximadamente 5,4. Este fato, todavia, é altamente dependente

das condições em que se encontra o músculo, no momento da morte do animal. As condições de "stress" proporcionadas por um período de descanso inadequado, sofrimento na operação de abate ou mesmo condições nervosas do animal, podem acarretar uma diminuição no nível de glicogênio e uma conseqüente elevação no pH final da carne. É o que se denomina "rigor alcalino", e tem efeito direto sobre as propriedades físicas da carne, apresentando-a macilenta, mole, exudativa e com uma cor escura NORMAN 38). Além disso, o pH em torno de 6,0, proporciona boas condições de proliferação microbiana, afirma POTTER (41).

O período necessário à transformação do músculo em carne é denominado "tempo de maturação", que é grandemente dependente da temperatura utilizada no local onde se realiza este beneficiamento.

Apesar da importância que o frio desempenha para uma melhor conservação da carne, a forma e a ocasião do seu uso tem também bastante relevância. Uma comprovação está no fato de que se a aplicação do frio for realizada por ocasião do "pre-rigor", poderão advir prejuízos à qualidade final da carne, principalmente com respeito a sua maciez. A conseqüência desse processo é o encurtamento do sarcômero, que, por sua vez, é a resultante do "cold-shortening" e do "thaw-shortening" (HAMM, 17).

Sobre esses fenômenos, MARSH et alii (30), realizaram um estudo no qual congelaram carcaças à velocidades distintas. Após o degelo e mantendo as amostras em temperaturas de -10°C , fizeram a medição do grau de maciez por meio de um amaciômetro. Foi constatado que aquelas amostras congeladas a uma maior velocidade, exigiram uma força de corte de $35^{\pm 4}$ unidades, enquanto que aquelas submetidas a uma menor velocidade de congelamento, necessitaram de uma força de $59^{\pm 9}$ unidades. A observação permitiu deduzir que também sob esse aspecto, o resfriamento rápido é mais adequado para que se

obtenha uma carne de melhor qualidade.

O processo de formação do "rigor mortis", apesar de não ter fundamentação conclusiva, parece estar ligado a união dos filamentos da actina com a miosina, formando a actomiosina. MARTINS(32), afirma que enquanto o conteúdo de actina e miosina decrescem após a morte do animal, há um incremento no teor de actomiosina (cerca de 80% durante o "rigor mortis").

Respostas específicas acerca da formação e resolução do "rigor mortis" são sugeridas por GOLL et alii (13). Este estado é também denominado de "tensão isométrica". Segundo esses pesquisadores, as possíveis causas básicas da formação do "rigor mortis" são: 1) desativação da bomba de Ca^{++} , pela proteólise; 2) declínio do pH "post-mortem"; e 3) decréscimo do nível de pH "ante mortem". Estas causas proporcionam perdas e impedem a retenção da Ca^{++} pelas membranas do retículo sarcoplasmático.

Com relação à resolução do "rigor-mortis", aqueles pesquisadores acreditam que duas causas possivelmente são importantes: 1) modificação da interação actina-miosina e 2) perda da integridade da linha "Z". Basicamente, essas causas são determinadas pela proteólise envolvendo o Ca^{++} , alterações sulfidrílicas e o declínio do pH.

Recentes estudos realizados por GOLL et alii (14), mostram que a principal alteração ocorrida na estocagem "post-mortem", é a gradual desintegração das miofibrilas. Desde que as miofibrilas são compostos estritamente proteicos, a proteólise continua a ser o agente causativo mais lógico.

Tendo em vista que a maioria das proteínas da carne tem o seu ponto isoelétrico em torno de um pH de 5,1, e que o pH no estado do rigor está entre 5,4 e 5,7, conclui-se que o aumento da maciez é acompanhado por um leve incremento no estado de hidratação

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

O processo de maturação natural do músculo apresenta as seguintes desvantagens, segundo ROBINSON & GOESER (46):

- 1 - quebra do peso da carcaça, devido a perda da umidade;
- 2 - desenvolvimento de "flavors" estranhos;
- 3 - descoloração das superfícies externas;
- 4 - tempo exigido para a consecução do processo;
- 5 - infraestrutura operacional onerosa.

Considera HAMM (17), que em virtude da carne possuir cerca de 75% de água e da forma como ela é ligada às estruturas musculares, quase sempre todos os procedimentos de estocagem e processamento são influenciados pela sua capacidade de reter água. Observa ainda o mencionado autor que a questão é de interesse econômico, tendo em vista que o problema da perda de peso nas operações de estocagem, cocção, congelamento e degelo, está relacionado com as ligações da água no interior do músculo. Como todas estas operações objetivam a qualidade final da carne, sua capacidade de reter água influencia diretamente sobre a maciez, pois está intimamente ligada ao relaxamento da rede do gel proteico.

Asseguram FORREST et alii (11), que muitas das propriedades físicas da carne, tais como a cor, a textura, a firmeza, a

suculência e a maciez, são parcialmente dependentes da sua capacidade de reter água e que, por ocasião do corte, pode ocorrer a perda de grandes quantidades do suco da carne. Este evento, acarreta uma redução no peso, no valor econômico, na sua palatabilidade e no teor de proteínas solúveis, vitaminas e minerais. A operação do corte é também vital para o sucesso da etapa posterior, a ser realizada pelo consumidor, qual seja a cocção.

2.6 - Cocção

Esta etapa desempenha igualmente papel relevante para a qualidade da carne, ao considerarmos o processamento como um todo, tendo em vista que a aplicação do calor, pode aumentar, com igual probabilidade, os índices de maciez tanto positiva, como negativamente. Este fato está diretamente relacionado com os dois componentes estruturais do músculo: as fibras musculares e o tecido conjuntivo (HEARNEY et alii, 18).

Afirmam FORREST et alii (11), que uma cocção a 56-58°C ocasiona um amaciamento relativamente baixo. No caso de temperaturas mais altas (72-74°C), o rápido encolhimento do colágeno acarreta o endurecimento. Entretanto, se o aquecimento for mantido, resulta em substancial incremento na formação de gelatina, o que eventualmente causa o amaciamento. Consideram ainda, que, apesar do grau de cocção depender da preferência do consumidor, o conhecimento da duração adequada do aquecimento da carne é essencial.

Reporta-se o mesmo autor (11), sobre os métodos de cocção que podem ser utilizados e a eficiência dos mesmos sobre os diversos tipos de corte. Assim, a cocção por calor seco (150-175°C), é adequada para fatias finas e o período de aquecimento deve ser curto. A cocção por calor úmido (95-100°C), deve ser utilizada para cortes maiores, que contenham grandes quantidades de tecido con

juntivo. O tempo de aplicação da fonte calorífica deve ser estendido por longos períodos, a fim de possibilitar a gelatinação do colágeno. O método de cocção por microondas é bastante rápido e utiliza frequências entre 915 e 2.450 megahertz. Sua maior aplicação é na indústria de alimentos preparados.

Ao estudarem a relação temperatura de cocção/idade, GOLL et alii (13), observaram que o colágeno do tecido conjuntivo de animais mais idosos, possuem suas ligações cruzadas mais extensas e mais fortes do que aquelas encontradas em animais mais jovens, razão porque necessitam de um maior período de tempo para que ocorra a gelatinização.

2.7 - Amaciamento Enzimático

A aplicação de enzimas no amaciamento da carne é conhecida há muitos séculos, pois, segundo LASSOUDIÈRE (27), Hugues já a citara em seu livro "The natural history of Barbados", editado em 1750. Em tal publicação, consta que os nativos, empiricamente, descobriram que ao adicionarem suco de abacaxi ou mesmo fatias do fruto à carne, antes da cocção, a sua maciez aumentava significativamente.

Somente neste século, mais especificamente a partir de 1940, é que o uso de enzimas passou a desempenhar papel importante na tecnologia de alimentos.

As enzimas envolvidas no processo de amaciamento da carne são denominadas de proteolíticas, por terem a habilidade de hidrolizar ou quebrar as proteínas fibrilares e as do tecido conjuntivo (BERNHOLDT, 01). Essas enzimas podem ter origem vegetal, animal e fúngica. Entre as primeiras, sobressaem-se pelo uso e eficiência: a ficina, a papaina e a bromelina. As mais importantes de origem animal, são a tripsina e a quimotripsina, enquanto que as obtidas

através de microorganismos, recebem a denominação comercial de proteases (TSEN & TAPPEL, 50; SCHWEIGERT, 48).

As enzimas proteolíticas de origem vegetal, são classificadas como glicoproteínas, globulares, sulfidrílicas e pela sua forma de atuação, identificadas como endopeptidases. Sua ação catalítica, como geralmente ocorre com todas as enzimas, é afetada pelas alterações de pH e temperatura, além de mostrar estrita especificidade ao substrato. Isso significa que este composto requer uma configuração na qual o centro de atividade catalítica esteja localizado em uma região de molécula, denominada "sítio ativo", caracterizado pela presença do grupo Sulfúrio (SH) (WHITAKER, 56, YAMAMOTO, 58; e LASSOUDIÈRE, 27).

Observou SCHWEIGERT (48), que as soluções enzimáticas atuam, tanto sobre as fibras musculares, como sobre os componentes do tecido conjuntivo durante as primeiras fases de cocção. Essa atuação é caracterizada por alterações estruturais e pela liberação de aminoácidos livres e/ou solúveis.

Demonstraram KANG & RICE (22) que o grau de hidrólise das mencionadas frações, varia com o tipo de enzima que é utilizada. Essas diferenças nas características hidrolíticas, podem consequentemente, ocasionar um melhor entendimento dos mecanismos do amaciamento enzimático e orientar a sua aplicação sobre os diferentes músculos.

Dentre todas as enzimas proteolíticas de origem vegetal, a papaina é a mais extensivamente estudada, em função de sua larga aplicação no processamento de alimentos. Esta enzima pode ser obtida do tronco, das folhas e do fruto do mamoeiro (Carica papaya, L.).

porém, em escala industrial, esta última alternativa é a mais rentável, principalmente se o mesmo estiver imaturo (HAENDLER & RUET, 16; CARVALHO, 05; YAMAMOTO, 58 e POTTER, 41).

De acordo com os dois primeiros pesquisadores (16; 05), os mamoeiros portadores de flores femininas e os hermafroditas, são mais produtivos em látex que aqueles de flores unicamente masculinas.

O processo de coleta, a partir do fruto, é efetuado através de incisões longitudinais, que não devem ultrapassar de 3mm de profundidade, a fim de não prejudicar o sabor da polpa. Esta operação deve ser realizada, preferencialmente, às primeiras horas da manhã, pois a temperatura mais amena, ao diminuir a velocidade de solidificação, facilita o escoamento do látex (HAENDLER & HUET, 16). Esses pesquisadores recomendam ainda, que o látex, após coletado, deve ser rapidamente congelado e desidratado, pois o contacto prolongado com o ar afeta sua estabilidade.

Segundo YAMAMOTO (58), a estabilidade da papaina em solução é boa em um pH de 5,0 e sua atividade ótima, é desenvolvida no pH igual a 7,0 para substratos como a albumina do ovo e a caseína. Sua atividade sobre a gelatina exige um pH ao redor de 5,0. LASSOUDIÈRE (27), opina que a estabilidade ótima é encontrada num pH entre 5-6 e que o ideal para a digestão das proteínas está entre 7 e 7,5.

Pesquisadores como KIMMEL & SMITH (25), discordam das opiniões emitidas por YAMAMOTO (58) e LASSOUDIÈRE (27), ao afirmarem que o pH ótimo para a hidrólise de substratos sintéticos pela papaina, geralmente são aqueles próximos de 5,0. Uma vantagem apresentada pela papaina, em relação as demais enzimas proteolíticas vegetais, é a sua estabilidade às altas temperaturas (WHITAKER, 56).

A ficina, observa YAMAMOTO (58), é em muitos aspectos, similar à papaina e é obtida a partir do látex de diferentes espécies do gênero *Ficus*. Estas espécies, segundo WHITAKER (56), são em número superiores a quarenta. Sua coleta é processada a partir do fruto verde e os cuidados recomendados para a papaina também são válidos na operação de estocagem. A enzima é obtida por centrifugação do látex (KRAMER & WHITAKER, 26).

Afirmativa efetuada por WHITAKER e transcrita por YAMAMOTO (58), estabelece que a atividade ótima da ficina, é obtida em valores de pH variando entre 7 e 8 e, que entre 3,5 e 9,0, esta propriedade pode ser considerada razoável. Reporta ainda o mencionado autor que o pH ótimo da atividade dessa enzima, é grandemente dependente do tipo de substrato. Com a caseína, por exemplo, a curva de atividade em função do pH, apresenta dois picos diferentes, um a 6,7 e outro a 9,5. Esses eventos, em função do tempo, proporcionam distintas velocidades de hidrólise. Com as demais proteases, a temperatura ótima de atividade da ficina depende do tempo da reação. Esta enzima é completamente inativada a 80°C.

A outra enzima proteolítica de origem vegetal, a bromelina, é obtida dos sucos da polpa e do caule do fruto do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, L) (YAMAMOTO, 58). Seu processamento industrial, nas etapas relativas a estocagem, desidratação e purificação, é semelhante àquelas adotadas para a papaina e a ficina.

Observa GOULD (15), que o pH ótimo da bromelina, com relação a substratos como a caseína e a hemoglobina, está entre 6 e 8. Com respeito a temperatura, o citado pesquisador, recomenda 50°C para a maioria dos substratos, porém com a gelatina, a maior atividade é encontrada a 60°C.

A forma de ação das enzimas proteolíticas, caracteriza-se pela quebra das moléculas proteicas em frações menores e a se

guir em aminoácidos livres ou hidrossolúveis. Segundo WHITAKER(56), essas enzimas desempenham um papel muito importante no processamento de alimentos, pois são usadas na produção de queijos, de cervejas, no amaciamento de carnes e na modificação das propriedades das proteínas dos cereais.

Para que elas possam ser utilizadas no processamento e/ou beneficiamento de alimentos, necessitam que sejam previamente purificadas WISEMAN, (57). De acordo com REED (45), a concentração máxima da solução enzimática não deverá ser superior a 500 ppm.

No caso específico do amaciamento da carne bovina, os métodos utilizados são: 1 - borrificação com polvilho enzimático; 2 - imersão em solução; 3 - "spray" da solução através de aerosol; 4 - sistema de injeções múltiplas e 5 - injeção da solução diretamente no sistema circulatório, antes do abate. (BERNHOLDT, 01).

Uma das limitações de alguns dos métodos de aplicação de enzimas sobre a carne, é a obtenção de uma distribuição uniforme através dos tecidos (SCHWEIGERT, 48); BERNHOLDT, 01; e MIER et alii, 34).

Essa limitação, representada pelo acúmulo dos agentes amaciadores, apenas sobre a superfície da carne, além de não atingir o centro do "steak", promove um indesejável super-amolecimento nas partes mais externas. Em razão desse fato, BERNHOLDT (01), propõe que os métodos de borrificação e de imersão, somente sejam utilizados em fatias muito finas.

Visando superar este problema, algumas técnicas têm sido exploradas. Uma delas, desenvolvida por MIER et alii (34), sugere a perfuração das fatias mecanicamente, antes de que se realize a aplicação da solução enzimática, a fim de proporcionar uma maior difusão através dos tecidos.

Um outro método, tentado por BERNHOLDT (1), utilizando agulhas múltiplas por onde a solução foi aplicada, apresentando melhores resultados, porém ocorreu igualmente, super-amaciamento nos locais perfurados pelas agulhas. Quando utilizou-se pedaços de maior tamanho, a distribuição mostrou-se insatisfatória.

Conforme afirmativa do mesmo autor (01), um procedimento que tem obtido algum êxito, é a aplicação da solução através de "spray", quando antecedida pela operação de múltipla perfuração. Este processo combina a ação da fase gasosa com a da fase líquida e promove uma atomização da enzima dentro do tecido. No seu trabalho, esse autor refere-se a estudo efetuado por WANG et alii, (54) no qual eles, após liofilizarem os "steaks", reidratavam-lhes com uma solução enzimática contendo bromelina e protease fúngica.

Fator de importância que deve ser considerado, ao submeter a carne ao amaciamento através da ação de enzimas, diz respeito à relação existente entre os teores de fibra muscular e tecido conjuntivo que cada músculo possui. Esta relação é que vai pesar na prescrição da solução que se vai utilizar. A relevância desse aspecto, liga-se a constatação de que as enzimas proteolíticas, possuem diferentes potenciais de hidrólise sobre as várias proteínas de cada músculo. Dessa forma, as preparações são fundamentais para a obtenção de um adequado amaciamento (01).

O trabalho de WANG et alii (54), referido anteriormente, demonstra a potência relativa das enzimas proteolíticas, vegetais, sobre os componentes do tecido muscular.

ENZIMA	FIBRA MUSCULAR	TECIDO CONJUNTIVO	
		COLÁGENO	ELASTINA
PICINA	+++	+++	++++
PAPAINA	++	+	++
BROMELINA	traços	+++	+

Baseado nesses dados, BERNHOLDT (01), realizou experimentos comparando a atuação de soluções mono-enzimáticas com soluções combinadas. A referida pesquisa apresentou os seguintes resultados.

MÚSCULOS	NÍVEL ENZIMÁTICO	M A C I E Z	
		CONTROLE	TESTE

FATIAS (-)

- "Rib-eye"	1:1 papaina	6,8	9,0
- "Strip loin"	1:1 papaina	6,3	8,9
- "Sirloin Butt"	1:1 papaina	6,4	9,2

POSTAS (*)

- "Inside"	1:5 bromelina/papaina	6,4	8,4
- "Knuckle"	1:4 bromelina/papaina	6,2	8,1
- "Out side"	1:3 bromelina/papaina	6,3	7,8

(*) - FATIAS: "steaks" de pequena espessura

POSTAS: "steaks" de maior espessura.

Uma constatação importante segundo o mesmo autor (01), refere-se ao fato de que no experimento com carne amaciada pelo mé

todo de "spray" a zero dia, foi significativamente mais tenra que um controle envelhecido durante 14 dias.

Atualmente, o método "pos-mortem" mais eficaz para melhorar qualitativamente a carne, é aquele denominado de "amaciamento da carcaça inteira". Com este método, as soluções enzimáticas são injetadas em áreas selecionadas do animal, logo após o abate. Os resultados demonstram haver uma distribuição mais uniforme da enzima, ocasionada, supõe-se, por dois fatores: a temperatura da carcaça e o estado do músculo no momento em que a enzima é aplicada(01).

Apesar dos bons resultados que o uso do "spray" e da injeção enzimática na carcaça intacta apresentaram, algumas limitações continuam a existir, principalmente com respeito à sua distribuição no interior dos tecidos. Uma tentativa bastante revolucionária, a injeção da solução na jugular do animal vivo, baseada em fatores já conhecidos, relacionados por BERNHOLDT (01) e citados por KANG & WARNER (23), demonstraram excelentes resultados:

- 1 - o sistema vascular do animal realiza uma perfeita distribuição da solução através dos tecidos;
- 2 - o coração é uma excelente bomba;
- 3 - a corrente sanguínea atua como um diluente para a enzima, com pequenas chances de ocorrência de concentrações indesejáveis; e
- 4 - as enzimas têm habilidade para amaciar a carne.

A técnica de utilização desse método, todavia, deve obedecer a alguns critérios fundamentais, quais sejam: 1 - as enzimas só poderão ser utilizadas na sua forma inativa; 2 - a concentração enzimática depende da idade do animal e das suas condições fisiológicas; e 3 - o tempo entre a aplicação e o abate deverá variar entre 2 e 10 minutos.

Conforme opinião de KANG & WARNER (23), se as enzimas utilizadas estiverem na sua forma ativa, podem ocasionar um estado de "stress" severo, caracterizado por respiração ofegante, congestão nasal, depressão e espumação.

Reporta-se BERNHOLDT (01) ao fato de que animais velhos e de má qualidade, necessitam geralmente, de duas vezes mais solução enzimática do que aqueles jovens e de boa linhagem.

Uma observação importante referida pelo mesmo autor, é que no caso dos animais já injetados não puderem ser abatidos, a solução é naturalmente excretada, sem que haja qualquer ameaça à sua vida.

Ao estudarem a influência da injeção enzimática no animal vivo, sobre a qualidade final da carne, SMITH et alii (49), chegaram a conclusão de que além de haver um aumento significativo na maciez, não foi constatada qualquer perda nas suas características organolépticas.

BERNHOLDT (01), que desenvolveu para a SWIFF COMPANY, este processo de amaciamento "antemortem", patenteado sob a denominação de PRO-TEN, apresenta algumas vantagens do seu uso, como sejam:

- 1 - o processo não afeta o "flavor" e a aparência da carne, resguardando pois suas características naturais;
- 2 - pode substituir ou complementar a operação de maturação pelo método convencional;
- 3 - o produto pode ser comercializado fresco ou refrigerado; e
- 4 - oferece uma maior utilização da carcaça, desde que aqueles "steaks" que geralmente necessitam de calor úmido, podem sofrer cocção por calor seco.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Matéria Prima

Neste trabalho utilizamos como matéria prima, músculos bovinos originários dos quartos dianteiros e traseiros. Os animais foram abatidos no Frigorífico Industrial de Fortaleza S/A.(FRIFORT), com idade aproximada de 36 meses, sendo predominantemente mestiços da raça zebuina. Os músculos dianteiros escolhidos foram: o Infra-spinatus e o Suprasspinatus, situados na região medial da escápula (pá). Os traseiros relacionados foram: o Longissimus dorsi, localizado na região sub-dorsal, conhecido comumente como "contra-filé", retirado a partir da sexta vértebra lombar e o Semimembranosus situado na face lateral da parte posterior do coxão (FELICIO & PICCHI, 10) e TUCKER et alii (51).

3.1.2 - Enzimas

As enzimas proteolíticas de origem vegetal usadas nesta pesquisa, tiveram as seguintes procedências e características:

Papaina MERCK: enzima purificada, produzida em Darmstadt (Alemanha), solúvel, com poder digestivo de 1:35 e atividade de 1 Anson - E/g 12.000 E/g.

Papaina CEPED: enzima não purificada, sem especificação, obtida pelo Centro de Pesquisas e desenvolvimento (CEPED) Camaçari, Bahia, resultado de pesquisa tecnológica financiada pela SUDENE.

Bromelina MERCK: enzima purificada, produzida em Darmstadt (Alemanha), solúvel, específica para testes bioquímicos, com atividade de 2m Anson - E/mg.

Bromelina BIOBRAS: enzima purificada, produzida pela Bioquímica do Brasil S/A. (BIOBRAS), em Montes Claros, Minas Gerais, com atividade proteolítica de 1.200 GDN/g, umidade menor que 4%, conteúdo proteico entre 0,50 e 0,55% por grama de pó e pH em água entre 5,4 e 5,8.

3.1.3 - Substratos artificiais

Os substratos usados na determinação da faixa ótima de atividade e das variações no grau de hidrólise, em razão dos aumentos nas concentrações das enzimas anteriormente mencionadas, foram: a caseína, elaborada segundo Hammarsten e a hemoglobina, obtida de acordo com o método de Anson, ambas produzidas pela E. Merck, Darmstadt, solúveis e específicas para estudos bioquímicos.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Determinação da atividade proteolítica das enzimas, usando-se a caseína como substrato

Este método, utilizado por PARK & DRAETTA (39), obedece basicamente às seguintes etapas: preparar com água deionizada, soluções de cada enzima na concentração de 1,1%; efetuar a pesagem de caseína, 0,1g, e adicioná-la a cada tubo de ensaio; pipetar 10ml da solução enzimática em cada tubo de ensaio que contém caseína, homogeneizar e a seguir manter o complexo em repouso por aproximadamente 10 minutos; incubar os tubos por 15 minutos, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95°C, respectivamente; este mesmo procedimento deverá ser adotado com relação ao controle, que deverá ter todos os componentes, menos a solução enzimática; decorridos 15 minutos de incubação, medir o pH com auxílio de papel de tornassol e adicionar 2ml de solução de ácido tricloroacético a 10% em cada tubo, com agitação, a fim de deter a ação proteolítica das enzimas; remover por filtração as proteínas não hidrolizadas; transferir 1ml

dos filtrados para balões volumétricos de 100ml, adicionar 3ml de NaOH 0,5N e 1 ml do reagente de Folin-Ciocalteus 1:2 (a razão da incorporação do NaOH à solução é o fato de que o corante fenólico, supramencionado, somente atua em soluções alcalinas); decorridos 10 minutos da reação, acrescentar água deionizada, agitando sempre, até completar o volume para 100ml; após realizada esta operação, medir a densidade óptica da solução à 660 nu, em espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb, ajustado anteriormente com água deionizada. A densidade óptica representa a concentração de aminoácidos totais que foi obtida pela hidrólise.

3.2.2 - Determinação da atividade proteolítica das enzi mas, usando-se a hemoglobina como substrato

O método utilizado foi o proposto por Anson e descrito por MARTINS (32), que obedece a seguinte metodologia. Inicialmente prepara-se uma solução de hemoglobina a 2% de acordo com o esquema a seguir: pesar 5g da hemoglobina e dissolvê-las em 50ml de água deionizada; a seguir colocar esta solução em um saco de celofane para diálise, por aproximadamente 12 horas, imerso em um recipiente contendo 1,000ml de água deionizada a temperatura de 4°C, para remover as substâncias dializáveis que possam interferir na ação das enzimas. Diluir 50ml desta solução para 100ml e adicionar 18,15ml de NaOH e 63g de uréia; a incorporação da uréia tem por finalidade auxiliar a execução da etapa seguinte, qual seja a desnaturação da hemoglobina; essa etapa é concluída pela manutenção da solução em reposo por um período mínimo de 60 minutos. Posteriormente, ajustar o pH, com ácido acético glacial para 4,4. Após essa operação, diluir a solução para 250ml com água deionizada e estocar em refrigerador. Após preparada a solução específica de hemoglobina, inicia-se a determinação analítica da atividade proteolítica das enzimas, que tem o seguinte procedimento: mistura-se 2,5ml da supramencionada

solução de pH 4,4, com água deionizada, em quantidade suficiente para que quando a enzima for adicionada, o volume total seja de 5,0ml. A temperatura deverá ser mantida em 35°C, em banho-maria, provido de controle termostático. Os tubos deverão ser conservados na água por 5 minutos. Adicionar a seguir, a amostra da enzima aos tubos, sob agitação. Sessenta segundos após, retirar uma alíquota de 2ml dessa solução e colocá-la em outro tubo que contenha 3,0ml de ácido tricloroacético a 5%; (este tubo será o controle). A quantidade restante deverá ser mantida em repouso, à temperatura ambiente, por um período de sessenta minutos. Decorrido esse tempo, separar as proteínas não hidrolizadas por filtração, utilizando papel quantitativo de operacionalidade lenta. Ato contínuo, retirar 1,0ml do filtrado, acrescentar 0,2ml de NaOH 2N e 5,0ml de Folin C. Deixar em repouso por dez minutos e adicionar 0,5ml de Folin D. Após um repouso de trinta minutos, fazer a leitura à 750m μ , utilizando um Spectronic 20 da Bausch & Lomb.

3.2.3 - Experimentos tecnológicos

3.2.3.1 - Preparo de amostra

Os músculos foram retirados de carcaça previamente selecionada, tendo em vista o desenvolvimento e harmonia de suas partes, depois de 24 horas de estocagem em câmara frigorífica à uma temperatura de 2°C. Depois de identificados e pesados, cada músculo foi acondicionado em saco de polietileno e armazenados à uma temperatura de -20°C. Visando a obtenção de amostras significativas, foram retiradas três porções de cada músculo, sendo que a fatia central serviu para a obtenção dos controles. Das fatias laterais, foram obtidas as amostras que sofreram o tratamento enzimático. Essas amostras, com dimensões de acordo com os fins a que se destinavam, foram submetidas a três tipos de experimento: medição da tenrura por processo mecânico, observação histológica e análise sensorial.

3.2.3.2 - Aplicação da solução enzimática

A forma de aplicação das enzimas foi a de "spray" por aerosol. Antes da aplicação, os cubos de carne foram perfurados a fim de facilitar a posterior difusão da solução. Este método, é considerado por BERNHOLDT (01), como um dos mais eficientes para a tenrificação da carne. A quantidade de enzima adicionada a cada "steak", foi calculada em função do comportamento de cada uma delas em relação à caseína e a hemoglobina e controlada de acordo com a vazão permitida pelo bico do aerosol (0,5ml/s) e do tempo de aplicação. O cubo de carne, após sofrer a adição da solução enzimática foi mantido em repouso por um período de tempo não inferior a 30 minutos, à temperatura ambiente, com a finalidade de permitir uma melhor distribuição das enzimas através dos tecidos da amostra.

3.2.3.3 - Técnica de cocção

A cocção das amostras foi realizada de acordo com as recomendações de autores como YEATES (59) e BERNHOLDT (01). Os mencionados pesquisadores, alertam para a conveniência de que fatias de pequena espessura, devem sofrer aquecimento lento, a fim de evitar o endurecimento das fibras musculares. O tempo de permanência da amostra sob a fonte calorífica não foi superior a 10 minutos, suficiente para que a temperatura de 70°C atingisse o ponto frio da mesma. Esta temperatura é importante pois permite uma melhor atividade da enzima e/ou solução enzimática. O aquecimento utilizado nesta etapa do experimento, foi uma grelhadeira elétrica doméstica, portadora de uma resistência de 111,2 ohms, à qual foram adaptados dois termômetros de precisão e um regulador automático de temperatura.

3.2.3.4 - Medição da tenrura

3.2.3.4.1- Por processo mecânico

Esta medição foi efetuada através do uso de um "tenderôme

ter® Warner-Bratzler Meat Shear, da GR ELETRIC, Cod. 2.000, com capacidade de 50 lb/pol, ou seja, $3,6505 \text{ kg/cm}^2$, que através de um mostrador, indica a força necessária para romper a fibra muscular.

3.2.3.4.2- Por observação histológica

O método utilizado nesta medição foi o adotado por PARK & DRAETTA (39), adaptando-se algumas sugestões de WANG et alii (54). Teve o seguinte procedimento: blocos de músculos, com dimensões de 0,5 x 0,5 x 1 cm após liofilizados em equipamento VIRTIS-RESEARCH (GARDNER-New York), nas condições de 25°C de temperatura e 23" de vácuo, foram mergulhados em 10ml de uma solução enzimática de papai na MERCK a 0,1% colocados em tubos de ensaio durante o período de 5 horas e à temperatura ambiente. Uma amostra controle foi preparada simultaneamente, adicionando-se 10ml de água deionizada. A seguir, os fragmentos foram fixados em formalina a 10%, por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas ao procedimento histológico, que constou das seguintes etapas: desidratação em série progressiva de álcool, clareamento pelo xilol e inclusão em parafina (Ponto de fusão: 56-58°C). A inclusão foi realizada de forma a que se obtivesse cortes transversais às fibras. O material foi submetido a um micrótopo rotatório para parafina (American Optical, Mod. 920), sendo obtidos cortes de 10 micrômetros de espessura. As amostras obtidas foram montadas em lâminas microscópicas e colocadas em estufa a 40°C para colagem e secagem. No processo de coloração, o material foi submetido às seguintes fases: 1 - desparafinização pela passagem por xilol; 2 - hidratação gradativa pelo álcool até a água e 3 - coloração propriamente dita. Nesta fase, foram aplicados 3 métodos distintos (CONN & DARROW, (07) a seguir descritos:

1 - MÉTODO DE HEMATOXILINA - EOSINA (HE)

1.1 - Soluções corantes

1.1.1 - Hematoxilina de Delafield

Hematoxilina	4 g
Etanol 95%	25 ml
Amonium alum, sat, sol. aquosa .	400 ml
Glicerol	10 ml
Metanol	100 ml

1.1.2 - Eosina

Solução aquosa de eosina a 1%

1.2 - Técnica

Corar a amostra com hematoxilina de Delafield por 15 minutos; lavar em água corrente até a amostra azular; passar em água destilada; corar pela eosina por 2 a 5 minutos; passagem rápida em água destilada; passagem em álcool 95 a 100% clarear e montar em Bálsamo do Canadá.

2 - MÉTODO DE COLORAÇÃO DE VAN GIESON

2.1 - Soluções corantes

2.1.1 - Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A: - Hematoxilina.....	1 g
Etanol 95%.....	100 ml
Solução B: - Cloreto férrico 29% em sol.	
aquosa	4 ml
Água destilada	95 ml
Ácido clorídrico	1 ml

OBS: - Na hora de usar, misturar em partes iguais as soluções A e B.

2.1.2 - Solução de picro-fucsina de Van Gieson

Fucsina ácida a 1%, em solução aquosa 10ml
 Ácido pícrico a 29%, em solução aquo-
 sa saturada 50ml

2.2 - Técnica

Aplicar sobre a amostra hematoxilina férrica de Weigert, por 5 a 20 minutos, para que ocorra a coloração nuclear; lavar com água destilada, para a retirada do excesso de corante; corar as a mostras com a solução de picro-fucsina de Van Gieson, por 5 minutos; lavar com água destilada; desidratar com álcool; clarear e montar em Bálsamo do Canadá.

3 - MÉTODO DE COLORAÇÃO TRICRÔMICA DE MASSON

3.1 - Soluções corantes

3.1.1 - Hematoxilina férrica de Weigart

3.1.2 - Solução A: Fucsina ácida 1 g
 Ácido acético 1 ml
 Água destilada 100 ml

3.1.3 - Solução B: Solução aquosa de ácido fosfo-
 molibdico a 1%.

3.1.4 - Solução C: Cromotrope 2R a 1%, em água.

3.2 - Técnica

Corar a amostra pela hematoxilina férrica de Weigert por 5 a 20 minutos; aplicar a solução A por 5 minutos; lavar com á gua destilada; diferenciar pela solução B, por 5 minutos; sem lavar, deitar sobre a lâmina 5 a 6 gotas da solução C, por 2 a 5 minutos;

lavar com água destilada; lavar em água acética, por 5 minutos; lavar em álcool absoluto a 100% por 30 segundos, desidratar e montar.

Após efetuar a coloração, o material foi submetido à observação microscópica e microfotografado; utilizando nesta operação ocular, de 6,3x e objetivas de 10 e 40x.

3.2.1 - Por análise sensorial

Para a realização desta análise, foi utilizado um painel de 10 (dez) provadores. Estes provadores, utilizando o teste de ordenação, opinaram sobre o grau de maciez gradativo de 6 amostras de carne, sob diferentes concentrações enzimáticas. O resultado apresentado foi a seguir analisado estatisticamente (MORAIS 35).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade das enzimas - papaina e bromelina - foi realizada em diferentes gradientes de temperatura, desde 30 até 89°C. Os picos máximos ocorreram a 84 e 66°C respectivamente, a um pH de aproximadamente 5,5.

Os dados obtidos nas condições do nosso experimento, estão graficamente representados na Fig. 1 e expressos numericamente nas tabelas 1 a 4.

Esses resultados, todavia, não estão coerentes com aqueles encontrados por BERNHOLDT (01) e PARK & DRAETTA (39), que concluíram estar as temperaturas ótimas da bromelina em torno de 60°C e da papaina em 70°C. Convém observar que apesar de utilizarmos enzimas de diferentes fontes, os resultados obtidos, para as temperaturas ótimas, foram consistentes e independeram da origem das mesmas. Podemos especular que os dados encontrados pelos mencionados pesquisadores, foram obtidos a um pH entre 7,0 e 7,5 para a papaina

e entre 6,0 e 8,0 para a bromelina. Nesta pesquisa, o pH foi ajustado entre 5,0 e 6,0, próximo ao da carne em estado de pós-rigor. Outro aspecto a considerar é o grau de pureza das preparações enzimáticas utilizadas neste trabalho.

Entretanto, a temperatura ótima determinada para a atividade máxima da papaina, está de acordo com as observações realizadas por WHITAKER (56) e YAMAMOTO (58), onde afirmam ser esta enzima a mais termoestável dentre as proteolíticas de origem vegetal, sem especificar contudo, qual a temperatura na qual ela começa a perder atividade. ROBINSON & GOESER (46), utilizaram papaina em um experimento de amaciamento de "Mutton Chops", com temperatura bastante elevada ($83,2^{\circ}\text{C}$), obtendo, mesmo assim, um grau de maciez por eles considerado como "bom".

No estudo visando medir o poder hidrolítico, em função da concentração das referidas enzimas, a uma temperatura de 35°C , utilizamos como substratos, a caseína e a hemoglobina. Os resultados estão apresentados numericamente nas Tabelas 1 a 10 e graficamente nas Figuras 2 a 7. Os dados obtidos em cada experimento da atividade hidrolítica sobre os citados substratos, foram agrupados graficamente nas Figuras 8 e 9.

Ficou evidenciado (Fig. 8) que à temperatura de 35°C a bromelina MERCK foi a enzima de maior poder hidrolizante sobre a caseína. Com relação à atividade das enzimas sobre a hemoglobina (Fig. 9), a mais ativa foi a papaina MERCK.

Este experimento com a papaina da MERCK, se realizado a concentrações semelhantes às aquelas utilizadas com as bromelinas, superariam, em alguns pontos, o limite máximo de absorbância do Spectronic 20 ($+2,0$), razão pela qual, os experimentos foram efetuados com concentrações mais baixas. Os dados correspondentes a esta en

zima e representados graficamente na Fig. 9, foram decorrentes de extrapolação, utilizando a equação $Y = 2,28x + 0,4$, obtida a partir dos dados experimentais.

A análise sensorial, aplicada a um painel de 10 (dez) provadores (Tabela II), permitiu fossem obtidas as seguintes conclusões: constatou-se uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre a amostra-controle e todas as demais amostras (que foram submetidas ao tratamento enzimático). Dentre estas amostras, e, por intermédio do teste de DUNCAN (LI, 29), foi observado que a solução bromelina/papaina 4:1, diferiu significativamente ($P \leq 0,05$) das de bromelina/papaina 3:2, bromelina 1:1 e papaina 1:1. Desta forma, a análise sensorial caracterizou as soluções bromelina/papaina 3:2, papaina 1:1 como as mais efetivas sobre o Longissimus dorsi.

Os dados da medição mecânica do grau de amaciamento efetuada com o auxílio do tenderômetro, estão contidos na Tabela 12. Desses dados foi possível determinar o percentual de eficiência de cada tratamento sobre os músculos estudados (Tabela 13). Esses percentuais demonstraram que a solução de papaina foi mais eficiente que todos os demais tratamentos, com relação aos músculos dianteiros, no caso o Infraspinatus e o Supraspinatus. A bromelina mostrou-se mais efetiva sobre o Semimembranosus e a mistura papaina/bromelina 4:1, sobre o Longissimus dorsi. Os percentuais de eficiência alcançados foram de 35,75, 20,44, 27,45 e 44,35% respectivamente.

Estatisticamente, não foram constatadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os mencionados tratamentos. Entretanto, foi encontrada diferença estatística significativa ($P \leq 0,01$), entre os diversos tratamentos enzimáticos e o controle.

Os resultados histológicos podem ser verificados pela análise comparativa das Lâminas I e II, que representam campos mi

microscópicos fotografados em pequeno e grande aumento, respectivamente. As preparações histológicas são de cortes transversais nos músculos, na espessura de 10 micrômetros, corados pelos métodos já descritos.

Em ambas as lâminas, as microfotografias dispostas à esquerda, representam campos obtidos de músculos que não sofreram a ação enzimática (controles), enquanto as dispostas à direita, são músculos submetidos à enzimas (experimentos). A fim de facilitar a análise comparativa das alterações estruturais, ao nível dos aumentos microscópicos utilizados, as microfotografias foram posicionadas aos pares, na seguinte ordem de cima para baixo: Infraspínatus, Supraspínatus, Semimembranosus e Longissimus dorsi.

Em todas as amostras submetidas ao tratamento enzimático, observou-se espaços brancos, aparentemente vazios, semelhantes a vacúolos no interior das fibrocélulas musculares, possivelmente surgidos durante o processo de liofilização, sendo no entanto, o fenómeno passível de estudos mais específicos.

Na análise comparativa das amostras, são bastante evidentes às diferenças estruturais, tanto ao nível dos elementos musculares, quanto dos conjuntivos, representados por células (fibrocélulas) e por fibras colágenas, demonstradas pelos métodos de coloração utilizados.

Nos controles, observa-se fibrocélulas musculares com núcleos bem visíveis e os elementos conjuntivos do perimísio e endomísio bem próximos daquelas, distinguindo-se os núcleos dos fibroblastos e das fibras colágenas. Nas amostras-experimento, observa-se nitidamente um acentuado afastamento dos fibroblastos, que formam autêntica malha entre as fibrocélulas, destacando o endomísio, representado basicamente pela rede de fibroblastos, e a destruição parcial dos elementos fibrosos do tecido conjuntivo.

Observa-se também na análise das micrografias das a mostras-experimento, que o efeito da papaína é maior nos músculos: Infraspinatus, Supraspinatus e Semimembranosus que no Longissimus dorsi, fato este também constatado na medição mecânica.

Com respeito a forma das fibras musculares, há aparente^é mente, uma alongação das mesmas naquelas amostras submetidas ao tratamento enzimático, como que motivada por alterações estruturais. Entretanto, uma afirmativa neste sentido somente poderá ser efetuada com relativa segurança, se apoiada em pesquisa mais especializada.

De um modo geral, os resultados histológicos observados no presente trabalho, confirmam, em muitos aspectos, a ação de enzimas proteolíticas na degradação e alteração dos elementos estruturais que compõem a carne.

No entanto, entendemos que o assunto deixa margem para investigações mais específicas, do ponto de vista histológico, inclusive histoquímico e histométrico, além de outros aspectos relacionados.

L Â M I. N A - "I"DESCRIÇÃO

Observar comparativamente em todas as microfotografias, a presença de vacúolos nas fibrocélulas musculares.

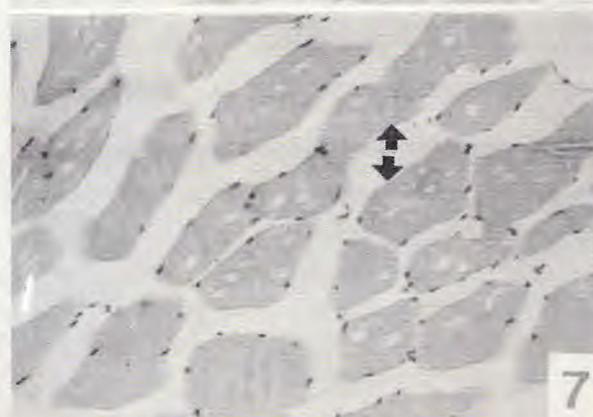
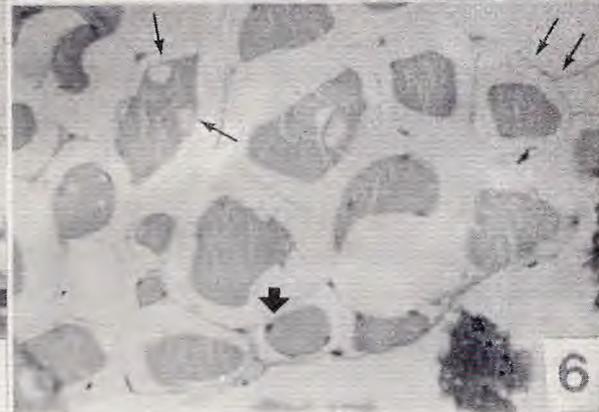
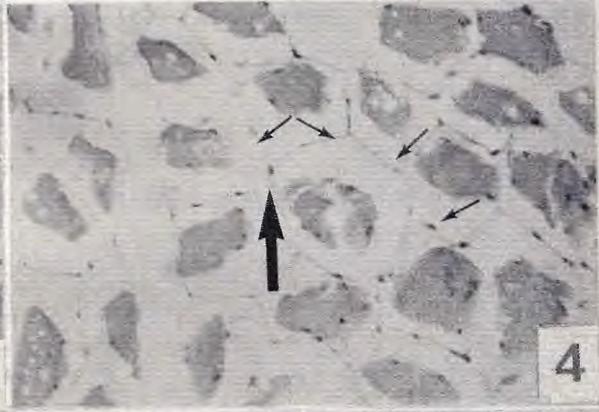
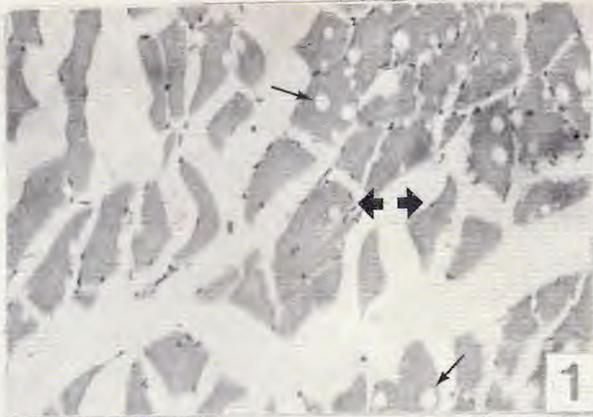
As setas grossas, contrapostas, indicam o afastamento dos elementos conjuntivos (endomísio), formando uma malha entre as fibrocélulas musculares; a foto 4 mostra com nitidez esse aspecto. Na foto 5, a seta grande indica o perimísio e a seta menor o endomísio, aspectos também evidenciados nas outras microfotografias.

De cima para baixo, aos pares, os músculos estão assim dispostos: Infraspinatus, Supraspinatus, Semimembranosus e Longissimus dorsi.

Os cortes histológicos foram realizados transversalmente, com espessura de 10 μ m; o método de coloração utilizado foi o da Hematoxilina de Weigert-Picrofucsina de Van Gieson. Ocular 6,3x e Objetiva 10x.

CONTRÔLE

EXPERIMENTO



L Â M I N A - "III"DESCRIÇÃO

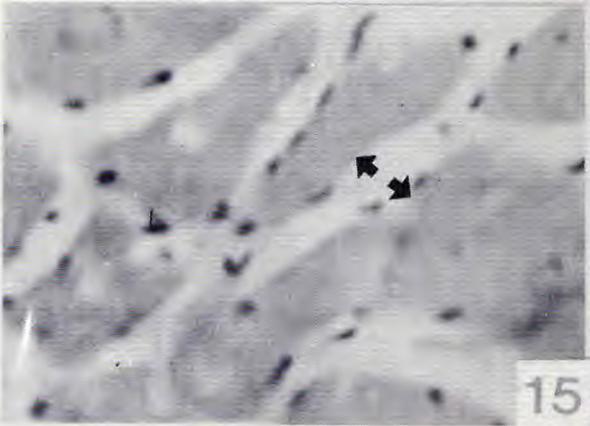
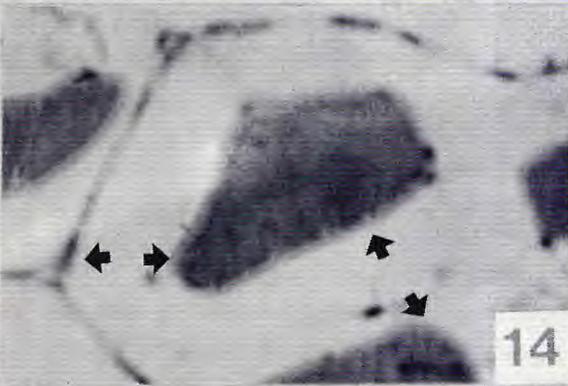
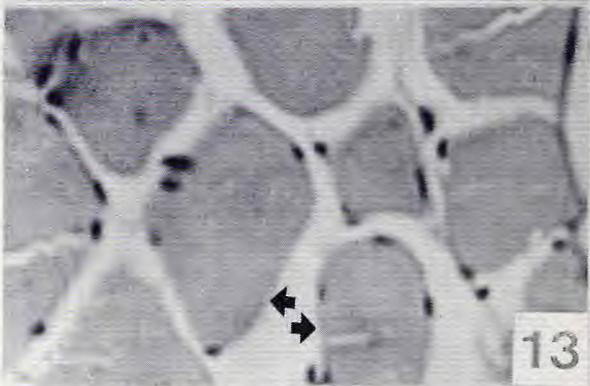
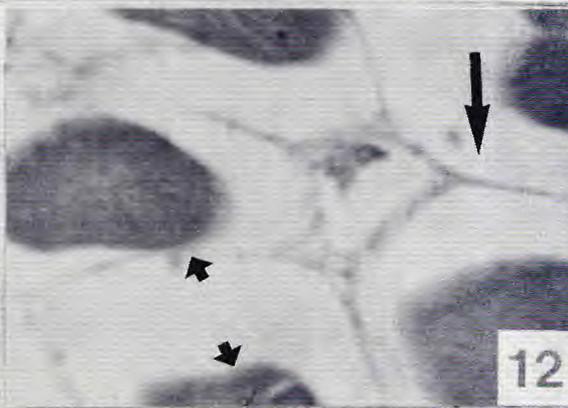
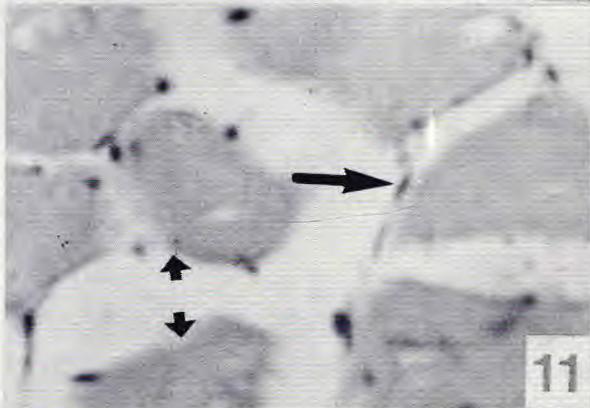
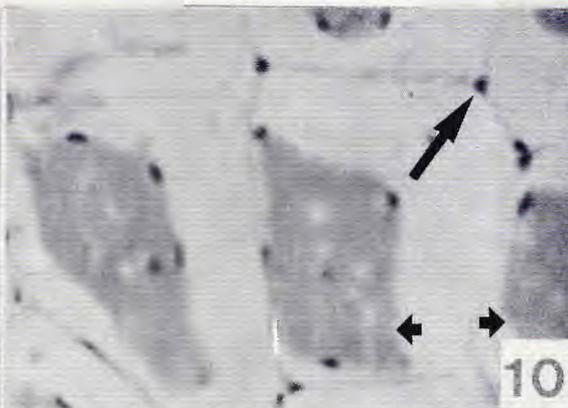
Observar em maiores detalhes os mesmos aspectos da Lâmina I, microfotografados em aumento maior.

Nas fotos das amostras-controle, visualiza-se que os elementos conjuntivos estão intimamente unidos às fitocélulas musculares. Nas fotos 10 e 11, as setas indicam núcleos de fibroblastos. As de número 10, 12 e 14, apresentam de forma evidente, a malha formada pelo endomísio, circundando as fibrocélulas musculares. Na maioria das microfotografias, as setas contrapostas indicam alterações estruturais e afastamento entre as células. Os núcleos destas, estão sempre bem nítidos em todas as fotos das amostras-experimento.

Os cortes histológicos foram realizados transversalmente com uma espessura de 10 μ m. Os métodos de coloração foram o da Hematoxilina de Weigert-Picrofucsina de Van Gieson e o Tricrômico de Masson. Este último método, fotos 12 e 14, destaca mais nitidamente a malha entre as fibrocélulas. Ocular 6,3x e Objetiva 40x.

CONTRÔLE

EXPERIMENTO



5 - CONCLUSÕES

Em virtude do fato que todas as amostras submetidas aos diversos tratamentos enzimáticos, apresentarem ao nível de 5%, diferenças significativas em relação à amostra-controle, é de se concluir que houve realmente uma eficiente atuação das enzimas proteolíticas sobre o grau de maciez da carne, apesar da baixa concentração que foi utilizada, propositadamente, nos diferentes testes.

A ação dos diversos tratamentos, entretanto, não foi uniforme a todos os músculos estudados, constatação esta, também observada por alguns pesquisadores desta área. Assim sendo, a solução de papaina demonstrou ser mais ativa sobre os músculos dianteiros, no caso o Infraspinatus e o Supraspinatus; a de bromelina sobre o Semimembranosus e a de papaina/bromelina 4:1, sobre o Longissimus dorsi.

Foi observado, outrossim, que o efeito proteolítico das enzimas elaboradas no País, no caso a da BIOBRAS e a do CEPED, foi equivalente às daquelas fabricadas no exterior. O produto do CEPED, considere-se, foi apenas testado sobre os substratos artificiais, tendo em vista que por não ser purificado, está legalmente impedido de ser adicionado aos alimentos.

6 - ABSTRACT

This paper deals with the activity of some proteolytic enzymes such as papain and bromelin substracts and on the bovine muscle both from the front and the hind of the animal.

The research to determine the hidrolisis rate of the above enzymes on casein and homoglobin at 35°C, showed that the MERCK bromelin was the most efficient of all. In general, all the enzymes under study had a specific power greater on homoglobin than on casein.

The activity of these proteins on the muscle was defined at three levels: sensorial analysis, mechanical measuring and histologic observation. The sensorial analysis, evidenced a sensible difference at the 5% level between the standard sample and all other samples. At the same level ($P < 0,05$) and for 3:1, concentration rates papain and bromelin were most effective on Longissimus dorsi.

Through mechanical measuring papain was evidenced to be by itself more effective on Infraspinatus and Supraspinatus at 35,75% and 20,44%; bromelin was the most active on Semimembranosus at 27,45% concentration rate while papain/bromelin at the ratio of 4:1 and a 44,35% concentration rate was particulary active on Lon-gissimus dorsi.

The cell survey evidenced structural alterations in the test samples of both the muscle tissue and the connective tissue. This, in turn, evidences that the effect of papain is more effecti-ve on Infraspinatus, Semimembranosus and Supraspinatus than on Lon-gissimus dorsi.

All the factors under consideration in this study showed similar results and this confirms the adequacy of the use of proteo-lytic enzymes to upgrade the quality of beef for marketing purposes.

T A B E L A - 1.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA "BIOBRAS", SOBRE A CA-
SEINA, EM DIFERENTES TEMPERATURAS, pH 5,5- 6,0.

AMOSTRAS T°C	A B S O R B Â N C I A (660 nu)						
	01	02	03	04	05	\bar{X}	B
30	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,010
38	0,14	0,12	0,15	0,13	0,13	0,13	0,005
47	0,18	0,10	0,11	0,15	0,15	0,14	0,000
57	0,21	0,19	0,20	0,20	0,19	0,20	0,020
66	0,18	0,26	0,23	0,25	0,23	0,23	0,010
75	0,19	0,18	0,17	0,18	0,19	0,18	0,005
84	0,12	0,12	0,11	0,12	0,07	0,11	0,000

T A B E L A - 2.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA "MERCK", SOBRE A CASE-
INA EM DIFERENTES TEMPERATURAS, pH 5,5 - 6,0.

AMOSTRAS T°C	A B S O R B Â N C I A (660 nu)						
	01	02	03	04	05	\bar{x}	B
30	0,10	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,010
38	0,19	0,14	0,13	0,18	0,14	0,16	0,010
47	0,18	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,000
57	0,19	0,20	0,19	0,19	0,20	0,19	0,020
66	0,25	0,26	0,25	0,28	0,24	0,26	0,010
75	0,20	0,20	0,21	0,20	0,22	0,21	0,005
84	0,07	0,08	0,07	0,10	0,07	0,08	0,000

T A B E L A - 3.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA "CEPED", SOBRE A CASEI-
NA EM DIFERENTES TEMPERATURAS, pH 5,5 - 6,0.

T ^o C	A B S O R B Â N C I A (660 nu)						
	01	02	03	04	05	\bar{X}	B
30	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,000
38	0,12	0,11	0,10	0,10	0,10	0,11	0,000
47	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,000
57	0,16	0,17	0,15	0,16	0,15	0,16	0,000
66	0,20	0,20	0,18	0,19	0,17	0,19	0,000
75	0,22	0,21	0,23	0,22	0,18	0,21	0,000
84	0,31	0,28	0,29	0,28	0,28	0,28	0,000
89	0,28	0,24	0,24	0,27	0,26	0,26	0,000

T A B E L A - 4.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAINA "MERCK", SOBRE A CASEI-
NA EM DIFERENTES TEMPERATURAS, pH 5,5 - 6,0.

T ^o C	A B S O R B Â N C I A (660 nu)						
	01	02	03	04	05	\bar{X}	B
30	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11	0,000
38	0,16	0,17	0,17	0,16	0,19	0,17	0,000
47	0,17	0,17	0,17	0,19	0,19	0,18	0,000
57	0,20	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,000
66	0,19	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21	0,000
75	0,30	0,22	0,22	0,29	0,29	0,26	0,000
84	0,28	0,25	0,26	0,33	0,28	0,28	0,000
89	0,24	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	0,000

T A B E L A 5.

AÇÃO HIDROLÍTICA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA
"BIOBRAS SOBRE A CASEINA, À TEMPERATURA DE 35°C E pH 5,5 - 6,6.

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA (mg/ml)	ABSORBÂNCIA (650 nu)	
	COM ENZIMA	CONTROLE
15	0,030	0
30	0,050	0
45	0,070	0
60	0,090	0
75	0,110	0

T A B E L A 6.

AÇÃO HIDROLÍTICA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA
"MERCK" SOBRE A CASEINA, À TEMPERATURA DE 35°C E pH 5,5 - 6,0.

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA(mg/ml)	ABSORBÂNCIA (660 nu)	
	COM ENZIMA	CONTROLE
15	0,080	0
30	0,110	0
45	0,130	0,001
60	0,140	0
75	0,150	0,001

T A B E L A 7.

AÇÃO HIDROLÍTICA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE PAPAINA
"MERCK", SOBRE A CASEINA, À TEMPERATURA DE 35°C E pH 5,5 -6,0

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA(mg/ml)	ABSORBÂNCIA (660 nu)	
	COM ENZIMA	CONTROLE
15	0,080	0,010
30	0,095	0,005
45	0,110	0,005
60	0,125	0,005
75	0,140	0,005

T A B E L A 8.

AÇÃO HIDROLÍTICA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA
"BIOBRAS", SOBRE A HEMOGLOBINA À TEMPERATURA DE 35°C E pH 5,5 - 6,0

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA (mg/ml)	ABSORBÂNCIA (750nu)	
	COM ENZIMA	CONTROLE
0,25	0,370	0,190
0,50	0,530	0,200
0,75	0,640	0,220
1,00	0,800	0,230
1,25	0,860	0,250

T A B E L A 9.

AÇÃO HIDROLÍTICA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA
"MERCK", SOBRE A HEMOGLOBINA, À TEMPERATURA DE 35°C E pH 5,5 - 6,0

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA(mg/ml)	ABSORBÂNCIA (750nu)	
	COM ENZIMA	CONTROLE
0,25	0,980	0,270
0,50	-	0,320
0,75	1,500	0,370
1,00	-	0,540
1,25	2,080	0,540

T A B E L A - 10.

AÇÃO HIDROLÍTICA DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE PAPAINA
"MERCK", SOBRE A HEMOGLOBINA À TEMPERATURA DE 35°C E pH 5,5 - 6,0.

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA(mg/ml)	ABSORBÂNCIA (750nu)	
	COM ENZIMA	CONTROLE
0,05	0,520	0,210
0,10	0,620	0,190
0,15	0,720	0,190
0,20	0,850	0,250
0,25	0,970	0,270

T A B E L A - 11.

RESULTADO DA ANÁLISE SENSORIAL, REALIZADA ATRAVÉS DO TESTE DE ORDENAÇÃO (*), POR UM PAINEL DE 10 PROVADORES, DO "LONGISSIMUS DORSI"

PROVADORES	A M O S T R A S					
	1	2	3	4	5	6
P 1	1	4	5	2	3	6
P 2	4	1	5	3	2	6
P 3	3	4	5	2	1	6
P 4	1	4	3	2	5	6
P 5	2	4	5	3	1	6
P 6	1	3	5	4	2	6
P 7	1	2	4	5	3	6
P 8	1	2	4	3	6	5
P 9	6	4	3	2	1	5
P 10	5	4	2	1	3	6
T O T A L	25	32	41	27	27	58

(*) - Mais tenro: 1 - Menos tenro: 6

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

- 1 - Bromelina/Papaina (3:2)
- 2 - Bromelina/Papaina (1:4)
- 3 - Bromelina/Papaina (4:1)
- 4 - Bromelina
- 5 - Papaina
- 6 - Controle

T A B E L A - 12.

MEDIÇÃO MECÂNICA DA MACIEZ ALCANÇADA PELOS DIVERSOS MÚSCULOS
APÓS SUBMETIDOS À DIFERENTES PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS		M Ú S C U L O S			
		<u>INFRASPI- NATUS</u>	<u>SUPRASPI- NATUS</u>	<u>SEMIMEMBRA- NOSUS</u>	<u>LONGISSI- MUS DORSI</u>
1 - PAPAÍNA					
Amostra	1	4,20	12,00	14,50	7,80
	2	6,80	7,00	11,80	7,70
	3	3,90	10,20	15,20	7,50
	4	4,80	3,80	11,30	7,20
	5	4,60	6,10	13,46	9,10
	6	3,70	6,40	16,50	10,00
	\bar{x}	<u>4,60</u>	<u>7,60</u>	<u>13,79</u>	<u>8,21</u>
2 - BROMELINA					
Amostra	1	7,00	8,00	14,30	9,50
	2	6,10	8,50	9,40	5,20
	3	6,80	7,50	17,90	11,60
	4	7,20	8,90	9,80	9,00
	5	7,50	7,80	11,20	11,30
	6	6,30	11,00	9,80	15,00
	\bar{x}	<u>6,81</u>	<u>8,61</u>	<u>12,05</u>	<u>10,26</u>

Continuação:

SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS		M Ú S C U L O S			
		<u>INFRASPI- NATUS</u>	<u>SUPRASPI- NATUS</u>	<u>SEMIMEMBRA- NOSUS</u>	<u>LONGISSI- MUS DORSI</u>
3 - BROMELINA/PAPAINA (3:2) -					
Amostra	1	8,50	6,80	13,00	11,60
	2	6,70	7,40	10,50	5,00
	3	4,70	6,80	11,20	9,50
	4	4,80	10,60	16,40	5,40
	5	6,00	7,70	11,50	8,50
	6	5,50	8,40	11,30	11,50
	\bar{X}	<u>6,03</u>	<u>7,95</u>	<u>12,31</u>	<u>8,58</u>
4 - BROMELINA/PAPAINA (4:1)					
Amostra	1	5,20	9,20	11,20	7,00
	2	7,00	8,60	13,40	7,50
	3	7,20	7,80	10,00	9,40
	4	6,30	6,60	18,50	11,30
	5	6,20	10,00	11,70	11,00
	6	6,30	8,70	12,00	9,60
	\bar{X}	<u>6,36</u>	<u>8,45</u>	<u>12,80</u>	<u>9,30</u>
5 - BROMELINA/PAPAINA (1:4)					
Amostra	1	6,70	8,10	12,00	5,40
	2	4,70	8,20	14,40	3,50
	3	6,20	10,80	8,00	5,60
	4	6,00	6,60	13,70	11,80
	5	5,40	8,90	12,40	6,70
	6	6,50	8,60	13,30	4,60
	\bar{X}	<u>5,91</u>	<u>8,53</u>	<u>12,30</u>	<u>6,25</u>

Continuação:

SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS	M Ú S C U L O S				
	<u>INFRASPI- NATUS</u>	<u>SUPRASPI- NATUS</u>	<u>SEMIMEMBRA- NCSUS</u>	<u>LONGISSI- MUS DORSI</u>	
6 - CONTROLE					
Amostras	1	6,50	5,90	16,40	10,00
	2	12,75	10,00	16,10	11,50
	3	8,00	10,20	16,80	11,50
	4	4,00	8,90	20,80	10,80
	5	5,50	8,00	15,00	11,30
	6	6,20	11,00	14,60	12,40
\bar{x}		<u>7,16</u>	<u>9,00</u>	<u>16,61</u>	<u>11,25</u>

TABELA - 13.

PERCENTAGEM DE EFICIÊNCIA DA APLICAÇÃO DE SOLUÇÕES
 ENZIMÁTICAS SOBRE OS MÚSCULOS ESTUDADOS

DISCRIMINAÇÃO		M Ú S C U L O S			
		INFRASPINATUS	SUPRASPINATUS	SEMIMEMBRA- NOSUS	LONGISSI- MUS DORS.
PAPAINA	(\bar{X})	4,60	7,60	13,79	8,21
CONTROLE	(\bar{X})	7,16	9,00	16,61	11,25
EFICIÊNCIA	(%)	<u>35,75</u>	<u>20,44</u>	<u>17,16</u>	<u>27,02</u>
BROMELINA	(\bar{X})	6,81	8,61	12,05	10,26
CONTROLE	(\bar{X})	7,16	9,00	16,61	11,25
EFICIÊNCIA	(%)	<u>4,88</u>	<u>4,33</u>	<u>27,45</u>	<u>8,80</u>
BROMELINA/PAPAINA					
(3:2)	(\bar{X})	6,03	7,95	12,31	8,58
CONTROLE	(\bar{X})	7,16	9,00	16,61	11,25
EFICIÊNCIA	(%)	<u>15,78</u>	<u>11,66</u>	<u>25,88</u>	<u>23,73</u>
BROMELINA PAPAINA					
(4:1)	(\bar{X})	6,36	8,45	12,80	9,30
CONTROLE	(\bar{X})	7,16	9,00	16,61	11,25
EFICIÊNCIA	(%)	<u>11,17</u>	<u>6,11</u>	<u>22,93</u>	<u>17,33</u>
BROMELINA PAPAINA					
(1:4)	(\bar{X})	5,91	8,53	12,30	6,26
CONTROLE	(\bar{X})	7,16	9,00	16,61	11,25
EFICIÊNCIA	(%)	17,46	5,22	25,94	44,35

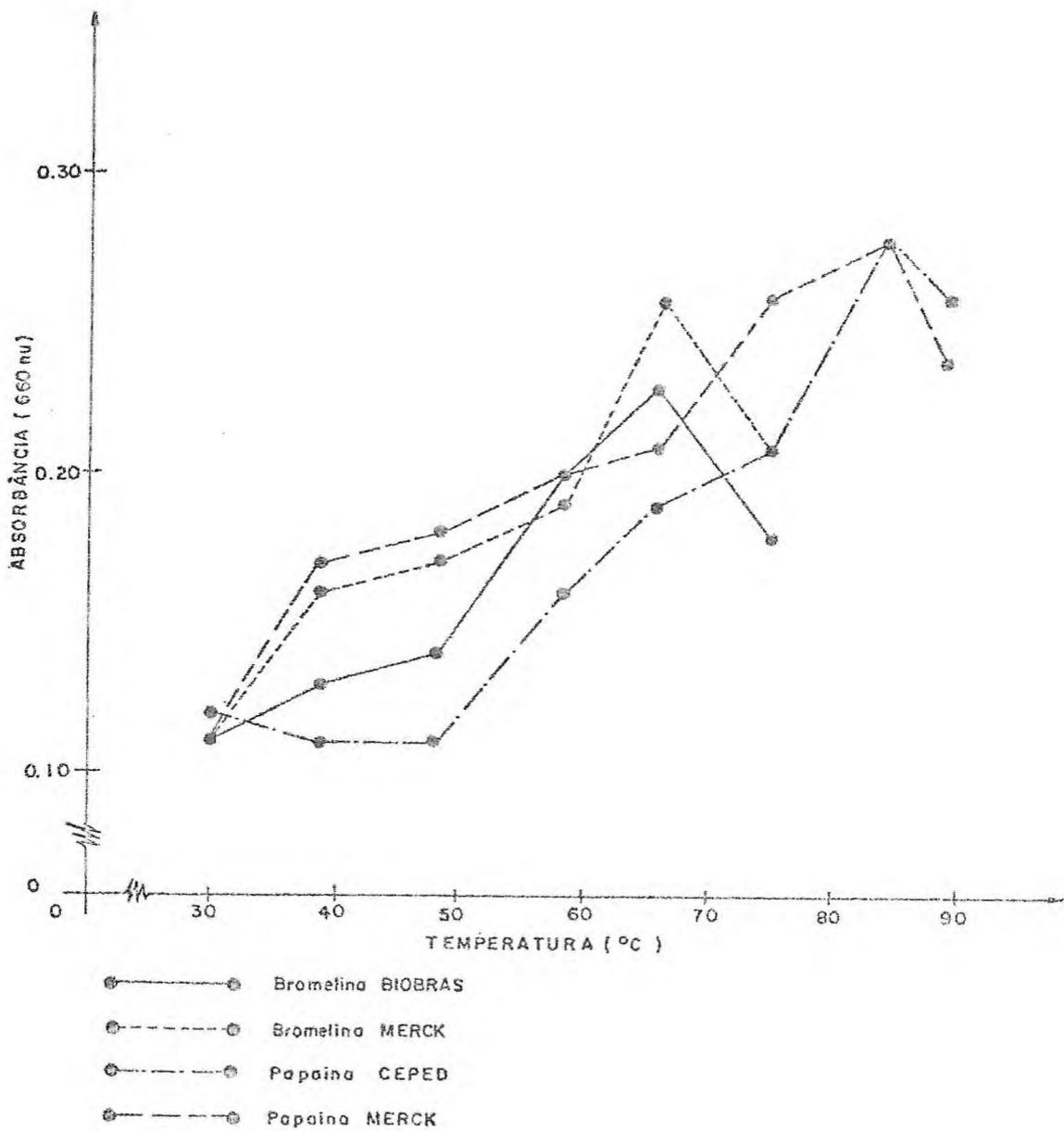


FIGURA 1 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS SOBRE A CASEINA, EM UM pH ENTRE 5.5 E 6.0 SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS..

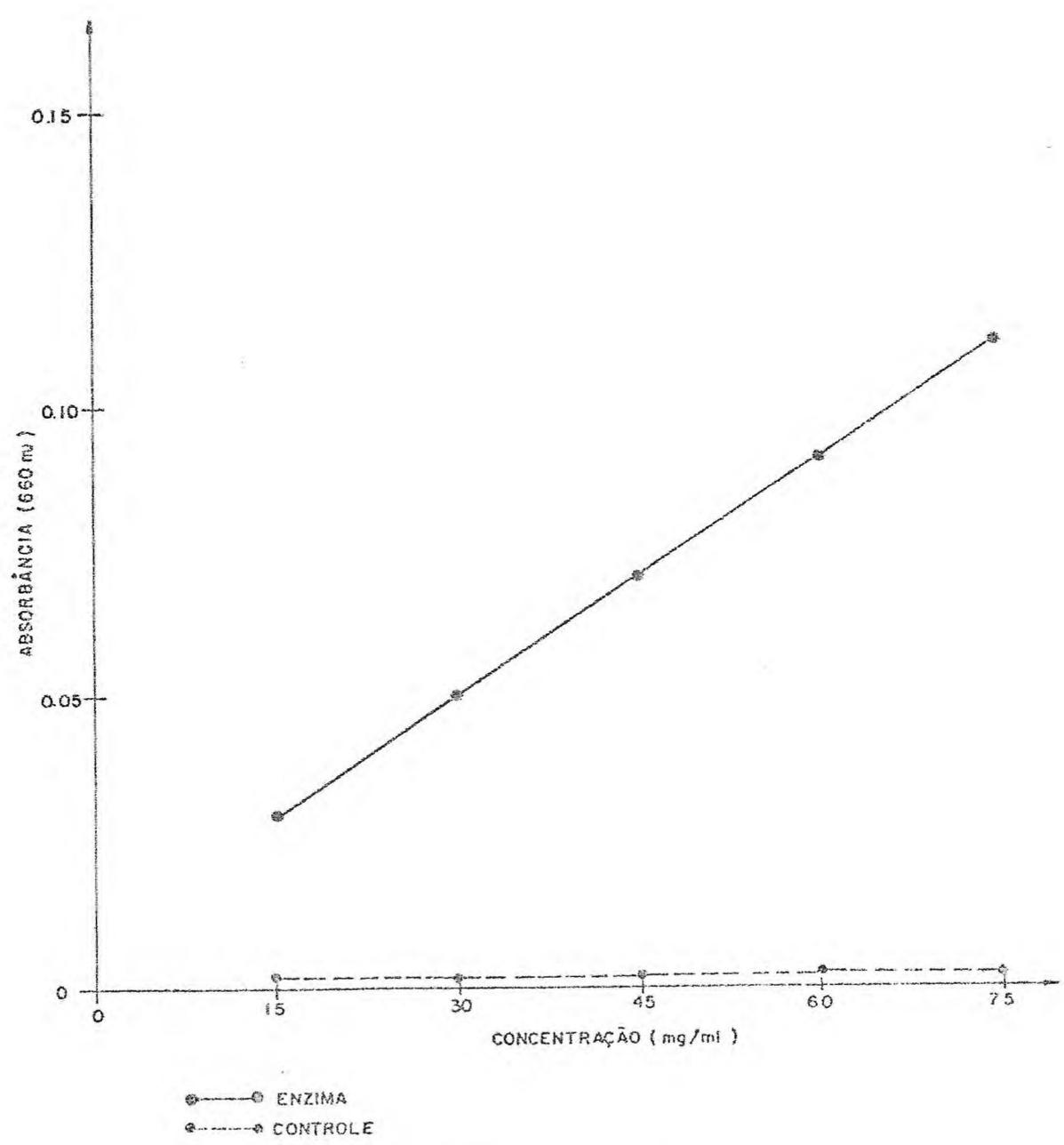


FIGURA 2 - VÁRIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA BIOBRAS SOBRE A CASEÍNA, A UMA TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

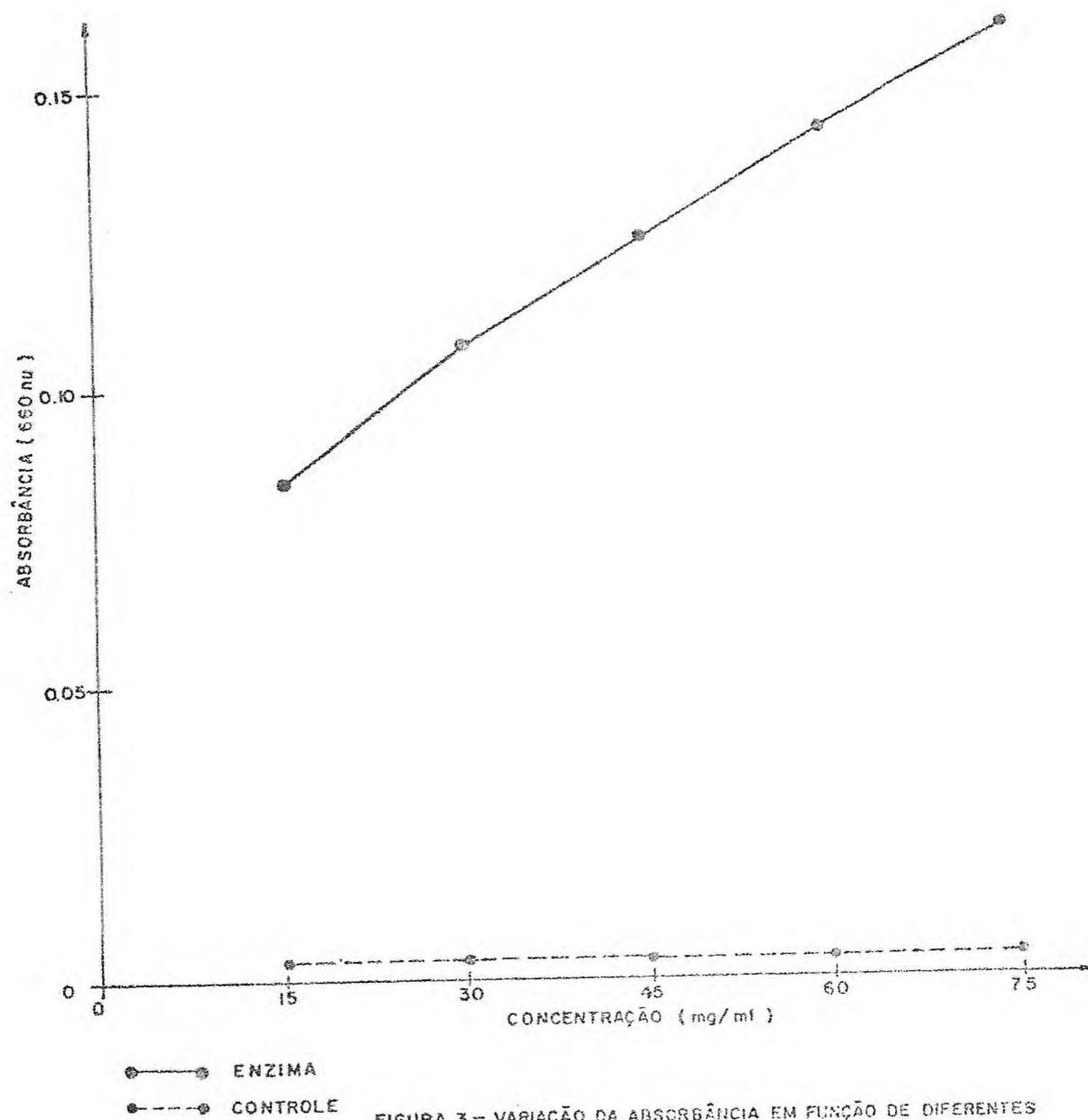


FIGURA 3 - VARIÇÃO DA ABSORVÂNCIA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA MERCK SOBRE A CASEÍNA, A UMA TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

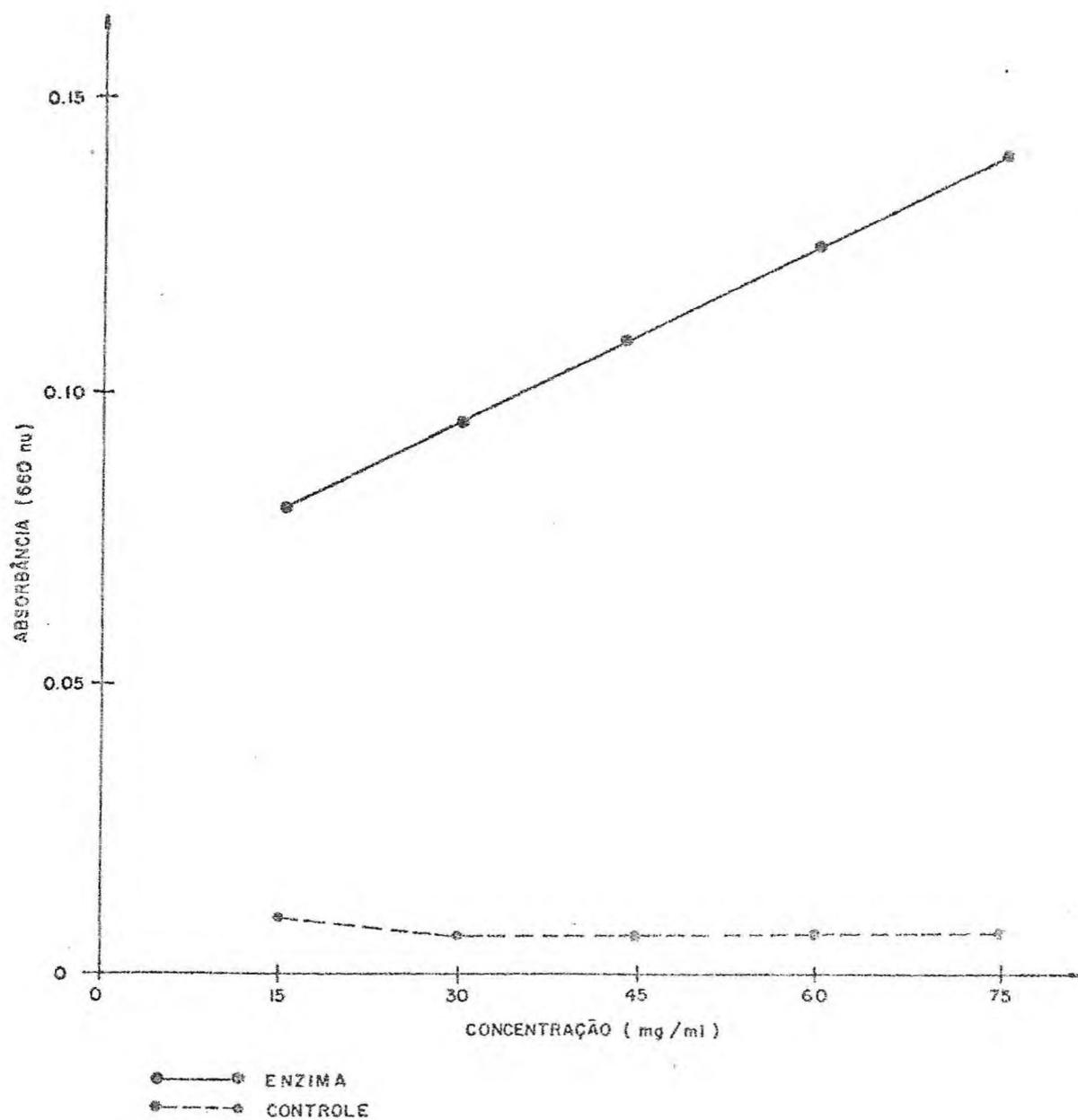


FIGURA 4 - VARIÇÃO DA ABSORVÂNCIA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PAPAINA MERCK SOBRE A CASEÍNA, A UMA TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

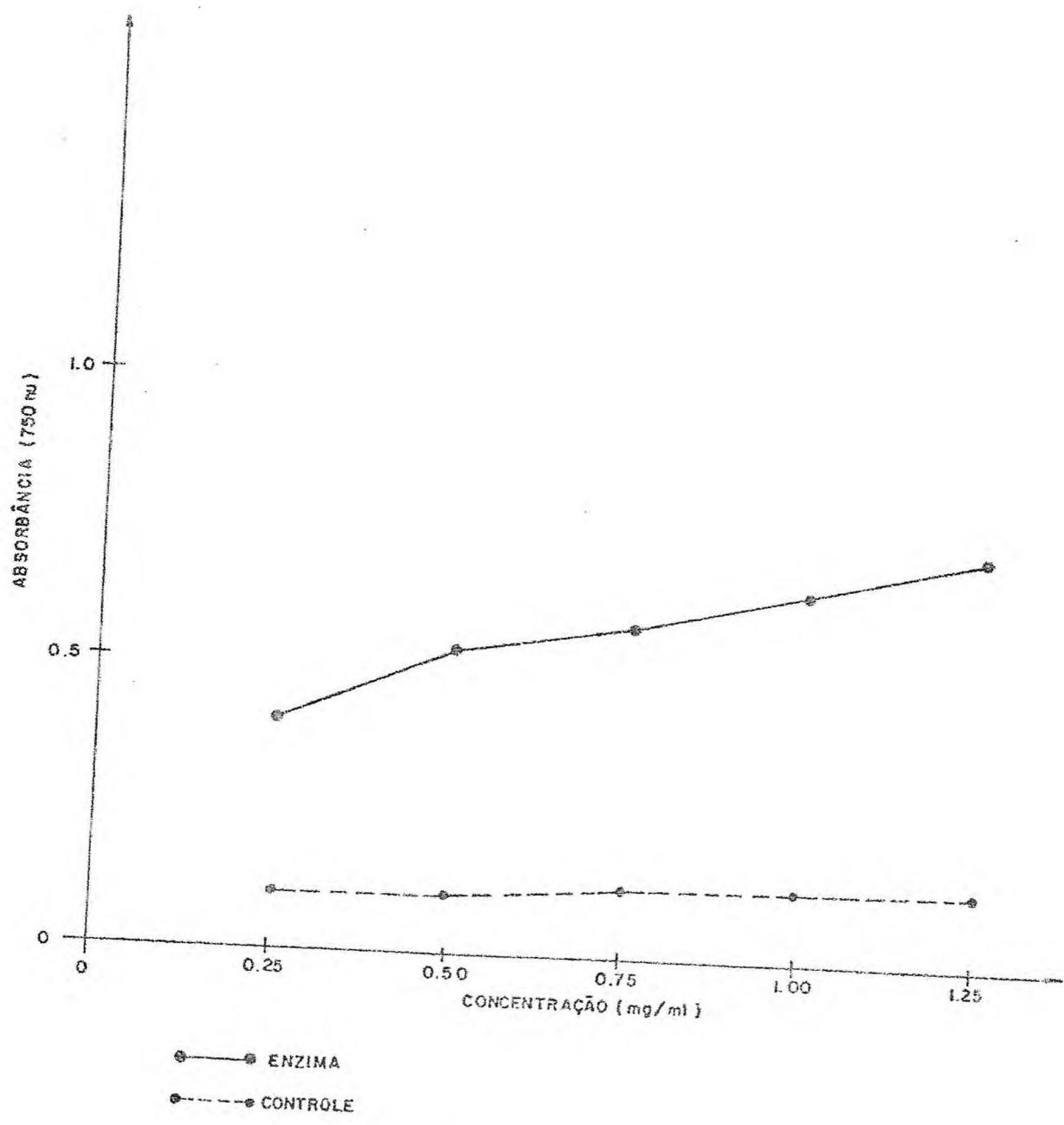


FIGURA 5 - VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA BRASILEIRA SOBRE A HEMOGLOBINA, A UMA TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

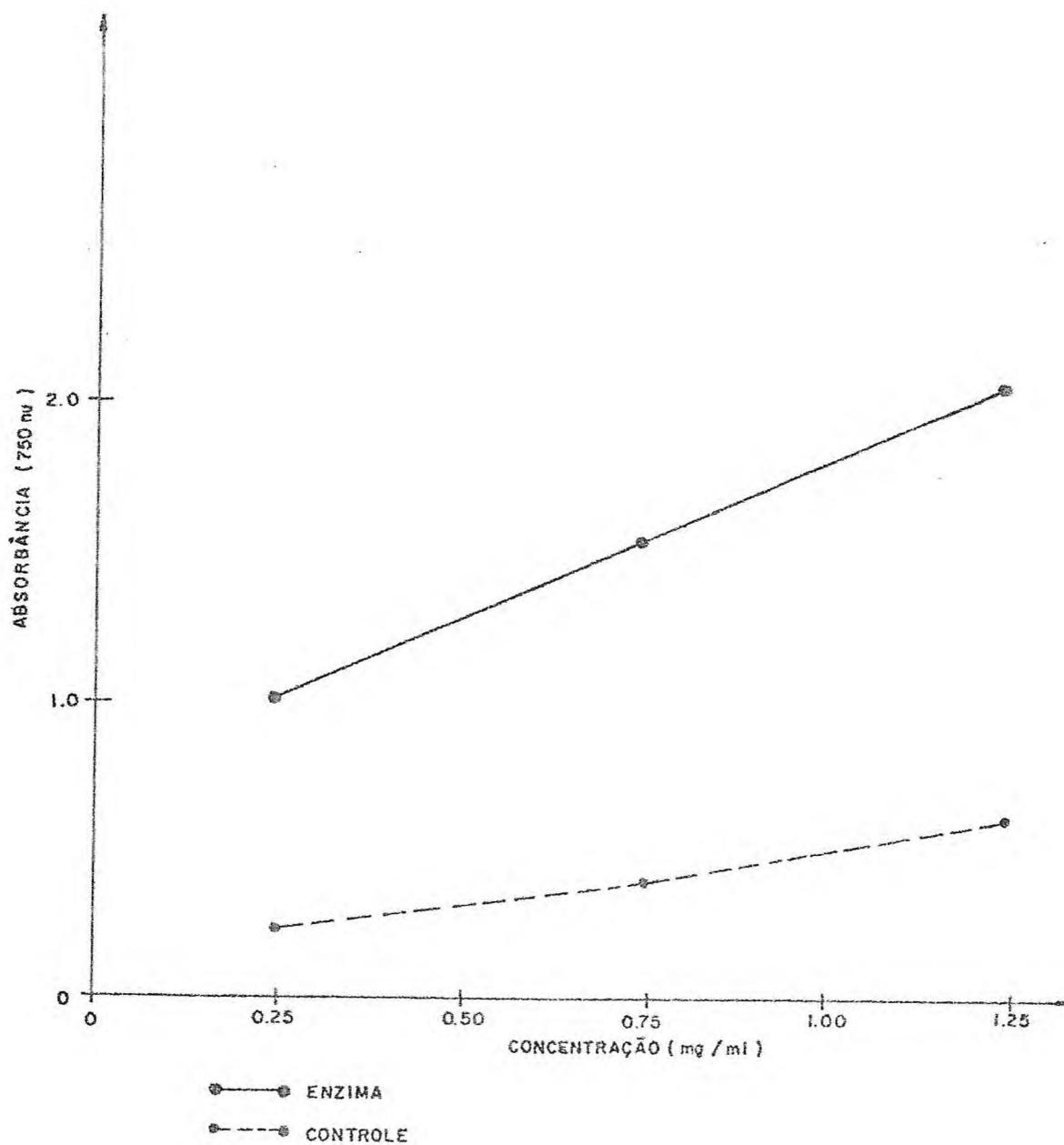


FIGURA 6 - VARIÇÃO DA ABSORBÂNCIA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BROMELINA MERCK, SOBRE A HEMOGLOBINA, A UMA TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

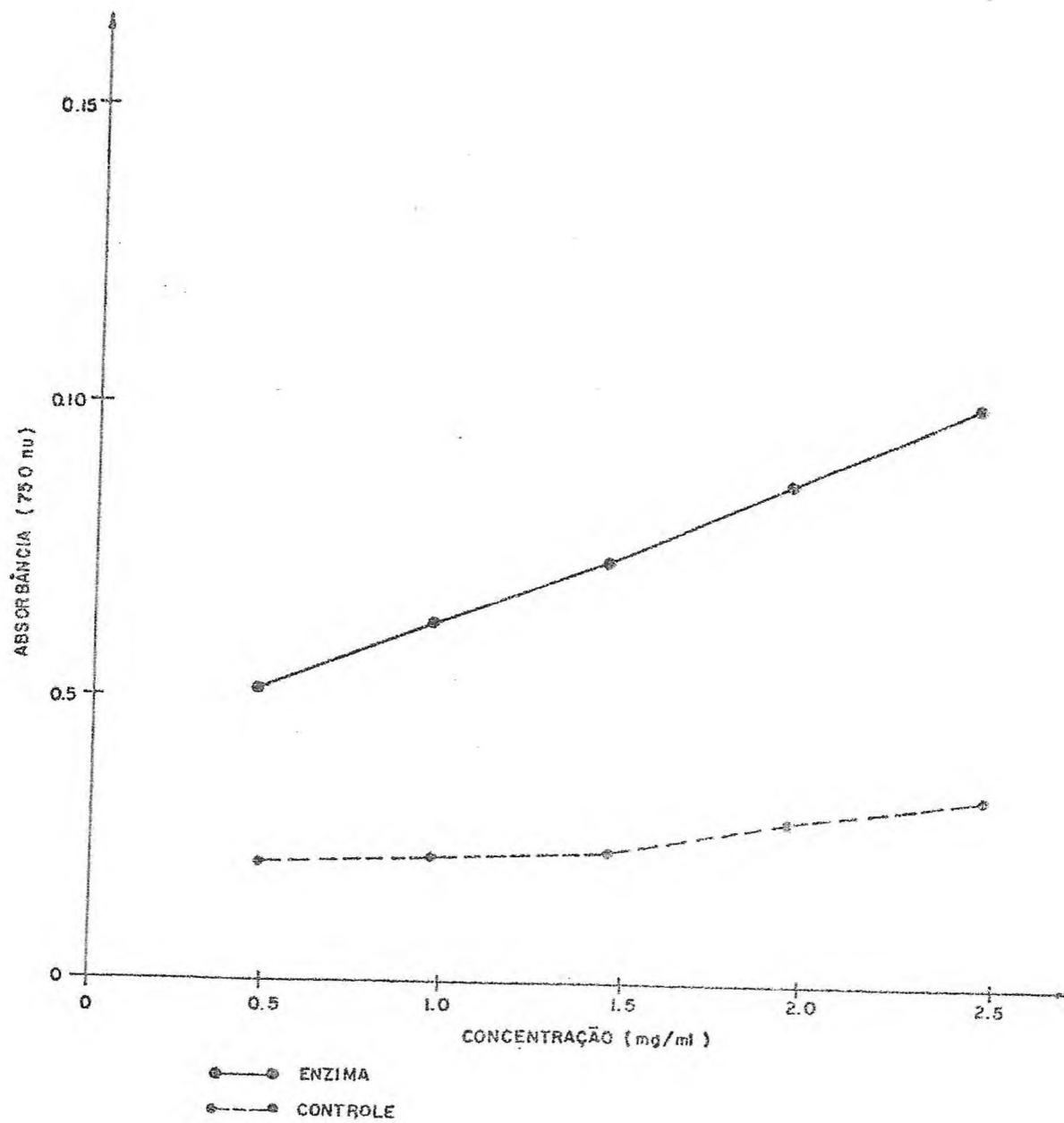


FIGURA 7 - VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA PAPAÍNA MERCK, SOBRE A HEMOGLOBINA, A UMA TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

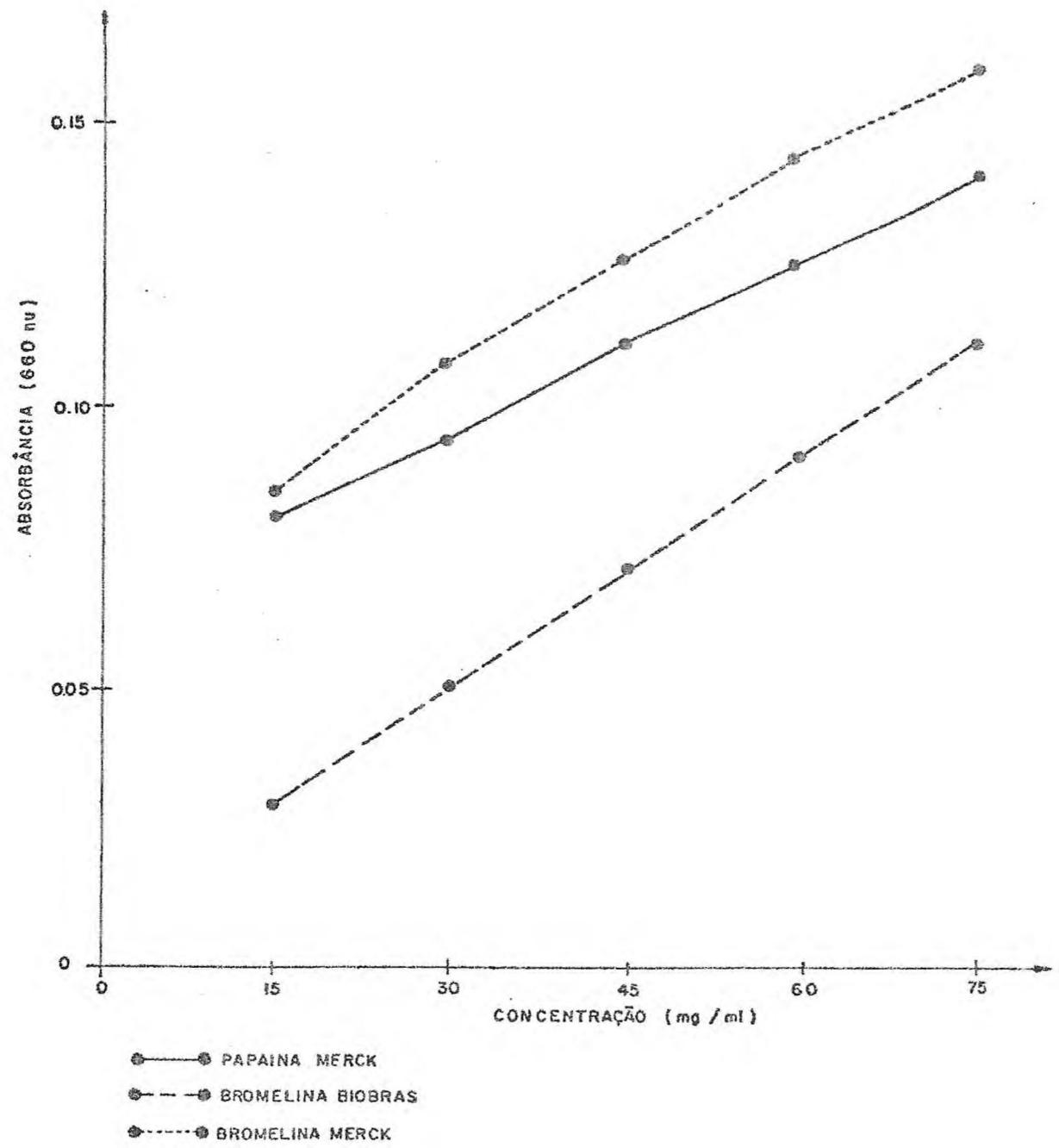


FIGURA B - VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ENZIMÁTICAS SOBRE A CASEÍNA, A UMA TEMPERATURA DE 35° C E pH ENTRE 5.5 E 6.0

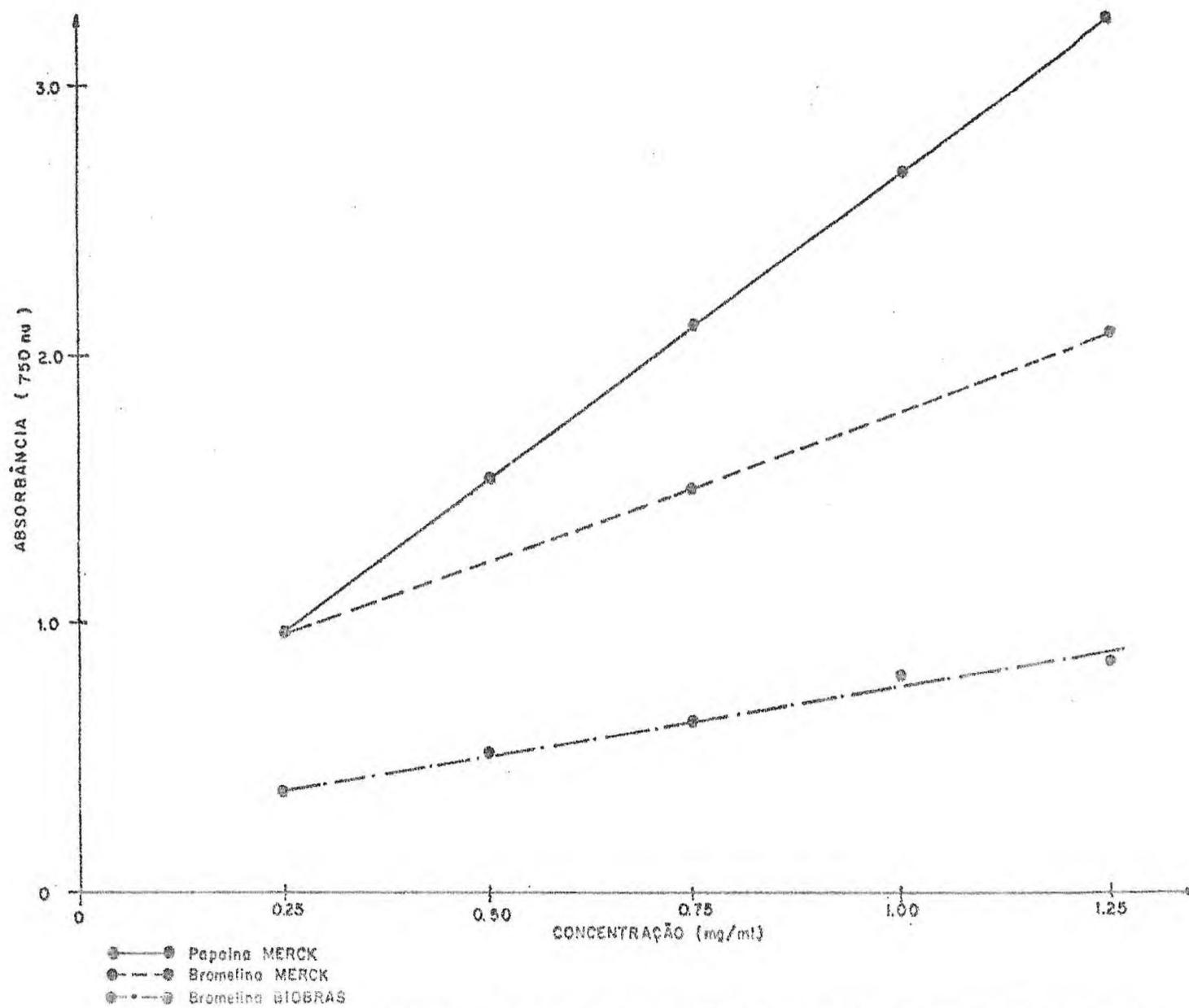


FIGURA 9 - VARIACÃO DA ABSORBÂNCIA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ENZIMÁTICAS SOBRE A HEMOGLOBINA, À TEMPERATURA DE 35°C E pH ENTRE 5,5 E 6,0

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - BERNHOLDT, H.F. Meat and other proteinaceous foods. In: REED, G. Enzymes in Food Processing, 2. ed. New York, San Francisco and London, Academic Press, 1975, p.473-92, passim.
- 02 - BRATZLER, L.J. Palatability characteristics of meat. In: PRICE, J.F. & SCHWEIGERT, R.S. The science of meat and meat products. 2. ed. San Francisco, W.H. Freeman and Co. 1971, p. 328-63, passim.
- 03 - BREIDENSTEIN, B.B; COOPER, C.C; CASSENS, R.G; EVANS, G. & BRAY, R.W. Influence of marbling and maturity on the palatability of beef muscle, J. Anim. Sci., Albany, 26: 893 (abst). 1967.
- 04 - BRISKEY, E.J. & KAUFFMAN, R.G. Quality characteristics of muscle as a food. In: PRICE, J.F. & SCHWEIGERT, R. S. The science of meat and meat products, 2 ed. San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1971, p. 367-401, passim.
- 05 - CARVALHO, G.M. Obtenção de papaina, Salvador, CEPED/SUDENE, 1976, passim.
- 06 - CASSENS, R.G. Microscopic structure of animal tissues. In: PRICE, J.F. & SCHWEIGERT, R.S. The science of meat and meat products, 2 ed. San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1971, p. 11-77, passim.
- 07 - CONN, H.J. & DARROW, M.A. Staining procedures, New York, Biotech Publications, 1946, p.1A3-6.

- 08 - DAVIS, G.W; SMITH, G.C; CARPENTER, Z.L; SUTSON, T.R. & CROSS, H.R., Tenderness variations among beef steak from carcasses of the same USDA quality grade. J. Anim. Sci., Albany, 49 (1): 103-14, 1979, passim.
- 09 - EBASHI, S. Studies on contractile systems from a physiological point of view, Proc. Inst, Union of Physiology Sciences, XXIII International Congress, Tokyo, 1965, apud MARTINS, C.B. Role of catheptic enzymes in meat tenderization, Davis (USA), University of California, 1966, p. 5.
- 10 - FELICIO, P.E. & PICCHI, V. Cortes comerciais. In: Curso Internacional sobre tecnologia de carne, Campinas, ITAL, 1978. p.7.1 - 7.14.
- 11 - FORREST, J.C; ABERLE, E.D; HEDRICK, H.B; JUDGE, M.D. & MERKEL, R.A. Properties of fresh meat, In: _____, Principles of meat science, San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1975, p. 175-89, 298-305.
- 12 - FRUTON, J.S. The enzymes, New York, Academic Press, v.4, p. 233-241, 1960, apud: MARTINS, C.B. Role of Catheptic enzymes in meat tenderization, Davis (USA), University of California, 1966. p. 11.
- 13 - GOLL, D.E; HOEKSTRA, W.G. & BRAY, R.W. Age-associated changes in bovine muscle connective tissue. II - Exposure to increasing temperature, J. Food. Sci. 29: 615-21, 1964.

- 14 - GOLL, D.E; STROMER, M.H; ROBSON, R.M; TEMPLE, J; EASON, B. A. & BUSCH, W.A. Tryptic digestion of muscle components many of the changes caused by postmortem storage, J. Anim. Sci., Albany, 33 (5); 963-82, 1971.
- 15 - GOULD, B.J. Enzyme date, In: WISEMAN, A. Handbook of enzyme biotechnology, New York, John Wiley & Sons Ltd., 1975, p. 259.
- 16 - HAENDLER, J. & HUET, R. La papaine, Paris, Institut Français des Recherches Frutières Outre-Mer (IFAC), Fruits, 20 (8): 411-15, 1965.
- 17 - HAMM, R. Water-holding capacity of meat, In: COLE, D.J.A. & LAWRIE, R.A. Meat, Westport, AVI, 1975, p. 321-38, passim.
- 18 - HEARNEY, L.E; PENFIELD, M.P. & GOERTZ, G.E. Heating effects on bovine semitendinosus: shear, muscle fiber measurements and cooking losses, J. Food Sci. 43:10-12, 1978.
- 19 - IBGE, Anuário Estatístico do Brasil, Rio de Janeiro, 1978, p.387.
- 20 - JOSEPH, R.L. & CONNOLLY, J. Tenderness of bull and steer beef, Irish Journal of Agricultural Research, Dublin, 13:307-22, 1974, passim.
- 21 - JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. Histologia básica, 4ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 1968.

- 22 - KANG, C.K. & RICE, E.E. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes, J. Food Sci., 35:563-65, 1970.
- 23 - KANG, C.K. & WARNER, W.D. Tenderization of meat with papaya latex proteases, J. Food Sci., 39:812-18, 1974.
- 24 - KELLAWAY, R.C; SEAMARK, R.F. & FARRANT, R.K. Sterilization of cattle by induced cryptorchidism. Aust. Vet. J., 47:547, apud, PURCHAS, R.W. The relative importance of some determinants of beef tenderness, J. Food Sci., 37:342, 1972.
- 25 - KIMMEL, J.R. & SMITH, E.L. Crystalline papain. I - Preparation, specificity and activation, J. Biol Chem., 207:515-31, 1974. passim.
- 26 - KRAMER, D.E. & WHITAKER, J.R. Ficus enzymes. III - Properties of the proteolytic enzymes from the latex of "Ficus carica" variety Kadota, The J. Biol. Chem., 239(7):2178-83, 1964.
- 27 - LASSOUDIÈRE, A. La papaine: production, propriétés, utilisation. Paris, Institut Français des Recherches Frutières Outre-Mer (IFAC), Fruits, 24(11-12): 503-17, 1969.
- 28 - LAWRIE, R.A. Ciencia de la carne, 2. ed. Zaragoza (España), Editorial Acribia, 1977, p. 150-79, passim.
- 29 - LI, J.C.R. Statistical inference, 3. ed. Michigan, Edwards Brothers, Inc., 1966, p. 611-12.

- 30 - MARSH, B.B; WOODHAMS, P.R. & LEET, N.G. Studies in meat tenderness. 5. The effects of tenderness of carcass cooling and freezing before the completion of rigor mortis. J. Food Sci., Chicago, 33 (1): 12-16, 1968.
- 31 - MARTINS, C.B. Role of catheptic enzymes in meat tenderization, Davis (USA), University of California, 1966, p. 4-14, passim.
- 32 - _____. Tenderness of certain muscles from mature beef cows. Arizona, University of Arizona, 1974, passim.
- 33 - MAXWELL, D.R; HOFFMAN, M.P; SELF, H.L; TOPEL, D.G. & BERGER, P.J. Beef quality grade: factor analysis and estimation. J. Anim. Sci. Albany, 39: 172 (abst), 1974.
- 34 - MIER, G; RHODES, V.J; MAHARG, L.G; WEBB, N.S; HODGERS, C; MANGEL, M. & BALDWIN, R. Beef tenderization by proteolytic enzymes: The effects of two methods of application. Food Technology, 4: 111-13, 1962.
- 35 - MCRAIS, M.A.C. Métodos para avaliação sensorial de alimentos, Campinas, UNICAMP, 1978, p. 67-80.
- 36 - MULLER, L; WEST, R.L; PALMER, A.Z. & CARPENTER, J.W. Indices of tenderness in cow carcasses. J. Anim. Sci., Albany, 39: 173 (abst), 1974.
- 37 - NEWBOLD, R.P. & HARRIS, P.V. The effect of pre-rigor changes on meat tenderness. J. Food Sci., Albany, 37: 337-40, 1972.

- 38 - NORMAN, G.A. pH, carne bovina enegrecida; PSE e encurtamento pelo frio. In: Curso Internacional sobre Tecnologia da Carne, Campinas, ITAL, 1978, passim.
- 39 - PARK, Y.K. & DRAETTA, Y.Y. Aplicação de vários enzimos proteolíticos de carnes, Campinas, Coletânea do ITAL, 3: 29-39, 1969/70.
- 40 - PEARSON, A.M. Muscle function and post-mortem changes, In: PRICE, J.F. & SCHWEIGERT, R.S. The science of meat and meat products, 2. ed. San Francisco, W.H. Freeman and Co. 1971, p. 208-29, passim.
- 41 - POTTER, N.N. Food Science, 2. ed. Westport, AVI, 1973, p. 391-423, passim.
- 42 - PROPERTIES OF MEAT AND TENDERIZERS. In: Meat tenderizing manual, Chicago, B. Heller and Co., 1975, p. 13-19, passim.
- 43 - PROST, E; PELCZYNSKA, E. & KOTULA, A.W. Quality characteristics of bovine meat. I - Content of connective tissue in relation to individual muscles, age and sex of animals and carcass quality grade, J. Anim. Sci., Albany, 41 (2): 534-40, 1975.
- 44 - PURCHAS, R.W. The relative importance of some determinants of beef tenderness, J. Food Sci., Albany, 37: 341, 1972.
- 45 - REED, G. Health and legal aspects of the use of enzymes. In: Enzymes in Food Processing, 2.ed..New York, San

Francisco and London, Academic Press, 1975, p. 549-54, passim.

- 46 - ROBINSON, H.E. & GOESER, P.A. J. Home Econ., 54(3), 1962, apud: BERNHOLDT, H.F. Meat and other proteinaceous foods, In: REED, G. Enzymes in food processing. 2.ed. New York and San Francisco, Academic Press, 1975. p. 473-92.
- 47 - SAWYER, R. The composition of meat: analytical aspects. In: COLE, D.J.A. & LAWRIE, R.A. Meat, Westport, AVI, 1975, p. 285-301, passim.
- 48 - SCHWEIGERT, B.S. Food aspects of enzymes affecting proteins. In: SCHULTZ, H.W. Food enzymes, Westport, AVI, 1960, p. 97-103.
- 49 - SMITH, G. C; WEST, R.L; REA, R.H. & CARPENTER, Z.L. Increasing the tenderness of bullock beef by use ante-mortem enzyme injection, J. Food Sci., Albany, 38: 182-3, 1973.
- 50 - TSEN, C.C. & TAPPEL, A.L. Meat tenderization. III- Hydrolysis of actomyosin, actin and collagen by papain, Food Research, 24 (4): 362-64, 1959.
- 51 - TUCKER, H.Q; VOEGELI, M.M. & WELLINGTON, G.H. A cross sectional muscle nomenclature of the beef carcass, Michigan State College Press, 1952, p. 5-29.
- 52 - TUMA, H.J; HENRICKSON, R.L; STEPHENS, D.F. & MOORE, R. Influence of marbling and animal age on factors associa

- ted with beef quality. J. Anim. Sci., Albany, 21:848, 1962.
- 53 - WALTER, M.J; GOLL, D.E; ANDERSON, L.P. & KLINE, E.A. Effects of marbling and maturity on beef tenderness. J. Anim. Sci., Albany, 22: 1115 (abst.), 1963.
- 54 - WANG, H; WIER, C.E; BIRKNER, M.L. & GINGER, B. Studies on enzymatic tenderization of meat. III- Histological and panel analysis of enzymes preparations from three distinct sources. Food Research, 23: 423-38, 1959.
- 55 - WEISSMAN, G. & THOMAS, L. The effect of corticosteroids upon connective tissue and lysosomes, Rec. Prog. Horm. Res., 20: 215, apud: PURCHAS, R.W. The relative importance of some determinants of beef tenderness, J. Food. Sci., 37: 342, 1972.
- 56 - WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the foods sciences. New York, Marcel Dekker Inc. 1972, p.515-48.
- 57 - WISEMAN, A. Industrial practice with enzymes. In: Handbook of enzyme biotechnology, New York, John Willey & Sons Ltd. 1975, p. 259.
- 58 - YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. Enzymes in food processing, 2. ed. Wisconsin, Academic Press, 1975, p. 123-59.
- 59 - YEATES, N.T.M. Avances in Zootecnia, Zaragoza, Ed. Acribia, 1967, p. 191-269, passim.
- 60 - YUDKIN, J. The meat-eating habit in man. In: COLE, D.J.A. & LAWRIE, R.A. Meat. Westport, AVI, 1975, p. 285-301.