

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INFLUÊNCIA DO CONGELAMENTO, TEMPERATURA E TEMPO DE  
ESTOCAGEM NA QUALIDADE DA CARNE BOVINA**

Laíse Gomes Custódio

Orientador: Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

GOIÂNIA

2017

LAÍSE GOMES CUSTÓDIO

**INFLUÊNCIA DO CONGELAMENTO, TEMPERATURA E TEMPO DE  
ESTOCAGEM NA QUALIDADE DA CARNE BOVINA**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciência Animal junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de  
Goiás

**Área de Concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Linha de Pesquisa:**

Controle de Qualidade em Produtos de Origem Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado – EVZ/UFG

Prof. Dr. Emmanuel Arnhold – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Senhor, que é a razão de tudo.

À minha família que é o meu sustento e suporte para todos os momentos e que me proporciona todo tipo de oportunidade para crescer.

Ao professor e orientador Moacir Evandro Lage por todo apoio e ensino compartilhado, pelo comprometimento e empenho que fomentam a pesquisa, ensino e educação.

Aos co-orientadores Cristiano Sales Prado e Emmanuel Arnhold pelo ensino e suporte para o aprendizado e realização desse projeto.

À toda equipe do CPA, pela ajuda, disposição e coleguismo. Aos colegas do programa de pós-graduação pelos treinamentos, conselhos, incentivos e palavras de ânimo.

Agradeço por toda comunidade acadêmica da Universidade Federal de Goiás, com todos seus recursos e organização que tornam possível a pesquisa em nossa sociedade.

Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia pela oportunidade de participar deste programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Estrutura e composição da carne .....	3
2.2 Armazenamento em congelamento .....	6
2.3 Oxidação de proteínas .....	10
3. OBJETIVOS .....	16
3.1 Objetivo Geral .....	16
3.2 Objetivos Específicos .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Materiais .....	17
4.2 Métodos .....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS .....	31

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Estrutura geral do músculo. Fonte: Adaptado de Listrat et al. <sup>17</sup> .....	3
FIGURA 2 –	Estruturas microscópicas de uma fibra muscular. As bandas A, I e H e a linha Z compõem o sarcômero. Fonte: Adaptado de Craig; Padrón <sup>18</sup> .....	4
FIGURA 3 –	Fotomicrografias de amostras de músculo semimembranoso congelado à -65°C durante 12 horas e descongelado em sequência. (A) Fibra muscular da carne fresca. (B) Fibra muscular da carne depois de diferentes tratamentos de congelamento e descongelamento. Fonte: Adaptado de Jeong et al. <sup>42</sup> .....	7
FIGURA 4 –	Esquematização das consequências mais comuns da oxidação de proteínas. (1) Irradiação, exposição à luz, metais catalisadores e peroxidação são algumas causas que geram a proteína radical. (2) Formam-se proteínas com ligação cruzada, aminoácidos com cadeia lateral modificada e fragmentação de proteínas. (3) Subprodutos formados. Fonte: Adaptado de Lund et al. <sup>13</sup> .....	11
FIGURA 5 –	Formação de carbonila da reação de cadeia lateral de Lisina, através da via de catalisação por metais. (1) Retirada do átomo de hidrogênio. (2) Íons de metais de transição. (3) Formação de AAS. Fonte: Adaptado de Estevez <sup>12</sup> .....	12
FIGURA 6 –	Extremidade da molécula de proteína, ligação cruzada entre as cadeias pesadas de miosina e resíduos de cisteína. Fonte: Lund et al. <sup>13</sup>	14
FIGURA 7 –	Associações de como a carbonilação e oxidação de proteínas podem afetar as características sensoriais e tecnológicas da carne. Fonte: Adaptado de Estévez <sup>12</sup> .....	15

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição centesimal de alguns tipos de carne. Fonte: Adaptado de Torres et al. <sup>23</sup> .....	5
TABELA 2 – Preparo das concentrações padrão de albumina para obtenção da curva-padrão para análise de carbonila.....	18
TABELA 3 – Curva de calibração para análise de TBARS.....	19
TABELA 4 – Preparo das concentrações-padrão de hidroxiprolina para obtenção de curva-padrão da análise colágeno solúvel.....	21
TABELA 5 – Caracterização da composição centesimal (umidade, lipídeos, proteína e cinzas) do músculo <i>Longissimus dorsi</i> em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.....	25
TABELA 6 – Mensuração dos subprodutos da oxidação de proteínas (carbonila e sulfidrila) e da oxidação lipídica (TBARS) do músculo <i>Longissimus dorsi</i> em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.....	26
TABELA 7 – Valores médios da concentração de colágeno total do músculo <i>Longissimus dorsi</i> em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.....	27
TABELA 8 – Valores médios da Perda de Peso por Cocção (PPC), Perda de Peso por Descongelamento (PPD), Capacidade Retenção de Água (CRA) e Força de Cisalhamento (FC) do músculo <i>Longissimus dorsi</i> em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.....	28

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

PPC – Perda de Peso por Cocção

PPD – Perda de Peso por Descongelamento

FC – Força de Cisalhamento

CRA – Capacidade de Retenção de Água

Kgf – Kilograma-força

## RESUMO

O consumo da carne bovina tem aumentado a cada ano, e junto com ele tem surgido um consumidor mais exigente, que demanda maior qualidade. Produção em larga escala e manutenção da qualidade é um desafio atual no cenário da indústria da carne. A produção em larga escala dos produtos cárneos estão intimamente ligados à refrigeração e meios de conservação para transporte e distribuição. O congelamento, técnica imprescindível nesse mercado, possibilita a comercialização desse produto a nível mundial. Em contra partida, associado ao um longo prazo de armazenamento, o congelamento pode alterar várias propriedades da carne. Uma importante alteração nesse tipo de condicionamento é a oxidação, e se tratando da carne e sua composição biológica, as reações oxidativas são comuns de ocorrerem. Os lipídeos e proteínas podem mudar seus compostos devido a essas reações químicas. A oxidação de proteínas tem sido investigada com maior critério dado a sua grande importância e influência na manutenção dos atributos dos produtos cárneos. Objetivou-se verificar as alterações causadas pelo longo período de armazenamento e duas temperaturas de congelamento de amostras de *Longissimus dorsi* bovino. Foram realizadas análises de oxidação de proteína e lipídeos, avaliação da capacidade de retenção de água, quantificação de colágeno solúvel, avaliação do índice de fragmentação miofibrilar, foram calculadas as perdas de peso por descongelamento e cocção, força de cisalhamento e composição centesimal. Amostras de *Longissimus dorsi* foram submetidas a tratamentos pelo frio,  $-18^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$  de temperatura, em diferentes intervalos de tempo, inicial e 45 dias de armazenamento. Os resultados de sulfidril e colágeno apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o tempo inicial e os grupos armazenados em congelamento por 45 dias, mas não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupo de temperatura ( $-18^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ ). As outras análises não apresentaram diferenças significativas entre o tempo inicial e tempo de armazenamento, nem entre os dois grupos de temperatura ( $-18^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ ).

**Palavras-chave:** carbonila; descongelamento; força de cisalhamento; oxidação de proteínas.



## ABSTRACT

The cows beef consumption increases every year, and along with it a more demanding consumer emerged, who demands higher quality. Large-scale production and quality maintenance is a current challenge in the meat industry scenario. The first one is closely linked to refrigeration and storage media for transportation and distribution. The freezing, indispensable technique in this market, makes possible the commercialization of this product worldwide. In contrast, when associated with a long-term storage, freezing can change various properties of the meat. An important change in this type of conditioning is oxidation, and when it comes to meat and its biological composition, oxidative reactions are common to occur. Lipids and proteins can change their compounds because of these chemical reactions. The oxidation of proteins has been investigated with greater criteria due to its great importance and influence in the maintenance of the attributes of meat products. The objective of this paper was to verify the changes caused by the long storage period for two freezing temperatures of beef. There were made protein and lipid oxidation, water retention capacity, soluble collagen quantification, myofibrillar fragmentation index evaluation, weight loss by thawing and cooking analysis; where shear force and centesimal composition were calculated. *Longissimus dorsi* samples were subjected to cold treatments, temperature of  $-18^{\circ}\text{C}$  and  $-40^{\circ}\text{C}$ , at different time intervals, initial and after 45 days of storage. The analysis performed were: centesimal composition, carbonyl, sulfhydryl, TBARS, soluble and total collagen, weight loss by cooking, freezing weight loss, shear force and water retention capacity. The sulfhydryl and collagen results showed statistically significant differences between the initial time and the groups stored in freezing for 45 days, but did not present significant differences between the two temperature groups ( $-18^{\circ}\text{C}$  and  $-40^{\circ}\text{C}$ ). The other analysis did not show significant differences between the initial time and storage time nor between the two temperature groups ( $-18^{\circ}\text{C}$  and  $-40^{\circ}\text{C}$ ).

**Key words:** protein oxidation; shear force; thawing; softness; carbonyl.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos pode ser influenciada por vários fatores relacionados tanto com o ambiente onde estão armazenados, como também com os constituintes específicos de cada produto. A carne fresca é um produto altamente perecível devido à sua composição biológica, e suas características podem ser alteradas pela ação de microrganismos, enzimas endógenas, oxigênio atmosférico, luz, umidade, temperatura de manutenção e tipos de embalagens para distribuição<sup>1</sup>.

Métodos de conservação dos alimentos são utilizados em larga escala, com o objetivo de prolongar a vida útil e manter suas qualidades, sejam elas sensoriais ou nutricionais. O congelamento, técnica milenar, tem sido cada vez mais aprimorado para gerar mínimas alterações no produto depois de sua aplicação<sup>2</sup>.

Na indústria, o congelamento desempenha papel essencial, possibilitando o fornecimento e comercialização de produtos com maior segurança para várias regiões do mundo, mas as consequências na qualidade da carne ainda é um problema significativo<sup>3</sup>. O congelamento provoca várias alterações físicas e físico-químicas, o que pode desencadear a deterioração das propriedades da carne<sup>4</sup>.

Redução da deterioração microbiana, maior tempo de armazenamento e preservação das características sensoriais e nutricionais são os principais objetivos da técnica de congelamento e estocagem em baixas temperaturas nos produtos cárneos. Entretanto a qualidade do alimento ainda pode ser afetada devido à aplicação desse processo<sup>5, 6</sup>.

A carne “in natura” ou processada, quando congelada e estocada à temperatura de pelo menos  $-18^{\circ}\text{C}$ , pode ser armazenada por vários meses<sup>3</sup>. A duração máxima do tempo de armazenamento dependerá do tipo da carne e da temperatura. A carne suína congelada em temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  pode ser armazenada por até 12 meses e quando armazenada a  $-30^{\circ}\text{C}$ , a vida de armazenamento aumenta para 24 meses, enquanto a carne bovina pode ser mantida sob congelamento por até 12 meses em temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  e por 24 meses quando estocada em temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ <sup>7</sup>.

Algumas características da carne podem ser afetadas quando congeladas ou armazenadas em temperaturas abaixo do ponto de congelamento. Mudanças no teor de umidade, cor, pH, maciez; desnaturação e oxidação de proteínas; oxidação de lipídeos e alterações na carga microbiana podem ser observados<sup>8</sup>. Apesar da deterioração microbiana ser efetivamente reduzida com o congelamento, a qualidade da carne pode ser afetada

especialmente na textura, sabor e cor. Efeitos prejudiciais são observados devido à remoção osmótica da água, desnaturação da miosina, injúria das fibras musculares, entre outros<sup>8,9</sup>.

Os processos de congelamento, armazenamento em congelamento e descongelamento contribuem para a diminuição da capacidade de retenção de água da carne, que está intimamente relacionada com a ruptura de estruturas das fibras musculares e alterações das proteínas, incluindo a sua desnaturação<sup>8</sup>. Por consequência, uma maior quantidade de exsudato pode ser formada, resultando em maior carreamento de proteínas solúveis, peptídeos, aminoácidos e nutrientes para o meio extracelular e, conseqüentemente, perda do valor nutricional do alimento<sup>10,11</sup>.

As proteínas são os componentes principais do tecido muscular, desempenhando papel decisivo nos aspectos sensorial, nutricional e tecnológico da carne<sup>12</sup>. A descoberta que as proteínas dos músculos são susceptíveis às reações oxidativas e que isso reflete na diminuição da qualidade dos produtos cárneos motivou o interesse de pesquisas na qualidade de carne e na nutrição humana<sup>12</sup>.

O conhecimento científico sólido sobre os mecanismos e formação da oxidação de proteínas tem se desenvolvido atualmente, já que a ocorrência e impacto desse processo foi ignorado por décadas, devido ao fato das alterações na carne geralmente ter sido sempre associadas à oxidação dos lipídeos e deterioração microbiana<sup>12,13</sup>.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estrutura e composição da carne

A estrutura do músculo estriado esquelético é composta por células individuais, denominadas fibras e são envolvidas por tecido conjuntivo<sup>14</sup>. O músculo é subdividido em agrupamentos de células musculares. Estes feixes, também denominados de fascículos, são cercados por uma fina estrutura de tecido conjuntivo chamada perimísio. O epimísio é uma bainha relativamente espessa do mesmo tecido que envolve o músculo inteiro e na maioria dos tipos de músculos e continua com os tendões e fazendo a ligação dos músculos aos ossos<sup>15</sup> (Figura 1).

As células musculares também são envolvidas pelo endomísio, estrutura de tecido conjuntivo que se encontra acima da membrana das células, o sarcolema. Essa é uma estrutura basal que está associada com uma camada exterior (camada reticular), rodeada por finas camadas de fibras colágenas, encaixadas em uma matriz<sup>8, 16</sup>.

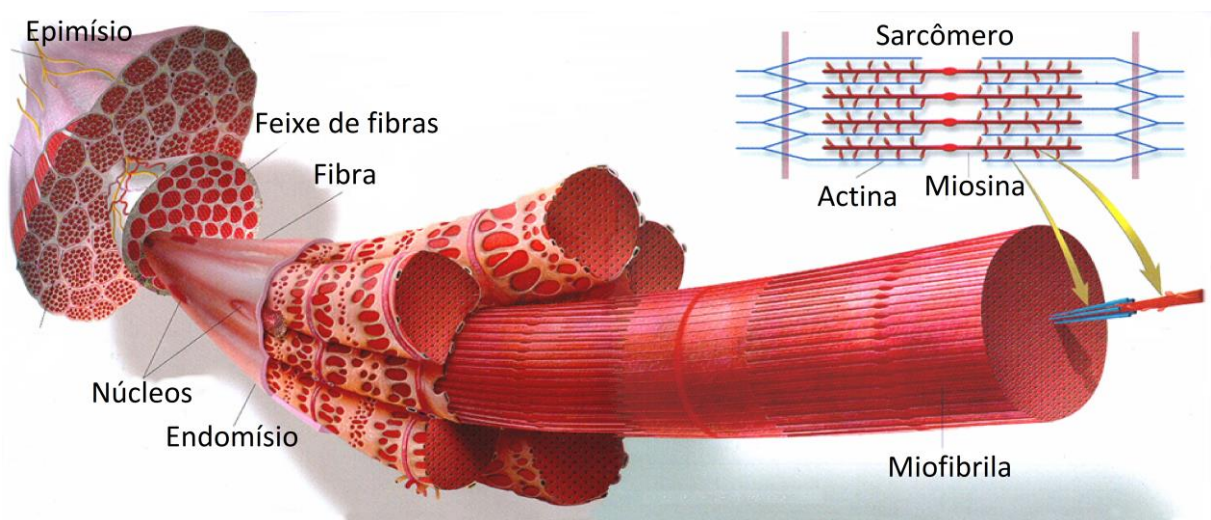


FIGURA 1 – Estrutura geral do músculo. Fonte: Adaptado de Listrat et al.<sup>17</sup>

Microscopicamente, as células musculares são estruturadas em estrias transversais regulares. Esse aspecto se forma pela alternância de proteína densa (banda A) e proteína menos densa (banda I) dentro da miofibrila (Figura 2). Uma linha de maior espessura, denominada linha Z atravessa a banda I, e o espaço entre duas linhas Z é denominado sarcômero, unidade básica responsável pela contração muscular<sup>15</sup>.

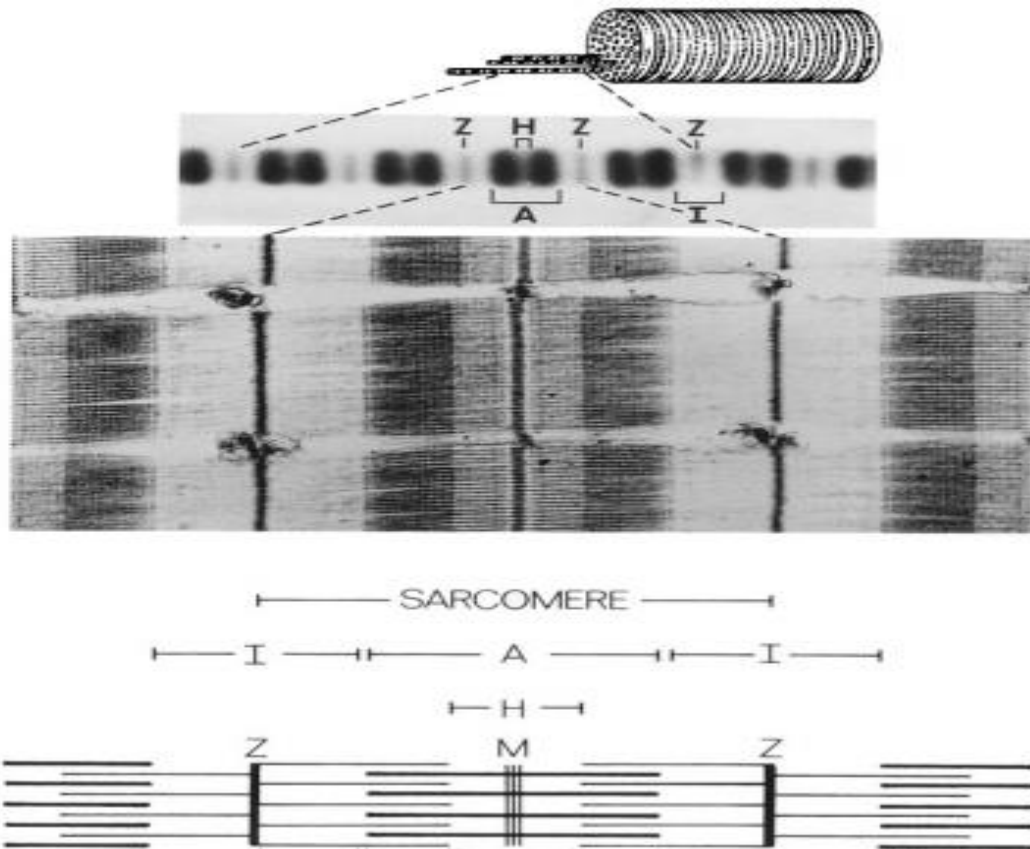


FIGURA 2 - Estruturas microscópicas de uma fibra muscular. As bandas A, I e H e a linha Z compõem o sarcômero.

Fonte: Adaptado de Craig; Padrón<sup>18</sup>

O sarcômero é uma estrutura complexa contendo pelo menos 28 tipos de proteínas<sup>16, 19</sup>. A miosina é a proteína mais abundante do músculo, e juntamente com outras proteínas miofibrilares, especialmente actina, troponina e tropomiosina, influenciam nas propriedades bioquímicas e de contratilidade do músculo e, conseqüentemente, no desenvolvimento do *rigor mortis*<sup>16</sup>.

As proteínas miofibrilares sofrem várias alterações durante o *rigor mortis*<sup>14</sup>. O complexo actinmiosina é formado com a interação permanente entre as proteínas actina e miosina, devido à baixa concentração de ATP. Outras transformações bioquímicas ocorrem durante e depois desse processo, caracterizando a conversão do músculo em carne<sup>8, 14, 16</sup>. Após essa fase, se desenvolvem as principais qualidades do alimento cárneo: cor, suculência, sabor, maciez e textura<sup>3</sup>. Essas características podem ser influenciadas pela ação de enzimas endógenas que atuam sobre a estrutura miofibrilar e também por mecanismos e reações químicas que continuam ocorrendo quando estocadas em baixas temperaturas<sup>15</sup>.

A carne bovina apresenta vários componentes nutricionais, como aminoácidos essenciais, que ajudam na manutenção nas necessidades da alimentação do homem, sendo esse

alimento classificado com alto valor biológico<sup>20</sup>. De acordo com a OCDE (2017), o consumo global de carne (porco, aves, ovelhas, bovinos e vitelo) em 2016 foi de 317 milhões de toneladas e desde 1995, a taxa média anual de crescimento foi de 2,3%. Sendo que a carne bovina cresceu pouco mais de 1% ao ano, tendência observada em todo o mundo<sup>21, 22</sup>.

De maneira geral, as carnes são compostas por aproximadamente 20% de proteínas, 5% de lipídeos, 1% de hidratos de carbono e 1% de vitaminas e minerais, sendo a água a composição maior de 75%<sup>14</sup>. A Tabela 1 demonstra a composição química dos principais tipos de carne<sup>23</sup>.

TABELA 1 – Composição centesimal de alguns tipos de carne.

Carnes	Composição Centesimal			
	Água	Proteína (%)	Gordura	Minerais
Suína	75,1	22,8	1,2	1,0
Bovina	75,0	22,3	1,8	1,2
Vitelo	76,4	21,3	0,8	1,2
Frango - peito	75,0	22,8	0,9	1,2
Frango – coxa	74,7	20,6	3,1	-
Peru - peito	73,7	24,1	1,0	-
Peru - coxa	74,7	20,5	3,6	-
Pato	73,8	18,3	6,0	-
Ganso	68,3	22,8	7,1	-

Fonte: Adaptado de Torres et al.<sup>23</sup>

A carne e produtos à base de carne constituem uma importante opção de nutrientes, proteínas e energia para a dieta da população<sup>24</sup>. Além de fornecer proteínas de alto valor biológico, a carne é uma fonte valiosa de ácidos graxos de cadeia longa, microminerais essenciais (cobre, ferro, iodo, manganês, selênio, zinco), a maioria das vitaminas B, e uma série de outros micronutrientes<sup>24, 25</sup>

A carne vermelha é uma fonte rica de ferro e essa concentração pode variar de acordo com o tipo de corte, dieta fornecida aos animais e idade ao abate<sup>26</sup>. A carne bovina contém cerca de 1,4 e 2,9 mg de ferro a cada 100 g, e essa variação depende da concentração de mioglobina e proteínas do grupo heme<sup>26</sup>. Ferro heme representa uma parcela significativa do ferro total em carne vermelha<sup>27</sup>. Nas reações oxidativas, pode participar doando ou recebendo elétrons, desempenhando um papel importante para as reações oxidativas e manutenção da qualidade nesse tipo de alimento<sup>28</sup>.

## 2.2 Armazenamento em congelamento

O congelamento é um método de conservação mais difundido para carnes e derivados<sup>29</sup>. A carne devido à sua composição, fornece um ambiente ideal para o crescimento de patógenos e microrganismos deteriorantes, sendo o armazenamento em condições de congelamento uma alternativa popular para preservação da qualidade e sua distribuição<sup>30</sup>.

Alguns fatores como a velocidade de congelamento e flutuações de temperatura durante a estocagem influenciam na qualidade da carne congelada<sup>31</sup>. A faixa de temperatura e seu controle inadequado durante o armazenamento podem alterar propriedades sensoriais e nutricionais<sup>30, 32</sup>.

Métodos tradicionais de congelamento podem causar perdas na qualidade da carne como ruptura da estrutura celular, aumento da perda por gotejamento e, conseqüentemente, alterações nos valores sensoriais<sup>2</sup>. O tratamento inadequado da carne pelo congelamento pode causar degradação e desnaturação das proteínas, aumento da ação enzimática e desencadeamento dos processos de oxidação e deterioração microbiana<sup>2, 33</sup>.

A temperatura final da carne congelada e armazenada, influencia na quantidade de água que não se congela e que permanece disponível para diversas reações. Estudos mostram que carnes congeladas em temperaturas acima de  $-20^{\circ}\text{C}$  mantém situação favorável para o desenvolvimento de reações bioquímicas. A temperatura ótima relatada para armazenamento da carne congelada é de  $-40^{\circ}\text{C}$ , já que neste ponto, apenas uma porcentagem mínima de água permanece descongelada<sup>8, 12</sup>.

### 2.2.1 Influência do congelamento na Capacidade de Retenção da Água (CRA)

A carne “in natura” possui alta capacidade de reter umidade e é uma das características mais importantes para a qualidade nesse tipo de alimento<sup>15</sup>. A água está presente em aproximadamente 75% da composição da carne<sup>14</sup>. A maior parte da água está contida dentro das miofibrilas (cerca de 85%) e o restante pode estar localizado no espaço entre as miofibrilas, entre o sarcolema e as miofibrilas, entre as fibras musculares ou entre os feixes<sup>14, 15</sup>.

A localização da água na carne pode mudar em consequência dos fatores do próprio tecido muscular e do manuseio do produto<sup>34</sup>. Tanto a quantidade de água, quanto a sua distribuição podem ser afetadas no congelamento e descongelamento<sup>35</sup>.

A carne, assim como diversos alimentos, possui uma baixa condutividade térmica, por isso técnicas convencionais de congelamento nesse tipo de produto ocasionam a formação lenta dos cristais de gelo. Essa taxa lenta de congelamento resulta na formação de grandes e

irregulares cristais de gelo e desuniformidade na distribuição dentro das fibras musculares, causando danos ao tecido muscular<sup>36</sup>.

A capacidade de retenção de água também pode ser afetada pelo tempo de armazenamento em congelamento, ocorrendo sua diminuição. Essa perda está associada, principalmente, com o fenômeno de recristalização da água e desnaturação das proteínas musculares<sup>37</sup>. Os processos de oxidação lipídica e proteica também podem influenciar a capacidade de reter umidade<sup>38</sup>.

### 2.2.2 Desnaturação de proteínas

Mudanças significativas no ambiente das fibras musculares afetam as características da membrana celular, influenciando diretamente na qualidade da carne<sup>39</sup>. Desnaturação das proteínas caracteriza-se em mudanças de suas estruturas secundárias e terciárias, isso devido à ruptura nas ligações covalentes (dissulfeto) e não-covalentes (eletrostáticas, de hidrogênio e ligações hidrofóbicas)<sup>40</sup>.

O congelamento por um longo período pode causar desnaturação das proteínas devido à formação dos cristais de gelo que alteram a redistribuição e concentração de solutos dentro das fibras musculares<sup>30, 41</sup>.

Estudos comparam fotomicrografias antes e depois do congelamento de carne bovina (Figura 3). Amostras de músculo semimembranoso foram armazenadas por 12 horas a uma temperatura de  $-65^{\circ}\text{C}$  e descongeladas por 12 horas a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . As fibras musculares da carne fresca apresentam melhores condições quando comparada as amostras congeladas, devido à formação de cristais de gelo durante ciclos de congelamento que resulta em danos das fibras musculares<sup>42</sup>.

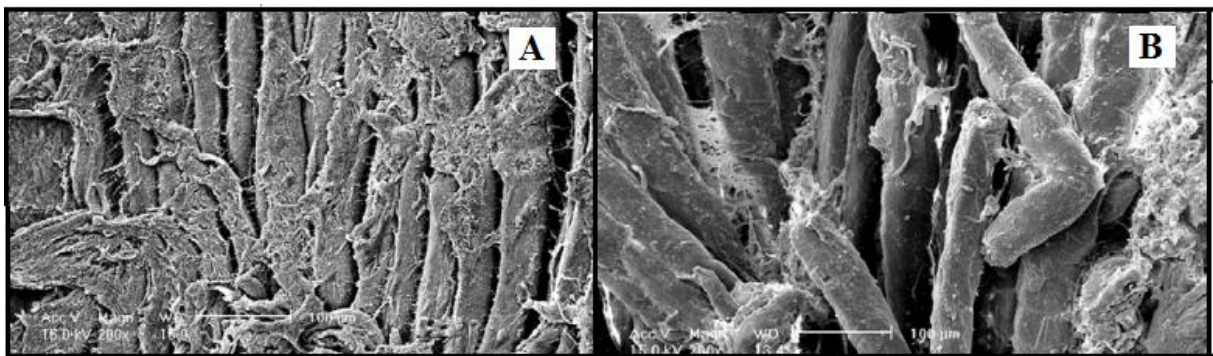


FIGURA 3 – Fotomicrografias de amostras de músculo semimembranoso congelado à  $-65^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas e descongelado em sequência. (A) Fibra muscular da carne fresca. (B) Fibra muscular da carne depois de diferentes tratamentos de congelamento e descongelamento. Fonte: Adaptado de Jeong et al.<sup>42</sup>



Desnaturação e degradação proteolítica são processos observados nas proteínas musculares armazenadas em temperaturas abaixo de zero<sup>37</sup>. A formação de cristais de gelo, juntamente com a recristalização da água e formação de exsudato devido à flutuações de temperatura durante a estocagem são fatores importantes que aumentam a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, alteração da qualidade<sup>30</sup>.

### 2.2.3 Atividade enzimática

O processo de amadurecimento da carne se inicia no período de *rigor mortis* e dependendo da carcaça pode ocorrer entre 3 e 24 horas após a morte do animal<sup>43, 44</sup>. Esse fenômeno acontece devido à liberação de cálcio que estava armazenado no retículo sarcoplasmático e nas mitocôndrias das células, ativando as proteases dependentes de cálcio, denominadas calpaína 1 e 2<sup>45</sup>. Outras enzimas também podem estar ligadas a esse processo, como catepsinas<sup>46</sup>, proteassomas e caspases<sup>44, 47</sup>.

As alterações bioquímicas *post mortem* naturais que ocorrem no músculo dos animais são determinantes essenciais da maciez final da carne<sup>39, 48</sup>. A ação de proteases endógenas sobre as fibras musculares produz efeito de maturação *post mortem*, conferindo melhoria na maciez da carne<sup>49</sup>. A proteólise miofibrilar, o comprimento do sarcômero e a quantidade de tecido conjuntivo estão diretamente relacionados com essa maciez<sup>39, 50</sup>.

Quando a carne é congelada, a taxa de proteólise é interrompida devido à supressão das atividades das calpaínas, entretanto essas enzimas não são destruídas<sup>51</sup>. Após o descongelamento, o processo proteolítico é restabelecido com a reativação das proteases dependentes de cálcio, podendo ser retomado a uma taxa mais rápida do que antes do congelamento<sup>44, 51</sup>. Isso pode ser explicado devido ao fato dos cristais de gelo crescerem e penetrarem o retículo sarcoplasmático, fazendo com que, após o descongelamento desses cristais, a liberação de cálcio no sarcoplasma seja mais rápida do que a remoção desses íons por bombas de cálcio<sup>52</sup>.

### 2.2.4 Cor, textura e sabor

A cor da carne “in natura” é considerada o mais importante atributo para os consumidores. Especialmente para a carne vermelha, como a bovina e a de cordeiro, é um indicador de frescor e qualidade para os consumidores<sup>53, 54</sup>. A cor dos alimentos cárneos pode ser influenciada por muitos fatores antes e *pós mortem*, como espécie, sexo, idade, localização anatômica e função fisiológica dos músculos, atividade física, variação do pH, taxa de

refrigeração da carcaça, tipos de embalagem e armazenamento influenciam a concentração e o estado químico dos pigmentos, mudando a cor da carne<sup>17, 44, 55</sup>.

O vermelho brilhante dos produtos cárneos é atribuído pela formação da oximioglobina, composto formado pela reação da mioglobina com o oxigênio. Quando a carne está armazenada à vácuo, a mioglobina está no seu estado reduzido, refletindo uma cor vermelho roxa. A oxidação da mioglobina, forma o composto metamioglobina, resultando na cor marrom, que é negativamente avaliada pelos consumidores<sup>44, 56</sup>.

O armazenamento em congelamento influencia na estabilidade da cor<sup>8</sup>. Essa alteração da cor pelo congelamento é justificada pelos danos às fibras musculares durante o congelamento, perdas por descongelamento e conseqüente remoção das enzimas redutoras da mioglobina (citocromo-enzimas)<sup>44</sup>.

O tempo de armazenamento congelado a longo prazo podem produzir efeitos variados nos parâmetros de cor da carne, e em alguns casos, podem ser atribuídos à oxidação lipídica e desnaturação proteica<sup>44, 57</sup>.

A maciez da carne é definida pela facilidade de mastigação, e particularmente para a carne bovina, ela é um dos principais medidores da qualidade pelos consumidores<sup>44</sup>. Ela pode ser avaliada pela força de cisalhamento e pela pesquisa sensorial, sendo essa uma avaliação mais subjetiva. A maciez da carne é uma variável intimamente dependente do processo de proteólise, sendo que a influência do congelamento sobre as enzimas reflete na mudança de resultados da força de cisalhamento<sup>44, 52</sup>.

O sabor da carne pode ser definido por diversos componentes, como aminoácidos, açúcares e gordura<sup>58, 59</sup>. De uma maneira geral, carnes congeladas em temperaturas abaixo de 15°C negativos, descongeladas e imediatamente cozidas, não apresentam diferenças significativas no sabor<sup>44</sup>. Entretanto a produção de derivados da oxidação lipídica, como aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos durante prazos maiores de armazenamento em congelamento possibilitam a formação da rancidez oxidativa, e podem levar à alterações no sabor da carne<sup>58</sup>. Cor e sabor podem ser alterados por mecanismos oxidativos, e a maciez da carne é influenciada por esses mecanismos juntamente com a proteólise<sup>60</sup>.

### **2.2.5 Oxidação de lipídeos**

Oxidação lipídica é um processo complexo e está intimamente ligada a perda de sabor e valor nutricional nos alimentos cárneos<sup>58</sup>. Os produtos cárneos congelados podem ter limitação no tempo de prateleira, pois a presença de lipídeos poliinsaturados podem desencadear a formação de ranço e deterioração de textura e sabor<sup>31</sup>.

Acredita-se que a oxidação lipídica ocorra principalmente na membrana celular, sendo assim, carnes magras ou gordas podem sofrer esse processo<sup>8</sup>. A partir da retirada de um átomo de hidrogênio de uma cadeia de ácido graxo, forma-se um radical livre que rapidamente reage com o oxigênio, gerando os produtos primários da oxidação, ou também denominados peróxidos. Esses compostos, extremamente instáveis, ocasionam uma série de reações secundárias que conduzem à degradação lipídica e desenvolvimento da rancidez oxidativa. Eles podem provocar oxidação de pigmentos, alteração do aroma e perda de vitaminas<sup>61</sup>.

Ácidos graxos insaturados oxidados podem se ligar as proteínas, formando complexos lipídeo-proteína insolúveis. Dessa forma, os processos de oxidação lipídica podem provocar descoloração, mudanças de textura e aroma e produção de compostos potencialmente tóxicos<sup>61</sup>. Produtos secundários da degradação de lipídeos podem produzir mudanças nas proteínas como a perda da atividade enzimática, polimerização, insolubilidade, ruptura e formação de complexos proteico-lipídicos<sup>40</sup>.

Durante o armazenamento em congelamento, os processos de oxidação são retardados, mas não cessam<sup>8</sup>. Alguns radicais solúveis em lipídeos podem ser ainda mais estáveis em temperaturas mais baixas, e assim propagar a oxidação<sup>31</sup>.

### **2.3 Oxidação de proteínas**

Processos de oxidação influenciam não somente os lipídeos, mas também as proteínas<sup>30</sup>. A oxidação lipídica e proteica podem ocorrer concomitantemente durante a estocagem da carne congelada, e há interação entre esses processos<sup>5</sup>. Assim como outras macromoléculas, as proteínas miofibrilares são susceptíveis a reações oxidativas, sendo miosina e troponina T, as mais sensíveis<sup>12</sup>.

O impacto e ocorrência da oxidação de proteínas ainda não está totalmente definido, mas sabe-se que pode levar a perda de aminoácidos essenciais, alterações na estrutura e funcionalidade das proteínas<sup>8</sup>, e diminuição da solubilidade<sup>8, 62</sup>. Estudos mais recentes destacaram que essa alteração oxidativa também está relacionada com alterações na hidrofobicidade e conformação (agregação e fragmentação) das proteínas, influenciando a susceptibilidade de substratos para enzimas proteolíticas (Figura 4). E essa é considerada uma das principais causas da redução da digestibilidade de proteínas e, portanto, diminuição do valor nutricional dos alimentos musculares<sup>13, 62</sup>.

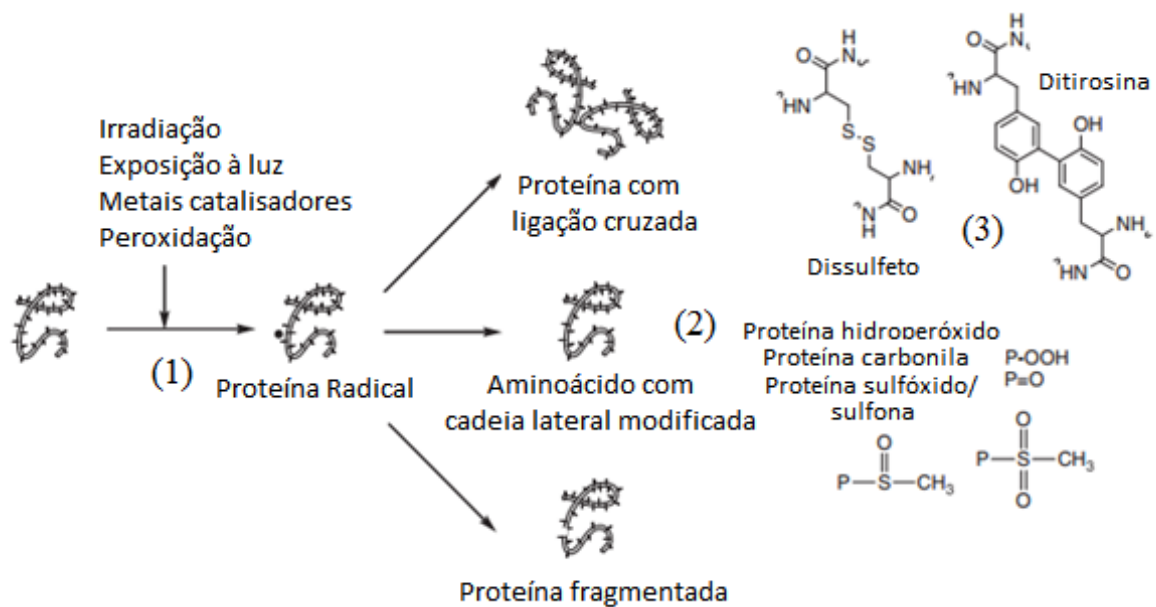


FIGURA 4 – Esquemática das consequências mais comuns da oxidação de proteínas. (1) Irradiação, exposição à luz, metais catalisadores e peroxidação são algumas causas que geram a proteína radical. (2) Formam-se proteínas com ligação cruzada, aminoácidos com cadeia lateral modificada e fragmentação de proteínas. (3) Subprodutos formados. Fonte: Adaptado de Lund et al.<sup>13</sup>

#### a) Mecanismo

Algumas espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido, hidroperóxido e radicais de hidroxila são reconhecidos como importantes iniciadores da cadeia de oxidação de proteínas. Outras espécies não radicais como o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos também podem iniciar esse processo<sup>12, 63</sup>. Componentes naturais do tecido muscular como lipídeos insaturados, pigmentos do grupo heme, metais de transição e enzimas oxidativas são potenciais precursores ou catalisadores na formação desses iniciadores da cadeia de oxidação<sup>12, 61</sup>. As proteínas miofibrilares são alvos de espécies reativas de oxigênio durante a estocagem e maturação da carne<sup>64</sup>.

As principais consequências da oxidação de proteínas nos alimentos cárneos, tem sido mensuradas e relatadas com a formação de proteínas carbonilas, perda de grupos sulfidrila e formação de proteínas com ligação cruzada<sup>13</sup>.

#### b) Formação de proteínas carbonilas

O estresse oxidativo provoca modificações irreversíveis e não enzimáticas das proteínas formando radicais carbonilas, processo também conhecido como carbonilação<sup>63</sup>. Aldeídos e cetonas constituem o grupo das carbonilas e são formados nas proteínas através de quatro vias: oxidação direta das cadeias laterais de lisina, treonina, arginina e prolina,

glicosilação não enzimática na presença de açúcares redutores; clivagem oxidativa da estrutura de peptídeos através da via alfa-amidação ou da oxidação de cadeias laterais glutamyl, e ligações covalentes em compostos de carbonilas não proteicos como malondialdeído<sup>63, 65</sup>. Dessas quatro vias, a oxidação direta das cadeias laterais de aminoácidos susceptíveis foi apontada como o principal e mais forte mecanismo de oxidação das proteínas<sup>66</sup>.

A formação de derivados de carbonila a partir de cadeias laterais de lisina, treonina, arginina e prolina ocorre em condições de intensa oxidação, mediada por metais, processo conhecido como oxidação catalisada por metais (MCO)<sup>67</sup>. A sensibilidade das proteínas para tal processo pode ser explicada por elas possuírem locais de ligação de metais, onde resíduos de aminoácidos situados nessa porção podem ser afetados. Entre os aminoácidos mais susceptíveis estão cisteína, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, prolina, arginina, lisina e metionina<sup>12, 67</sup>.

Como consequência da oxidação catalisada por metais, resíduos de aminoácidos são transformados em compostos de carbonila. Como exemplos, a lisina é convertida em semialdeído amino- $\alpha$  adípico (AAS) e a arginina e prolina se transformam em  $\gamma$ -glutâmico semialdeído (GGS). Estes dois compostos, AAS e GGS são considerados indicadores e principais produtos da oxidação proteica, representando 70% do total da quantidade de proteínas carbonilas<sup>13</sup>.

De acordo com esse mecanismo (Figura 5), a cadeia lateral dos susceptíveis aminoácidos sofrem oxidação na presença de metais de transição, como ferro e cobre. As espécies reativas de oxigênio atacam o grupo amina da cadeia lateral do aminoácido, resultando na retirada de um átomo de hidrogênio do carbono vizinho, que se torna um carbono central radical. Dessa forma, o íon reativo do carbono radical interage com formas oxidadas de íons metálicos formando um grupo amino, que logo em seguida é espontaneamente hidrolisado, formando os subprodutos da oxidação de proteínas<sup>12</sup>.

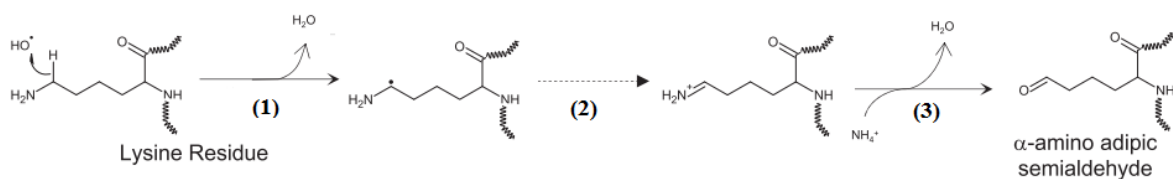


FIGURA 5 – Formação de carbonila da reação de cadeia lateral de Lisina, através da via de catalisação por metais. (1) Retirada do átomo de hidrogênio. (2) Íons de metais de transição. (3) Formação do AAS.

Fonte: Adaptado de Estevéz<sup>12</sup>

Os métodos de identificação e quantificação de proteínas carbonílicas tem sido cada vez mais aprimorados. O mais comum é o método 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH), entretanto é relativamente inespecífico<sup>68</sup>. O método é baseado na reação entre o DNPH e compostos proteicos carbonílicos, que resulta em outro composto, 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP), mensurado em aparelhos de espectrofotometria, utilizando comprimento de onda de 370 nm para leitura. O procedimento consiste em uma determinação simultânea dos derivados de carbonila e o teor de proteína da amostra. A concentração de proteína é determinada através de uma amostra de controle (sem DNPH adicionado) lida a 280 nm usando albumina sérica bovina como padrão<sup>69</sup>.

Recentes estudos relataram metodologias mais específicas e eficientes como espectroscopia de ressonância do spin do elétron, espectroscopia fluorescente e espectrometria de massa, que demonstram a importância do ferro, mioglobina, compostos fenólicos e lipídeos na ocorrência da oxidação das estruturas proteicas<sup>70</sup>.

#### c) Perda dos grupos sulfidrila

A presença de peróxido de hidrogênio induz a oxidação, principalmente, do grupo tiol de cisteína (RSH), composto altamente susceptível a essa espécie reativa. Enzimas proteolíticas da carne como a m-calpaína contem sítios de cisteína, que em contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuem a atividade enzimática, através da formação de pontes dissulfeto<sup>13</sup>.

A oxidação de grupos de tiol resulta em vários produtos de oxidação tais como ácido sulfênico, ácido sulfínico e ligações cruzadas de dissulfeto e ditirosina. A mensuração de grupos de tiol é um bom marcador da oxidação proteica<sup>12, 71</sup>. Uma metodologia bastante utilizada baseia-se na quantificação dos grupos reativos de sulfidrila que formam um composto com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), sendo as absorvâncias lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm<sup>72</sup>.

#### d) Formação de proteínas com ligação cruzada

O processo oxidativo de uma estrutura proteica, com a retirada de um átomo de hidrogênio, por exemplo, pode levar a formação de radicais de carbono. Na ausência de oxigênio, dois radicais podem se combinar, gerando ligações intra e inter proteicas<sup>12</sup>.

A formação de diversas ligações cruzadas intra e inter moleculares (Figura 6) ocorre como consequência da oxidação proteicas, através de ligações dissulfeto e ditirosina<sup>13</sup>. Essas ligações podem ocorrer devido à interação de grupos sulfidrila e resíduos de cisteína<sup>73</sup>. As

ligações cruzadas posteriormente resultam na polimerização das proteínas e podem ser mensurados como subprodutos da oxidação de proteínas<sup>13, 73</sup>.



FIGURA 6 – Extremidade da molécula de proteína, ligação cruzada entre as cadeias pesadas de miosina e resíduos de cisteína.  
Fonte: Lund et al.<sup>13</sup>

### 2.3.1 Congelamento e oxidação proteica

A carbonilação de proteínas da carne durante o armazenamento em congelamento pode ser influenciada pelo tipo de músculo, temperatura de congelamento, tipo de embalagem e sua ocorrência pode também estar relacionada com reações de oxidação lipídica<sup>12</sup>.

Estudos demonstraram que as carnes suínas, bovinas e de aves sofreram reações oxidativas em proteínas após 6 meses de congelamento em temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ <sup>37</sup>. Outro relato demonstrou que carnes suínas submetidas a diferentes ciclos de congelamento sofreram reações oxidativas nas proteínas<sup>74</sup>.

A oxidação das proteínas está correlacionada com uma menor maciez devido à formação de proteínas com ligações cruzadas<sup>74</sup>, inibindo a proteólise, devido à inativação da calpaína-1<sup>44</sup>. Taxas de congelamento mais lentas ou em temperaturas mais altas, acima de  $10^{\circ}\text{C}$  negativos, podem contribuir com a maior formação de derivados de carbonila<sup>15, 44, 74</sup>.

### 2.3.2 Impacto da oxidação de proteínas sobre a qualidade da carne

As recentes descobertas e avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na formação de carbonilas proteicas, destacam que a diminuição da qualidade da carne em diversas situações está intimamente ligada ao processo oxidativo das proteínas. As modificações oxidativas das proteínas podem mudar suas características físicas, propriedades químicas, incluindo conformação, estrutura, solubilidade, susceptibilidade a proteólise e atividades enzimáticas<sup>73</sup>.

Estudos com diferentes níveis de oxidação em sistemas com produtos à base de carne mostram que, em níveis de oxidação leve e moderada, a hidrofobicidade favorece o reconhecimento das proteases, e subsequente degradação das proteínas oxidadas. Isso acontece pelo fato da susceptibilidade proteolítica da cadeia pesada da miosina aumentar por causa da

ação dos radicais de oxigênio. Em condições de intensa oxidação, o efeito é contrário, devido à grande formação de proteínas cruzadas, sendo que essa agregação não se torna um substrato para as enzimas proteolíticas<sup>75, 76</sup>.

Esse processo de oxidação resulta em alterações na funcionalidade e menor solubilidade das proteínas e diminuição da capacidade de retenção de água dos produtos cárneos<sup>15</sup>. A redução da atividade enzimática proteolíticas e ligação cruzada de proteínas miofibrilares influenciam negativamente na capacidade da carne reter umidade<sup>37</sup>.

A diminuição da maciez devido a oxidação das proteínas tem sido associada a duas hipóteses: inativação das atividades de m-calpaína e ligação cruzadas das proteínas que conferem maior fortalecimento da estrutura miofibrilar<sup>13</sup>.

Na carne e nos produtos à base de carne, a oxidação modificam as proteínas, resultando em carbonilação, colapso e agregação. Essas modificações envolvem mudanças na solubilidade e funcionalidade da proteína, levando potencialmente a digestibilidade diminuída, distúrbios de gelificação, emulsificação e menor capacidade de retenção de água, além de ter um potencial impacto no sabor devido à formação de compostos carbonilos<sup>2, 12, 13</sup> (Figura 7).

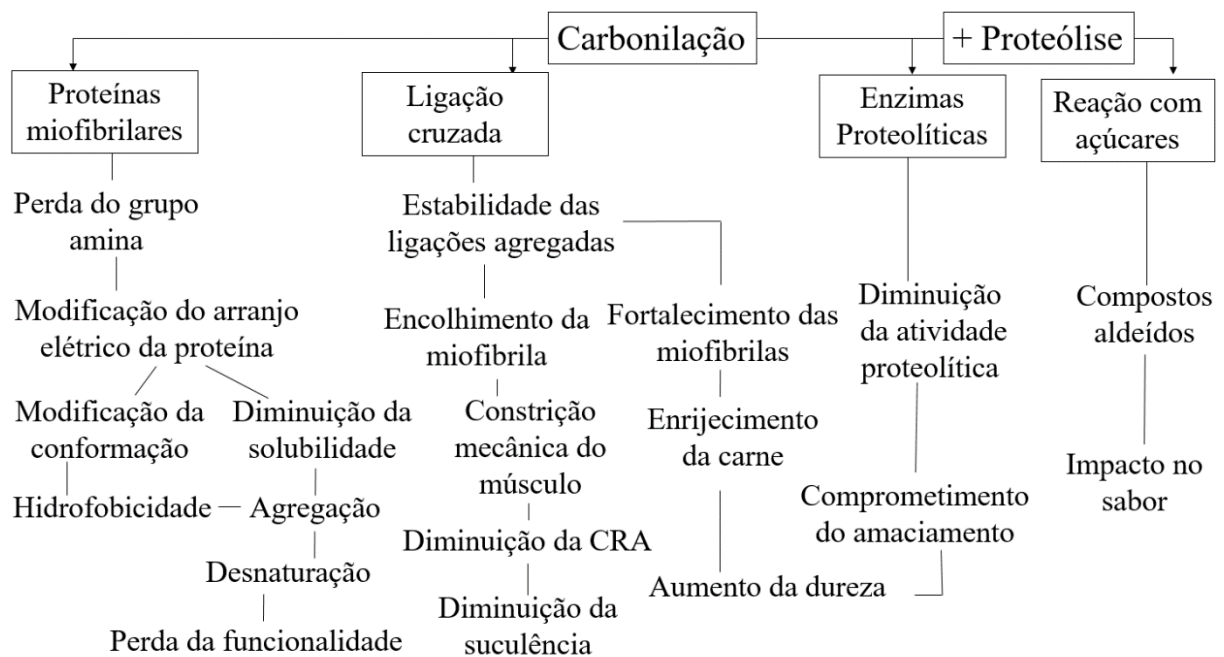


FIGURA 7 – Associações de como a carbonilação e proteólise podem afetar as características sensoriais e tecnológicas da carne.

Fonte: Adaptado de Estévez<sup>12</sup>



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a correlação do congelamento e temperatura com as características físico-químicas da carne bovina comparando dois tempos de estocagem.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1. Avaliar o efeito do congelamento nas amostras em diferentes temperaturas:  $-18^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ .

3.2.2. Avaliar as amostras em tempo inicial e avaliar o efeito do tempo de estocagem de 45 dias.

3.2.3. Mensurar a quantidade de subprodutos da oxidação proteica das amostras nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

3.2.4. Mensurar a quantidade de subprodutos da oxidação lipídica das amostras nos diferentes produtos e temperaturas de congelamento

3.2.5. Verificar a capacidade de retenção de água das amostras nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

3.2.6. Mensurar o índice de fragmentação miofibrilar das amostras nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

3.2.7. Mensurar a quantidade e solubilidade do colágeno nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

3.2.8. Mensurar a perda de peso por descongelamento e por cocção das amostras nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

3.2.9. Mensurar a força de cisalhamento das amostras nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

3.2.10. Determinar as análises centesimais das amostras nos diferentes períodos e temperaturas de congelamento.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Local e duração do experimento

As análises físico-químicas das amostras de *Longissimus dorsi* bovino foram desenvolvidas no laboratório do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

#### 4.1.2 Obtenção das amostras de *Longissimus dorsi*

As amostras de *Longissimus dorsi* foram adquiridas no frigorífico JJZ Alimentos situado em Goianira-GO. Foram disponibilizados peças inteiras de contrafilé de bovinos mestiços pertencentes a três animais de um mesmo lote, garantindo maior padronização das amostras e minimizando qualquer fator inerente aos animais, como diferenças no tipo racial, tratamento e idade.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Oxidação de proteína

Foram quantificados dois subprodutos da oxidação proteica, carbonila e grupos sulfidrila, utilizando as metodologias propostas por Vuorela<sup>69</sup>, modificado por Turgut<sup>72</sup>.

##### a) Carbonila

Foi pesado 1 grama de carne triturada em tubos específicos do tipo Falcon, identificados em duplicata, com adição de 10 ml de KCl 0,15M. Após homogeneização de 60 segundos, foram retiradas 2 alíquotas de 200 µl em tubos de 5 ml para quantificação da proteína e outra para quantificação da carbonila.

Para a quantificação da proteína foram adicionados 2 ml de HCl 2M, fazendo incubação de uma hora em temperatura ambiente, com agitação a cada 20 minutos em agitador do tipo Vórtex. Em seguida, 2 ml de TCA a 10% foram adicionados e novamente homogeneizado. Utilizando centrífuga sob refrigeração a 4°C, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a uma velocidade de 2880 g, retirando o sobrenadante. O resíduo foi lavado com 2 ml da solução acetato de etila:etanol e centrifugado por 5 minutos a 11500 g. Esse processo foi repetido por três vezes. O resíduo foi secado completamente com gás nitrogênio e no tubo foi adicionado 3 ml de tampão fosfato de sódio contendo guanidina 6M, aguardando repouso de 15 minutos no banho-maria a 37°C. Foi centrifugado pela última vez durante 5

minutos a 2880 g. A absorvância das amostras de proteína foi lida a 280 nm por Espectrofotômetro.

Para a quantificação da carbonila foi realizado o mesmo processo, sendo que o HCl adicionado continha 0,2% de DNPH. A absorvância das amostras de carbonila foi lida a 370nm, utilizando a leitura das proteínas nesse mesmo comprimento de onda como branco.

Os cálculos foram obtidos com a obtenção de uma curva-padrão de albumina. Foram preparadas concentrações-padrão de albumina diluindo-se a solução tampão de fosfato de sódio com guanidina 6M com a proteína padrão, gerando uma solução mãe de 10mg de albumina por ml. Para a formação dos 5 pontos da curva, diluiu-se alíquotas da solução mãe com a solução padrão, conforme tabela 2.

TABELA 2 – Preparo das concentrações padrão de albumina para a obtenção da curva-padrão para a análise de carbonila.

Concentração de Albumina (mg/ml)	Solução mãe de Albumina (ml)	Solução Padrão (ml)
0	0	3
0,5	0,15	2,85
1	0,3	2,7
1,5	0,45	2,55
2	0,6	2,4

#### b) Sulfidrilas

As análises foram realizadas em duplicata. Em tubos do tipo FALCON, foi pesado 0,5 grama de carne triturada e adicionado 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,05M com pH 7,2. Em seguida foi homogeneizado por 60 segundos em homogeneizador. Foi transferido 1 ml para tubos contendo 9 ml de tampão fosfato de sódio contendo 8M ureia, 0,6mM de EDTA e 0,6M de NaCl (pH 7,2). Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 14000 g, sob uma refrigeração de 5°C, durante 15 minutos. Do sobrenadante foram retirados 3 ml e transferidos para outro tubo contendo 0,04 ml de acetado de sódio com 0,01M de DTNB. A incubação dos tubos foi realizada durante 15 minutos em banho-maria a 40°C.

A absorvância das amostras de sulfidrilas foi lida a 420 nm no espectrofotômetro. As concentrações dos compostos de sulfidrilas foram calculadas a partir de um coeficiente de extinção molar de  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , através da seguinte fórmula:

$$\frac{[(\text{Abs}_{420 \text{ nm}} - \text{Abs Branco}_{420 \text{ nm}}) \times 1000] \times 666,67}{13600}$$

#### 4.2.2 Oxidação de lipídeos

##### a) TBARS

A avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada de acordo com o método de Vyncke<sup>77</sup>. Foram pesados 10 gramas de carne triturada em tubos do tipo FALCON identificados em duplicata. Em cada tubo foi adicionado 50 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% e homogeneizado por 5 minutos. As amostras foram filtradas com papel filtro quantitativo em balão volumétrico âmbar de 50 ml. Após a filtragem, os balões tiveram os volumes completados com TCA 7,5%.

Foi transferido 5 ml do filtrado para tubos de ensaio com tampa de rosca e adicionados 5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,02M. Após agitação mecânica, os tubos foram colocados em banho-maria por 10 minutos a uma temperatura de 98°C. Um tubo controle foi realizado com a adição de 5 ml de TCA e 5 ml de TBA, sendo utilizado como branco na leitura das absorbâncias.

Após o tempo de incubação as amostras foram resfriadas em banho de gelo e as absorbâncias lidas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 538 nm.

Para os cálculos, utilizou-se uma curva de calibração preparada com 1,1',3,3' tetraetoxipropano (TEP) em diferentes concentrações. Uma solução mãe foi preparada diluindo uma alíquota de 0,1 ml de TEP em 100 ml de água destilada. Para formar os pontos da curva, foi preparada uma solução 2, diluindo 0,1 ml da solução mãe em 100 ml de TCA a 7,5%. Conforme a Tabela 3, os pontos da curva de calibração foram realizados com a mistura de diferentes quantidades da solução 2 (TEP), TCA e TBA em tubos de ensaio com tampa de rosca e submetidos ao mesmo processo de incubação das amostras.

TABELA 3 – Curva de calibração para análise de TBARS.

Concentração de TEP (mg/L)	Solução 2 (ml)	TCA 7,5% (ml)	TBA 0,02M (ml)
0	0	5	5
0,176448	1	4	5
0,352896	2	3	5
0,529344	3	2	5
0,705792	4	1	5
0,794016	4,5	0,5	5

### 4.2.3 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A capacidade de retenção de água foi mensurada de acordo com a metodologia de Gomez-Guilen<sup>78</sup>. As análises foram conduzidas em quadruplicada. Inicialmente, foi anotado o peso do papel qualitativo seco. Em tubos do tipo FALCON foi colocado o papel qualitativo e pesado 2 gramas de carne triturada, obtendo-se o peso da carne úmida. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4000 g. Após centrifugação, as amostras de carne foram retiradas do papel qualitativo e pesadas. O papel qualitativo foi colocado em estufa a 60°C até atingir peso constante.

A porcentagem da CRA foi obtida através da seguinte equação:  $CU - (CS + \%G^*)$ .

$$*\%G = PI - PS$$

CU = peso da carne úmida

CS = peso da carne após centrifugação

PI = peso do papel inicialmente

PS = peso do papel seco em estufa

### 4.2.4 Quantificação de colágeno solúvel

A determinação do conteúdo de colágeno solúvel nas amostras de carne seguiu a metodologia de Hill<sup>79</sup> com algumas modificações. A quantificação de hidroxiprolina foi baseada na metodologia de Neuman e Logan<sup>80</sup> modificado por Bergman e Loxley<sup>81</sup>.

As amostras foram trituradas até a obtenção de uma massa homogênea, com a remoção de fragmentos de gordura e tecido conjuntivo. Em tubos do tipo FALCON foram pesados 4 gramas, realizando a duplicata para cada amostra. Em seguida foram adicionados 12 ml de uma solução de extração (solução de Ringer com ¼ de força iônica) e com auxílio de um bastão de vidro a massa cárnea foi misturada com a solução de extração. Os tubos foram incubados em banho-maria a 77°C durante 1h10min com constante agitação.

Após a incubação, os tubos foram resfriados em água corrente e centrifugados a uma velocidade de 3000g a 4°C por 10 minutos, para separação do resíduo e sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para tubos de autoclave e o resíduo ressuspendido com 8 ml da solução de extração, sendo submetido a mesma centrifugação. Novamente o sobrenadante foi separado e o resíduo transferido com auxílio de uma espátula para os tubos de autoclave. Para completar o volume do resíduo, os tubos do tipo FALCON foram lavados com 5 ml de solução de extração, repetindo esse processo duas vezes.

Para a hidrólise ácida das amostras, foram adicionados 10 ml de HCl 6M nos tubos contendo o resíduo e 20 ml nos tubos contendo o sobrenadante, com incubação de 16 horas em estufa a 105°C. Após esse período, as amostras foram esfriadas em temperatura ambiente.

Foi adicionado 1 grama de carvão ativado e os tubos foram agitados rigorosamente em agitador do tipo Vórtex. A mistura foi filtrada em papel qualitativo em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml. Cada tubo de autoclave foi lavado com 50 ml de água destilada e filtrado no papel-filtro.

O filtrado foi titulado com NaOH 2M, obtendo pH entre 6,0 e 7,0. Para essa etapa foi adicionada uma gota de indicador de vermelho de metila e posteriormente adição do NaOH até viragem da cor rosa para amarelo. Para confirmação do pH, fitas indicadoras foram utilizadas nas amostras. O filtrado de sobrenadante foi diluído com água destilada em balão de 200 ml e o resíduo em balão de 500 ml. Dessa forma, após a diluição cada amostra deveria conter 1 a 5 µg/ml de hidroxiprolina em solução.

A quantificação da hidroxiprolina foi realizada misturando 2 ml da diluição final de cada amostra com 1 ml de uma solução oxidante em tubos de ensaio e agitados em Vórtex. Um tubo controle foi realizado com a substituição da amostra com água destilada. Após repouso de 20 minutos, foi adicionado 1 ml da solução de Ehrlich, com agitação em Vórtex. Os tubos de ensaio foram cobertos com papel alumínio e deixados em banho-maria a 60°C durante 15 minutos. Depois de resfriados em água corrente a absorbância das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 558 nm, utilizando o controle como branco.

A quantidade de colágeno solúvel foi calculada através de uma curva-padrão com concentrações diferentes de hidroxiprolina para a obtenção dos pontos, conforme mostrado na tabela 5.

TABELA 4 – Preparo das concentrações-padrão de hidroxiprolina para obtenção de curva-padrão.

Concentração de hidroxiprolina no tubo	Água destilada (ml)	Solução de hidroxiprolina (6µg/ml)
0,6	9	1
1,2	8	2
1,8	7	3
2,4	6	4
3	5	5
3,6	4	6
4,2	3	7

Com a equação da reta foi calculada a quantidade de hidroxiprolina na cubeta (h) e com a fórmula a seguir, pode-se calcular a quantidade de hidroxiprolina de cada amostra levando em consideração as diluições realizadas no resíduo e sobrenadante.

$$H = 10^{-4} \cdot \frac{h \cdot V_d}{2 \cdot P_a} \quad [\text{g de hidroxiprolina}/100 \text{ g de amostra}]$$

H = quantidade de hidroxiprolina na amostra (g/100g)

h = quantidade de hidroxiprolina na cubeta (µg)

V<sub>d</sub> = volume diluído após neutralização (ml)

P<sub>a</sub> = peso da amostra (g)

#### 4.2.5 Perda de Peso por Descongelamento (PPD)

A metodologia utilizada para calcular as perdas de peso por descongelamento e cocção foi de Vaz e Restle<sup>82</sup>. As amostras de carne de 2,5 cm de espessura foram descongeladas em refrigeração de 4°C durante 24 horas. Após descongelamento, a amostra foi pesada antes e depois da retirada da embalagem, contabilizando a perda por descongelamento.

#### 4.2.6 Perda de Peso por Cocção (PPC)

Após a pesagem para calcular a PPD, as amostras foram colocadas em bandejas com grelhas e submetidas ao processo de cocção. O controle da temperatura interna dos bifes foi realizado através de um termopar metálico da marca Texto, modelo 0602.5792, equipado de eletrodos que foram inseridos na região central dos bifes. Os bifes foram assados em forno elétrico da marca Venâncio, modelo FEP 90 SÉRIE ITÁLIA, com ajuste de temperatura e resistência elétrica na parte superior e inferior. Inicialmente, o forno foi ajustado na posição de temperatura máxima (aproximadamente 170°C). Os bifes ao atingirem 40°C foram virados na grelha e a temperatura do forno ajustada para a temperatura mínima. Ao atingirem 71°C, os bifes foram retirados do forno.

Imediatamente após a retirada do forno, as amostras foram pesadas e as perdas foram calculadas por diferença de peso da bandeja/grelha/ amostra antes e depois do processo de cocção.

#### 4.2.7 Força de Cisalhamento (FC)

A força de cisalhamento foi medida conforme a metodologia de Wheeler et al.<sup>83</sup>. Os bifes após resfriamento em temperatura ambiente, foram embalados e refrigerados a 7°C por 24 horas. Após esse período, foram desembalados e com auxílio de um amostrador (coring cutter) acoplado à uma furadeira elétrica, foram obtidos 8 cilindros (área transversal 1,0 cm x 1,0 cm). Os cilindros foram cortados paralelamente ao sentido das fibras musculares e posteriormente cortados perpendicularmente utilizando o equipamento WARNER-BLATZLER MEAT SHEAR, modelo 235. Foi tomado o cuidado para que a linha de corte evitasse o tecido conectivo e adiposo, sendo o resultado registrado em kgf e o valor expresso pelas médias de cada tratamento.

#### 4.2.8 Composição Centesimal

A análise de composição centesimal foi realizada, quantificando lipídeos, proteína, umidade e cinzas.

##### a) Lipídeos

A extração de lipídeos foi feita através do método de Bligh & Dyer<sup>84</sup>, com a quantificação em duplicata de cada amostra. Foram pesados béqueres em temperatura ambiente, previamente aquecidos em estufa a 105°C durante uma hora. Após a extração, 5 ml foram adicionados aos béqueres e deixados em estufa a 60°C por duas horas. Após esfriamento em dessecador, os béqueres foram pesados novamente, utilizando a diferença do peso inicial e final para a quantificação.

##### b) Proteína

A análise de proteína consistiu na quantificação de nitrogênio total e protídeos conforme a metodologia de Kjeldahl<sup>85</sup>. As amostras foram analisadas em duplicata, pesando 0,25 gramas de carne triturada em pequenos pedaços de papel manteiga. O conteúdo foi adicionado em tubos específicos contendo 2,5 gramas de mistura catalítica com 7 ml de ácido sulfúrico p.a. Os tubos foram colocados em bloco digestor com temperatura inicial de 100°C, e gradativamente, a temperatura foi elevada até atingir 400°C. Aproximadamente 5 horas depois, o conteúdo se transformou em um líquido transparente de tonalidade azul-esverdeada. Após esfriamento foi adicionado 10 ml de água destilada.

As amostras foram destiladas em destilador manual, em Erlenmeyer contendo 20 ml de solução de ácido bórico à 4% com indicador misto. Ao atingir volume de 100 ml, as amostras foram retiradas do destilador e tituladas com ácido sulfúrico 0,1N até viragem do



indicador, que passou da tonalidade verde para rosa. Os cálculos de nitrogênio total e protídeos foram realizados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\%NT = \frac{V \times N \times FC \times 0,014 \times 100}{m} \qquad \% \text{ protídeos} = \%NT \times f$$

V: volume de ácido sulfúrico, descontado do branco (ml)

FC: fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1N

M: massa da amostra (g)

Fator: fator de correção da relação nitrogênio/proteína (f = 6,25)

#### c) Umidade

As amostras foram preparadas em triplicata. Anotou-se o peso dos cadinhos em temperatura ambiente, que previamente foram aquecidos em estufa a 105°C durante 1 hora. Cada cadinho recebeu 5 gramas de carne triturada e foram colocados na estufa em temperatura de 105°C. A primeira pesagem foi realizada após 3 horas, com intervalo entre as pesagens de 1 hora, até atingirem peso constante. A tolerância de pesagem para determinação de peso constante foi a diferença de até 0,000250 grama. A porcentagem de umidade foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\%U = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

P<sub>i</sub> = peso inicial da amostra

P<sub>f</sub> = peso final da amostra

#### d) Cinzas

Os cadinhos utilizados para determinar a umidade, foram colocados em forno do tipo mufla a 550°C. Após 8 horas, com a obtenção de cinzas claras, os cadinhos foram esfriados em dessecadores e depois pesados. A quantificação de cinzas foi gerada com a diferença de peso do cadinho inicial e final.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo verificou-se as possíveis alterações nas propriedades físico-químicas do músculo *Longissimus dorsi* bovino em tempo inicial e em diferentes temperaturas de congelamento (-18°C e -40°C) armazenados por 45 dias. Os dados da Tabela 5 apresentam a comparação das médias das análises de composição centesimal. Não houve diferença significativa entre o tempo inicial e o tempo de estocagem de 45 dias, nem entre os grupos das duas temperaturas (-18°C e -40°C), para nenhuma das análises.

TABELA 5 – Caracterização da composição centesimal (umidade, lipídeos, proteína e cinzas) do músculo *Longissimus dorsi* em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.

Variáveis (%)	Tratamentos			p	C.V.(%)	EPM
	0	-18°C (45 d)	-40°C (45 d)			
Umidade	74.9027 <sup>a</sup>	74.4806 <sup>a</sup>	74.8975 <sup>a</sup>	0,758	1,0300	0,4453
Lipídeos	2.1919 <sup>a</sup>	2.3612 <sup>a</sup>	2.4032 <sup>a</sup>	0,6018	10,99	0,1471
Proteína	21.6966 <sup>a</sup>	21.0159 <sup>a</sup>	21.2017 <sup>a</sup>	0,4896	3,0900	0,3797
Cinzas	1.1203 <sup>a</sup>	1.4120 <sup>a</sup>	1.1910 <sup>a</sup>	0,0804	9,45	0,0677

Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Achados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por Machado<sup>86</sup>, que analisou bifes de *Longissimus dorsi* bovino congelados à -18°C, com análises nos tempos 0, 30, 60 e 120 dias. No tempo 0 e 30, o valor de umidade foi 74,29% e 72,65%, respectivamente, não apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Seus valores de proteína também não apresentaram diferenças significativas, com média de 21,48%. O mesmo trabalho constatou valor médio para cinzas 1,88% e não apresentando diferenças significativas entre os tempos de armazenamento.

A quantificação dos produtos formados à partir dos processos oxidativos das proteínas e lipídeos estão dispostos na Tabela 6.

TABELA 6 – Mensuração dos subprodutos da oxidação de proteínas (carbonila e sulfidril) e da oxidação lipídica (TBARS) do músculo *Longissimus dorsi* em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.

Variáveis	Tratamentos			P	C.V.	EPM
	0	-18°C (45 d)	-40°C (45 d)			
Carbonila (nmol/mg ptn)	2,1483 <sup>a</sup>	1,7983 <sup>a</sup>	2,2976 <sup>a</sup>	0,6167	28,84	0,3466
Sulfidril (mmol/g carne)	64,4529 <sup>a</sup>	57,0509 <sup>b</sup>	55,5149 <sup>b</sup>	0,0219	4,13	1,4085
TBARS (mg/kg)	0,5747 <sup>a</sup>	0,5478 <sup>a</sup>	0,4895 <sup>a</sup>	0,6149	18,92	0,0587

Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A concentração de carbonila não apresentou mudanças significativas nos dois grupos de temperatura de congelamento em 45 dias de armazenamento. Estudos com produtos à base de carne congelada encontraram, inicialmente, 1,48 nmol de carbonilas por mg de proteína, verificando um aumento de 2,5 vezes na concentração de carbonila em armazenamento de -18°C e 3 vezes maior na temperatura de -7°C, ao final de um período de 180 dias<sup>29</sup>, indicando que a formação dos compostos carbonilas é sensível ao tempo de estocagem e temperatura. A ocorrência dos processos oxidativos aumentam conforme os fatores de desencadeamento desses processos se tornam mais abundantes dentro do sistema carne, embalagem e acondicionamento, sendo que a temperatura desempenha um papel fundamental na formação dos compostos carbonilas, pois as temperaturas maiores aumentam a reação de aminas e carbonilas<sup>73</sup>.

As concentrações dos grupos sulfidrilas apresentaram diferenças significativas na comparação das análises do tempo inicial e os grupos armazenados por 45 dias. A concentração dos grupos sulfidrilas diminui à medida que aumenta as reações oxidativas, por isso é um bom indicador desse processo oxidativo nas proteínas<sup>13, 87</sup>. No tempo inicial, a concentração média foi de 64,45 mmol por grama de carne, sendo que após o armazenamento de 45 dias, os resultados foram 57 e 55 mmol/g em temperatura de -18°C e -40°C, respectivamente. Esses resultados demonstram que o processo oxidativo aumentou com o armazenamento, mas não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos de temperatura.

A redução percentual dos grupos sulfidrilas em ordem decrescente também foi observada em análises realizadas em produtos à base de carne por Botsoglou et al.<sup>88</sup> durante o armazenamento congelado, sendo que no primeiro dia a concentração era de 68,4-69,7 mmol/g diminuindo para 46,8 mmol/g depois de 60 dias de armazenamento na temperatura de -20°C,

demonstrando uma perda de mais de 30% dos grupos sulfidrilas. O mesmo estudo verificou que ao final de 180 dias de armazenamento, a perda do grupo de sulfidrilas foi pouco mais de 50% das concentrações iniciais. Esse decréscimo pode ocorrer devido à formação de ligações de dissulfeto entre e dentro das moléculas de proteínas<sup>13</sup>.

O trabalho de Zhang et al.<sup>73</sup> verificou que os níveis de TBARS aumentaram conforme o aumento dos compostos da oxidação de proteína, confirmando a interação entre as duas atividades oxidativas, que pode ser desencadeada por duas vias: produtos primários (peróxidos) e secundários da oxidação lipídica (aldeídos, cetonas), e radicais de peróxido que podem ser gerados por radicais livres (FeCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbato)<sup>89</sup>. Huang et al.<sup>29</sup> também relacionou os achados de TBARS compatíveis com a mudança significativa na avaliação da rancidez sensorial.

TABELA 7 – Valores médios da concentração de colágeno total do músculo *Longissimus dorsi* em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.

Variáveis (%)	Tratamentos			P	C.V.	EPM
	0	-18°C (45 d)	-40°C (45 d)			
Colágeno Total	2,1983 <sup>a</sup>	1,5055 <sup>b</sup>	1,4599 <sup>b</sup>	0,0028	6,97	0,0693

Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os valores de colágeno total apresentaram diferenças significativas (p<0,05) comparando as análises iniciais e os grupos armazenados em 45 dias, conforme indicado na Tabela 7. Estudos realizados por Fausto<sup>90</sup> encontraram 2,4% de colágeno total em músculo *Longissimus dorsi*, sendo o colágeno total relativamente constante, podendo ser alterado pela dieta dos animais, efeitos da maturação da carne e também efeitos que tornem as ligações entre as moléculas mais resistentes e estáveis, podendo conferir à carne maior resistência ao corte.

Essa diferença nos resultados de colágeno total pode ser associada às diferenças que também foram encontradas na mensuração dos grupos sulfidrilas, correlacionando o fato da oxidação proteica resultar na formação de ligações cruzadas entre as proteínas ou destruição dos grupos sulfidrilas que indicam dano proteico durante o armazenamento congelado<sup>91</sup>. A diminuição da solubilidade protéica e a perda da maciez na carne, que é geralmente observado após congelamento ou armazenamento congelado, pode ser explicado por uma agregação de moléculas de proteínas, que na carne não armazenada não apresenta essas formações em

grandes quantidades. Esta agregação pode ser provocada pela formação de ligações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, ligações de íons e ligações dissulfureto<sup>91</sup>.

Apesar das diferenças significativas na quantidade de colágeno total entre o tempo inicial e os grupos armazenados em 45 dias, a força de cisalhamento não refletiu a mesma diferença.

A Tabela 8 demonstra que não houve diferenças significativas nas médias das análises PPC, PPD, CRA e FC entre os três grupos.

TABELA 8 – Valores médios da Perda de Peso por Cocção (PPC), Perda de Peso por Descongelamento (PPD), Capacidade Retenção de Água (CRA) e Força de Cisalhamento (FC) do músculo *Longissimus dorsi* em tempo inicial e congelado às temperaturas -18°C e -40°C, armazenado por 45 dias.

Variáveis	Tratamentos			P	C.V.	EPM
	0	-18°C (45 d)	-40°C (45 d)			
PPC (%)	21,5883 <sup>a</sup>	19,5809 <sup>a</sup>	19,5970 <sup>a</sup>	0,6958	15,65	1,8306
PPD (%)	1,3871 <sup>a</sup>	1,7480 <sup>a</sup>	1,7984 <sup>a</sup>	0,7708	44,82	0,4255
CRA (%)	31,2464 <sup>a</sup>	33,5044 <sup>a</sup>	34,2918 <sup>a</sup>	0,4379	8,2	1,5635
FC (kgf)	6,3 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	5,4 <sup>a</sup>	0,2957	11,5	0,3808

Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da força de cisalhamento não apresentaram diferenças significativas comparando os três tratamentos. Relatos semelhantes foram descritos sobre o músculo *Longissimus* da carne bovina congelada em temperatura de -20°C e -80°C e também não apresentaram diferenças significativas na força de cisalhamento. Esse mesmo estudo encontrou redução da capacidade de retenção de água com 90 dias de armazenamento nos dois grupos de temperatura<sup>92</sup>.

A média da força de cisalhamento no tempo inicial foi de 6,3 kgf resultado semelhante encontrado por Nassu et al.<sup>93</sup>, que analisaram a força de cisalhamento do músculo *Longissimus* em vários períodos até 14 dias após o abate (6,4 kgf e 6,3 kgf nos dias 3 e 5). Nesse mesmo estudo foi verificado também o valor médio de perda de peso cocção de 25,2%, valor considerado adequado e, também, condizente aos valores encontrados no tempo inicial, demonstrado na Tabela 8.

Holman et al.<sup>94</sup> analisaram amostras congeladas por 52 semanas em duas temperaturas distintas (-12°C e -18°C). Não foi observado mudança entre os grupos de temperatura e a força de cisalhamento diminuiu com o tempo de armazenamento. Outro estudo

também não achou diferenças na força de cisalhamento, perda de peso por cocção, capacidade de retenção de água do músculo *Longissimus thoracis* armazenado em dois grupos de temperatura (-20°C e -80°C) e analisados em tempos diferentes (0, 30, 75 e 90 dias)<sup>92</sup>.

As temperaturas e velocidade de congelamento já são conhecidas por influenciar nas características de qualidade de carne bovina devido às diferenças no tamanho e distribuição de cristais de gelo que impactam mecanicamente as estruturas da carne<sup>95</sup>. Entretanto a qualidade sensorial da carne não é severamente modificada apenas pelo congelamento. Um estudo realizado por Huang et al. observou que independente da temperatura de congelamento (-7°C/-18°C), todas as amostras apresentaram deterioração da qualidade sensorial associado ao tempo de armazenamento prolongado de 180 dias.

O trabalho realizado por Farouk et al.<sup>4</sup> não encontrou diferenças na capacidade retenção de água, força de cisalhamento, perda de peso por cocção e cor em amostras de carnes bovina do músculo *Semitendinosus* em três grupos de temperatura (-18°C, -35°C e -75°C) e com tempo de armazenamento de até 12 meses.

A perda da capacidade de retenção de água pode estar relacionada à flutuações de temperatura, já que a formação irregular dos cristais de gelo levam a ruptura das estruturas da carne, entretanto o congelamento de carne e outros tecidos, se for feito corretamente, não causa necessariamente a desnaturação das proteínas<sup>91</sup>.

## 6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento e melhoria das tecnologias de conservação dos alimentos, incluindo o congelamento e armazenamento dos produtos cárneos em baixas temperaturas, é fundamental para o cenário atual, onde a demanda por alta qualidade, segurança microbiológica, aparência fresca, e prolongamento da vida útil é cada vez maior.

É necessário o conhecimento e associação dos efeitos adversos do tempo e temperatura de estocagem, possibilitando aplicar tecnologias na preservação da carne, mantendo suas características e qualidade.

A oxidação de proteínas é um tópico emergente, já que vários estudos tem demonstrado a importância desse processo na qualidade da carne, sendo fundamental construir uma dados concretos sobre a influência da origem, composição e processamento industrial no desenvolvimento e intensidade da oxidação proteica.

Sob o ponto de vista nutricional, descobertas no campo da ciência da carne se faz necessário para o aprimoramento do controle de qualidade, possibilitando maior vida útil aos produtos cárneos e garantindo qualidade e segurança microbiológica.

Espera-se que esses resultados possam auxiliar na determinação do prazo limiar de armazenamento e temperatura de segurança que garantam a qualidade da carne de bovina nas redes de exportação, alavancando o acesso ao mercado e melhorando a produção.

## REFERÊNCIAS

1. Warner RD, McDonnell CK, Bekhit AED, et al. Systematic review of emerging and innovative technologies for meat tenderisation. *Meat science*. 2017; 132: 72-89.
2. Zhan X, Sun D-W, Zhu Z and Wang Q-J. Improving the Quality and Safety of Frozen Muscle Foods by Emerging Freezing Technologies: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017: 00-.
3. Damen FWM and Steenbekkers LPA. Consumer behaviour and knowledge related to freezing and defrosting meat at home: An exploratory study. *British Food Journal*. 2007; 109: 511-8.
4. Farouk MM, Wieliczko KJ and Merts I. Ultra-fast freezing and low storage temperatures are not necessary to maintain the functional properties of manufacturing beef. *Meat science*. 2004; 66: 171-9.
5. Utrera M, Morcuende D and Estevez M. Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *Meat science*. 2014; 96: 1250-7.
6. Gil L, Barat JM, Baigts D, et al. Monitoring of physical–chemical and microbiological changes in fresh pork meat under cold storage by means of a potentiometric electronic tongue. *Food Chemistry*. 2011; 126: 1261-8.
7. FAO. Manual on meat cold store operation and management . [acesso 28 ago 2015]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep>.
- Beef during Maturation and by Different Model Oxidation Systems. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1997; 45.
8. Leygonie C, Britz TJ and Hoffman LC. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: review. *Meat science*. 2012; 91: 93-8.
9. Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C and Tanaka M. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage. *Food Research International*. 2003; 36: 787-95.
10. Kim GD, Jung EY, Lim HJ, Yang HS, Joo ST and Jeong JY. Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat science*. 2013; 95: 323-9.
11. Cagdas E and Kumcuoglu S. Effect of grape seed powder on oxidative stability of precooked chicken nuggets during frozen storage. *Journal of food science and technology*. 2015; 52: 2918-25.
12. Estevez M. Protein carbonyls in meat systems: a review. *Meat science*. 2011; 89: 259-79.



13. Lund MN, Heinonen M, Baron CP and Estevez M. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research*. 2011; 55: 83-95.
14. Pearce KL, Rosenvold K, Andersen HJ and Hopkins DL. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes--a review. *Meat science*. 2011; 89: 111-24.
15. Huff-Lonergan E and Lonergan SM. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*. 2005; 71: 194-204.
16. Choi YM and Kim BC. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*. 2009; 122: 105-18.
17. Listrat A, Lebret B, et al. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *The Scientific World Journal*. 2016; 2016: 14.
18. Craig RW and Padrón R. Molecular Structure of the Sarcomere.
19. Luther PK, Padrón R, Ritter S, Craig R and Squire JM. Heterogeneity of Z-band Structure Within a Single Muscle Sarcomere: Implications for Sarcomere Assembly. *Journal of Molecular Biology*. 2003; 332: 161-9.
20. Pensel N. The Future for Red Meat in Human Diets. *The Professional Animal Scientist*. 1998; 14: 133-40.
21. Domaradzki P, Stanek P, Litwińczuk Z, Skąlecki P and Florek M. Slaughter value and meat quality of suckler calves: A review. *Meat science*. 2017; 134: 135-49.
22. OECD. Meat consumption. 2017.
23. Torred EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Phillipi ST and Minazzi-Rogrigues RS. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Food Science and Technology*. 2000; 20: 145-50.
24. De Smet S and Vossen E. Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat science*. 2016; 120: 145-56.
25. Rooke JA, Flockhart JF and Sparks NH. The potential for increasing the concentrations of micro-nutrients relevant to human nutrition in meat, milk and eggs. *The Journal of Agricultural Science*. 2010; 148: 603-14.
26. Czerwonka M and Tokarz A. Iron in red meat--friend or foe. *Meat science*. 2017; 123: 157-65.
27. Kalpalathika PVM, Clark EM and Mahoney AW. Heme iron content in selected ready-to-serve beef products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1991; 39: 1091-3.

28. Klaudia J and Marian V. Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2011; 17: 3460-73.
29. Huang L, Xiong YL, Kong B, Huang X and Li J. Influence of storage temperature and duration on lipid and protein oxidation and flavour changes in frozen pork dumpling filler. *Meat science*. 2013; 95: 295-301.
30. Huang L, Liu Q, Xia X, Kong B and Xiong YL. Oxidative changes and weakened gelling ability of salt-extracted protein are responsible for textural losses in dumpling meat fillings during frozen storage. *Food Chem*. 2015; 185: 459-69.
31. Ladikos D and Lougovoï V. Lipid Oxidation in Muscle Foods: A Review. *Food Chemistry*. 1990; 35: 295-314.
32. Dima JB, Santos MV, Baron PJ, Califano A and Zaritzky NE. Experimental study and numerical modeling of the freezing process of marine products. *Food and Bioprocess Processing*. 2014; 92: 54-66.
33. Shafiur Rahman M. Food Preservation. *Handbook of Food Preservation, Second Edition*. CRC Press, 2007, p. 3-17.
34. Bottinelli R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2001; 443: 6-17.
35. Zhou GH, Xu XL and Liu Y. Preservation technologies for fresh meat - a review. *Meat science*. 2010; 86: 119-28.
36. Sun D-W. Fundamentals of Freezing. *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging, Second Edition*. CRC Press, 2011, p. 1-2.
37. Estevez M, Ventanas S, Heinonen M and Puolanne E. Protein carbonylation and water-holding capacity of pork subjected to frozen storage: effect of muscle type, premincing, and packaging. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011; 59: 5435-43.
38. Karlsdóttir MG, Sveinsdóttir K, Kristinsson HG, Villot D, Craft BD and Arason S. Effect of thermal treatment and frozen storage on lipid decomposition of light and dark muscles of saithe (*Pollachius virens*). *Food Chem*. 2014; 164: 476-84.
39. Hopkins DL and Thompson JM. The relationship between tenderness, proteolysis, muscle contraction and dissociation of actomyosin. *Meat science*. 2001; 57: 1-12.
40. Saeed S and Howell NK. Effect of lipid oxidation and frozen storage on muscle proteins of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal of the science of food and agriculture*. 2002; 82: 579-86.

41. Petzold G and Aguilera JM. Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods. *Food Biophysics*. 2009; 4: 378-96.
42. Jeong J-Y, Kim G-D, Yang H-S and Joo S-T. Effect of freeze–thaw cycles on physicochemical properties and color stability of beef semimembranosus muscle. *Food Research International*. 2011; 44: 3222-8.
43. Koohmaraie M, Kent MP, Shackelford SD, Veiseth E and Wheeler TL. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat science*. 2002; 62: 345-52.
44. Coombs CE, Holman BW, Friend MA and Hopkins DL. Long-term red meat preservation using chilled and frozen storage combinations: A review. *Meat science*. 2017; 125: 84-94.
45. Dransfield E. Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat science*. 1994; 36: 105-21.
46. Quali A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*. 1992; 74: 251-65.
47. Huff Lonergan E, Zhang W and Lonergan SM. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat science*. 2010; 86: 184-95.
48. Zor K, Dymek K, Ortiz R, et al. Indirect, non-competitive amperometric immunoassay for accurate quantification of calpastatin, a meat tenderness marker, in bovine muscle. *Food Chem*. 2012; 133: 598-603.
49. Gerelt B, Rusman H, Nishiumi T and Suzuki A. Changes in calpain and calpastatin activities of osmotically dehydrated bovine muscle during storage after treatment with calcium. *Meat science*. 2005; 70: 55-61.
50. Hopkins DL, Lamb TA, Kerr MJ and van de Ven RJ. The interrelationship between sensory tenderness and shear force measured by the G2 Tenderometer and a Lloyd texture analyser fitted with a Warner–Bratzler head. *Meat science*. 2013; 93: 838-42.
51. Crouse JD and Koohmaraie M. Effect of Freezing of Beef on Subsequent Postmortem Aging and Shear Force. *Journal of food science*. 1990; 55: 573-4.
52. Ertbjerg P and Puolanne E. Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. *Meat science*. 2017; 132: 139-52.
53. Jeong JY, Hur SJ, Yang HS, et al. Discoloration characteristics of 3 major muscles from cattle during cold storage. *Journal of food science*. 2009; 74: C1-5.
54. Chakanya C, Arnaud E, Muchenje V and Hoffman LC. Colour and oxidative stability of mince produced from fresh and frozen/thawed fallow deer (*Dama dama*) meat. *Meat science*. 2017; 126: 63-72.

55. Lebret B, Povše MP and Candek-Potokar M. Muscle and fat colour. Handbook of Reference Methods for the Assessment of Meat Quality Assessment Parameters. 2015, p. 33-44.
56. Suman SP, Hunt MC, Nair MN and Rentfrow G. Improving beef color stability: Practical strategies and underlying mechanisms. *Meat science*. 2014; 98: 490-504.
57. M Farouk M, Wiklund E, Stuart A and Dobbie P. Ageing Prior to Freezing Improves the Colour of Frozen-Thawed Beef and Venison. 55st International Congress of Meat Science and Technology. Copenhagen, Dinamarca2009.
58. Khan MI, Jo C and Tariq MR. Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors--A systematic review. *Meat science*. 2015; 110: 278-84.
59. Neethling J, Hoffman LC and Muller M. Factors influencing the flavour of game meat: A review. *Meat science*. 2016; 113: 139-53.
60. Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat science*. 2006; 74: 44-58.
61. Thanonkaew A, Benjakul S, Visessanguan W and Decker EA. The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze–thaw cycles. *Food Chemistry*. 2006; 95: 591-9.
62. Santé-Lhoutellier V, Astruc T, Marinova P, Greve E and Gatellier P. Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and in Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008; 56: 1488-94.
63. Berlett BS and Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 20313–6.
64. Martinaud A, Mercier Y, Marinova P, Tassy C, Gatellier P and Renerre M. Comparison of Oxidative Processes on Myofibrillar Proteins from Beef during Maturation and by Different Model Oxidation Systems. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1997; 45: 2481-7.
65. Requena JR, Chao CC, Levine RL and Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 69-74.
66. Estevez M and Heinonen M. Effect of phenolic compounds on the formation of alpha-amino adipic and gamma-glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron, and myoglobin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010; 58: 4448-55.
67. Stadtman ER and Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. 2003; 25: 207-18.

68. Soglia F, Petracci M and Ertbjerg P. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. *Food Chem.* 2016; 197: 670-5.
69. Vuorela S, Salminen H, Mäkelä M, Kivikari R, Karonen M and Heinonen M. Effect of Plant Phenolics on Protein and Lipid Oxidation in Cooked Pork Meat Patties. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2005; 53: 8492-7.
70. Rajabi K, Ashcroft AE and Radford SE. Mass spectrometric methods to analyze the structural organization of macromolecular complexes. *Methods.* 2015; 89: 13-21.
71. Rysman T, Jongberg S, Van Royen G, Van Weyenberg S, De Smet S and Lund MN. Protein thiols undergo reversible and irreversible oxidation during chill storage of ground beef as detected by 4,4'-dithiodipyridine. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2014; 62: 12008-14.
72. Turgut SS, Soyer A and Işıklı F. Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. *Meat science.* 2016; 116: 126-32.
73. Zhang W, Xiao S and U Ahn D. *Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality.* 2013, p.1191-201.
74. Xia X, Kong B, Liu Q and Liu J. Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles. *Meat science.* 2009; 83: 239-45.
75. Xue M, Huang F, Huang M and Zhou G. Influence of oxidation on myofibrillar proteins degradation from bovine via  $\mu$ -calpain. *Food Chemistry.* 2012; 134: 106-12.
76. Berardo A, Claeys E, Vossen E, Leroy F and De Smet S. Protein oxidation affects proteolysis in a meat model system. *Meat science.* 2015; 106: 78-84.
77. Vyncke W. Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* 1970; 72: 1084-7.
78. Gómez-guillón MC and Montero P. Extraction of Gelatin from Megrim (*Lepidorhombus boscii*) Skins with Several Organic Acids. *Journal of food science.* 2001; 66: 213-6.
79. Hill F. The Solubility of Intramuscular Collagen in Meat Animals of Various Ages. *Journal of food science.* 1966; 31: 161-6.
80. Neuman RE and Logan MA. The determination of collagen and elastin in tissues. *J Biol Chem.* 1950; 186: 549-56.

81. Bergman I and Loxley R. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. *Analytical Chemistry*. 1963; 35: 1961-5.
82. Vaz FN and Restle J. Características de carcaça e da carne de novilhos Hereford terminados em confinamento com diferentes fontes de volumoso. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2005; 34: 230-8.
83. Wheeler TL, Shackelford SD and Koohmaraie M. Tenderness classification of beef: III. Effect of the interaction between end point temperature and tenderness on Warner-Bratzler shear force of beef longissimus. *Journal of animal science*. 1999; 77: 400-7.
84. Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959; 37: 911-7.
85. Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*. 1883; 22: 366-82.
86. Machado MM. Efeito do congelamento e estocagem sobre a qualidade da carne bovina. Escola de Veterinária. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
87. Lara MS, Gutierrez JI, Timon M and Andres AI. Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. *Meat science*. 2011; 88: 481-8.
88. Botsoglou E, Govaris A, Ambrosiadis I, Fletouris D and Botsoglou N. Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation of long-term frozen n-3 fatty acids-enriched pork patties. *Meat science*. 2014; 98: 150-7.
89. Park D, Xiong YL and Alderton AL. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chemistry*. 2007; 101: 1239-46.
90. Fausto DA. Contribuição do tecido conjuntivo intramuscular na textura da carne de fêmeas zebuínas adultas submetidas a diferentes sistemas de manejo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba Universidade de São Paulo, 2011.
91. Hofmann K and Hamm R. Sulfhydryl and Disulfide Groups in Meats. *Advances in food research*. 1978; 24: 1-111.
92. Vieira C, Diaz MT, Martinez B and Garcia-Cachan MD. Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. *Meat science*. 2009; 83: 398-404.
93. Nassu RT, Francisco VC, Pacheco ML. Comparação de procedimento para determinação de força de cisalhamento em carne bovina em diferentes dias. 11º Simpósio Latino Americano de Ciência em Alimentos. 2015.

94. Holman BWB, Coombs CEO, Morris S, Kerr MJ and Hopkins DL. Effect of long term chilled (up to 5weeks) then frozen (up to 12months) storage at two different sub-zero holding temperatures on beef: 1. Meat quality and microbial loads. *Meat science*. 2017; 133: 133-42.
95. Kiani H and Sun D-W. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2011; 22: 407-26.