

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS  
MIOFIBRILARES E OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CARNE DE  
FRANGO MECANICAMENTE DESOSSADA**

*Receber*  
**MARISE APARECIDA RODRIGUES POLLONIO** 8/765

ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Marise Aparecida Rodrigues Pollonio e aprovada pela Comissão Julgadora em 02.12.94.*  
**Dr. ALOÍSIO JOSÉ ANTUNES**

ORIENTADOR

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor  
em Ciência de Alimentos**

**Campinas, SP - 1994**



**BANCA EXAMINADORA**

*Aloisio José Antunes*

---

**Prof. Dr. Aloisio José Antunes**  
(Orientador)

*Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres*

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres**  
(Membro)

*Hélia Harumi Sato*

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Hélia Harumi Sato**  
(Membro)

*Suplente*

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra Lúcia Regina Durrant**  
(Membro)

*Nelson Beraquet*

---

**Prof. Dr. Nelson Beraquet**  
(Membro)

*Suplente*

---

**Prof. Dr. Olavo Rusig**  
(Membro)

*Pedro Eduardo de Felício*

---

**Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício**  
(Membro)

*A meus pais*

*Antonio e Maria de Lourdes*

## *AGRADECIMENTOS*

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Aloísio José Antunes pela orientação deste trabalho e, principalmente por ter me introduzido na área de pesquisa em Ciência de Alimentos.

À Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela realização do curso de doutoramento e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

A realização dessa pesquisa foi viabilizada através do suporte técnico e operacional oferecido pelo Centro de Tecnologia de Carnes, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, no preparo da matéria-prima e processamentos realizados. Nesse sentido, gostaria de registrar meus agradecimentos pela receptividade e interesse científico demonstrados, particularmente à Engenheira Maria Tereza E. L. Galvão.

À Hoechst do Brasil Química e Farmacêutica S.A. e à Sadia, na pessoa do Dr. Getúlio Takahashi pela colaboração prestada em relação aos processamentos realizados.

Meus sinceros agradecimentos à Cooperativa Agropecuária Holambra pelo apoio ao trabalho de pesquisa, através do fornecimento da matéria-prima durante todo o trabalho experimental, em especial ao Engenheiro Alexandre Cassaro, pela atenção e espírito científico.

Às colegas Eliana Maria Pettrossi Motta e Nadeje Hamdan pela colaboração e apoio prestados durante a realização da pesquisa.

Finalmente, gostaria de agradecer aos membros da Banca Examinadora pelas sugestões na redação final da Tese e a todos que direta ou indiretamente, me incentivaram e apoiaram, dando assim sua contribuição para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE GERAL

	<b>página</b>
RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	4
REVISÃO DA LITERATURA.....	5
1. Oxidação lipídica.....	5
2. Propriedades funcionais de CFMD e interação com lipídios oxidados.....	14
3. Ação de polifosfatos, ascorbato e nitrito em produtos cárneos.....	21
3.1. Polifosfatos.....	21
3.2. Nitrito de sódio.....	25
3.3. Ascorbatos.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1. Matéria-Prima.....	29
1.1. Preparação das misturas.....	29
2. Descrição do Experimento.....	30

A-Avaliação da oxidação lipídica e degradação dos pigmentos heme durante armazenamento sob congelamento.....	31
B-Avaliação das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares extraídas das diferentes misturas de CFMD e do grau de desnaturação protéica.....	31
C-Influência do conteúdo e liberação de ferro hemínico e não-hemínico nas diferentes misturas de CFMD no processo de oxidação lipídica durante congelamento e sob aquecimento.....	32
D-Processamento de salsichas de frango com adição das diferentes misturas de CFMD em sua formulação.....	33
E-Efeito da adição de medula óssea à carne de peito e coxa de frango submetida a diferentes processos de moagem.....	33
3. Metodologia.....	34
3.1. Determinação da composição química e pH.....	34
3.2. Determinação do nº de TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	35
3.3. Modificação do método de ácido 2-tiobarbitúrico para determinação de malonaldeído em carnes curadas.....	37
3.4. Determinação de pigmentos totais e concentração de mioglobina em carnes mecanicamente desossadas.....	37
3.4.1. Pigmentos totais.....	38
3.4.2. Concentração de mioglobina.....	39
3.5. Metodologia empregada na avaliação das propriedades funcionais.....	40
3.5.1. Extração das proteínas miofibrilares.....	40

3.5.2. Determinação da porcentagem de solubilidade protéica.....	41
3.5.3. Formação e estabilidade do gel.....	42
3.5.4. Índice de atividade de emulsificação (EAI).....	42
3.6. Determinação da atividade de ATPase.....	44
3.7. Procedimento para eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS.....	46
3.8. Determinação do conteúdo de ferro hemínico e não- hemínico.....	49
3.8.1. Quantificação de ferro total por espectrofotometria no visível com 1,10 o-fenantrolina.....	49
3.8.2. Quantificação de ferro total por espectrometria de absorção atômica.....	51
3.8.3. Determinação de ferro não- hemínico.....	51
3.9. Metodologia empregada no processamento e avaliação de salsichas de frango com adição das diferentes misturas.....	54
3.9.1. Processamento de salsicha.....	54
a) Matéria-prima.....	54
b) Ingredientes.....	54
c) Formulação e procedimento.....	54
d) Análises realizadas na avaliação da qualidade das salsichas.....	57
3.10. Análise Estatística.....	59
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
1. Avaliação da oxidação lipídica, composição química e degradação dos pigmentos durante armazenamento sob congelamento das diferentes misturas de CFMD.....	60
1.1. Estabilidade à oxidação lipídica de CFMD na presença de polifosfato, nitrito e ascorbato.....	61

a. Polifosfato.....	66
b. Nitrito.....	67
c. Ascorbato e oxidação de pigmentos heme.....	69
2. Avaliação das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares extraídas das diferentes misturas de CFMD e do grau de desnaturação protéica.....	75
2.1. Solubilidade.....	75
2.2. Gelatinização e sinerese de géis.....	80
2.3. Índice de atividade de emulsão (IAE).....	84
2.4 Atividade de ATPase e perfil eletroforético das proteínas miofibrilares das diferentes misturas.....	84 87
3. Influência do conteúdo e liberação de ferro hemínico e não-hemínico nas diferentes misturas de CFMD no processo de oxidação lipídica durante congelamento e sob aquecimento.....	92
3.1. Comparação entre os diferentes métodos.....	92
3.2. Variação dos teores de ferro hemínico e não-hemínico nas diferentes formulações durante armazenamento sob congelamento.....	94
3.3. Efeito do aquecimento na estabilidade à oxidação lipídica nas diferentes formulações durante armazenamento sob congelamento.....	98
4. Avaliação de salsichas de frango processadas com adição das formulações de CFMD durante armazenamento sob congelamento.....	102
5. Efeito da adição de medula óssea à carne de peito e coxa submetida a diferentes processos de moagem.....	108
CONCLUSÕES.....	114
BIBLIOGRAFIA.....	117
APÊNDICE.....	139



# **ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES E OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CARNE DE FRANGO MECANICAMENTE DESOSSADA**

**Candidata: Marise Aparecida Rodrigues Pollonio**  
**Orientador: Prof. Dr. Aloísio José Antunes**

## **RESUMO**

Carne de frango mecanicamente desossada (CFMD), a qual é obtida de partes menos nobres de frango (dorso, pescoço, e poedeiras de descarte) constitui-se numa matéria-prima comumente utilizada em produtos emulsionados processados. O processo mecânico resulta em alteração da composição lipídica devido à incorporação de medula óssea, pigmentos heme, gordura, Fe, Cu, Ca e P. Ocorre também rompimento das fibras musculares e exposição dos fosfolípidios presentes nas membranas celulares.

Os ingredientes, polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio são utilizados em produtos cárneos processados, aos quais têm sido atribuídos propriedades antioxidantes.

Considerando que interações entre lípidios oxidados e outros constituintes musculares, especialmente proteínas miofibrilares, afetam negativamente a qualidade de produtos processados, este estudo teve por objetivos: a) avaliar a influência da oxidação lipídica sobre as propriedades funcionais da CFMD, com e sem pele, durante armazenamento sob congelamento; b) caracterizar o papel do ferro não-hemínico e ferro hemínico no processo de oxidação lipídica durante o mesmo período; c) avaliar o efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio em CFMD durante armazenamento sob congelamento e sua influência sobre as propriedades funcionais.

Os resultados indicaram que CFMD com e sem pele, com adição de polifosfato, nitrito e ascorbato foi consideravelmente mais estável à oxidação lipídica, apresentando baixa porcentagem de degradação de pigmentos heme, indicando expressiva ação antioxidante.

Em relação às propriedades funcionais, valores de solubilidade, índice de atividade de emulsão e líquido liberado de géis formados por proteínas miofibrilares das diferentes formulações foram negativamente influenciados nas amostras controle, ao longo do período de armazenamento. Adição de polifosfato,

nitrito e ascorbato atuou favoravelmente, evitando a desnaturação protéica, o que foi indicado pelos resultados das propriedades funcionais das proteínas, altos valores de atividade de ATPase e perfil eletroforético, demonstrando a manutenção da banda de miosina ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados obtidos indicaram também que o ferro não-hemínico foi o principal responsável pelo processo de oxidação lipídica nas amostras de CFMD sob aquecimento e o ferro hemínico, naquelas armazenadas cruas.

Oxidação lipídica ocorrida nas matérias-primas influenciou significativamente os valores de TBARS de salsichas processadas contendo tais amostras em sua formulação, sendo que os maiores índices foram encontrados para CFMD armazenada sem os aditivos.

# **FUNCTIONAL PROPERTIES OF MYOFIBRILLAR PROTEINS AND LIPID OXIDATION OF MECHANICALLY DEBONED CHICKEN MEAT**

**Candidate: Marise Aparecida Rodrigues Pollonio**

**Advisor: Prof. Dr. Aloisio José Antunes**

## **SUMMARY**

Mechanically deboned chicken meat (MDCM) is an important raw material which is frequently utilized in the manufacture of processed meat products. The mechanical process alters the composition of lipid fraction by incorporating bone marrow (heme pigments, fat, Fe, Cu, Ca and P) and causes a rupture of the muscle fibers, exposing phospholipids which are constituents of the cell membranes.

Polyphosphate, nitrite and sodium ascorbate are frequently used as ingredient in the manufacture of processed meat products. These ingredients hold important antioxidant properties.

Interactions among oxidated lipids and other muscle constituents, mainly myofibrillar proteins, adversely affect the quality of processed meat products. The basic objectives of this study were as follows: a) to evaluate the influence of lipid oxidation on the functional properties of MDCM, with and without skin, during frozen storage; b) to characterize the role of non-heme iron and heme-iron during the same storage period; c) to study the effect of polyphosphate, nitrite and sodium ascorbate on the behaviour of MDCM during frozen storage and also their influence on the functional properties.

Our results have indicated that MDCM with and without skin were considerably more stable when polyphosphate, nitrite and ascorbate were incorporated; a low degradation of heme-pigments was indicative of an expressive antioxidant action of these compounds.

The functional properties (solubility, emulsifying activity index and liberation of liquid from gels made with myofibrillar proteins) were significantly reduced in the control samples during frozen storage. The addition of polyphosphate, nitrite and ascorbate inhibited protein denaturation and, as a consequence, functional properties were maintained, ATPase activity was preserved and the electrophoretic pattern of myosin was kept.

Non-heme iron was the main responsible for the process of lipid oxidation in the samples of heated MDCM and the heme-iron in the raw samples.

The process of lipid oxidation markedly increased the TBARS values obtained for the frankfurters; the highest values were obtained for the control samples, without polyphosphate, nitrite and ascorbate.

## ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1 - Formulação básica do batter de salsicha processado com CFMD sem pele.....	56
Tabela 2 - Teores (g) de fosfato, nitrito e ascorbato nas diferentes formulações de CFMD sem pele.....	56
Tabela 3 - Condições de processamento térmico e resfriamento de salsicha.....	56
Tabela 4 - Formulação básica de batter de salsicha processado com CFMD com pele.....	58
Tabela 5 - Teores (g) de fosfato, nitrito e ascorbato nas diferentes formulações com CFMD com pele.....	58
Tabela 6 - Composição química e valores de pH das formulações de CFMD com pele.....	60
Tabela 7 - Composição química e valores de pH das formulações de CFMD sem pele.....	61
Tabela 8 - Valores de pH das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	62
Tabela 9 - Valores de pH das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C) .....	62
Tabela 10 - Valores de TBARS das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	65
Tabela 11 - Valores de TBARS das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	65
Tabela 12 - Determinação de pigmentos heme, mioglobina (Mb) e hemoglobina (Hb) (mg/g) das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	71
Tabela 13 - Determinação de pigmentos heme, mioglobina (Mb) e hemoglobina (Hb) (mg/g) das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	71
Tabela 14 - Variação na concentração de pigmentos totais (mg/g) em CFMD com e sem pele (C/P, S/P) durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	72

Tabela 15 - Avaliação de cor (valores L*, a*, b*), das formulações de CFMD com e sem pele (C/P, S/P) durante armazenamento sob congelamento (-18°C) (superfície interna).....	73
Tabela 16 - Avaliação de cor (valores L*, a*, b*), das formulações de CFMD com e sem pele (C/P, S/P) durante armazenamento sob congelamento (-18°C) (superfície externa).....	73
Tabela 17 - Valores de índice de atividade de emulsão (m <sup>2</sup> /g) das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C)	85
Tabela 18 - Valores de índice de atividade de emulsão (m <sup>2</sup> /g) das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C)	86
Tabela 19 - Comparação entre os métodos de espectroscopia de absorção atômica (EAA) e 1,10 o-fenantrolina para determinação de ferro total nas formulações de CFMD com e sem pele.....	93
Tabela 20 - Valores de ferro total <sup>(1)</sup> (µg/g) para formulações de CFMD durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	95
Tabela 21 - Valores de ferro hemínico (µg/g) para formulações de CFMD com pele.....	95
Tabela 22 - Valores de ferro hemínico (µg/g) para formulações de CFMD sem pele.....	96
Tabela 23 - Valores de ferro não-hemínico (µg/g) para formulações de CFMD com pele.....	96
Tabela 24 - Valores de ferro não-hemínico (µg/g) para formulações de CFMD sem pele.....	96
Tabela 25 - Efeito do aquecimento no valor de TBARS nas formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	98
Tabela 26 - Efeito do aquecimento no valor de TBARS nas formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento.....	98
Tabela 27 - Valores de TBARS de salsichas elaboradas com adição de 20% das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C) .....	102

Tabela 28 - Valores de TBARS de salsichas elaboradas com adição de 20% das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	102
Tabela 29 - Valores de rendimento de processamento de salsichas com envoltório de celulose elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	104
Tabela 30 - Valores de rendimento de processamento de salsichas com envoltório de celulose elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	104
Tabela 31 - Valores de porcentagem de rendimento após reaquecimento de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	104
Tabela 32 - Valores de porcentagem de rendimento após reaquecimento de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	105
Tabela 33 - Avaliação de cor (valores L*, a*, b*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C) (superfície interna).....	106
Tabela 34 - Avaliação de cor (valores L*, a*, b*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C) (superfície externa).....	106
Tabela 35 - Avaliação de cor (valores L*, a*, b*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (superfície interna).....	107
Tabela 36 - Avaliação de cor (valores L*, a*, b*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C) (superfície externa).....	107

Tabela 37 - Caracterização química de carne de peito e coxa de frango, adicionada de diferentes níveis de medula óssea.....	108
Tabela 38 - Valores de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	109
Tabela 39 - Valores de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 2 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	110
Tabela 40 - Valores de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 4 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	111
Tabela 41 - Valores de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 6 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	112
Tabela 42 - Valores de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 8 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	113



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>página</b>
Figura 1 - Etapas de iniciação, propagação e terminação no processo de oxidação de lipídios.....	6
Figura 2 - Mecanismos de oxidação lipídica e formação de produtos.....	7
Figura 3 - Fluxograma básico do processamento de salsichas com ordem de adição dos ingredientes.....	55
Figura 4 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio nos valores de TBARS de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	63
Figura 5 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio nos valores de TBARS de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	64
Figura 6 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio nos valores de % de solubilidade das proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	76
Figura 7 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio nos valores de % de solubilidade das proteínas miofibrilares de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	77
Figura 8 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio no volume de líquido liberado (mL) de géis formados por proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	82
Figura 9 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio no volume de líquido liberado (mL) de géis formados por proteínas miofibrilares de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	83
Figura 10 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio na atividade de ATPase ( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) das proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).....	88

Figura 11 - Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio na atividade de ATPase ( $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ de proteína) das proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).....	89
Figura 12 - Perfil eletroforético das proteínas miofibrilares de CFMD com e sem pele durante armazenamento sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).....	91

## INTRODUÇÃO

Produtos processados de frango têm sido recentemente industrializados em larga escala como resultado da expansão avícola e em resposta ao apelo de um segmento do mercado consumidor por produtos com menores teores de gordura e colesterol. Tais produtos, entretanto, são altamente susceptíveis à deterioração oxidativa e alteração de flavor conhecida como "warmed-over-flavor", a qual se desenvolve rapidamente após processamento térmico e durante estocagem congelada (Ang & Young, 1989).

Esse processo agravou-se com o advento da operação de desossa mecânica de partes menos nobres (dorso, pescoço, peito sem músculo) e poedeiras de descarte, constituindo-se em matéria-prima de produtos emulsionados e processados. O processo mecânico leva à alteração da composição química da matéria-prima através da incorporação de componentes pró-oxidantes da medula óssea, pigmentos heme, lipídios, metais como Fe, Cu e elementos como Ca e P, bem como rompimento das fibras musculares e exposição dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares.

Proteínas e mais especificamente proteínas miofibrilares, constituem-se nos principais componentes estruturais e funcionais, sendo responsáveis pelas propriedades de emulsificação, gelatinização e retenção de água e gordura (Smith, 1988) em produtos cárneos processados. A funcionalidade das proteínas é influenciada por propriedades que incluem carga superficial, peso molecular, conformação, hidrofobicidade e tendências de associação/dissociação, as quais, por sua vez, são afetadas por fatores extrínsecos como pH, força iônica, conteúdo de umidade, temperatura e condições de processamento (Wilding *et al.*, 1986).

Interações entre lipídios oxidados e outros constituintes musculares com proteínas alteram as propriedades funcionais, afetando negativamente a qualidade do produto final. Reações dessa natureza ocorrem em CFMD e têm sido estudadas em vários sistemas modelos (Buttukus, 1967; Jarenback & Liljemark, 1975; Nakhost & Karel, 1983, 1984). Smith (1987) atribuiu as mudanças bioquímicas e funcionais observadas nas proteínas de peru desossado mecanicamente à oxidação lipídica ocorrida durante o armazenamento congelado.

Uma vez que a oxidação lipídica constitui-se num dos fatores limitantes da qualidade de CFMD, bem como em carnes em geral, muitos estudos têm sido conduzidos com objetivo de prevenir ou ao menos minimizar os efeitos da oxidação sobre a cor, flavor e funcionalidade das proteínas musculares. Diferentes métodos de aquecimento, tratamento da matéria-prima, sistemas de estocagem congelada a diferentes atmosferas, remoção de O<sub>2</sub>, têm sido extensivamente revisados na literatura (McMahon & Dawson, 1976; Mast & MacNeil, 1976; Orr & Wogar, 1979).

De acordo com vários autores (Sofos, 1986; Ang & Young, 1989; Farr & May, 1970; Tims & Watts, 1958), o uso de polifosfatos em produtos cárneos aumenta a capacidade de ligação com a água, melhora a textura e retarda a oxidação lipídica em carnes cozidas (Shahidi et al., 1987), sugerindo um efeito quelante sobre íons metais, especialmente ferro não-hemínico, como possível mecanismo para sua ação anti-oxidante.

Nitrito de sódio tem efeito contra o processo de oxidação lipídica e faz parte da formulação da maioria dos produtos processados de carne, principalmente os emulsionados. Igene *et al.* (1979) reportaram que a adição de 156 mg/g de nitrito de sódio a músculo lavado, tomado por sistema modelo, evitou oxidação lipídica catalisada por fosfolipídios, pigmentos heme e ferro não-hemínico em carne cozida. Resultados similares foram encontrados por outros autores (Zubillaga *et al.*, 1984).

Ascorbatos são agentes redutores que atuam em produtos cárneos diminuindo o tempo para o desenvolvimento de cor, minimizando a descoloração durante armazenamento e reduzindo o nitrito residual (Tellefson & Bowers, 1981). De acordo com Fox (1974), as propriedades antioxidantes de nitrito são devidas à sua rápida oxidação a óxido nítrico, o qual ocorre na presença de ascorbato (ou outro agente redutor). Vários autores têm proposto que, portanto, ascorbatos possuem também atividade antioxidante, especialmente a altas concentrações, onde atuariam como capturadores de O<sub>2</sub> ou pela manutenção das formas Fe<sup>+2</sup> e Fe<sup>+3</sup> em equilíbrio, envolvidas na oxidação de lipídios em carnes (Sato & Hegarty, 1971).

Embora a funcionalidade das proteínas da CFMD e sua estabilidade à oxidação lipídica tenham sido reportadas na literatura (Xiong e Brekke, 1990; Smith et al., 1987), pouca informação existe a respeito da interação entre esses

dois aspectos e menos ainda em relação aos efeitos de fosfatos, nitrito e ascorbato como agentes antioxidantes na matéria-prima e sobre as propriedades funcionais ao longo da estocagem congelada.

Este estudo, portanto, tem por objetivo estabelecer as relações existentes entre propriedades funcionais e oxidação lipídica de CFMD com adição de fosfato, ascorbato e nitrito durante armazenamento congelado.

## **OBJETIVOS**

O presente estudo tem por objetivos principais:

1. Avaliação da influência da oxidação lipídica sobre as propriedades funcionais de carne de frango mecanicamente desossada, com pele e sem pele, durante armazenamento congelado;
2. Caracterização do papel do ferro hemínico e não-hemínico no desenvolvimento da oxidação lipídica durante armazenamento congelado;
3. Avaliação do efeito da adição de fosfato, nitrito e ascorbato de sódio sobre a oxidação lipídica e propriedades funcionais da carne de frango mecanicamente desossada durante armazenamento congelado.

## REVISÃO DA LITERATURA

Carne de frango mecanicamente desossada constitui-se numa matéria-prima comumente utilizada na elaboração de produtos cárneos e sua produção deve ser inserida dentro de um cuidadoso programa de controle de qualidade (Galvão, 1994). Fatores como temperatura inicial do material a ser desossado, temperatura final ao término da operação, características da matéria-prima (partes da carcaça, presença ou não de pele), tipo de congelamento e armazenamento aplicado são fatores determinantes na manutenção da qualidade do produto (Degenhardt, 1989).

Entretanto, apesar da manipulação adequada pré e pós desossa, a operação mecânica altera significativamente a composição e estrutura da matéria-prima original tornando-a altamente susceptível à oxidação lipídica (Froning, 1976), com rompimento das fibras do tecido muscular, resultando em diminuição das propriedades funcionais de suas proteínas. Estes e outros aspectos serão abordados na presente revisão bibliográfica.

Uma observação a ser realizada é que, embora a legislação brasileira defina o produto obtido a partir de ossos ou partes da carcaça dos animais liberados pelo Serviço de Inspeção Federal, processados em máquinas de desossa mecânica como carne de frango mecanicamente separada, neste trabalho será utilizada a terminologia carne de frango mecanicamente desossada por se tratar de um estudo bioquímico sobre oxidação lipídica e funcionalidade de proteínas, onde a maioria dos trabalhos publicados sobre o tema utiliza o referido termo.

### 1. Oxidação Lipídica

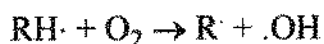
O processo de oxidação lipídica constitui-se num dos principais fatores de deterioração da qualidade de produtos cárneos resultando em alteração de flavor, cor, textura, valor nutritivo e produção de componentes tóxicos (Allen & Foegeding, 1981). Recentemente, com a moderna formulação de alimentos emulsionados, reestruturados e pré-cozidos, envolvendo a utilização de partes desossadas mecanicamente (Pearson *et al.*, 1983), muitos estudos têm sido

conduzidos com o objetivo de esclarecer o mecanismo de peroxidação lipídica e encontrar formas de evitar ou minimizar tais problemas.

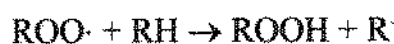
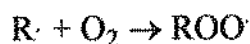
A autoxidação de lipídios em produtos cárneos envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, em particular daqueles associados com fosfolipídios localizados nas membranas celulares. Desenvolve-se através de três etapas: iniciação, propagação e fase terminal (Figura 1). A susceptibilidade ao processo de oxidação depende da capacidade (habilidade) dos ácidos graxos doarem um átomo de hidrogênio, com produção de um radical livre de lipídio o qual, por sua vez, reage com oxigênio molecular para formar um radical peroxi. Assim, os átomos de carbono adjacentes às duplas ligações tendem a doar um átomo de hidrogênio, levando à formação de radicais estabilizados por ressonância (Halliwell & Gutteridge, 1990). Os produtos primários da autoxidação lipídica são hidroperóxidos, os quais não causam problemas de flavor e ranço. Entretanto, a decomposição de tais hidroperóxidos em produtos secundários como hidrocarbonetos, alcoóis, cetonas e aldeídos, influenciam significativamente o flavor e sabor de carnes. Dependendo da composição dos ácidos graxos nos lipídios, a proporção desses produtos de oxidação vai variar extensivamente (Gray, 1978) (Figura 2).

**Figura 1. Etapas de iniciação, propagação e terminação no processo de oxidação de lipídios.**

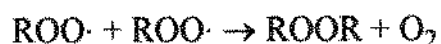
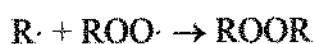
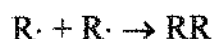
**a) Iniciação:**



**b) Propagação:**



**c) Terminação:**

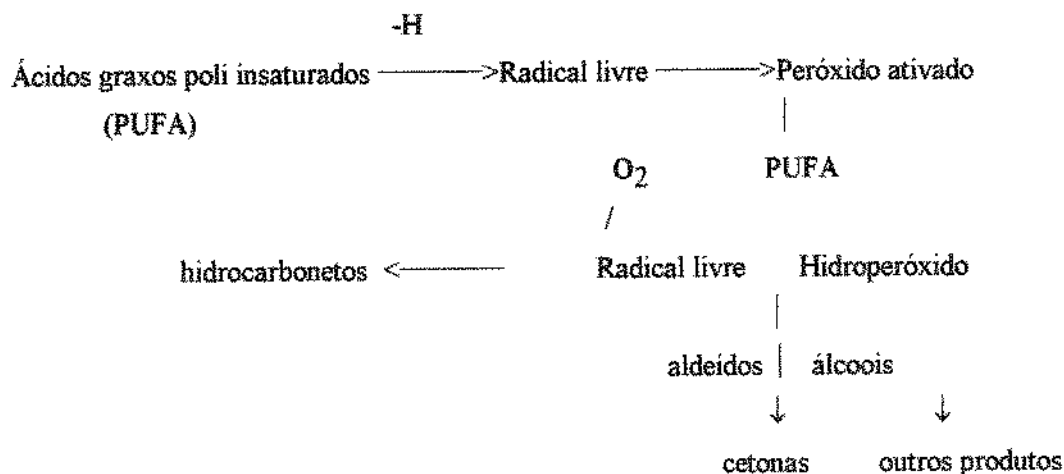


onde,



RH = ácido graxo insaturado  
 H = átomo de H adjacente a uma dupla ligação  
 ROOH = hidroperóxidos

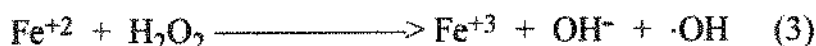
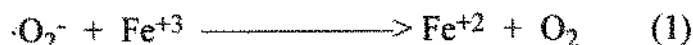
**Figura 2. Mecanismos de oxidação lipídica e formação de produtos.**



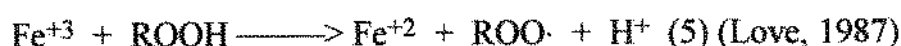
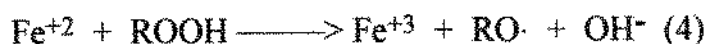
Oxigênio, luz, calor, metais, pigmentos e grau de insaturação dos ácidos graxos influenciam as reações acima descritas.

Metais promovem oxidação lipídica por facilitar a etapa de iniciação através da transferência de elétrons, levando a maiores taxas na produção de radicais livres e também pela decomposição de hidroperóxidos. Entre os que catalisam a autooxidação em carnes, o ferro é o mais estudado.

O elemento ferro ( $Z = 26$ ) apresenta vários estados de oxidação, sendo a forma oxidada, férrica ( $Fe^{+3}$ ) e sua forma reduzida, ferrosa ( $Fe^{+2}$ ) as mais estáveis, ocorrendo naturalmente em alimentos, o que lhe permite atuar como doador e acceptor de elétrons, conferindo importantes propriedades catalíticas. Na presença de  $O_2$ , íons ferrosos produzem o radical superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) (1), o qual é dismutado a  $H_2O_2$  (2).  $Fe^{+2}$  pode também reduzir  $H_2O_2$  a radicais hidroxí ( $\cdot OH$ ) (3) (Kanner *et al.*, 1988). Essas reações, as quais foram descritas por Fong *et al.* (1973), são designadas como reações de Haber-Weiss catalisadas por ferro e são apresentadas a seguir:



O ferro também atua na decomposição de hidroperóxidos pré-formados em alimentos através das reações:



Em tecido muscular, o ferro acumula-se principalmente na mioglobina e uma menor quantidade é encontrada na hemoglobina, constituindo as formas de ferro hemínico. Teores muito baixos são encontrados em enzimas da cadeia respiratória e em proteínas de transporte denominadas transferrinas.

Outra fonte de ferro importante na peroxidação de lipídios são as ferritinas, as quais são as principais proteínas que armazenam ferro celular. São encontradas principalmente no fígado, baço e medula óssea e em menor extensão nos outros tecidos (Clegg *et al.*, 1980). De acordo com Linder *et al.* (1981), células musculares contém apenas uma ferritina, a qual migra rapidamente em eletroforese em gel. Outra ferritina foi isolada de células não-musculares do parênquima.

*In vivo*, a síntese de ambas as formas de ferritina é estimulada pelo ferro e a ingestão desse elemento resulta em acúmulo de ferritina. Ferro, por sua vez, é liberado da ferritina e utilizado pela mitocôndria para síntese de pigmentos heme. Em células musculares é a mitocôndria quem sintetiza mioglobina (Ulvik, 1982).

Em carnes, as maiores concentrações de ferro são encontradas na mioglobina (Mb), cujos valores típicos são: 2-5 mg/g de Mb em carne bovina; 4-7 mg/g Mb em ovelhas; 2,5-7 mg/g Mb em suínos; 1-2 mg/g Mb em carne de frango (Love, 1987). De acordo com Ahn *et al.* (1992), 0,4 mg Mb/g carne equivale a, aproximadamente, 1,3-1,4 ppm de ferro iônico livre.

Hazell (1982) separou os componentes de ferro solúvel em carne bovina, suína, de frango e carneiro. De um modo geral, ferro distribui-se em cinco grandes componentes: uma fração insolúvel, ferritina, hemoglobina, mioglobina e uma fração de baixo peso molecular. Enquanto em carne bovina, mais de 70% do ferro distribui-se entre mioglobina e hemoglobina, em tecido muscular de frango, os pigmentos heme contribuem com menos de 30% na porcentagem de ferro e 58% estão presentes na fração insolúvel. Entretanto, em todas as amostras, a maior parte do ferro solúvel encontra-se associada à mioglobina e hemoglobina.

Um dos aspectos mais importantes relativo ao papel do ferro no processo de oxidação lipídica, está no estabelecimento de sua forma mais ativa: se ferro hemínico ou não-hemínico.

As primeiras pesquisas sobre o assunto sugerem que é o ferro hemínico das proteínas heme mioglobina e hemoglobina, o principal catalisador da peroxidação de lipídios (Schaich, 1980; Greene & Price, 1975; Greene, 1969; Tappel, 1962; Younathan & Watts, 1959). Mais especificamente, é o ferro hemínico na forma oxidada, ou seja,  $Fe^{+3}$  presente na metamioglobina e metahemoglobina, o responsável pela propagação no processo de oxidação lipídica. Dados da literatura indicam que pigmentos heme nativos não possuem ação catalítica (Kendrick & Watts, 1969) e o mecanismo principal de catálise dos pigmentos heme oxidados parece ser a decomposição catalítica de hidroperóxidos e produção de radicais livres (Love, 1983). Outro processo de catálise sugere que lipídios sejam complexados com heme. O mecanismo mais aceito assume que os dois processos ocorrem simultaneamente (Fox & Benedict, 1987).

Hirano & Olcott (1971) reportaram que altos níveis de pigmentos heme inibiram peroxidação de lipídios; entretanto, de acordo com Ladikos e Lougovois (1990) esse efeito antioxidante dos pigmentos heme somente é observado em concentrações irrealis do ponto de vista prático em produtos cárneos. A inibição em altas concentrações foi sugerida ocorrer em função da ligação dos peróxidos com proteínas.

Segundo outros pesquisadores, entretanto, é o ferro não-hemínico e não os pigmentos heme, o principal agente pró-oxidante em carnes (Love & Pearson, 1974).

Sato & Hegarty (1971) adicionaram  $FeCl_2$  e  $FeCl_3$  em extratos lavados de carne para remoção de mioglobina e observaram que oxidação lipídica

ocorreu em elevadas taxas em carne cozida, enquanto que adição de mioglobina purificada não elevou o TBARS, nem induziu o aparecimento de "warmed-over-flavor". Love & Pearson (1974) encontraram que baixos níveis de adição como 1-10 ppm de  $Fe^{+2}$  promoveram a oxidação lipídica em sistemas modelos semelhantes.

Igene *et al.* (1979) atribuíram o rápido desenvolvimento de "warmed-over-flavor" em carne cozida à liberação de íons de  $Fe^{+2}$  provenientes dos pigmentos heme. Assim, seriam os íons  $Fe^{+2}$  liberados da mioglobina e não a mioglobina por si, os responsáveis pela catálise de oxidação. Em estudo posterior, os mesmos autores (Igene *et al.*, 1985) evidenciaram inibição completa da oxidação lipídica quando utilizaram agentes quelantes de  $Fe^{+2}$  em seus sistemas modelos.

Liu (1970a, 1970b) relacionou a ação de ferro hemínico, não-hemínico e pH, concluindo que ambos catalisaram a reação de oxidação lipídica. Entretanto, íon ferroso foi mais efetivo em pH ácido e nenhuma catálise ocorreu em pH acima de 6,4. Metamioglobina acelerou o consumo de  $O_2$  em emulsões de lipídios na faixa de pH entre 5,6-7,8, com tendência a maior catálise em pHs mais altos. Agentes quelantes como EDTA inibiram oxidação por  $Fe^{+2}$ , mas não pela mioglobina.

Tichivangana & Morrissey (1985) concluíram que, em carne fresca e em emulsões modelo, pigmentos no estado férrico são potentes catalisadores de oxidação lipídica, enquanto que em carnes aquecidas, o sistema é mais complexo e ferro não-hemínico parece desempenhar um papel mais importante.

Além do ferro não-hemínico e pigmentos heme, ferro presente em proteínas armazenadoras também desenvolvem ação catalítica no processo de oxidação lipídica. Operações como aquecimento, desossa mecânica rompem estruturas das membranas facilitando a liberação do ferro. Sob tais condições, oxigênio pode reagir diretamente com íon ferroso na carne e ativar  $O_2$  a um radical superóxido, altamente reativo ( $\cdot O_2^-$ ) (Ahn *et al.*, 1993). Kanner & Doll (1991) concluíram que ferritina do músculo é uma principais fontes de ferro livre catalítico, exercendo um papel importante nas etapas de iniciação e propagação da peroxidação de lipídios de músculos de peru. Wells (1966) reportou que ferritina estimulou oxidação lipídica na presença de ascorbato. Tal efeito catalítico foi

também demonstrado por outros autores ( Decker & Welch, 1990; O'Connell *et al.*, 1985).

Alguns autores atribuem parte dessa controvérsia em relação ao papel do ferro hemínico e não-hemínico às diferentes metodologias empregadas nos estudos. Estudos com sistemas modelos contendo tecido muscular lavado pode remover compostos importantes por arraste, após exaustivas lavagens e diálise. No caso de se empregarem emulsões de linoleato, outra prática comum, estas possuem hidroperóxidos pré-formados e não podem simular a peroxidação lipídica nas células musculares, as quais são constituídas principalmente de membranas contendo lipídios não-oxidados (Kanner *et al.*, 1991).

Outro fator que causa diferenças nos efeitos catalíticos de ferro hemínico e não-hemínico é creditado à inexistência de um método adequado para sua quantificação (Ahn *et al.*, 1993). Entre os métodos disponíveis mais comumente utilizados estão os de digestão ácida direta de Schricker *et al.* (1982); quelação do ferro não-hemínico com EDTA, seguida de precipitação com ácido tricloroacético (Igene *et al.*, 1979) e o procedimento de Chen (1984), envolvendo também quelação do ferro não-hemínico com EDTA, com subsequente precipitação com acetona. Em todos eles, ferro total deve ser previamente determinado e o teor de ferro hemínico é calculado por diferença entre o ferro total e ferro não-hemínico.

Rhee & Ziprin (1987) modificaram o método de Schricker (1982), adicionando  $\text{NaNO}_2$  à amostra e fazendo correção dos valores de absorbância encontrados em relação à fase líquida incubada sem adição dos reagentes de cor na reação colorimétrica. Segundo vários autores (Igene *et al.*, 1979), a maior crítica ao método de Schricker (1982) é a super-estimação do ferro não-hemínico em função do ferro liberado dos pigmentos heme, devida à clivagem oxidativa do anel porfirínico durante longa incubação em meio ácido. Uso de  $\text{NaNO}_2$  (nitrito de sódio) estabiliza os pigmentos heme e reduz esse efeito no músculo.

A temperatura e taxa de aquecimento influenciam a liberação de ferro não-hemínico. De acordo com Chen *et al.* (1984) curto tempo de aquecimento pode ser a razão pela qual hemoglobina, mioglobina e metamioglobina tem apresentado pouco ou nenhum efeito oxidante. Sato & Hegarty (1971) e Love & Pearson (1974) aqueceram amostras em água em ebulição até temperatura interna de  $70^\circ\text{C}$ , levando aproximadamente 2 minutos, o

que parece ser pouco para elevar a concentração de ferro não-hemínico nas amostras. Chen *et al.* (1984) demonstraram que aquecimento lento aumentou o teor de ferro não-hemínico numa proporção de 71,75% em comparação a 5,34% no aquecimento rápido. Como o cozimento da carne geralmente envolve aquecimento lento, isto pode ajudar a explicar a propensão da carne pré-cozida para oxidação lipídica com liberação de ferro não-hemínico atuando como catalisador ativo no processo de autoxidação.

Radicais livres que intermediam reações de peroxidação e decomposição de pigmentos heme causam também perda de cor (Haurowitz, 1941). A concentração de pigmentos totais de qualquer músculo determina a cor e aceitabilidade de produtos cárneos processados (Livingston & Brown, 1981). O principal pigmento responsável pela cor da carne é mioglobina no músculo. Em carne mecanicamente desossada devido à incorporação de medula óssea, a hemoglobina é o pigmento presente em maior concentração.

O estado de oxidação do ferro presente no grupo heme e a capacidade de oxigenação influenciam a cor da carne. O átomo de ferro liga-se a 4 nitrogênios no centro do anel da protoporfirina, podendo formar duas ligações adicionais, uma em cada plano do heme e esses sítios de ligação são chamados de 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> posições de coordenação.

Desoximioglobina, comumente conhecida como mioglobina ou mioglobina reduzida, contém ferro no estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ), sendo caracterizado pela ausência de qualquer ligante na 6<sup>a</sup> posição coordenada; têm cor vermelho-púrpura que é a cor típica de músculo recém cortado. Ocorre a pressões parciais de  $O_2$  muito baixas, combinando-se muito rapidamente com  $O_2$  a pressões parciais mais elevadas (Stryer, 1991).

Oximioglobina caracteriza-se pela 6<sup>a</sup> posição ocupada com  $O_2$  e apresenta-se como um pigmento vermelho brilhante; o ferro deve estar no estado ferroso para que ocorra oxigenação (Livingston & Brown, 1981). Nessa forma, o pigmento é estável sob altas pressões parciais de  $O_2$ , mas se baixas tensões de  $O_2$  são desenvolvidas, parte da oximioglobina é desoxigenada a desoximioglobina, a qual é menos estável, exceto se condições muito baixas de  $O_2$  forem criadas. Em função dessa menor estabilidade da mioglobina reduzida, pode ocorrer alguma oxidação à forma férrica ( $Fe^{+3}$ ). Uma vez ocorrida a oxidação, forma-se metamioglobina a qual possui água ligada à 6<sup>a</sup> posição de coordenação. A cor desse pigmento é indesejável, um marrom que é associado pelo consumidor com

produto impróprio para o consumo. Entretanto, descoloração pode ocorrer bem antes que outras mudanças deteriorativas aconteçam. Oxidação do pigmento mioglobina ocorre mais rapidamente a pHs mais baixos e é diretamente dependente da concentração do íon hidrogênio e influenciada pelo nível de O<sub>2</sub>.

A difusão de oxigênio no músculo é dependente da temperatura e pH, sendo maior à temperatura próxima de 0°C, onde a atividade enzimática é mínima. Em temperaturas mais altas, enzimas respiratórias usam mais oxigênio, e portanto, limitam sua difusão. Atividade enzimática respiratória também é favorecida por pHs mais altos e, conseqüentemente, músculos com pH mais alto usam menos O<sub>2</sub> e menos O<sub>2</sub> difunde-se para o músculo. O resultado é um produto colorido mais escuro, o qual tem somente uma fina camada de oximioglobina.

Carne moída ou desossada mecanicamente apresenta um sério problema, pois possui área superficial muito maior e portanto, mais exposta ao ar. Além disso o próprio processo incorpora oxigênio ao produto, muitas vezes a um nível de 100% de oxigenação, (Gray & Pearson, 1987), acelerando intensamente a peroxidação de lipídios.

Em carne mecanicamente desossada, a cor constitui-se num dos índices mais óbvios de vida de prateleira. De um ponto de vista teórico, correlação entre cor e qualidade da carne desossada mecanicamente é de valor limitado, mas do ponto de vista prático, a utilização dessa matéria-prima pode favorecer o desenvolvimento de cor indesejável em produtos que a contém em sua formulação.

Segundo Froning & Johnson (1973), carne mecanicamente desossada de frango apresenta o triplo da concentração de pigmentos heme em relação à mesma matéria-prima desossada manualmente; o teor de mioglobina, entretanto, permaneceu invariável, indicando que hemoglobina proveniente de medula óssea é, portanto, o principal pigmento. Remoção de alguns componentes heme e de lipídios através de centrifugação, melhora a estabilidade da CFMD durante estocagem (Dhillon & Maurer, 1975b).

Estratégias comerciais para prevenção de oxidação lipídica incluem uso de antioxidantes fenólicos, agentes quelantes de metais e condições físicas tais como vácuo ou embalagens com atmosferas modificadas. Entretanto, nenhuma solução eficaz foi ainda sugerida. Pikul & Kummerow (1990) reportaram que o teor absoluto de produtos de oxidação lipídica em músculos de frango e pele, após processamento, foram afetados pelo nível inicial de produtos de

oxidação lipídica nas matéria-primas cruas. Assim, métodos efetivos de armazenamento e manipulação adequada da matéria devem ser buscados para minimizar problemas de oxidação lipídica.

Além da presença e estado químico dos metais e disponibilidade de oxigênio, a natureza, proporção e grau de insaturação de ácidos graxos presentes em tecido muscular é um excelente indicador da susceptibilidade desse produto à deterioração oxidativa. De um modo geral, quanto maior a proporção e grau de insaturação dos ácidos graxos, maior suscetibilidade à oxidação, razão pela qual fosfolipídios tem sido a fração comumente associada ao processo de oxidação lipídica em produtos cárneos (Melton, 1983; Allen & Foegeding, 1981; Moerck & Ball, 1974; Keller & Kinsella, 1973). Entretanto, a contribuição da fração lipídica neutra à rancidez também tem sido demonstrada (Golkap *et al.*, 1983). Ácidos graxos insaturados liberados como resultado da hidrólise de fosfolipídios podem, por sua vez, converterem-se em sub-produtos caracterizados como a principal fonte de off-flavor em produtos cárneos (Mollins, 1991). Entretanto, se ácidos graxos isoladamente contribuem à oxidação lipídica, é assunto de intensos estudos (Love, 1983).

Carne de frango apresenta níveis relativamente altos de ácidos graxos insaturados e baixas concentrações de antioxidantes naturais (tocoferóis), tornando-a relativamente instável. Carne de frango mecanicamente desossada, além dessa característica contém altos níveis dos lipídios originários da medula óssea, e todos os outros componentes pró-oxidantes (heme, P, Ca, Cu, Fe). Quanto menor o tamanho das partículas obtidas na desossa, maior ruptura celular ocorre e, maior tendência à baixa estabilidade durante armazenamento (Dawson & Gartner, 1983) é verificada.

## **2. Propriedades Funcionais de CFMD e Interação com Lipídios Oxidados.**

Proteínas miofibrilares, miosina no músculo *pré-rigor* e actomiosina no *post-rigor*, são responsáveis pelas propriedades funcionais incluindo emulsificação, solubilidade, gelatinização, viscosidade, capacidade de retenção de água e gordura. O estudo das propriedades funcionais de proteínas da carne é requerido na utilização de fontes cárneas mais baratas e não convencionais,



com o objetivo de controlar o processamento, custos de energia e reduzir perdas (Smith, 1988).

CFMD é empregada principalmente em produtos emulsionados e cominuídos em função de sua consistência pastosa. Portanto, propriedades funcionais não comumente estudadas na literatura em relação a essa matéria-prima são a emulsificação, gelatinização, retenção de água, gordura e solubilidade (Maurer *et al.*, 1969), as quais são também as mais importantes na estabilidade de "batters".

Cominuição é definida como o processo de redução de matéria-primas a um estado particulado fino, o qual rompe fisicamente o tecido muscular, membranas e o sarcolema com objetivo de liberar miofibrilas e miofilamentos, com consequente extração das proteínas miofibrilares, quando realizada à elevada força iônica (0,6 M ou superior) (Smith, 1988). Ocorre entumescimento das fibras musculares, despolimerização com solubilização da miosina e/ou actomiosina e, uma vez que os sítios de ligação das proteínas miofibrilares são expostos à solução salina ao invés de estarem restritas apenas às interações proteínas-proteínas, a capacidade de ligação de água é aumentada, bem como a viscosidade do sistema. Nesse processo de cominuição, gordura é reduzida a glóbulos e tecido conectivo converte-se em partículas ou fragmentos (Whiting, 1988).

O aumento da viscosidade da matriz protéica contínua, causada pelo entumescimento da fibra muscular na presença de soluções salinas, estabiliza a gordura da fase dispersa. Isto ocorre devido ao lento desenvolvimento da adsorção da camada de proteínas miofibrilares, restringindo a coalescência dos glóbulos de gordura (Asghar *et al.*, 1985).

A importância da emulsificação na estabilização da gordura em produtos cominuídos e emulsionados tem sido extensivamente relatada na literatura (Acton *et al.*, 1981). A capacidade das proteínas estabilizarem emulsões está relacionada com a área interfacial que pode ser recoberta por estas. Membranas protéicas depositam-se em torno dos glóbulos de gordura estabilizando "batters" através da teoria clássica de emulsão (Jones & Mandigo, 1982).

Miosina parece ser a proteína mais importante envolvida no encapsulamento dos glóbulos de gordura e, entre as propriedades físico-químicas que a tornam um bom agente emulsificante inclui-se a existência de uma região

hidrofóbica que se orienta em direção à matriz protéica da fase contínua e sua flexibilidade molecular que permite uma migração à interface, reduzindo tensões superficiais (Smith, 1988). Estabilidade da emulsão é devida à repulsão eletrostática entre as moléculas de miosina negativamente carregadas. Nakai *et al.* (1986) encontraram uma boa correlação entre as propriedades de emulsificação de proteínas miofibrilares e hidrofobicidade superficial, conteúdo de grupos sulfidrila e solubilidade.

A restrição física dos glóbulos de gordura, evitando sua coalescência na emulsão, varia com a fonte de matéria-prima, tipo de gordura, tempo e temperatura de cominuição e equipamento de processamento (Dockerty *et al.*, 1986). Entretanto, a instabilidade de "batters" resulta, de um modo geral, quando há insuficiente concentração de proteína para recobrir completamente a área superficial dos glóbulos de gordura formados no processo de cominuição (Asghar *et al.*, 1985). Segundo outros pesquisadores, "batters" são também desestabilizados quando ocorre desnaturação de miosina com rompimento da matriz protéica devido a uma membrana muito frágil em torno dos glóbulos de gordura (Lee, 1985).

Após a etapa de cominuição ocorre aquecimento e as propriedades funcionais em evidência são a gelatinização e a capacidade de retenção de água (Whiting, 1988). Com o calor, a gordura funde-se e ocorre expansão térmica dos glóbulos e células de gordura, e as interações proteína-proteína contribuem na formação de um gel com rede estruturada tridimensional. Na interface da fase aquosa, a proteína adsorvida desnatura-se englobando as partículas de gordura. Tais eventos são responsáveis pelas características microestruturais e reológicas do gel formado, influenciando textura, aparência e rendimento de cozimento (Hermansson, 1982).

A capacidade de retenção de água das proteínas miofibrilares é influenciada pelo estado de ionização e densidade de carga da proteína, os quais são modificados pela adição de sal e pH. Quanto mais próximo do ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares, menor é a capacidade de ligação de água (Acton *et al.*, 1983).

Durante a extração das proteínas através do efeito "salting-in" do cloreto de sódio e desintegração do tecido muscular, ocorre um aumento na capacidade de ligação de água das proteínas miofibrilares. Adição de NaCl produz

uma mudança no ponto isoelétrico das proteínas para valores mais baixos criando uma maior carga líquida negativa em relação ao pH existente dos grupos carboxilas ionizáveis da proteína. Repulsão entre esses grupos negativamente carregados leva à abertura das moléculas de proteína e a um aumento na hidratação (Hamm *et al.*, 1960). Íons cloretos hidratados são fortemente atraídos pelos grupos positivamente carregados da proteína rompendo assim as pontes inter e intra protéicas, resultando num aumento adicional da carga negativa e por sua vez numa maior atração e ligação com a água (Lumry, 1973).

A capacidade de ligação e/ou retenção de água são diretamente influenciadas pelo grau de extração de proteínas, tratamento mecânico, ambiente iônico e pH. Entre as proteínas miofibrilares, miosina, actina e o complexo actomiosina são as mais importantes. Colágeno, entretanto, pode significativamente contribuir para a capacidade de retenção de água de carnes cozidas.

Gelatinização é definida por Asghar (1985) como a associação ou ligação cruzada de cadeias de polímeros dispersos randomicamente em solução para formar uma rede contínua tridimensional, a qual imobiliza líquidos nas estruturas intersticiais e resistem ao fluxo e pressão. Géis protéicos são formados por interações intermoleculares resultando em rede tridimensional de fibras de proteína. O mecanismo de formação de gel pode diferir entre proteínas devido principalmente ao tipo de interação molecular que é responsável pela estabilização do gel. Estas interações podem consistir de múltiplas ligações peptídicas, dissulfídicas ou ligações hidrofóbicas e eletrostáticas. A flexibilidade das moléculas dos polímeros protéicos e extensão das ligações cruzadas determinam a elasticidade da estrutura do gel (Catsimpoolas & Meyer, 1970).

Em "batters" de produtos cárneos, o cozimento causa abertura das proteínas, exposição à interface e formação de uma rede tridimensional bem ordenada e estabilizada por ligações hidrogênio e hidrofóbicas (Whiting, 1988). Gordura e água ficam fisicamente restritas dentro dessa matriz protéica.

De acordo com Schmidt & Trout (1986), a formação da rede protéica envolve primeiramente a agregação de regiões da cabeça da miosina a 30-50°C, seguida pela formação de gel em ligações cruzadas com as regiões da cauda à temperaturas superiores a 50°C.

Samejima *et al.* (1984) apontaram a necessidade de cadeias intactas de miosina para obter máxima força de gel, uma vez que cadeias leves se dissociam e são solubilizadas durante aquecimento. Sub-fragmentos de miosina produzem géis mais fracos que cadeias pesadas em sistemas modelos (Ishioroshi *et al.*, 1981; Samejima *et al.*, 1981). Estudos com actina tem revelado que isoladamente esta proteína não exhibe qualquer propriedade de gelatinização (Fukazawa *et al.*, 1961). Entretanto, na presença de miosina, actina exerce um efeito sinérgico complementando consideravelmente as propriedades de ligação e gelatinização da miosina (Asghar *et al.*, 1985). Acredita-se que esse fato seja devido a formação do complexo actomiosina no sistema (Yates *et al.*, 1983).

Em relação à CFMD, a grande desvantagem é a completa ruptura da fibra muscular resultando em redução das propriedades de ligação e retenção de água, emulsificação e gelatinização. Exames histológicos tem indicado que CFMD apresenta uma menor matriz protéica disponível para formação de emulsões em comparação com as partes manualmente desossadas. Isto ocorre provavelmente em função de desnaturação das proteínas miofibrilares durante o ciclo de desossa mecânica (Froning, 1976).

A incorporação de medula óssea, de acordo com Whiting (1988) eleva drasticamente os níveis de gordura, pigmentos heme, Fe, Cu e Mg, afetando negativamente a funcionalidade das proteínas.

O conteúdo de pele também tem influência negativa, especialmente sobre as propriedades de emulsificação da CFMD. De acordo com Froning *et al.* (1978), quanto maior o teor de colágeno na matéria-prima, menor será a capacidade e a estabilidade da emulsão.

Propriedades funcionais da CFMD são influenciadas também pela composição e fonte da matéria-prima. Entre as principais partes desossadas mecanicamente, dorso e pescoço apresentam maiores valores de capacidade e estabilidade de emulsão em relação a poedeiras de descarte ou outras aves inteiras (Froning, 1976). Outro fator de diferença, que foge ao controle do processador quando este não é o produtor das aves, diz respeito à natureza da matéria-prima que vai gerar as partes a serem desossadas mecanicamente. Orr & Wogar (1979) demonstraram que matéria-primas provenientes de diferentes plantas de processamento variam em idade, sexo, espécie e alimentação. Tipo de corte e

proporção de pele, além de acabamento da carcaça também influenciam a composição química e propriedades funcionais da CFMD.

Vários tratamentos tem sido propostos para melhorar a funcionalidade das proteínas de CFMD. Modificação enzimática por hidrólise parcial com proteases (Eisele & Brekke, 1981); texturização com objetivos de melhorar aparência visual, firmeza, resistência e estabilidade ao armazenamento (Lampilla *et al.*) e extração de lipídios e pigmentos heme através de lavagens e centrifugação estão entre alguns métodos citados para expandir a utilização dessa matéria-prima no processamento de produtos cárneos (Dawson *et al.*, 1988).

Alterações nas propriedades funcionais de CFMD e em partes desossadas manualmente tem sido evidenciadas durante armazenamento congelado (Dhillon & Maurer, 1975a; Orr & Wogar, 1979; Hoke *et al.*, 1968; Johnson *et al.*, 1974) e parecem estar relacionadas com insolubilização das proteínas miofibrilares (Khan *et al.*, 1963; Yamamoto *et al.*, 1977).

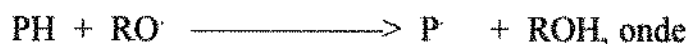
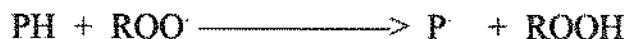
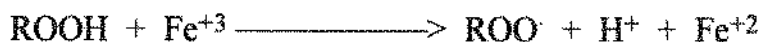
A desnaturação protéica ocorrida durante estocagem congelada da carne pode ser causada pela cristalização de gelo, danificando células e membranas; desidratação de moléculas protéicas; aumento na concentração de soluto na fase não congelada; atividade enzimática e reação de proteínas com produtos de oxidação lipídica (Smith, 1987).

Recentemente, reações de proteínas com lipídios peroxidados tem sido extensivamente estudadas em sistemas modelos (Buttukus, 1967; Jarenback & Liljemark, 1975; Nakhost & Karel, 1984). De acordo com vários autores (Kanner & Karel, 1976; Furns *et al.*, 1982) lipídios peroxidados podem causar polimerização e insolubilização de proteína, cisão da cadeia polipeptídica, destruição de aminoácidos e formação de produtos de adição com proteínas. Essas interações influenciam as propriedades funcionais da carne e quanto maior a instabilidade do material, à oxidação lipídica, como é o caso da CFMD, maiores serão os efeitos sobre a funcionalidade.

Quando proteínas são expostas a lipídios peroxidados, uma considerável proporção de lipídios complexa-se com proteínas através de associação hidrofóbica e/ou ligações hidrogênio, conforme estabelecido por Narayan & Kummerow (1963).

Além de complexos não covalentes, quando os lipídios oxidados interagem com proteínas pode ocorrer a formação de radicais protéicos, resultando

em vários prejuízos para o sistema. Esse processo é extensivamente acelerado por íons de metais de transição ou metaloproteínas com destaque para o íon ferro. Gardner (1979) ilustrou as reações de formação de radicais de proteínas:



PH = proteína

P<sup>·</sup> = radicais de proteínas (produtos de cisão, oxidação).

Essas reações tem sido demonstradas por vários autores (Karel *et al.*, 1975; Schaich & Karel, 1976).

Em sistemas com alta atividade de água ou solução aquosa, proteínas formam ligações cruzadas entre si na presença de lipídios peroxidados com simultânea perda de solubilidade (Gardner, 1979). Tais lipídios peroxidados podem também ligar-se covalentemente à proteína (Nielsen, 1978) tornando vários grupamentos amino ou sulfidrilas indisponíveis. Cisão de proteínas também podem ocorrer com prejuízo aos aminoácidos, sendo os mais susceptíveis a reação: histidina, cisteína/cistina, metionina, lisina e tirosina (O'Brien, 1966).

O mecanismo de reação covalente pode se dar através de radicais livres dos lipídios, os quais ligam-se às proteínas para formar um novo radical livre de proteína-lipídio ou radical livre de proteína. Schaich & Karel (1976) postularam que transferência de radicais ocorre através de complexos entre os hidroperóxidos (ROOH) e sítios de nitrogênio e enxofre de resíduos reativos através do esquema abaixo:





Os radicais formados podem polimerizar-se diretamente ou realizarem ligações cruzadas através de radicais livres de lipídios.

Em relação à reação de proteínas com produtos secundários de oxidação lipídica, interação entre malonaldeído e miosina está entre as mais estudadas. Malonaldeído origina-se de endoperóxidos formados via autooxidação de ácidos graxos polinsaturados e sua detecção é a base do método mais comumente utilizado para monitorar desenvolvimento de rancidez em produtos cárneos através do teste do ácido 2-tiobarbitúrico (Tarladgis *et al.*, 1960).

Vários estudos com sistemas modelo tem demonstrado a reação entre malonaldeído e grupos aminos livres de proteínas. Buttukus (1967) reportou que miosina purificada reagiu com malonaldeído a pH 6,8 e força iônica de 0,5. A  $-20^{\circ}\text{C}$  a taxa de reação foi muito mais rápida que a  $0^{\circ}\text{C}$  e quase tão intensa como a  $20^{\circ}\text{C}$ . Análise de aminoácidos demonstrou que lisina, tirosina e arginina reagem preferencialmente. Histidina não reagiu. Destes, 40% reagiram dentro de 8 horas e como resultado, miosina adquiriu consistência viscosa tipo gel e perdeu sua solubilidade em solução salina.

Cheftel *et al.* (1986) discutiram as possíveis reações entre malonaldeído e amino grupos livres de proteínas as quais levaram à formação de ligações covalentes irreversíveis resultando em intensa perda de solubilidade.

Uma vez que a oxidação lipídica constitui-se num dos fatores limitantes da qualidade de CFMD, muitos estudos tem sido conduzidos com o objetivo de evitar ou minimizar os efeitos negativos da oxidação sobre cor, flavor e funcionalidade de suas proteínas miofibrilares. Vários componentes utilizados em formulações de produtos processados de carne possuem reconhecida ação antioxidante, mas pouco se sabe sobre seus efeitos durante armazenamento congelado e sobre as propriedades funcionais. Entre esses ingredientes, polifosfatos, ascorbatos e nitrito serão estudados nesse trabalho e descritos a seguir.

### **3. Ação de Polifosfatos, Ascorbato e Nitrito em Produtos Cárneos:**

#### **3.1. Polifosfatos:**

Fosfatos têm sido usados na indústria de carnes principalmente para melhorar a capacidade de retenção de água e outras características de textura (Ellinger, 1972; Sofos, 1986). Além disso, apresentam efeitos benéficos em relação à inibição de mudanças oxidativas e de alterações de flavor (Tim & Watts, 1958; Ang & Hamm, 1986; Rao *et al.*, 1975).

Constituem-se em sais de sódio ou potássio de diferentes ácidos fosfóricos compostos de uma ou mais unidade de fosfato. Ortofosfatos tem uma unidade de fosfato e tem 1,2 ou 3 dos íons hidrogênio do ácido substituídos por íons de sódio ou potássio. Fosfatos condensados ou polimerizados possuem mais de uma unidade de ortofosfato com diferentes comprimentos de cadeia: pirofosfato (2), tripolifosfato (3), tetrapolifosfato (4-10) e hexametafosfato (10-15) (Trout & Schmidt, 1987) e aqueles com comprimento de cadeias maior que 100, denominados metafosfato de sódio, raramente usados na indústria por serem insolúveis. Fosfato trissódico ou tripotássico são os únicos não permitidos.

Existem várias teorias sobre o modo de ação dos fosfatos (Molins, 1991). Hamm (1970) sugere que a influência dos polifosfatos na textura da carne é devida em parte, à (1) sua capacidade de aumentar o pH e força iônica ( $\mu$ ); (2) quelar cátions de metais divalentes resultando num efeito não específico da força iônica, determinada pela concentração e cargas elétricas dos íons e (3) interagir com proteínas da carne.

A influência que o pH e diferentes íons exercem na capacidade de retenção de água da carne pode ser explicada por mudanças nas cargas elétricas das proteínas musculares. O pH normal do músculo *pós-rigor* (pH ~ 5,5) é muito próximo do ponto isoelétrico (pI) da actomiosina (pH ~ 5,0). Nesse valor de pI, a carga líquida de uma proteína é mínima, predominando máxima interação entre as moléculas e assim, a repulsão eletrostática entre grupos de cargas similares é mínima. Nessa região, a proteína mostra uma capacidade de retenção de água muito baixa (Ellinger, 1972). Pela adição de ácido ou base, ocorre uma clivagem nas pontes salinas entre as proteínas e a repulsão eletrostática é aumentada, levando a um aumento na capacidade de retenção de água e entumescimento já que a rede protéica é aberta, podendo reter mais água.

Fosfatos apresentam a capacidade de elevar o pH da carne, afastando as proteínas miofibrilares de seu ponto isoelétrico e através de modificação no ambiente iônico, alteram as interações proteína-proteína facilitando a retenção de mais água no sistema (Mollins, 1991).



Entretanto, pH e força iônica não explicam todas as mudanças na funcionalidade como, por exemplo, porque fosfatos são muito mais efetivos que outros sais de força iônica e pH similares ou ainda, porque eles são mais eficientes somente quando a concentração de cloreto de sódio é superior a 0,8% (Mollins, 1991).

Em função das limitadas justificativas de pH e força iônica para explicar a ação de fosfatos, tem sido proposto que o mecanismo de melhora nas propriedades funcionais envolve mudança na conformação das proteínas miofibrilares (Trout & Schmidt, 1987). Como resultado da mudança na conformação, as proteínas não se agregam excessivamente quando aquecidas, podendo formar uma matriz coesiva tridimensional mais bem ordenada capaz de envolver a água livre em seus espaços e permitindo sua retenção.

Sob esses aspectos, muitos dos efeitos dos fosfatos somente podem ser explicados satisfatoriamente em termos de interações entre proteínas e o conteúdo de grupos hidrofóbicos. Sherman (1961) atribuiu o aumento da capacidade de retenção de água em carne fresca com adição de fosfato, não ao pH, mas a uma maior solubilização de actomiosina induzida por este constituinte. Outros pesquisadores tem postulado que com aumento da solubilidade protéica, fosfatos reduzem a viscosidade de soluções, o que resulta em efeito benéfico na estabilidade de "batters", já que baixas viscosidades reduzem a geração de calor durante moagem. Isto por sua vez, auxilia na manutenção de baixas temperaturas durante a etapa crítica de formação de "batters" (Harget *et al.*, 1980; Knipe *et al.*, 1985).

Além da solubilização de proteínas, estudos indicam que fosfatos dissociam actomiosina insolúvel em actina e miosina, proporcionando maior concentração de proteína disponível para estabilizar "batters" (Trout *et al.*, 1984).

Os fosfatos não aumentam a funcionalidade das proteínas da carne na mesma extensão. Em geral a ordem de eficiência é a seguinte: pirofosfato > tripolifosfato > tetrapolifosfato > hexametafosfato ~ ortofosfato, sendo que o fosfato menos efetivo aumenta mais a funcionalidade das proteínas que cloreto de sódio e outros sais simples (Trout & Schmidt, 1987).

Soluções de fosfato são hidrolisadas quando aquecidas e piro e polifosfatos adicionados à carne fresca também sofrem hidrólise catalisada por enzimas (Mollins *et al.*, 1987). A taxa desse rompimento depende da concentração

e do tipo de fosfato, temperatura e presença de outras substâncias que podem acelerar o processo já que o músculo contém uma série de fosfatases ácidas e alcalinas. Atividade de tripolifosfatase em carne é maior que a atividade de pirofosfatase. Tripolifosfato é hidrolisado a igual número de moles de ortofosfato e pirofosfato e pirofosfato é hidrolisado a ortofosfato (Knipe *et al.*, 1990). Para alguns autores, o aumento do pH que a carne apresenta na presença de fosfato é consequência da ação tamponante desses ortofosfatos formados. Misturas de fosfatos alcalinos comerciais elevam o pH de peitos de frango cortados a quente de valor inicial de 5,81 a 6,15 quando injetados em solução aquosa de 0,5% a 4% (p/p) ou quando adicionados à carne de frango enlatada (Peterson, 1977; Rao *et al.*, 1978). Hidrólise de polifosfatos ocorre também sob congelamento. Tenhet *et al.* (1981) determinaram a estabilidade de tripolifosfato de sódio marcado com P<sup>32</sup> em soluções aquosas 0,5 e 1% em camarões limpos. Após 2 semanas a -26°C, somente 12% da atividade de fósforo total no músculo correspondeu ao polifosfato original. Após 10 semanas, o nível residual de tripolifosfato continuou estável em 12% da atividade de fósforo total no músculo, 2% de pirofosfato e 45% de ortofosfato.

Ação antioxidante ou retardamento no desenvolvimento de rancidez oxidativa tem sido atribuída a fosfatos por muitos autores. Tim & Watts (1958) demonstraram que tripolifosfato de sódio, pirofosfato e polifosfato, mas não ortofosfatos apresentaram propriedades antioxidantes que foram sinérgicas com ácido ascórbico, atribuindo tais efeitos à quelação de íons de metal. Shahidi *et al.* (1986) obtiveram os mesmos resultados e a capacidade dos fosfatos prevenirem oxidação lipídica em carne cozida decresceu quando o comprimento da cadeia fosfatada aumentou. Rao *et al.* (1978) encontraram compostos carbonilas menos insaturados em carne de frango enlatada tratadas com mistura de fosfatos e, ao contrário da maioria dos pesquisadores, esses autores postularam que a redução na oxidação lipídica proporcionada pelos fosfatos não foi resultado da quelação de íons de metais, mas da inibição de hidrólise de ácidos dicarboxílicos durante esterilização.

Efeitos antioxidantes de fosfatos têm sido demonstrados em salsichas (Matlock *et al.*, 1984); carne de frango mecanicamente desossada (McMahon & Dawson, 1976; Kondaiah & Panda, 1989); partes de frango manualmente desossada (Farr & May, 1970; Rao *et al.*, 1978; Ang & Hamm,

1986); produtos de carne bovina (Nakost & Karel, 1985; Molins *et al.*, 1987), produtos processados de frango e peru (King & Earl, 1988; Landes, 1972).

### 3.2. Nitrito de sódio:

Nitrito de sódio desempenha função essencial no processo de desenvolvimento de cor em produtos curados e atua como agente antimicrobiano potente, impedindo a formação de toxina pelo *Clostridium botulinum*, em concentrações acima de 50 ppm (Tellefson & Bowers, 1981). Além disso, tem sido reconhecido há muito tempo que adição de nitrito de sódio retarda ou mesmo previne rancidez oxidativa (Igene *et al.*, 1979).

Watts (1954) reportou que nitrito retardou oxidação lipídica e esteve associado a mudanças de cor durante estocagem da carne. Tarladgis (1961) propôs que pigmentos heme do músculo são catalisadores ativos do processo de oxidação lipídica quando presentes na forma oxidada ( $Fe^{+3}$ ). Nitrito, pela formação de pigmentos de carne curada, retém o heme na forma reduzida ( $Fe^{+2}$ ), a qual é inativa para desenvolver oxidação lipídica. Muitos pesquisadores têm confirmado a eficiência do nitrito na eliminação de oxidação lipídica em presunto fresco sob refrigeração, demonstrando a diferença entre os perfis de voláteis através da análise de gases do espaço livre em controle e em amostras com adição de nitrito (Cross & Ziegler, 1965). Price & Greene (1978) concluíram que um "flavor" desejável e de grande aceitação por panelistas pareceu estar associado a um intenso flavor de carne curada e um menor desenvolvimento de rancidez.

MacDonald *et al.* (1980) investigaram três níveis de nitrito (50, 200 e 500 mg/kg) em presunto fresco curado durante estocagem refrigerada. Os dados indicaram que as três concentrações de nitrito significativamente reduziram oxidação lipídica medida através do número de TBARS e 50 mg foi tão efetivo quanto 500 mg/kg.

Muitos estudos têm sido conduzidos para elucidar o mecanismo pelo qual nitrito atua como agente antioxidante, mas ainda não se chegou a um consenso (Fox & Benedict, 1987). Gray & Pearson (1987) propuseram que nitrito estabiliza pigmentos heme de forma que não há liberação de  $Fe^{+2}$  nem oxidação à forma férrica, prevenindo o aparecimento de "warmed-over-flavor". Sato & Hegarty (1971) e Goutefongea *et al.* (1977) sugerem que nitrito reage com lipídios nas membranas estabilizando-as quanto à liberação de fosfolipídios. Igene &

Pearson (1979) demonstraram que nitrito significativamente reduziu TBARS trabalhando em sistemas modelos com fosfolipídios insaturados e purificados. Os autores sugeriram que nitrito atua convertendo pigmentos da carne a formas cataliticamente inativas e estabilizando ácidos graxos polinsaturados.

Outros possíveis mecanismos de ação de nitrito descrito por Gray & Pearson (1987) incluem: (1) formação de forte complexo com pigmentos heme, prevenindo a liberação de  $Fe^{+2}$  e a consequente catálise da etapa de propagação da oxidação lipídica; (2) pela estabilização dos lipídios insaturados dentro das membranas e (3) tornando ferro reduzido ( $Fe^{+2}$ ) indisponível para as etapas de peroxidação lipídica. Segundo os autores, há evidências de que os três mecanismos atuam simultaneamente, embora o primeiro pareça ser o mais importante.

Quando nitrito é adicionado à carne, é rapidamente reduzido por redutores endógenos ou exógenos para formar óxido nítrico, o qual complexa-se com pigmentos heme e esse óxido nítrico é excelente capturador de radicais, finalizando as reações de propagação antes que elas se processem de forma indiscriminada.

Kanner (1979) demonstrou que S-nitrosocisteína (RSNO), um composto gerado durante a etapa de cura da carne, apresentou atividade antioxidante comparável a BHT e alfa-tocoferol em sistemas modelos de linoleato na presença de mioglobina. RSNO atuou não somente como um inibidor da oxidação de ácido linoleico, mas também decompôs hidroperóxidos, além de ter sido efetivo em carne de peru moída.

Um recente mecanismo de ação de nitrito ainda não completamente esclarecido foi proposto por Zubillaga *et al.* (1984). Segundo os autores, adição de nitrito de sódio levou à formação de um fator antioxidante em carne bovina e suína frescas. Embora tal fator não tenha sido elucidado, foi associado com lipídios polares e não envolveu formação e adição de óxido nítrico às duplas ligações dos ácidos graxos polinsaturados e nem esteve relacionado à redução da atividade pro-oxidante de compostos de ferro pelo nitrito. A atividade antioxidante da fração de lipídios polares foi estável sob vários meses quando estocada em hexana a  $-20^{\circ}C$ .

### **3.3. Ascorbatos:**

Ascorbatos (e eritorbatos) são agentes redutores usados na formulação de produtos cárneos com objetivo de reduzir tempo de cura para

desenvolvimento de cor através de conversão mais rápida de nitrito a óxido nítrico (Tellefson & Bowers, 1981). Possuem também ação antioxidante em determinadas concentrações e reduzem descoloração de carne e produtos processados durante estocagem (Gray & Pearson, 1987).

Segundo vários autores, baixos níveis de ascorbato (até 100 mg/kg) catalisam o desenvolvimento de rancidez oxidativa demonstrado através de elevação no número de TBA de diferentes produtos, enquanto que altos níveis (acima de 100 mg/kg) retardam autooxidação em carnes (Tims & Watts, 1958; Sato & Hegarty, 1971). Sato & Hegarty (1971) postularam que altos níveis de ascorbato inibem peroxidação de lipídios possivelmente pela manutenção de equilíbrio entre os íons ferroso e férrico ou atuando como capturador de oxigênio.

Gomez-Basauri & Regenstein (1992) demonstraram que ascorbato de sódio foi mais efetivo na prevenção da liberação de ferro hemínico quando comparado a embalagem a vácuo, tanto em amostras frescas como aquecidas, em estudo conduzido com peixes marinhos.

Cor é um dos parâmetros mais importantes que determinam a qualidade de carne fresca e produtos processados. A oxidação de mioglobina reduzida a metamioglobina é indesejável uma vez que produz a cor marrom escuro a qual reduz a aceitabilidade do produto (Pearson & Tauber, 1984).

De acordo com Stewart (1965), enzimas presentes na carne podem reduzir metamioglobina a mioglobina sob condições anaeróbias, uma capacidade conhecida como atividade redutora de metamioglobina (ARM). Assim, um dos métodos mais comumente citados na literatura para prevenir a formação desse pigmento indesejável é o acondicionamento em embalagens impermeáveis ao O<sub>2</sub>. Entretanto, a grande desvantagem dessa medida e a razão pela qual ela não é adotada é que a cor da mioglobina reduzida é vermelho púrpura, também não típica de carne fresca, levando o consumidor a associar equivocadamente o produto com qualidade inferior.

Segundo Greene (1969), embalagem anaeróbica é desnecessária quando um antioxidante é adicionado à carne. De acordo com o autor, butilhidroxianisol e propil galato inibiram oxidação lipídica e retardaram a formação de metamioglobina, deixando o pigmento permanecer na forma oxigenada (oximioglobina).

Watts *et al.* (1966) demonstraram que redução de metamioglobina e oxigênio é mediada por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Dessa forma, adição de substratos que proporcionem elétrons ao NAD e metamioglobina são capazes de manter a carne no estado reduzido e efetivamente retardam oxidação. Saleh & Watts (1968) estudaram vários substratos e intermediários na redução enzimática de metamioglobina em carne bovina moída, demonstrando como ARM foi importante na prevenção de oxidação. Com base nesses estudos, têm sido sugerido que adição de altos níveis de ascorbatos criam condições redutoras preservando ARM.

Newbold & Scopes (1971) observaram que processos de moagem e ruptura de membranas como os que ocorrem em CFMD aceleram a perda de NAD e, portanto, ascorbatos poderiam atuar como uma maneira de proteger enzimas redutoras e pigmentos heme, quando imediatamente adicionados após o ciclo de desossa.

Apesar da extensa literatura sobre o uso de fosfatos, nitrito e ascorbato em produtos processados, dados são escassos em relação a ação desses componentes sobre a funcionalidade das proteínas de CFMD e interação com o processo de oxidação lipídica durante a estocagem congelada dessa matéria-prima, itens que serão abordados nesse trabalho.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1. Matéria-Prima

Dorso de frango sem os ossos, correspondentes à parte do peito foram obtidos de processador local (Cooperativa Agropecuária HOLAMBRA) logo após abate e mantidos congelados (-18°C) por um período não superior a 48 horas. Parte do material foi tratado para remoção de pele superficial, gordura cavitária e cloaca à temperatura de -5°C. No primeiro caso, a matéria-prima foi caracterizada como dorso com pele e no segundo dorso sem pele, sendo a seguir submetidas à desossa mecânica em equipamento POSS-PDE-1000 em sala climatizada na usina piloto do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos do ITAL.

A temperatura ao final do ciclo de desossa não foi superior 0°C para ambas matérias-primas.

### 1.1. Preparação das misturas

Dorso, com e sem pele, imediatamente após terem sido desossados mecanicamente, foram fracionados em porções de 30Kg e receberam adição dos seguintes compostos nas concentrações abaixo:

		Em 30 Kg
a) tripolifosfato de sódio comercial:	0,3%	90g
b) nitrito de sódio:	0,02% (200 ppm)	6g
c) ascorbato de sódio:	0,05% (500 ppm)	15g
d) mistura (a+b+c)		90+6+15

Os lotes foram homogeneizados em misturador de pás horizontal de aço inox, por 3 minutos. A preparação das misturas com pele e sem pele foi feita em

duplicata. O controle de temperatura foi realizado durante todas as etapas de preparação. Ao final da homogeneização, a matéria-prima atingiu, no máximo uma temperatura entre 1-2°C.

A seguir, uma parte de cada lote foi sub-fracionado em porções de 200g e 2kg sendo imediatamente congelados a -18°C ao longo do experimento.

As diferentes misturas foram assim designadas:

A- CFMD (carne de frango mecanicamente desossada) C/P (com pele):

F<sub>1</sub> = CFMD pura - Controle

F<sub>2</sub> = CFMD + tripolifosfato de sódio comercial

F<sub>3</sub> = CFMD + nitrito de sódio

F<sub>4</sub> = CFMD + ascorbato de sódio

F<sub>5</sub> = CFMD + (tripolifosfato + nitrito + ascorbato) de sódio

B- CFMD (carne de frango mecanicamente desossada) S/P (sem pele):

F<sub>1</sub> = CFMD pura - Controle

F<sub>2</sub> = CFMD + tripolifosfato de sódio comercial

F<sub>3</sub> = CFMD + nitrito de sódio

F<sub>4</sub> = CFMD + ascorbato de sódio

F<sub>5</sub> = CFMD + (tripolifosfato + nitrito + ascorbato) de sódio

## **2. Descrição do Experimento:**

Com objetivo de analisar os efeitos da adição de nitrito, tripolifosfato e ascorbato de sódio sobre a estabilidade à oxidação lipídica e propriedades funcionais da CFMD e suas co-relações, o trabalho foi dividido em 5 estudos:



#### **A - Avaliação da oxidação lipídica e degradação dos pigmentos heme durante armazenamento sob congelamento.**

A estabilidade à oxidação lipídica foi avaliada através da determinação do nº de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) a cada 15 dias, durante 6 meses de estocagem congelada. As determinações foram realizadas em triplicatas.

Pigmentos heme mioglobina e hemoglobina foram determinados nas misturas nos tempos 0, considerado 48-72 horas após preparo, 3 e 6 meses. As amostras foram tomadas na superfície congelada e no interior, sendo realizadas em triplicatas. Avaliação de cor foi realizada através da determinação dos valores L\* (luminosidade), a\* (intensidade de vermelho) e b\* (intensidade de amarelo) durante estocagem nos tempos 0, 3 e 6 meses nas superfícies externas e internas.

#### **B - Avaliação das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares extraídas das diferentes misturas de CFMD e do grau de desnaturação protéica.**

Proteínas miofibrilares foram extraídas de cada mistura e avaliadas com relação às seguintes propriedades funcionais:

- % de solubilidade protéica;
- Formação e estabilidade de gel;
- Índice de atividade de emulsão.

O índice de desnaturação protéica foi avaliado através da determinação da atividade de ATPase e perfil eletroforético das proteínas extraídas.

A avaliação das propriedades funcionais e atividade de ATP-ase foram realizadas a cada 30 dias e em triplicata, enquanto que eletroforese em gel de poliacrilamida foi conduzida nas misturas de CFMD logo após preparação (dentro de 1 semana) e ao final do período de armazenamento congelado (6 meses).

**C - Influência do conteúdo e liberação de ferro hemínico e não-hemínico nas diferentes misturas de CFMD no processo de oxidação lipídica durante congelamento e sob aquecimento.**

Esse estudo consistiu nas seguintes etapas:

- a) Comparação entre os métodos de quantificação de ferro total por espectroscopia de absorção atômica e por espectrofotometria no visível (510 nm) com 1,10-o-fenantrolina, com determinação da % de recuperação em ambos os métodos.

Essa etapa inicial teve por objetivo adaptar o método de 1,10-o-fenantrolina, em substituição ao de absorção atômica, nas condições operacionais de realização do trabalho de tese. O experimento foi conduzido em duplicata e cada determinação em triplicata.

- b) Determinação do teor de ferro hemínico, não-hemínico e ferro total ao longo do período de congelamento nos tempos 0, 3 e 6 meses.
- c) Determinação do teor de ferro hemínico, não-hemínico nas misturas de CFMD após aquecimento nos tempos 0, 3 e 6 meses.

Amostras em triplicatas foram colocadas em tubos de centrífugas, hermeticamente vedados e aquecidos em banho-maria a 90°C durante 15 minutos, quando então atingiram a temperatura de 75°C. O processo de aquecimento das amostras foi monitorado com termômetros inseridos diretamente nas misturas e na água de aquecimento.

- d) Paralelamente à determinação de ferro hemínico e não-hemínico, amostras aquecidas e não aquecidas foram avaliadas em relação à oxidação lipídica através da determinação do nº de TBARS nos tempos acima estabelecidos, em triplicata.

#### **D - Processamento de salsichas de frango com adição das diferentes misturas de CFMD em sua formulação.**

Salsichas de frango foram preparadas com adição de 20% das misturas de CFMD em estudo em suas formulações, nível máximo estabelecido pela legislação vigente (Ministério da Saúde, 1981).

Processamento foi realizado nos tempos 0, 1, 3 e 6 meses com objetivo de avaliar a influência dessa matéria-prima na qualidade de produtos embutidos. As salsichas foram avaliadas com relação a:

- rendimento de processamento
- rendimento após reaquecimento
- cor
- textura
- nº de TBARS

#### **E - Efeito da adição de medula óssea à carne de peito ou coxa de frango submetidas a diferentes processos de moagem.**

Esse item do experimento teve por objetivo avaliar o efeito de medula óssea adicionada à carne de peito e coxa em moedor de carne convencional utilizado industrialmente e passada através de desossador mecânico, na estabilidade lipídica durante estocagem congelada a -18°C.

Carne de peito e coxa foi manualmente removida das carcaças de frango, mantida a 4°C e preparada para ser armazenada sob congelamento dentro de um prazo máximo de 12 horas. Os tratamentos aplicados foram:

1. Carne de peito e coxa refrigerada foi moída em moedor de carne Hobart com diâmetro dos orifícios de 4 mm (amostras PMC e CMC), respectivamente.
2. Carne de peito e coxa pré-congelada foi processada em desossador mecânico (POSS-PDE 1000) (amostras PMM e CMM).

Medula óssea foi removida de ossos congelados de tíbia e fêmur sendo imediatamente congelada. Tais ossos foram cortados transversalmente e a medula foi retirada com auxílio de pequenas espátulas de aço inox. quando ainda estava congelada e acondicionada em pequenos tubos escuros para evitar contato com a luz. Pigmentos totais, mioglobina e hemoglobina foram determinados de acordo com Rickansrud & Henrickson (1967). Medula óssea (22 mg de pigmentos totais/g) foi adicionada às amostras de carne (PMC, CMC, PMM e CMM) para resultar em aproximadamente 2, 4, 6 e 8 mg pigmentos totais/g de amostra. Realizou-se uma amostra controle sem adição de medula.

Amostras foram embaladas em porções de 50 g em embalagens plásticas, congeladas a -18°C e analisadas após 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 e 180 dias de estocagem.

O conteúdo de lipídios totais na medula óssea foi determinado pelo procedimento de Bligh and Dyer (1959) e a porcentagem de cinzas de acordo com AOAC (1984). Oxidação lipídica foi acompanhada pelo método de destilação de Tarladgis *et al.* (1960) e expressa em termos de mg de malonaldeído/kg amostra.

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Determinação da composição química e pH:**

##### **a. pH**

pH foi determinado de acordo com Foegeding (1987). 10 g das amostras foram homogeneizadas com 50 mL de água destilada durante 1 minuto em liquidificador, com posterior leitura em pHmetro Micronal previamente calibrado.

##### **b. Umidade**

Foi determinada em estufa a 100-105°C até peso constante, de acordo com método descrito pela AOAC (1984).

##### **c. Proteína**

Nitrogênio total foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, de acordo com método padrão da AOAC (1984) e a proteína total expressa como %N x 6,25.

#### **d. Gordura**

Gordura presente nas amostras secas foi extraída com éter de petróleo em extrator do tipo Soxhlet durante 5-6 horas e seu teor determinado gravimetricamente, como descrito na metodologia da AOAC (1984).

#### **e. Cinzas**

A % de cinzas foi determinada em mufla a 525°C, segundo método padrão da AOAC (1984).

Todas as determinações acima (a, b, c, d, e) foram realizadas em triplicatas.

### **3.2. Determinação do nº de TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.**

#### **Reagentes utilizados:**

- a) Reagente de TBA: ácido 2-tiobarbitúrico 0,02M em 98% ácido acético glacial.
- b) Solução de HCL 4N: 1 parte de HCL: 2 partes H<sub>2</sub>O destilada
- c) Solução de BHT: 1g/mL em metanol
- d) Solução de 1,1,3,3 tetra etóxi propano 10<sup>-3</sup>M
- e) Solução de sulfanilamida: 0,5% de sulfanilamida em HCl 20% (v/v)

A determinação do nº de TBARS foi realizada de acordo com Tarladgis *et al.* (1960) através das seguintes etapas:

-Misturar 10g da amostra (carne moída), 1-2 gotas de antiespumante e 1 mL de solução BHT (1mg/mL) com 50 mL de água destilada em liquidificador por 2 minutos.

-Transferir a mistura quantitativamente para um balão de fundo chato de 250 mL com lavagem adicional de 46,5 mL de água.

-Adicionar 2,5 mL de solução de HCl 4 N para trazer o pH a 1,5.

-Colocar algumas contas de vidro para evitar turbulência e choques.

-Aquecer o balão na amostra de aquecimento em nível alto de aquecimento para recolher 50 mL de destilado em  $\pm 15-20$  min.

-Misturar o destilado, pipetar 5 mL do mesmo em tubo de vidro rosqueado e adicionar 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,02 M em ácido acético. Fechar os tubos, misturar os conteúdos e imergir em banho de água fervente por 35 minutos.

-Preparar um branco 5mL H<sub>2</sub>O-5mL de TBA e tratar como as amostras.

-Após o aquecimento, resfriar em água corrente por 10 minutos; transferir a uma cubeta e ler absorvância da amostra contra o branco a 532nm.

-Multiplicar a leitura pelo fator correspondente da constante de destilação (Kd), conforme calculada a seguir para converter a mg de malonaldeído/1000 g de amostra.

#### **Testes de recuperação e cálculo da constante de destilação (Kd):**

Os testes de recuperação são realizados com 1,1,3,3 tetra etóxiopropano (TEP), o qual é convertido a malonaldeído. No procedimento, 10 mL de  $6,0 \times 10^{-5}$ M de TEP são adicionados junto com 10 g de amostra; o mesmo método de destilação utilizado para a amostra é empregado. Realiza-se também a destilação de somente 10 mL de TEP e da amostra individualmente.

A porcentagem de recuperação é dada por:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_3 - A_1}{A_2} \times 100, \text{ onde}$$

$A_1$  = absorvância da amostra

$A_2$  = absorvância da solução de 10 mL TEP

$A_3$  = absorvância da amostra + 10 mL de TEP

O valor de Kd (constante de destilação) é dado por:

$$K_{\text{dest}} = \frac{S}{A} \times 72,063 \times \frac{10^7}{C} \times \frac{100}{P}, \text{ onde:}$$

S = concentração de TEP padrão variando de  $1 \times 10^{-8}$  a  $8 \times 10^{-8}$  M em 5 mL de destilado.

A = absorvância do padrão

72,063 = PM do malonaldeído

C = peso da amostra

P = porcentagem de recuperação

Calcular o Kd para cada concentração de TEP e tirar a média.

### **3.3. Modificação do método de ácido 2-tiobarbitúrico para determinação de malonaldeído em carnes curadas.**

A presença de nitrito em produtos curados, mesmo em pequenas concentrações é capaz de reduzir significativamente o n° de TBARS, fornecendo baixos valores de rancidez, sendo que essa redução aumenta linearmente com a concentração de nitrito. Para minimizar esse efeito, emprega-se uma modificação no método que leva à formação de um sal de diazônio para controlar a interferência de nitrito na determinação do n° de TBARS em carnes curadas ou naquelas onde ocorre adição de nitrito.

O procedimento é idêntico ao método de Tarladgis *et al.* (1960) com exceção do acréscimo do reagente de sulfanilamida 0,5% em HCl 20% v/v, segundo Zipser & Watts (1962).

Em amostras contendo concentrações < 100 ppm de nitrito, adicionar 1 mL do reagente de sulfanilamida antes de homogeneizar a amostra no liquidificador e para concentrações > 100 ppm, acrescentar 2 mL de sulfanilamida. Diminuir 1 e 2 mL, respectivamente, do volume de H<sub>2</sub>O adicionada a fim de completar os 100 mL de volume requerido no método. A seguir proceder como descrito anteriormente.

### **3.4. Determinação de pigmentos totais e concentração de mioglobina em carnes mecanicamente desossadas**

Pigmentos totais foram determinados de acordo com Rickansrud & Henrickson (1967) com algumas modificações descritas previamente por Fleming *et al.* (1960).

### **Reagentes utilizados:**

Solução tampão acetato de sódio 0,01N pH 4,5

Solução de ferricianeto de potássio  $K_4 [Fe_2 (CN)_6]$  5g/L

Solução de cianeto de potássio 1 g/L

Solução tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 7,1

Acetato de chumbo básico saturado

Fosfato monobásico e fosfato dibásico de potássio.

#### **3.4.1. Pigmentos totais:**

-Pesar 25 g da amostra de carne mecanicamente desossada congelada (mesmo a matéria-prima fresca deve ser rapidamente congelada para ser pesada, evitando-se com isso perda de pigmentos por gotejamento).

-Homogeneizar com 100 mL de solução tampão acetato de sódio 0,01N, pH 4,5 em liquidificador por 3 minutos.

-Centrifugar o material resultante a 3000 rpm a 6°C por 15 minutos, filtrando a seguir o sobrenadante através de papel de filtro com ajuda de funil de Buchner a vácuo. Essa etapa deve ocorrer o mais rapidamente possível.

-Re-extrair o resíduo da centrifugação até obter um sedimento precipitado claro, praticamente livre de pigmentos. Descartar a gordura separada ao final de cada centrifugação.

-Combinar os dois extratos e trazer o volume a 200 mL com tampão acetato de sódio 0,01N, pH 4,5.

-Caso o material ainda apresente turbidez realizar uma segunda filtração por gravidade.

-Transferir uma porção de 20 mL do filtrado e converter a cianetometamioglobina pela adição de 1 mL de ferricianeto de potássio e 1 mL de cianeto de potássio (1g/L) para proporcionar uma concentração final, após diluição, de 0,6 e 0,8 milimoles/L respectivamente nos 20 mL de filtrado.

-A concentração de pigmentos totais é calculada a partir de leituras de densidade ótica à 540 nm em espectrofotômetro através da seguinte relação:



$$\frac{\text{mg pigmentos totatis}}{\text{g de tecido}} = \frac{\text{OD}}{11300} \times \frac{17000 \times (0,20 + d) \times 100}{\text{g da amostra}}, \text{ onde:}$$

D = densidade ótica a 540 nm

11300 = coeficiente de extinção molar da cianetometamioglobina a 540 nm.

17000 = peso equivalente dos pigmentos.

0,20 = volume do extrato em L

d = aumento do volume devido à adição dos cianetos.

### 3.4.2. Concentração de mioglobina

-Tomar 50 mL do filtrado final obtido previamente (sem adição dos cianetos) e ajustar o pH a 7,0 pela adição de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,1.

-Adicionar solução de acetato de chumbo básico saturado igual a 1/4 do volume de solução e misturar bem.

-Centrifugar a 2500 rpm/15 min. a 6°C.

-Filtrar o sobrenadante em papel filtro.

-Coletar 25 mL do filtrado e adicionar 11,65 g da mistura equimolar de fosfato monobásico e dibásico de potássio para trazer a concentração de fosfato a 3M e pH 6,6.

Nessa etapa mioglobina é separada da hemoglobina com precipitação dessa última. (Utiliza-se 6,52 g de  $K_2HPO_4$  e 5,10 g de  $KH_2PO_4$  → em 25 mL concentração molar = 3M).

-Centrifugar a solução a 2500 rpm/15 min.

-Filtrar a solução em papel filtro.

-Converter o sobrenadante a cianeto mioglobina pela adição de ferricianeto de potássio e cianeto de potássio em concentrações que proporcionem uma relação final de 0,6 e 0,8 milimoles/L, respectivamente.

-Centrifugar a amostra a 2500 rpm/15min e posteriormente realizar leitura do sobrenadante a 520 nm.

-Calcular a concentração de mioglobina através da relação:

$$[\text{Mb}] \text{ (mg/g músculo)} = \frac{\text{OD} \times K}{\text{peso da amostra}} \quad \begin{array}{l} \text{OD} = \text{absorbância a 520} \\ K = \text{cte. de proporcionalidade} \end{array}$$

onde,

$K = \frac{1700 \times \text{volume da alíquota (l)} \times \text{fator de diluição}}{E}$ , onde:

E

E = coeficiente de extinção milimolar da mioglobina, = 11,300 nM/L

17000 = PM da mioglobina (17000 mg/mM)

fator de diluição = fração da concentração total presente no extrato de 200 mL iniciais.

-Os valores de concentração de mioglobina foram expressos da mesma maneira que aqueles da determinação de pigmentos totais.

-A concentração de hemoglobina é calculada pela diferença entre as concentrações de pigmentos totais ( $A_T$ ) e de mioglobina ( $A_{MB}$ )

Assim:

$$A_{Hb} = A_T - A_{Mb}, \quad \text{onde } E_{Hb} = 11,5$$

$$E_{Mb} = 11,5 \quad (\text{Drabkin, 1950})$$

O cálculo baseia-se no fato de que citocromos, flavinas e outros pigmentos estão presentes no músculo em quantidades muito pequenas e portanto contribuem pouco ou nada à cor da carne. Assim, a quantidade de outros pigmentos com exceção da mioglobina foi assumida ser a concentração de hemoglobina nas amostras. O método tem a vantagem de que autoxidação, frequentemente ocorrida em outros métodos é aqui eliminada uma vez que soluções de cianetohemoglobina e cianetomioglobina são formas estáveis.

### **3.5. Metodologia empregada na avaliação das propriedades funcionais**

#### **3.5.1. Extração das proteínas miofibrilares.**

As proteínas miofibrilares foram isoladas de acordo com o seguinte procedimento:

-Passar a carne isenta de gordura e tecido conjuntivo visível duas vezes em moedor. No caso da carne mecanicamente separada, como já se trata de um material homogêneo, essa etapa pode ser suprimida.

-Adicionar 4 volumes de tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,1M NaCl, pH 7,0 e homogeneizar em liquidificador por 90 segundos.

-Extrair por 1 hora, sob resfriamento, usando agitador de velocidade variável.

-Centrifugar a 6000 rpm por 20 minutos.

-Descartar o sobrenadante (proteínas solúveis em água) e re-extrair o resíduo com 4 volumes de tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,1 M NaCl a pH 7,0 por 1 hora, sob resfriamento.

-Descartar o sobrenadante e adicionar ao resíduo 1/3 de seu volume de tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 2,4 M NaCl, pH 7,0. Agitar para dispersar o resíduo.

-Adicionar 1-2 volumes de tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,6 M NaCl, pH 7,0 e extrair como anteriormente por 1 hora.

-Centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos.

-Descartar o sedimento (proteínas insolúveis) e adicionar 5 volumes de água destilada gelada sob agitação ao sobrenadante.

-Centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos.

-Centrifugar o resíduo mais uma vez, se necessário.

-Dosar proteína pelo método semi-micro Kjeldahl para fazer os cálculos para quantificação da fração de proteínas miofibrilares. As proteínas miofibrilares isoladas devem ser estocadas a 0°C e usadas dentro do prazo máximo 24-36 horas.

### **3.5.2. Determinação da porcentagem de solubilidade protéica.**

Foi empregado o procedimento descrito por Xiong e Brekke, (1989) com algumas modificações descritas a seguir:

-Preparar acuradamente uma suspensão de proteínas miofibrilares contendo 5 mg/mL de proteína em tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,6 M NaCl, pH 7,0.

-Evitar a formação de espuma e trabalhar sempre sob refrigeração e tomar 10 mL da suspensão de proteínas colocando em tubos de centrifuga em triplicata.

-Centrifugar a 5000 rpm por 15 min. a 2-3°C.

-Medir o volume do sobrenadante e determinar a porcentagem de proteína no mesmo usando o método semi-micro Kjeldahl.

-A porcentagem de solubilidade protéica será dada através de:

$$\% \text{ solubilidade} = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante}}{\text{concentração de proteína nos 10 mL originais}} \times 100$$

### 3.5.3. Formação e estabilidade do gel.

Os géis foram preparados de acordo com Xiong & Brekke, (1989) com algumas modificações descritas a seguir.

-Preparar acuradamente uma suspensão de proteínas miofibrilares contendo 20 mg proteína/mL em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,6 M NaCl, pH 7,0.

-Desaerar previamente a suspensão de proteínas, através de leve centrifugação a 500 rpm por 1 minuto.

-Tomar 10 mL da suspensão e colocar em tubos de vidro de centrifuga com tampa. Evitar que a suspensão deslize pela parede do vidro.

-Colocar os tubos com amostras em banho-maria a 75°C por 20 minutos.

-Após esse tempo, resfriar imediatamente as amostras em gelo e mantê-las em refrigerador por uma noite.

-Centrifugar os tubos com géis formados a 2500 rpm/15 minutos a 2°C.

-Medir o volume de líquido liberado após centrifugação.

### 3.5.4. Índice de Atividade de Emulsificação (EAI)

O índice de atividade de emulsificação foi determinado de acordo com Pearce & Kinsella (1978), com modificações sugeridas por Li-Chan *et al.* (1984), através do seguinte procedimento:

-Preparar emulsão de proteínas miofibrilares com 6 mL de soluções proteicas a 1% em solução tampão 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,6 M NaCl, pH 7,0 e 2 mL de óleo de milho.

-Homogeneizar em alta velocidade por 1 minuto.

-Tomar alíquotas da emulsão do fundo do recipiente, evitando espuma e diluir em série em soluções de SDS 0,3% (1 mL de emulsão em 9 mL de SDS 0,3%).

-Ler absorvância a 500 nm.

-Tomar alíquotas de 1 mL da emulsão e da solução de proteína no tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,6 M NaCl e secar em estufa a 100-110°C até peso constante.

$$\text{I.A.E.} = \frac{2.303 \times 2 \times (A_{500} \times f \text{ diluição})}{(m^2/g) \quad C \times \emptyset \times 10.000}, \text{ onde}$$

$A_{500}$  = absorvância a 500 nm

$f$  = fator de diluição na absorvância lida

$c$  = peso da proteína por unidade de volume da fase aquosa antes da formação de emulsão.

$\emptyset$  = fração de volume de óleo da emulsão, dada por:

$$\emptyset = \frac{C - A - E(B - C)}{C - A + (B - C) \{(1+E) D_0/D_s - E\}}, \text{ onde}$$

$A$  = peso do béquer

$B$  = peso do béquer + emulsão

$C$  = peso do béquer + matéria-seca

$D_0$  = densidade do óleo

$D_s$  = densidade da solução protéica

$E$  = concentração de solutos (massa por unidade de solvente) massa de proteína seca/1 mL de solvente.

### 3.6. Determinação da Atividade de ATPase

A atividade de ATPase das proteínas miofibrilares foi determinada de acordo com Hay *et al.* (1972).

#### Reagentes:

- a) Solução de álcool isobutílico: benzeno (1:1)  
25 mL benzeno  
25 mL álcool isobutílico
- b) Reagente de molibdato  
b.1.) 53 mL de  $H_2SO_4$  em 100 mL de água destilada  
b.2.) 20 g  $(NH_4)_6 MO_7 O_{24} \cdot 4H_2O$  em 100 mL de água destilada.  
Misturar iguais volumes de b.1. e b.2. e diluir a 400 mL com água destilada.
- c) Solução de  $H_2SO_4$  em álcool etílico  
Diluir 1,74 mL de  $H_2SO_4$  concentrado em 100 mL de álcool etílico absoluto.
- d) Solução stock de cloreto de estanho ( $Sn Cl_2$ )  
Dissolver 10 g de  $Sn Cl_2 \cdot 2H_2O$  em 25 mL de HCl concentrado.  
Armazenar em frasco escuro bem fechado e rosqueado.
- e) Solução de cloreto de estanho diluída  
Diluir 1 mL de  $SnCl_2$  stock em 200 mL de  $H_2SO_4$  0,5 M.  
Preparar imediatamente antes do uso.
- f) Tampão tris-acetato 0,02 M, 1 mM  $CaCl_2$ ; 0,02 M K Cl, pH 7,0
- |      |                                       |        |
|------|---------------------------------------|--------|
| f.1. | Tris                                  | 2,42 g |
|      | ácido acético                         | 1,2 mL |
|      | Completar a 100 mL com água destilada |        |
| f.2. | NaOH 0,02 M                           |        |
|      | NaOH                                  | 0,08 g |

Completar a 100 mL de água destilada

f.3.	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1475 g
	KCl	1,51 g
	Completar a 100 mL com H <sub>2</sub> O destilada.	

Misturar f.1.; f.2.; f.3. e completar a 1000 mL de solução, acertando previamente o pH a 7,0 com NaOH ou HCl.

- g) Solução de ácido tricloroacético 15%
- |                       |      |
|-----------------------|------|
| ácido tricloroacético | 15 g |
|-----------------------|------|
- completar a 100 mL com H<sub>2</sub>O destilada

#### Reação de mistura:

-Ajustar a solução de proteína para uma concentração exata de 0,25 mg/mL em tampão tris-acetato 20mM, 1mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0 e 20 mM KCl. Agitar lentamente até completa dissolução.

-Adicionar ATP para concentração de 1mM; homogeneizar bem, lenta e continuamente;

-Remover alíquotas de 2mL da solução acima em intervalos de tempo de 60 segundos, 2 minutos, 5, 10 e 15 minutos e transferir para em tubo de ensaio em banho de gelo contendo 3 mL de ácido tricloroacético 15%.

-Centrifugar os tubos a 10.000 rpm por 10 minutos para remoção de proteína desnaturada e retirar 2 mL da camada sobrenadante.

-Determinar o teor de fosfato inorgânico nos 2 mL de sobrenadante removidos ao longo da reação, conforme procedimento descrito a seguir. Ler a absorbância a 660 nm.

-Preparar um branco contendo apenas tampão tris-acetato e outro apenas com ATP sem solução de proteína. Descontar os valores de Absorbância a 660 nm desse valor.

-Expressar os resultados em  $\mu\text{moles Pi/min./mg}$  proteína.

#### Preparação da curva padrão de fósforo inorgânico

-Secar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $100^\circ\text{C}$ .

-Pesar 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 1000 mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (solução stock: 1 mL  $\rightarrow$  155  $\mu\text{g}$  Pi).

-Realizar diluições para obter 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5  $\mu\text{mol}$  Pi/mL

-Pipetar 2 mL da solução da amostra (reação de mistura) ou soluções padrões em tubo rosqueado contendo 2 mL de reagente de molibdato e 5 mL de solução álcool isobutílico - benzeno.

-Agitar o tubo vigorosamente em posição vertical por 1 minuto.

-Pipetar 2 mL da camada superior (após repouso) em tubo contendo 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  alcoólico.

-Misturar bem. Adicionar 0,5 mL de  $\text{SnCl}_2$ , solução diluída e misturar gentilmente.

-Após repouso de 30 minutos à temperatura ambiente, medir a cor desenvolvida em espectrofotômetro a 660 nm.

### 3.7. Procedimento para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS

Foi realizado de acordo com Laemmli (1970).

#### **Soluções:**

##### Tampão Tris-glicina para eletrodo

(0,025 M Tris, 0,192 M glicina)

15,5 g de trizma base

72,0 g de glicina

5,0 g de SDS

Ajustar o pH para 8,3. Completar com água destilada a 1000 mL.

##### Solução stock de Tris-SDS, pH 6,8

(0,025 M Tris)

39,4 g de trizma HCl

2,0 g de SDS

Ajustar o pH para 6,8. Completar com água destilada para 1000 mL.

##### Solução stock de Tris-SDS, pH 8,8



(0,75 M Tris)

71 g de trizma base

46,2 g de trizma HCl

2,0 g de SDS

Ajustar o pH para 8,8. Completar com água destilada para 1000 mL.

#### Tampão para a amostra

(0,0625 M Tris)

25 mL de solução stock de Tris-SDS, pH 6,8

2,0 g de SDS

10 mL de glicerol

5 mL de 2-mercaptoetanol

0,1 mL de bromofenol blue a 1%

Completar com água destilada para 100 mL. Guardar em recipiente bem fechado.

#### Solução stock de acrilamida

30 g de acrilamida, especialmente purificada para eletroforese

0,8 g de N'-N metilenobisacrilamida

Completar para 100 mL com água destilada. Guardar em frasco escuro em temperatura de 4°C.

#### Solução de persulfato de amônia

0,1 g de persulfato de amônia

Completar para 10 mL com água destilada. Preparar sempre fresco para cada corrida de eletroforese.

#### Solução de gel de resolução 10% (gel inferior)

19,8 mL de solução stock de acrilamida

30 mL de solução stock de Tris, pH 8,8

Completar para 60 mL com água destilada

15 µL de TEMED

1,5 mL de solução 1% de persulfato de amônia

#### Solução de "stacking" gel (gel superior)

2,7 mL de solução stock de acrilamida

10 mL de solução stock de Tris, pH 6,8

Completar para 20 mL com água destilada  
15  $\mu$ L de TEMED  
0,5 mL de solução de persulfato de amônia

### **Procedimento:**

O sistema de eletroforese de disco descrito por Laemmli (1970) inclui um "gel de resolução" (10% de acrilamida) e um "stacking" gel (3% de acrilamida). O gel de resolução deve ter uma altura de 10 cm e o "stacking" gel de 1 cm. Os tubos de vidros devem ser lavados com detergente, com ácido, água destilada e, finalmente, enxaguados com Photo-Flo.

Misturar a solução stock de acrilamida com a solução stock de Tris, pH 8,8 e água destilada em béquer. Adicionar o TEMED e o persulfato de amônia. Imediatamente pipetar a solução dentro dos tubos previamente preparados e secos até a marca dos 10 cm.

Em seguida cobrir os géis com água saturada com álcool isopropílico e deixar em repouso por 1 hora a temperatura ambiente. Se houver necessidade de deixar os géis por mais de 1 hora, remover a camada de água destilada saturada com álcool isopropílico e substituí-la por uma solução stock de Tris a 25% pH 8,8.

Antes de preparar o "stacking" gel, remover a camada de água. Cuidadosamente, usando um pedaço de lenço de papel macio, secar a superfície do gel, para remover qualquer umidade remanescente, sem entretanto, perturbar a sua superfície. É muito importante que a superfície do gel de resolução esteja seca, para permitir polimerização satisfatória do "stacking" gel.

Para a preparação do "stacking" gel misturar a solução stock de acrilamida com a solução stock de Tris, pH 6,8 e a água destilada em béquer. Adicionar TEMED e persulfato de amônia. Agitar gentilmente para misturar bem os ingredientes. Colocar, numa altura de 1 cm, sobre a superfície do gel de resolução e cobrir com água saturada com álcool isopropílico. Deixar em repouso por 1 hora, em temperatura ambiente, para que a polimerização ocorra.

A amostra deve ser aplicada sobre a superfície do gel, já previamente coberta com o tampão do eletrodo, com uso de microseringa .

Aplicar corrente de 3 mA por tubo, até que a frente do indicador bromofenol blue alcance o final do tubo de vidro.

Os géis devem ser corados em 0,4% Coomassie Brilliant Blue em mistura de ácido acético-metanol-água na proporção 9/45/45 (v/v/v) por um período de 6 horas. Descorar em mistura de ácido acético-metanol-água na proporção de 7,5/25/67,5 (v/v/v) até que o gel se apresente claro, com as bandas protéicas bem visíveis. Os géis devem ser preservados em solução de ácido acético a 7,5%.

### **3.8. Determinação do conteúdo de ferro hemínico e não-hemínico.**

#### **3.8.1. Quantificação de ferro por espectrofotometria no visível com 1,10 o-fenantrolina**

O íon ferroso forma um complexo colorido com o-fenantrolina; para determinar ferro total, o íon férrico é reduzido com hidroxilamina e o íon ferroso resultante é complexado com o-fenantrolina. A cor do complexo alaranjado é medido a 510 nm. O procedimento adotado foi o de Thomas & Chamberlin (1980).

#### **Preparo da Amostra**

A amostra seca e desengordurada deve ser incinerada em mufla com a seguinte programação de temperatura:

200°C	2 horas
300°C	3 horas
450°C	2 horas
500°C	5 horas ou mais até que as cinzas se apresentem com cor branca.

Diluir as cinzas com ligeira umidificação com água destilada e posteriormente realizar digestão com ácido clorídrico concentrado. Adicionam-se aproximadamente 5 mL de HCl concentrado e aquece-se em chapa elétrica até completa dissolução das cinzas. Realiza-se a seguir sucessivas lavagens do cadinho com água destilada até total remoção da amostra e completa-se o volume até 100 mL. A concentração final do ácido clorídrico será de 2% (m/v). É essencial que a amostra esteja completamente dissolvida.

## Reagentes:

### Solução tampão

40 g de acetato de amônio ( $\text{CH}_3\text{COO NH}_4$ )

50 mL ácido acético glacial

Completar o volume para 100 mL com água destilada

### Solução de hidrocloreto de hidroxilamina

20 g de hidrocloreto de hidroxilamina

Completar o volume para 100 mL com água destilada

### Solução de o-fenantrolina

0,5 g de 1,10 o-fenantrolina

100 mL de água destilada

Aquecer até  $80^\circ\text{C}$  até completa dissolução. Não ferver. Descartar se a solução ficar escura. Aquecimento não é necessário se 4-5 gotas de HCl concentrado for adicionado à água destilada.

## Preparo da curva padrão

### **Solução stock:**

Dissolver 1,40 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em 50 mL de água destilada. Adicionar lentamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado e agitar.

Adicionar  $\text{KMnO}_4$  0,1 N, gota a gota, até que uma cor rósea pálida seja persistente. Diluir a 1000 mL em balão volumétrico com água destilada livre de ferro. Cada 1 mL da solução contém 200  $\mu\text{g}$  Fe.

### **Soluções padrões:**

Pipetar 50 mL da solução stock em balão volumétrico de 1000 mL e diluir com água destilada. Cada 1 mL da solução stock contém 10  $\mu\text{g}$  de Fe. A seguir pipetar 10 mL dessa solução e diluir a 100 mL com água destilada. Cada 1 mL da solução contém 1  $\mu\text{g}$  de Fe.

A partir dessas soluções preparar soluções padrões na faixa 0-5  $\mu\text{g}$  Fe/mL. Na preparação dessas soluções utilizar solução aquosa de HCl 2% (m/v) tal como foi diluída a amostra. A seguir, proceder à reação colorimétrica.

### **Reação colorimétrica:**

Transferir 20 mL da amostra diluída, ou dos padrões para um tubo de ensaio rosqueado. Adicionar 2 mL de tampão acetato de sódio, 2 mL de 1,10. o-fenantrolina e 1 mL de hidroxilamina. Deixar em repouso por 30 min e proceder à leitura em espectrofotômetro a 510 nm. Preparar um branco utilizando solução aquosa em HCl 2% (m/v), substituindo amostra ou padrões.

### **3.8.2. Quantificação de ferro total por espectroscopia de absorção atômica**

As amostras foram preparadas como anteriormente e as mesmas diluições foram utilizadas para as leituras em um espectrofotômetro de plasma de argônio indutivamente acoplado, modelo simultâneo, BAIRD-CP 2000. Foi utilizada curva de Ferro contra padrões ácidos em comprimento de onda 259,94 nm (emissão de Fe).

As soluções padrões de ferro contendo 0, 1, 2, 3, 4 e 5  $\mu\text{g Fe/mL}$  foram preparadas em solução aquosa de ácido clorídrico 2% (m/v) a partir da solução stock descrita e concidiram com as concentrações respectivas da curva de Fe padrão do plasma.

### **3.8.3. Determinação de ferro não-hemínico**

Reagentes:

#### Mistura ácida

HCl 6N

Ácido tricloroacético 40%

Misturar em partes iguais (1:1)

#### Reagente de $\text{NaNO}_2$ (156 ppm)

0,39 g  $\text{NaNO}_2$

100 mL de água destilada

Preparar diariamente

#### Reagente de cor

acetato de sódio

1,10 o-fenantrolina

## hidroxilamina

Adicionar os reagentes acima já descritos anteriormente na proporção 2:2:1 (mL)

Utilizou-se o método de Schricker *et al.* (1982) modificado por Rhee e Ziprin (1987):

-Moer finamente a amostra em equipamento de aço inox para evitar contaminação com ferro; essa etapa é desnecessária para carne de frango mecanicamente separada uma vez que o material apresenta-se bem homogêneo.

-Tomar 5 g da amostra em triplicata em tubos de vidro com boa vedação resistente à ação de ácido.

-Adicionar 0,2 mL de reagente de  $\text{NaNO}_2$  (156 ppm) baseado no peso da carne.

-Adicionar 15 mL da mistura ácida e agitar vigorosamente.

-Incubar a  $65^\circ\text{C}$  por 20 horas e a cada 1-2 horas agitar vigorosamente.

-Resfriar completamente à temperatura ambiente. Os extratos devem apresentar-se de cor marrom escuro e a carne completamente digerida.

-Tomar 5 mL da camada ácida líquida superficial, denominada de fase líquida incubada e transferir a pequenos tubos de centrífugas;

-Adicionar os reagentes de cor como no método de 1,10 o-fenantrolina e se necessário, centrifugar a 3500 rpm/10 min. à temperatura ambiente.

-Ler a absorvância do sobrenadante a 510 nm contra o branco constituído de 5 mL da mistura ácida + reagentes de cor.

-Para eliminar o efeito da coloração marrom escuro formada após digestão ácida, ler absorvância da fase líquida incubada antes da adição do reagente de cor, substituindo 2 mL de 1,10-o-fenantrolina por 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  contra o branco preparado anteriormente a 510 nm. Subtrair todos os valores de absorvância das amostras desse valor obtido.

-Usando curva padrão de Fe 0-5,0  $\mu\text{g Fe/mL}$  determinar o conteúdo de ferro em 1 mL da fase líquida incubada.

-O conteúdo de Fe não-hemínico é calculado pela seguinte equação:

$\mu\text{g Fe não-hemínico}$  = concentração de ferro na fase líquida incubada ( $\mu\text{g/mL}$ ) X  
g de carne (15 + 0,2 + % umidade de 5 g de amostra) mL / 5 g

**Cálculo da % de recuperação:**

Em todos os procedimentos, adicionar juntamente com a amostra 10  $\mu\text{g Fe}$  (1 mL da solução stock) e seguir como descrito em cada método, calculando a seguir a % de Ferro recuperado.

### **3.9. Metodologia para processamento e avaliação de salsichas de frango com adição das diferentes misturas**

#### **3.9.1. Processamento de salsicha**

##### **a) Matéria-prima**

A matéria-prima constituiu-se de carne de peito e coxa de frango desossados, sem pele, obtida em até 48 horas antes do processamento de um produtor local. A CFMD controle (fresca) foi obtida como no item I para cada processamento. Toucinho foi removido da porção costal-lombar de suínos.

##### **b) Ingredientes:**

Os ingredientes comerciais constituíram-se em sal, açúcar, tripolifosfato de sódio, nitrito de sódio, ascorbato de sódio e condimentos. As salsichas foram embutidas em tripas artificiais de celulose de calibre 22 mm.

##### **c) Formulação e procedimento:**

Os "batters" de salsicha foram preparados com adição de 20% das misturas F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub> e controle, o qual constituiu-se de CFMD C/P ou S/P recém desossado. Previamente foi determinada a composição química de cada matéria-prima cárnea para estabelecimento da formulação.

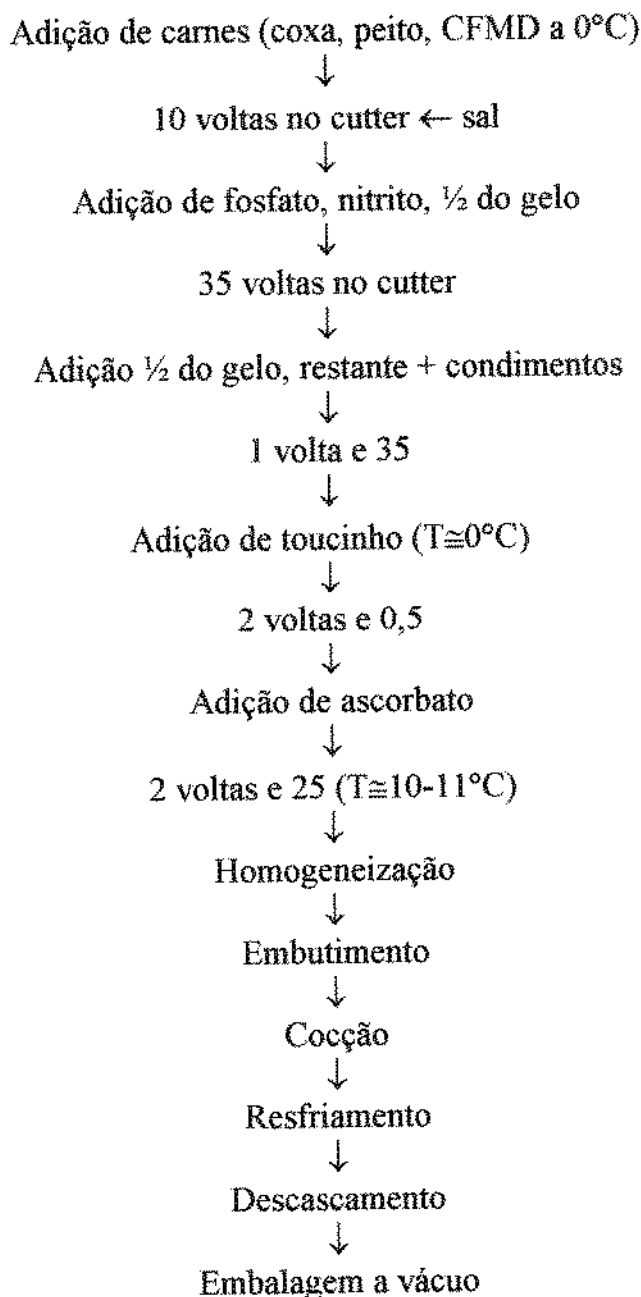
O processamento do "batter" para a produção de salsicha seguiu o fluxograma apresentado na Figura 3. As formulações utilizadas nos processamentos contendo 20% de S/P e C/P são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A relação umidade:proteína foi igual a 4,5. Adicionou-se ainda mais 10% de gelo referente ao peso total da formulação para compensar as perdas na estufa.

A ordem de adição dos ingredientes e aditivos está descrita na Figura 3 e foi rigorosamente obedecida em todos os processamentos. A temperatura final de cominuição no "cutter" foi de aproximadamente 10-11°C, sendo a massa então, homogeneizada em moinho de facas rotativas. Isto levou a um aumento na temperatura final da massa de aproximadamente 2-4°C e em nenhum processamento ultrapassou 15°C. A massa foi transferida para embutideira de pistão descontínua e por extrusão as salsichas foram formadas em tripas artificiais de celulose calibre



22mm. A cada 10 cm, foram amarrados manualmente os gomos de salsicha, procedendo-se então à cocção, cujo programa de cozimento e resfriamento é apresentado na Tabela 3. Salsichas foram pesadas antes e após cozimento com casca para determinação das % de rendimento.

**Figura 3 - Fluxograma básico do processamento de salsichas com ordem de adição dos ingredientes**



**Tabela 1 - Formulação básica do batter de salsicha processado com CFMD sem pele**

Matérias-Primas	Quantidade	Umidade		Proteína		Gordura	
		kg	kg	%	kg	%	kg
Peito	2,40	1,73	72,05	0,56	23,30	0,04	1,80
Coxa	2,40	1,79	74,75	0,43	18,00	0,14	6,00
CFMD S/P	1,90	1,33	70,15	0,24	12,45	0,28	15,00
Toucinho	1,90	0,28	15,00	0,01	0,78	1,52	80,00
Sub total	8,60	5,13	59,65	1,24	14,42	1,95	23,02
Sal	2,2%	0,21					
Nitrito	0,02%	0,0018					
Ascorbato	0,05%	0,0047					
Polifosfato	0,3%	0,028					
Condimento	0,52%	0,049					
Água	0,56	0,56	100%				
Total	9,45	5,69	60,21	1,24	13,12	1,95	20,63
Água +10%	1,05						

**Tabela 2 - Teores (g) de fosfato, nitrito e ascorbato nas diferentes formulações considerando-se as quantidades já presentes na CFMD sem pele armazenada.**

	Controle	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
Fosfato	28,35	28,35	22,65	28,35	28,35	22,65
Nitrito	1,89	1,89	1,89	1,51	1,89	1,51
Ascorbato	4,72	4,72	4,72	4,72	3,77	3,77

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

**Tabela 3 - Condições de processamento térmico e resfriamento da salsicha**

Processo	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Secagem	50	15
Avermelhamento (I)	55	30
Avermelhamento (II)	60	20
Cozimento	60	5
	65	5
	70	5
	75	5
	80	até Ti = 72°C (~10 min.)
Chuveiro	-	10 min
Câmara fria	2	16 horas

Ti = temperatura interna

## **d) Análises realizadas na avaliação da qualidade das salsichas**

### **d.1) Estabilidade à oxidação lipídica**

Foi realizada através do método de TBARS, em triplicata, para cada formulação, de acordo com Tarladgis (1960), utilizando-se a modificação de Zipser & Watts (1962) já descrita na seção.

### **d.2) pH**

Dez gramas de amostras de salsicha foram adicionadas a 50 mL de água destilada, homogeneizado por 1 min em liquidificador e as leituras realizadas em pHmetro "Micronal" devidamente calibrado. A determinação foi realizada em triplicata.

### **d.3) % Rendimento de processamento**

Foi realizado de acordo com Mittal e Osborne (1986) com base nos pesos dos produtos do lote antes da cocção em estufa, e após o resfriamento em câmara fria.

### **d.4) % Rendimento após reaquecimento**

Foi determinado de acordo com Nuckles *et al* (1990). Vinte gramas de amostra foram aquecidos em 100 mL de H<sub>2</sub>O a 100°C por 5 minutos e resfriados a temperatura ambiente por 5 minutos. A porcentagem de rendimento foi obtida dividindo-se peso das salsichas resfriadas pelo seu peso antes do aquecimento.

### **d.5) Avaliação de cor (superfície externa e interna)**

Dez salsichas de cada formulação foram cortadas transversalmente e as leituras da cor de cada lado (superfície externa e interna) foram realizadas através do colorímetro Minolta modelo CR 200b, previamente calibrado, obtendo-se os parâmetros L\* (luminosidade), a\* (intensidade de vermelho), b\* (intensidade de amarelo).

Para CFMD com pele e sem pele, as leituras foram realizadas nos blocos de 2 kg externamente e imediatamente cortados para as leituras no interior.

Foram realizadas quinze leituras em cada região e tomadas as dez mais próximas para a determinação da média, uma vez que o alto teor de umidade e a baixa temperatura levaram a variações significativas nas leituras.

**Tabela 4 - Formulação básica do batter de salsicha processado com CFMD com pele**

Matérias-Primas	Quantidade	Umidade		Proteína		Gordura	
		kg	kg	%	kg	%	kg
Peito	2,40	1,73	72,05	0,55	23,30	0,04	1,80
Coxa	2,40	1,78	74,75	0,43	18,00	0,14	6,00
CFMD C/P	1,80	1,08	60,05	0,15	8,50	0,55	30,42
Toucinho	1,40	0,21	15,00	0,01	0,78	1,12	80,05
Sub total	8,00	4,80	60,00	1,14	14,25	1,85	23,12
Sal	2,2%	0,190					
Nitrito	0,02%	0,0017					
Ascorbato	0,05%	0,0043					
Polifosfato	0,3%	0,025					
Condimento	0,52%	0,045					
Água		0,39	0,39	100%			
Total		8,66	5,19	59,93	1,14	13,16	1,85
Água +10%		0,96					21,36

**Tabela 5 - Teores (g) de fosfato, nitrito e ascorbato nas diferentes formulações considerando-se as quantidades já presentes na CFMD com pele armazenada.**

	Controle	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
Fosfato	25,98	25,98	20,58	25,98	25,98	20,58
Nitrito	1,732	1,732	1,732	1,372	1,732	1,372
Ascorbato	4,33	4,33	4,33	4,33	3,43	3,43

F<sub>1</sub>- Controle; F<sub>2</sub>- Fosfato; F<sub>3</sub>- Nitrito; F<sub>4</sub>- Ascorbato; F<sub>5</sub>- Mistura

**Observações:**

- A planilha utilizada para o cálculo das formulações foi cedida por Felício, P. E. - Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia.

- Os processamentos das salsichas foram realizadas na planta piloto do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos.

### **3.10. Análise Estatística:**

Os dados das análises e testes realizados foram avaliados estatisticamente por análise de variância. Quando a análise de variância indicou resultados significativos entre as médias dos diferentes tratamentos, foi realizado o teste de Tukey a nível de significância de 5%, através do programa estatístico SANEST, desenvolvido, autorizado e gentilmente cedido pela Faculdade de Engenharia Agrícola, da Universidade Estadual de Campinas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Avaliação da oxidação lipídica, composição química e degradação dos pigmentos durante estocagem congelada das diferentes misturas de CFMD

A composição química de CFMD apresentada nas Tabelas 6 e 7 e os valores obtidos para CFMD de dorso com e sem pele estão dentro da faixa citada na literatura (Orr & Wogar, 1975; Essary, 1979; McNeill *et al.*, 1988). As variações encontradas na composição química das diferentes amostras são devidas a diferenças na matéria-prima (idade das aves, relação carne/ossos, tipo de corte, teor de gordura), métodos, equipamentos de desossa, bem como a porcentagem de rendimento desejada (Beraquet, 1990). A matéria-prima com pele apresenta teores muito mais elevados de gordura, praticamente o dobro (30%) em relação à matéria-prima sem pele (15%) e menores teores de umidade e proteína. Pele de frango, apresentando aproximadamente 46% de gordura, foi o componente responsável por esse acréscimo. Teores de cinzas de CFMD sem pele foram consideravelmente maiores que as respectivas amostras com pele, em função da maior proporção relativa de ossos e medula óssea incorporados na operação de desossa.

Tabela 6 - Composição química e valores de pH das formulações de CFMD com pele.

Determinação	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
% Umidade	60,05±0,58 <sup>a</sup>	60,54±0,34 <sup>a</sup>	60,18±0,28 <sup>a</sup>	60,45±0,61 <sup>a</sup>	60,85±0,64 <sup>a</sup>
% Gordura	30,42±0,54 <sup>a</sup>	31,08±0,62 <sup>a</sup>	30,85±0,35 <sup>a</sup>	30,95±0,82 <sup>a</sup>	30,15±0,44 <sup>a</sup>
% Proteínas	8,50±0,65 <sup>a</sup>	8,15±0,72 <sup>a</sup>	8,65±0,24 <sup>a</sup>	8,45±0,38 <sup>a</sup>	8,72±0,67 <sup>a</sup>
% Cinzas	0,62±0,02 <sup>a</sup>	0,73±0,02 <sup>b</sup>	0,67±0,01 <sup>a</sup>	0,65±0,02 <sup>a</sup>	0,79±0,03 <sup>b</sup>
pH	6,20±0,01 <sup>a</sup>	6,54±0,02 <sup>b</sup>	6,28±0,01 <sup>a</sup>	6,31±0,01 <sup>a</sup>	6,61±0,02 <sup>b</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 7 - Composição química e valores de pH das formulações de CFMD sem pele.**

Determinação	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
% Umidade	70,15±0,58 <sup>a</sup>	70,85±1,05 <sup>a</sup>	70,45±0,82 <sup>a</sup>	71,02±0,48 <sup>a</sup>	70,82±0,55 <sup>a</sup>
% Gordura	15,00±0,64 <sup>a</sup>	15,52±0,28 <sup>a</sup>	15,48±0,43 <sup>a</sup>	15,86±0,52 <sup>a</sup>	15,09±0,28 <sup>a</sup>
% Proteínas	12,45±0,34 <sup>a</sup>	12,50±0,38 <sup>a</sup>	12,28±0,21 <sup>a</sup>	12,91±0,42 <sup>a</sup>	12,43±0,69 <sup>a</sup>
% Cinzas	1,08±0,03 <sup>a</sup>	1,17±0,02 <sup>b</sup>	1,12±0,01 <sup>a</sup>	1,10±0,02 <sup>a</sup>	1,24±0,03 <sup>b</sup>
pH	6,58±0,03 <sup>a</sup>	6,85±0,02 <sup>b</sup>	6,60±0,01 <sup>a</sup>	6,65±0,02 <sup>a</sup>	6,93±0,01 <sup>b</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

Em todas as amostras, adição de polifosfatos, nitrito e ascorbato não levou a diferenças significativas nas porcentagens de umidade, gordura e proteína. Entretanto nas formulações F<sub>2</sub> (polifosfatos) e F<sub>5</sub> (mistura), ocorreram teores mais elevados de cinzas significativamente diferentes ao nível de 5%. Essa diferença é devida provavelmente ao maior teor de minerais presentes no polifosfato comercial, contribuindo para elevação do teor de cinzas.

Valores de pH de dorso mecanicamente desossado sem pele foram ligeiramente mais elevados que a matéria-prima com pele (Tabelas 7 e 8). Grunden *et al.* (1972) reportaram valores semelhantes de pH. Adição de polifosfato resultou em aumento significativo de pH nas amostras com e sem pele. O mesmo ocorreu na formulação F<sub>5</sub> contendo os três ingredientes e, portanto, a elevação de pH foi devido à adição de polifosfato. Os resultados estão de acordo com Shults & Wierbicki (1973) os quais reportaram que músculo de frango aumentou 0,2-0,6 unidades de pH com diferentes tipos de polifosfatos adicionados. Adição de tripolifosfato de sódio elevou o pH de 5,7 para 6,1. No presente experimento, o aumento de pH foi de aproximadamente 0,3-0,4 unidades, similares aos dados reportados na literatura.

**Tabela 8 - Valores de pH das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18° C).**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	6,20±0,01 <sup>a</sup>	6,54±0,02 <sup>b</sup>	6,28±0,01 <sup>a</sup>	6,31±0,02 <sup>a</sup>	6,61±0,02 <sup>b</sup>
30	6,20±0,02 <sup>a</sup>	6,50±0,02 <sup>b</sup>	6,29±0,02 <sup>a</sup>	6,30±0,01 <sup>a</sup>	6,65±0,06 <sup>b</sup>
60	6,19±0,01 <sup>a</sup>	6,55±0,03 <sup>b</sup>	6,30±0,02 <sup>a</sup>	6,33±0,02 <sup>a</sup>	6,60±0,03 <sup>b</sup>
90	6,20±0,02 <sup>a</sup>	6,57±0,02 <sup>b</sup>	6,29±0,03 <sup>a</sup>	6,38±0,03 <sup>a</sup>	6,63±0,02 <sup>b</sup>
120	6,21±0,03 <sup>a</sup>	6,56±0,04 <sup>b</sup>	6,30±0,01 <sup>a</sup>	6,31±0,01 <sup>a</sup>	6,65±0,03 <sup>b</sup>
150	6,23±0,01 <sup>a</sup>	6,58±0,05 <sup>b</sup>	6,32±0,03 <sup>a</sup>	6,36±0,04 <sup>a</sup>	6,64±0,03 <sup>b</sup>
180	6,30±0,04 <sup>a</sup>	6,60±0,03 <sup>b</sup>	6,33±0,03 <sup>a</sup>	6,37±0,05 <sup>a</sup>	6,80±0,02 <sup>b</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfatos; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c,d</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 9 - Valores de pH das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18° C).**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	6,58±0,03 <sup>a</sup>	6,85±0,02 <sup>b</sup>	6,61±0,01 <sup>a</sup>	6,65±0,02 <sup>a</sup>	6,93±0,01 <sup>b</sup>
30	6,60±0,02 <sup>a</sup>	6,85±0,05 <sup>b</sup>	6,60±0,02 <sup>a</sup>	6,64±0,03 <sup>a</sup>	6,70±0,01 <sup>b</sup>
60	6,61±0,04 <sup>a</sup>	6,83±0,04 <sup>b</sup>	6,61±0,03 <sup>a</sup>	6,63±0,04 <sup>a</sup>	6,95±0,03 <sup>b</sup>
90	6,60±0,02 <sup>a</sup>	6,86±0,03 <sup>b</sup>	6,62±0,03 <sup>a</sup>	6,60±0,03 <sup>a</sup>	7,01±0,02 <sup>b</sup>
120	6,59±0,03 <sup>a</sup>	6,87±0,03 <sup>b</sup>	6,64±0,04 <sup>a</sup>	6,61±0,04 <sup>a</sup>	6,98±0,04 <sup>b</sup>
150	6,62±0,05 <sup>a</sup>	6,86±0,03 <sup>b</sup>	6,62±0,04 <sup>a</sup>	6,63±0,03 <sup>a</sup>	7,02±0,03 <sup>b</sup>
180	6,65±0,03 <sup>a</sup>	6,89±0,04 <sup>b</sup>	6,65±0,05 <sup>a</sup>	6,67±0,02 <sup>a</sup>	7,03±0,06 <sup>b</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfatos; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

### **1.1. Estabilidade à oxidação lipídica de CFMD na presença de polifosfato, nitrito e ascorbato**

A extensão da oxidação lipídica foi monitorada através do teste de TBA expresso pelo número de TBARS ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em mg de malonaldeído/kg de amostra. Durante autoxidação de ácidos graxos polinsaturados, malonaldeído é produzido sendo altamente reativo e permanecendo ligado a outros componentes dos alimentos (Shahidi & Hong, 1991). De acordo com Talardgis *et al.* (1960) o tratamento térmico ácido libera o malonaldeído ligado, que reage com ácido tiobarbitúrico formando um pigmento róseo com máxima absorção a 532 nm. Assume-se que a intensidade da cor é uma medida da concentração do malonaldeído. A concentração de malonaldeído têm sido positivamente correlacionada com rancidez oxidativa e "warmed-over-flavor" (Igene & Pearson, 1979).

Nas condições do experimento, a porcentagem de Recuperação e o valor de K<sub>d</sub> foram respectivamente, 96% e 5,93.

A determinação da estabilidade da oxidação lipídica das diferentes formulações indicou que tanto nas amostras com pele como nas sem pele, adição de polifosfato, nitrito e ascorbato resultou em redução do processo de oxidação lipídica com menores valores de TBARS em comparação às amostras controle durante todo o período de estocagem congelada (Figuras 4 e 5; Tabelas 10 e 11).



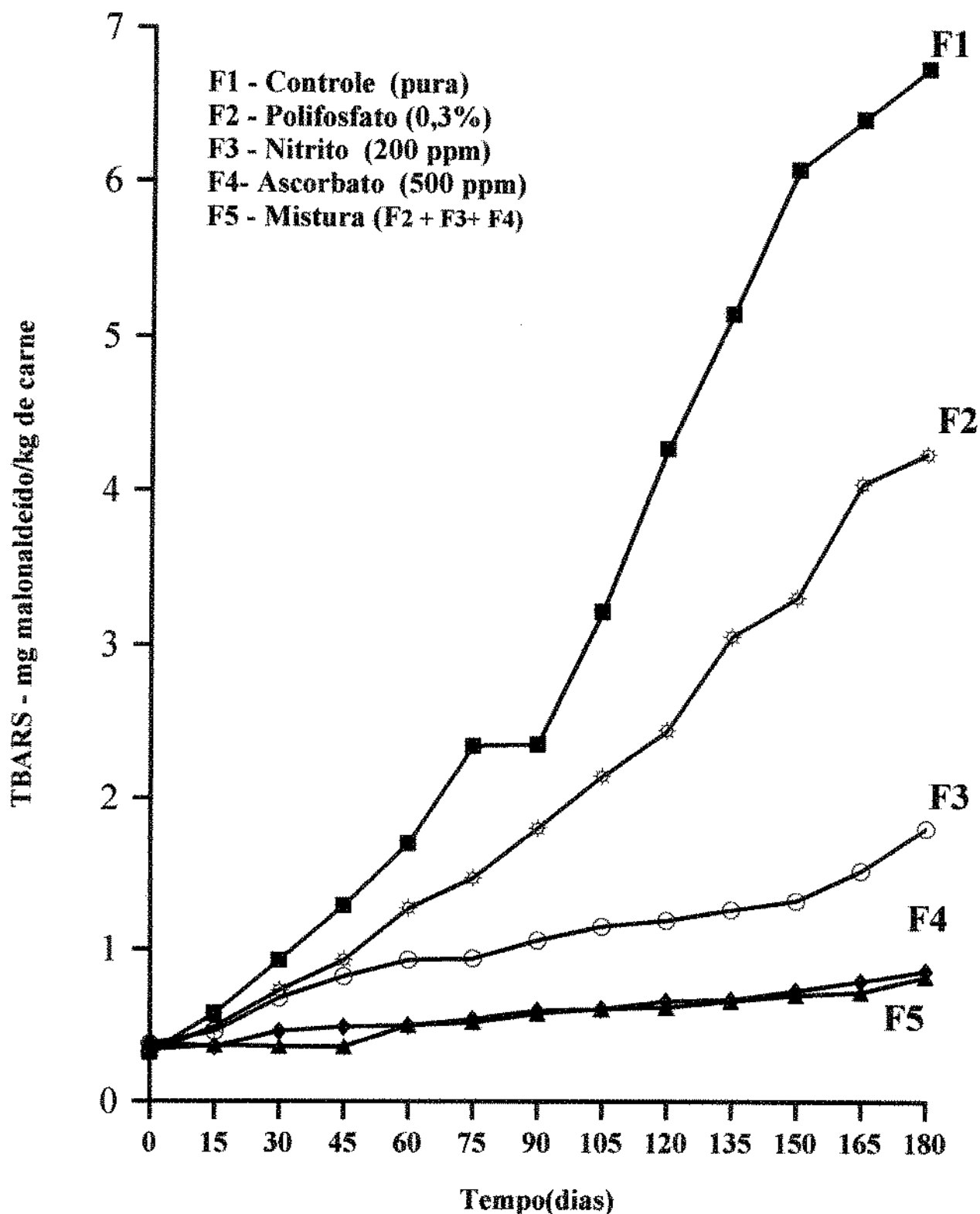


Figura 4. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio nos valores de TBARS de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC).

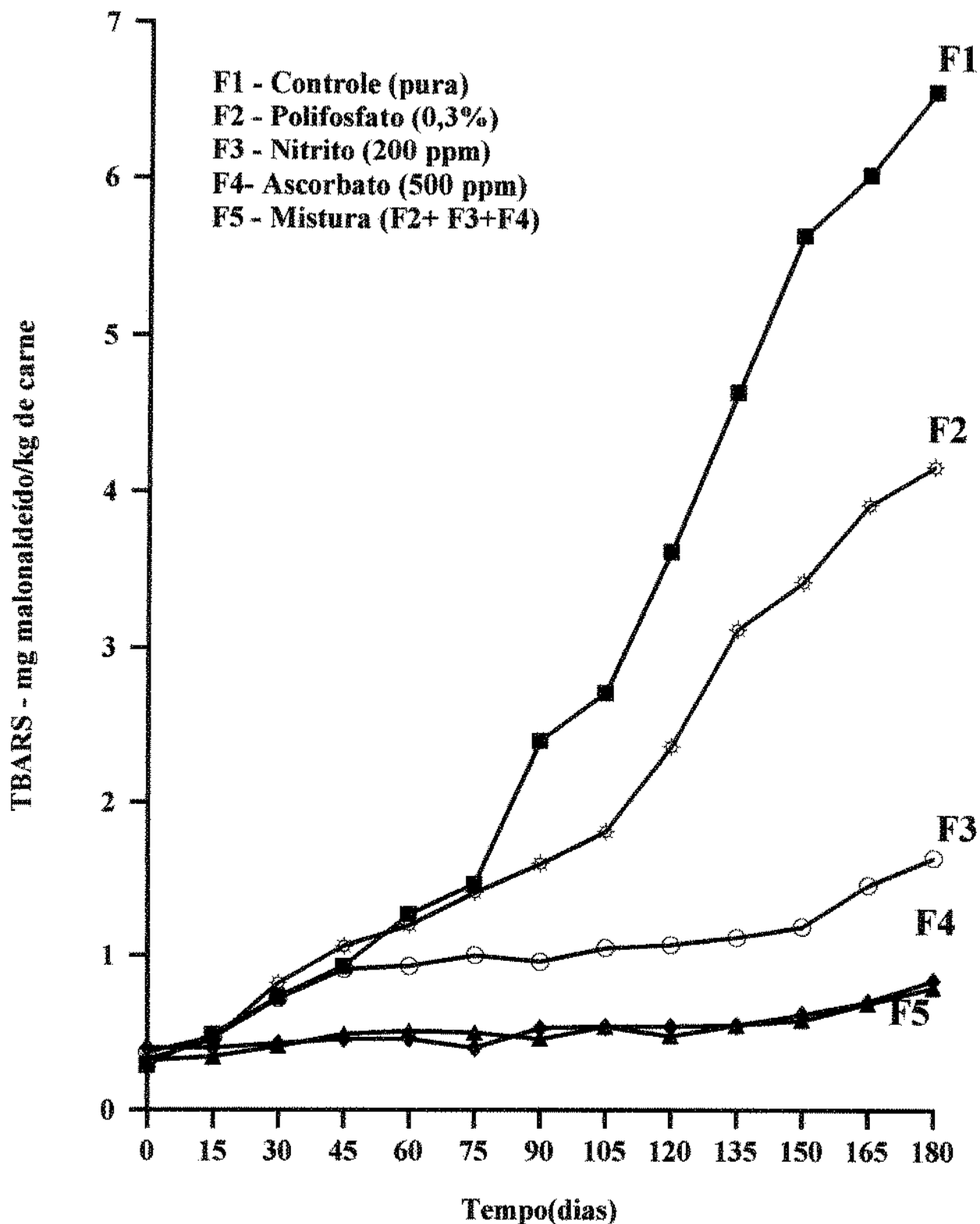


Figura 5. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio nos valores de TBARS de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-180C).

**Tabela 10 - Valores de TBARS das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18° C).**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	0,32±0,03 <sup>a</sup>	0,32±0,02 <sup>a</sup>	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,39±0,03 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>a</sup>
15	0,58±0,02 <sup>a</sup>	0,49±0,02 <sup>b</sup>	0,46±0,02 <sup>b</sup>	0,36±0,01 <sup>c</sup>	0,37±0,02 <sup>c</sup>
30	0,93±0,01 <sup>a</sup>	0,73±0,02 <sup>b</sup>	0,68±0,03 <sup>b</sup>	0,46±0,02 <sup>c</sup>	0,36±0,03 <sup>d</sup>
45	1,29±0,04 <sup>a</sup>	0,93±0,02 <sup>b</sup>	0,82±0,03 <sup>c</sup>	0,49±0,02 <sup>d</sup>	0,36±0,01 <sup>c</sup>
60	1,70±0,03 <sup>a</sup>	1,27±0,05 <sup>b</sup>	0,93±0,03 <sup>c</sup>	0,50±0,03 <sup>d</sup>	0,50±0,02 <sup>d</sup>
75	2,35±0,16 <sup>a</sup>	1,47±0,05 <sup>b</sup>	0,94±0,04 <sup>c</sup>	0,54±0,04 <sup>d</sup>	0,52±0,02 <sup>d</sup>
90	2,36±0,05 <sup>a</sup>	1,80±0,08 <sup>b</sup>	1,06±0,09 <sup>c</sup>	0,60±0,05 <sup>d</sup>	0,58±0,03 <sup>d</sup>
105	3,22±0,15 <sup>a</sup>	2,15±0,10 <sup>b</sup>	1,15±0,04 <sup>c</sup>	0,61±0,09 <sup>d</sup>	0,61±0,04 <sup>d</sup>
120	4,28±0,23 <sup>a</sup>	2,45±0,57 <sup>b</sup>	1,19±0,11 <sup>c</sup>	0,66±0,01 <sup>d</sup>	0,62±0,02 <sup>d</sup>
135	5,16±0,19 <sup>a</sup>	3,06±0,23 <sup>b</sup>	1,26±0,05 <sup>c</sup>	0,67±0,03 <sup>d</sup>	0,66±0,02 <sup>d</sup>
150	6,09±0,15 <sup>a</sup>	3,31±0,16 <sup>b</sup>	1,32±0,14 <sup>c</sup>	0,73±0,02 <sup>d</sup>	0,70±0,02 <sup>d</sup>
165	6,42±0,10 <sup>a</sup>	4,05±0,08 <sup>b</sup>	1,52±0,03 <sup>c</sup>	0,79±0,04 <sup>d</sup>	0,72±0,03 <sup>d</sup>
180	6,75±0,10 <sup>a</sup>	4,25±0,07 <sup>b</sup>	1,80±0,07 <sup>c</sup>	0,86±0,01 <sup>d</sup>	0,82±0,03 <sup>d</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 11 - Valores de TBARS das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	0,29±0,02 <sup>a</sup>	0,32±0,04 <sup>a</sup>	0,37±0,02 <sup>a</sup>	0,40±0,02 <sup>a</sup>	0,32±0,02 <sup>a</sup>
15	0,49±0,02 <sup>a</sup>	0,46±0,02 <sup>a</sup>	0,47±0,02 <sup>a</sup>	0,40±0,01 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>a</sup>
30	0,73±0,01 <sup>a</sup>	0,82±0,03 <sup>a</sup>	0,72±0,02 <sup>a</sup>	0,43±0,02 <sup>b</sup>	0,41±0,02 <sup>b</sup>
45	0,93±0,04 <sup>a</sup>	1,06±0,04 <sup>a</sup>	0,91±0,02 <sup>a</sup>	0,46±0,03 <sup>b</sup>	0,49±0,02 <sup>b</sup>
60	1,27±0,07 <sup>a</sup>	1,20±0,05 <sup>a</sup>	0,93±0,02 <sup>b</sup>	0,46±0,02 <sup>c</sup>	0,51±0,03 <sup>c</sup>
75	1,47±0,07 <sup>a</sup>	1,41±0,05 <sup>a</sup>	1,00±0,07 <sup>b</sup>	0,49±0,03 <sup>c</sup>	0,50±0,03 <sup>c</sup>
90	2,41±0,16 <sup>a</sup>	1,60±0,02 <sup>b</sup>	0,96±0,03 <sup>c</sup>	0,53±0,03 <sup>d</sup>	0,46±0,03 <sup>d</sup>
105	2,72±0,10 <sup>a</sup>	1,81±0,08 <sup>b</sup>	1,05±0,07 <sup>c</sup>	0,54±0,03 <sup>d</sup>	0,48±0,03 <sup>d</sup>
120	3,62±0,08 <sup>a</sup>	2,37±0,06 <sup>b</sup>	1,07±0,08 <sup>c</sup>	0,54±0,02 <sup>d</sup>	0,48±0,02 <sup>d</sup>
135	4,65±0,11 <sup>a</sup>	3,12±0,09 <sup>b</sup>	1,12±0,10 <sup>c</sup>	0,55±0,04 <sup>d</sup>	0,55±0,03 <sup>d</sup>
150	5,65±0,10 <sup>a</sup>	3,42±0,31 <sup>b</sup>	1,19±0,09 <sup>c</sup>	0,62±0,03 <sup>d</sup>	0,58±0,03 <sup>d</sup>
165	6,04±0,21 <sup>a</sup>	3,92±0,42 <sup>b</sup>	1,46±0,08 <sup>c</sup>	0,70±0,02 <sup>d</sup>	0,69±0,01 <sup>d</sup>
180	6,58±0,02 <sup>a</sup>	4,17±0,16 <sup>b</sup>	1,64±0,06 <sup>c</sup>	0,84±0,03 <sup>d</sup>	0,79±0,03 <sup>d</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

Matéria-prima com pele, sem adição de qualquer ingrediente, apresentou tendência ligeiramente maior à oxidação lipídica que o respectivo material sem pele. Entretanto, ao final de 6 meses de estocagem congelada, não

houve diferença significativa entre os valores de TBARS na CFMD com e sem pele. Apesar da matéria-prima sem pele possuir teores de gordura consideravelmente menores, apresenta maior teor de medula óssea incorporado conforme indicado pelo conteúdo de pigmentos totais (Tabela 12).

Segundo Pollonio & Antunes (1993) o alto teor de gordura da medula óssea de frango (43,15%) e de pigmentos totais (hemoglobina e mioglobina) foram responsáveis pela extensa oxidação lipídica que ocorreu quando diferentes teores de medula foram adicionados à músculos de peito e coxa, processados em equipamento de desossa mecânica.

#### **a. Polifosfato**

Entre os produtos adicionados, a mistura de polifosfato, nitrito e ascorbato mostrou ser a mais eficiente no controle da oxidação lipídica com variação mínima dos valores de TBARS de 0,34 e 0,32 no tempo zero para 0,82 e 0,79 após 6 meses para matéria-prima com pele e sem pele, respectivamente. Resultados praticamente idênticos foram encontrados para ascorbato (0,86 e 0,84). A seguir, menores índices de oxidação lipídica foram observados para nitrito e finalmente por polifosfato. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre  $F_5$  (mistura) e  $F_4$  (ascorbato). Entretanto, amostras com polifosfato, nitrito e ascorbato foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

Nos valores observados nas Tabelas 10 e 11 observa-se que embora amostras com polifosfato tenha resultado em valores de TBARS significativamente diferentes que as amostras controle, não foi eficiente no controle da oxidação lipídica da matéria-prima armazenada; os valores finais foram 4,25 e 4,17 para amostras com pele e sem pele respectivamente. Proteção efetiva de polifosfatos como antioxidantes tem sido descrito na literatura principalmente em carnes cozidas e sua ação antioxidante é atribuída à quelação de metais, especialmente ferro (Shahid, 1986). Johnson (1966), citado em Greene (1969), encontrou que em carne fresca, grupos fosfatos foram hidrolisados presumivelmente por fosfatase no músculo e portanto, quando se desejava utilizar fosfato como antioxidante, foi necessário, primeiramente, aquecer a carne em temperatura da ordem de 70°C.

Em relação a matéria-primas frescas, Mollins *et al.* (1987) reportaram que polifosfatos retardaram a oxidação lipídica em "patties" de carne bovina congelados. Marion & Forsythe (1962) demonstraram que polifosfatos

protegeram lipídios de carne de peru da oxidação lipídica com resultados similares ao uso de BHA (butil hidroxí anisol). Ang & Young (1986) estudaram o efeito de marinação de peito e coxa de frango congelada com solução de fosfato de sódio, concluindo que oxidação lipídica foi efetivamente inibida durante estocagem sob congelamento com subsequente descongelamento. De acordo com Dawson & Gartner (1983) polifosfatos podem ser efetivos na prevenção de oxidação durante a operação de desossa, uma vez que podem atuar como sequestrante de metais.

Uma possível explicação para a ação antioxidante de fosfatos em carnes congeladas pode estar relacionada com seu efeito sobre as proteínas miofibrilares. Adição de fosfatos induz à solubilização de actina e miosina. Com uma maior disponibilidade de proteína, interações com lipídios e sub-produtos da oxidação lipídica também aumentaria e com isso também diminuiria a probabilidade de desenvolvimento de “off-flavor” e “off-odors”, sinais óbvios de rancidez naqueles lipídios ligados às proteínas. De acordo com Buttukus (1967) malonaldeído reage com proteínas formando ligações covalentes. Dessa maneira, sub-produtos de oxidação lipídica precoce tornar-se-iam indisponíveis através de ligações com proteínas miofibrilares.

Esse mecanismo poderia explicar a redução dos valores de TBARS exibidos pelas amostras de CFMD com pele e sem pele e, como posteriormente será discutido, os mais altos valores de solubilidade encontrados para essas mesmas amostras. Essa teoria foi parcialmente suposta por Mollins (1991) e os resultados aqui reportados, até então não disponíveis na literatura parecem sugerir a viabilidade dessa hipótese.

## **b. Nitrito**

O nitrito de sódio consistentemente apresenta ação antioxidante em carnes. Dados apresentados nas Tabelas 10 e 11 demonstram esse fato, indicando que o nitrito reduziu de maneira eficiente a oxidação lipídica em CFMD com e sem pele durante armazenamento a (-18°C) . Nas amostras F<sub>3</sub> contendo 200 ppm de nitrito e na formulação F<sub>5</sub> (mistura) o teste de TBARS foi modificado de acordo com Zipser & Watts (1962). Presença de nitrito de sódio residual leva a baixos valores de TBARS devido à reação deste com malonaldeído; sulfanilamida reage com moléculas de nitrito residual resultando em melhor quantificação pela eliminação dessa interferência. Especial atenção deve ser tomada em relação ao

fato de que nitrito residual deve realmente estar presente já que sulfanilamida pode reagir com malonaldeído na ausência de nitrito. Como nas amostras o teor de nitrito foi de 200 ppm, esse erro não ocorreu.

Assim como foi observado em relação a polifosfato, estudos na literatura relatam a ação antioxidante de nitritos principalmente em carnes cozidas. Zipsler *et al.* (1964) propôs que nitrito forma um complexo estável com porfirinas desnaturadas pelo calor. Pearson *et al.* (1977) sugeriram que nitrito provavelmente estabiliza as membranas contendo lipídios prevenindo oxidação lipídica. Igene *et al.* (1985) descreveram três possíveis mecanismos pelos quais nitrito atua como agente antioxidante: (1) formação de um forte complexo com pigmentos heme prevenindo liberação de íons ferroso e sua tendência à catálise no estágio de propagação das reações de autooxidação; (2) estabilização dos lipídios insaturados das membranas e (3) servindo como um sequestrador de íons metálicos tais como íon ferroso, tornando-os indisponíveis nas reações de oxidação. Evidências têm sido apresentadas indicando que os três mecanismos estão envolvidos, mas parece que o primeiro é o mais importante. Essa discussão será aprofundada posteriormente.

Entre os poucos trabalhos que relatam a ação antioxidante de nitrito em carne fresca, Zubillaga *et al.* (1984) demonstraram que carne bovina moída tratada com 156 mg de  $\text{NaNO}_2$  (~100 ppm) apresentou baixos valores de TBARS durante três semanas de estocagem a 4°C variando de 0,50 a 0,77 mg malonaldeído/kg amostra, enquanto que amostras não tratadas os valores variaram entre 7,80-13,80. No caso do presente estudo, valores de TBARS para CFMD com pele e sem pele foram respectivamente 0,38 e 0,37 no tempo zero e 1,80 e 1,64 após 6 meses de armazenamento sob congelamento, em comparação a 6,75 e 6,58 para as respectivas amostras controle. Ao contrário da maioria das pesquisas de nitrito em carne cozida, os autores concluíram que nitrito não resulta em redução da atividade pró-oxidante do ferro nem parece envolver um produto de adição de óxidos de nitrogênio às duplas ligações de ácidos graxos insaturados. A atividade antioxidante de nitrito foi atribuída a uma associação com a fração de lipídios polares, gerando um fator antioxidante em carne fresca, o qual foi estável por vários meses a -20°C. A natureza e características desse fator, entretanto, não foram elucidadas.

Durante o congelamento, nenhuma etapa de desnaturação severa ocorre como no aquecimento, assim é provável que nitrito se associe com lipídios

susceptíveis ao processo de oxidação (Karel, 1973). A natureza dessa associação, entretanto, permanece desconhecida. Goutenfongea *et al.* (1977) estudaram a reação de nitrito de sódio com tecido adiposo e determinaram que cerca de 2-3% do nitrito ligaram-se aos lipídios, sugerindo que a associação ocorrida esteve relacionada com o grau de insaturação dos lipídios, onde nitrito ou derivados reagiram com uma ou mais duplas ligações.

O efeito do nitrito na proteção contra autooxidação é descrito por Sato & Hegarty (1971); Igene *et al.* (1979), Fooladi *et al.* (1979) e Chen *et al.* (1984)..

### **c. Ascorbato e oxidação de pigmentos heme**

Ascorbato na concentração de 500 ppm foi o ingrediente individual mais efetivo na prevenção da oxidação lipídica em carne de dorso de frango mecanicamente desossada com pele e sem pele. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre CFMD contendo ascorbato e a formulação F<sub>5</sub> (mistura) com valores muito baixos do número de TBARS, aproximadamente 0,84. As formulações F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub>, entretanto, foram significativamente diferentes das demais (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>). Não houve diferença significativa entre amostras com pele e sem pele.

Informações a respeito da adição de ascorbato em produtos frescos variam consideravelmente na literatura (Deng *et al.*, 1977; Liu & Watts, 1970; Love & Pearson, 1974; Sato & Hegarty, 1971). Deng *et al.* (1978) reportaram que a ação de ascorbato em alimentos depende do potencial de oxidação redução do sistema, pH, atmosfera aeróbica ou anaeróbica, presença ou ausência de metais oxidantes e quantidade de ascorbato em relação às concentrações de outros reagentes no processo de oxidação; enzimas e tempo.

Saleh & Watts (1968) demonstraram que ascorbato atuou como antioxidante em gorduras insaturadas quando hemoglobina ou extrato de músculo estiveram presentes. Esse sistema modelo é muito semelhante ao da CFMD já que o pigmento heme predominante é a hemoglobina (Tabelas 12 e 13), o que pode explicar em partes os dados aqui obtidos. Liu (1970a) reportou que ácido ascórbico acelerou catálise de ferro não-hemínico mas inibiu a do ferro hemínico. De acordo com Sato & Hegarty (1971) e Love & Pearson (1974), baixos níveis de ascorbato estimularam catálise de íon ferroso em carne cozida e resíduo extraído de músculo, enquanto que altos níveis foram inibidores. Os autores sugeriram que

ascorbato foi responsável pelo balanço entre as formas ferrosa e fêrrica e ainda atuou como sequestrador de O<sub>2</sub>. Foi verificada ainda a eficiência da combinação ascorbato-fosfato na prevenção do processo de autooxidação, tendo sido proposto que ascorbato criou condições redutoras e pelo menos uma considerável parte do ferro permaneceu no estado ferroso. Saleh & Watts (1968) demonstraram também que a atividade redutora em carne fresca desempenhou importante papel na proteção contra oxidação lipídica. Adição de substratos que forneçam elétrons ao NAD e metamioglobina mantém a carne no estado reduzido e efetivamente retardam a oxidação lipídica.

Oxidação lipídica ocorrida em carnes vem acompanhada por alterações nos pigmentos heme e portanto na cor da carne. Pigmentos são mais susceptíveis à oxidação se a porção hemoglobina estiver desnaturada. Entretanto, Little *et al.* (1968) indicaram que destruição da parte heme da hemoglobina pode ser o principal ponto de ataque por hidroperóxidos. Medidas das mudanças nas concentrações desses pigmentos ao longo da estocagem congelada são importantes na avaliação dos resultados reportados. De acordo com Nakhost & Karel (1985), a medida da extensão da oxidação lipídica, usando métodos clássicos do número de TBARS e índice de peróxidos podem ser inadequados em certos sistemas envolvendo carnes. Em função disso, os autores desenvolveram uma metodologia para detecção do processo de autooxidação em carnes liofilizadas baseada em mudanças induzidas pela oxidação na mioglobina. Medidas desse índice foram reportadas como porcentagem de insolubilização da mioglobina com determinação do decréscimo na absorbância dos extratos de carnes a 525 nm (derivados de mioglobina) e porcentagem de oxidação da mioglobina, quantificada pela medida da absorbância da metamioglobina (630 nm).

O método para determinação de pigmentos utilizado neste trabalho determina as porcentagens de mioglobina e hemoglobina convertidos a cianetomioglobina e cianetohemoglobina (absorbância de 540 nm) e portanto pigmentos oxidados durante congelamento não são estimados, indicando assim, a extensão da oxidação desses componentes.

De acordo com as Tabelas 12 e 13, teores de pigmentos totais foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em CFMD sem pele em relação às amostras com pele (~30%), devido ao aumento de medula óssea incorporada, principalmente hemoglobina, já que os teores de mioglobina praticamente não mudaram nas amostras com pele e sem pele. Não houve diferenças significativas



entre os teores de pigmentos totais nas cinco formulações ( $p < 0,05$ ) indicando que os aditivos não interferiram no método utilizado.

Durante o período de armazenamento sob congelamento, amostras controle e com fosfato ( $F_1$  e  $F_2$ ) apresentaram concentrações de pigmentos totais (mg/g), mioglobina e hemoglobina significativamente diferentes (tempos 0, 3 e 6 meses), com considerável redução nos valores inicialmente obtidos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 14). Fosfato portanto, não preveniu oxidação dos pigmentos heme, sendo que as porcentagens de perda de pigmentos totais foram respectivamente de 38 e 42% para amostras com pele e sem pele. Ao se comparar esses dados com os elevados valores de TBARS dessas mesmas amostras, conclui-se que oxidação dos pigmentos heme constituiu-se num fator determinante da oxidação das matéria-primas.

**Tabela 12 - Determinação de pigmentos heme, mioglobina (Mb) e hemoglobina (Hb) (mg/g) das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
(meses)	Mb	Hb	Mb	Hb	Mb	Hb	Mb	Hb	Mb	Hb
0	1,12±0,06 <sup>a</sup>	3,06±0,11 <sup>a</sup>	1,08±0,05 <sup>a</sup>	3,11±0,15 <sup>a</sup>	1,13±0,16 <sup>a</sup>	3,13±0,05 <sup>a</sup>	1,14±0,10 <sup>a</sup>	3,20±0,07 <sup>a</sup>	1,07±0,05 <sup>a</sup>	3,18±0,17 <sup>a</sup>
3	0,89±0,05 <sup>b</sup>	2,72±0,14 <sup>b</sup>	0,81±0,06 <sup>b</sup>	2,77±0,24 <sup>b</sup>	0,93±0,04 <sup>a</sup>	2,99±0,06 <sup>a</sup>	1,08±0,05 <sup>a</sup>	3,14±0,01 <sup>ab</sup>	1,00±0,02 <sup>a</sup>	3,12±0,13 <sup>a</sup>
6	0,70±0,10 <sup>c</sup>	2,14±0,21 <sup>c</sup>	0,73±0,09 <sup>c</sup>	2,30±0,12 <sup>c</sup>	0,74±0,06 <sup>b</sup>	2,34±0,10 <sup>b</sup>	1,02±0,03 <sup>a</sup>	3,00±0,15 <sup>b</sup>	0,98±0,06 <sup>a</sup>	2,92±0,15 <sup>a</sup>

F1 - Controle; F2 - Fosfato; F3 - Nitrito; F4 - Ascorbato; F5 - Mistura

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

**Tabela 13 - Determinação de pigmentos heme, mioglobina (Mb) e hemoglobina (Hb) (mg/g) das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
(meses)	Mb	Hb	Mb	Hb	Mb	Hb	Mb	Hb	Mb	Hb
0	1,25±0,14 <sup>a</sup>	4,25±0,09 <sup>a</sup>	1,21±0,11 <sup>a</sup>	4,20±0,08 <sup>a</sup>	1,27±0,06 <sup>a</sup>	4,17±0,16 <sup>a</sup>	1,29±0,18 <sup>a</sup>	4,31±0,09 <sup>a</sup>	1,30±0,14 <sup>a</sup>	4,25±0,16 <sup>a</sup>
3	0,97±0,05 <sup>b</sup>	3,74±0,13 <sup>b</sup>	1,03±0,05 <sup>b</sup>	3,49±0,17 <sup>b</sup>	1,04±0,03 <sup>b</sup>	3,75±0,12 <sup>b</sup>	1,23±0,12 <sup>a</sup>	4,19±0,02 <sup>a</sup>	1,21±0,07 <sup>a</sup>	4,20±0,07 <sup>a</sup>
6	0,75±0,08 <sup>c</sup>	2,76±0,16 <sup>c</sup>	0,79±0,03 <sup>c</sup>	3,02±0,15 <sup>c</sup>	0,80±0,05 <sup>c</sup>	3,00±0,08 <sup>c</sup>	1,16±0,12 <sup>a</sup>	4,10±0,03 <sup>b</sup>	0,17±0,05 <sup>a</sup>	4,02±0,09 <sup>b</sup>

F1 - Controle; F2 - Fosfato; F3 - Nitrito; F4 - Ascorbato; F5 - Mistura

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

**Tabela 14 - Variação na concentração de pigmentos totais (mg/g) em CFMD com e sem pele (C/P; S/P) durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	C/P	S/P	C/P	S/P	C/P	S/P	C/P	S/P	C/P	S/P
0	4,18±0,24 <sup>a</sup>	5,30±0,02 <sup>a</sup>	4,19±0,27 <sup>a</sup>	5,41±0,17 <sup>a</sup>	4,26±0,19 <sup>a</sup>	5,44±0,05 <sup>a</sup>	4,34±0,32 <sup>a</sup>	5,60±0,24 <sup>a</sup>	4,25±0,05 <sup>a</sup>	5,56±0,31 <sup>a</sup>
3	3,61±0,15 <sup>b</sup>	4,51±0,03 <sup>b</sup>	3,70±0,29 <sup>b</sup>	4,52±0,16 <sup>b</sup>	3,92±0,14 <sup>a</sup>	4,79±0,09 <sup>a</sup>	4,22±0,41 <sup>a</sup>	5,42±0,52 <sup>a</sup>	4,12±0,50 <sup>a</sup>	5,41±0,17 <sup>a</sup>
6	2,84±0,09 <sup>c</sup>	3,51±0,17 <sup>c</sup>	3,03±0,36 <sup>c</sup>	3,81±0,33 <sup>c</sup>	3,08±0,15 <sup>b</sup>	3,80±0,14 <sup>b</sup>	4,02±0,34 <sup>a</sup>	5,26±0,61 <sup>a</sup>	3,90±0,23 <sup>b</sup>	5,19±0,23 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

Nitrito de sódio protegeu pigmentos heme até o terceiro mês de armazenamento, conforme indicado pelos resultados não estatisticamente diferentes nessas datas (p<0,05) tanto nas amostras com pele como nas sem pele. Resultados, entretanto, de pigmentos totais, mioglobina e hemoglobina obtidos ao final do sexto mês de estocagem foram significativamente diferentes daqueles nos tempos 0 e 3 meses (p<0,05), com porcentagem de redução na concentração de pigmentos totais muito próximas às formulações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>.

Considerando-se os baixos valores de TBARS obtidos no sexto mês quando nitrito foi incorporado a CFMD, pode-se concluir que nitrito atuou como agente antioxidante através de outro mecanismo além da proteção dos pigmentos heme, já que esta ocorreu parcialmente. Mais uma vez, os dados aqui reportados fornecem subsídios para supor a existência de uma ligação entre nitrito e lipídios gerando uma ação antioxidante.

Ascorbato (F<sub>4</sub>) e mistura dos três ingredientes (polifosfato, nitrito e ascorbato) (F<sub>5</sub>) foram as formulações mais eficientes na prevenção da oxidação de pigmentos heme, não tendo sido encontrados valores significativamente diferentes para estas amostras, ao longo de todo período de armazenamento e nem entre as amostras (P<0,05).

Comparando-se os respectivos valores de TBARS para as amostras com ascorbato e a formulação F<sub>5</sub>, os quais foram os menores obtidos, a proteção dos pigmentos heme proporcionada por esses mesmos ingredientes e o resultados obtidos com fosfato, conclui-se que oxidação de pigmentos heme é o fator mais importante na autooxidação de CFMD crua com pele e sem pele.

Uma outra forte evidência dessa proteção dos pigmentos heme observada pelo uso de ascorbato no material fresco, são os valores L\*

(Luminosidade), a\* (intensidade de vermelho) e b\* (intensidade de amarelo) das amostras ao longo da estocagem apresentados nas Tabelas 15 e 16.

**Tabela 15 - Avaliação de cor (valores L\*, a\*, b\*), das formulações de CFMD com e sem pele (C/P; S/P) durante armazenamento sob congelamento (-18°C) - superfície interna.**

Amostra	t = 0 mês			t = 3 meses			t = 6 meses		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
F <sub>1</sub> C/P	53,4±1,43 <sup>a</sup>	9,3±0,17 <sup>b</sup>	10,3±0,30 <sup>a</sup>	51,2±1,67 <sup>b</sup>	7,9±0,96 <sup>a</sup>	10,2±0,17 <sup>a</sup>	49,2±1,60 <sup>b</sup>	7,0±1,63 <sup>b</sup>	10,8±0,71 <sup>a</sup>
S/P	49,1±1,21 <sup>a</sup>	11,8±1,34 <sup>a</sup>	9,3±0,16 <sup>a</sup>	46,3±1,74 <sup>b</sup>	11,3±0,45 <sup>a</sup>	9,6±0,18 <sup>a</sup>	43,2±1,30 <sup>b</sup>	10,3±0,71 <sup>b</sup>	9,8±0,92 <sup>a</sup>
F <sub>2</sub> C/P	50,7±1,81 <sup>a</sup>	8,6±0,32 <sup>a</sup>	10,1±0,27 <sup>a</sup>	49,2±1,30 <sup>a</sup>	6,9±0,64 <sup>a</sup>	9,8±0,19 <sup>a</sup>	48,5±1,45 <sup>b</sup>	6,9±0,82 <sup>a</sup>	9,9±0,39 <sup>a</sup>
S/P	44,3±1,32 <sup>a</sup>	11,2±0,11 <sup>a</sup>	9,5±0,48 <sup>a</sup>	43,0±1,14 <sup>a</sup>	8,6±0,71 <sup>a</sup>	9,4±0,15 <sup>a</sup>	42,8±1,32 <sup>b</sup>	8,4±0,67 <sup>a</sup>	9,6±0,67 <sup>a</sup>
F <sub>3</sub> C/P	51,6±1,16 <sup>a</sup>	8,9±0,47 <sup>a</sup>	10,3±0,97 <sup>a</sup>	50,2±2,01 <sup>a</sup>	7,4±0,82 <sup>a</sup>	10,8±0,61 <sup>a</sup>	50,1±1,15 <sup>a</sup>	7,5±0,94 <sup>a</sup>	10,3±0,85 <sup>a</sup>
S/P	46,4±1,24 <sup>a</sup>	11,0±0,88 <sup>a</sup>	9,5±0,85 <sup>a</sup>	45,2±1,86 <sup>a</sup>	10,6±0,15 <sup>a</sup>	9,9±0,71 <sup>a</sup>	44,9±1,17 <sup>b</sup>	10,3±0,43 <sup>a</sup>	10,2±0,38 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub> C/P	53,8±2,01 <sup>a</sup>	9,5±0,97 <sup>a</sup>	10,5±0,79 <sup>a</sup>	53,2±1,74 <sup>a</sup>	8,9±0,24 <sup>a</sup>	10,6±0,41 <sup>a</sup>	53,1±1,50 <sup>a</sup>	8,8±0,78 <sup>b</sup>	10,3±0,72 <sup>a</sup>
S/P	49,0±1,42 <sup>a</sup>	11,7±0,60 <sup>b</sup>	9,7±0,61 <sup>a</sup>	48,7±1,68 <sup>a</sup>	11,2±0,16 <sup>a</sup>	9,8±0,27 <sup>a</sup>	48,6±1,61 <sup>a</sup>	11,2±0,21 <sup>a</sup>	9,9±0,87 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub> C/P	51,2±1,54 <sup>a</sup>	9,0±0,71 <sup>a</sup>	10,9±1,00 <sup>a</sup>	51,0±1,34 <sup>a</sup>	8,5±0,91 <sup>a</sup>	10,5±0,88 <sup>a</sup>	51,0±1,92 <sup>a</sup>	8,5±0,91 <sup>a</sup>	10,8±0,45 <sup>a</sup>
S/P	48,3±1,31 <sup>a</sup>	10,5±0,77 <sup>a</sup>	9,1±0,95 <sup>a</sup>	48,9±1,52 <sup>a</sup>	10,2±0,16 <sup>a</sup>	9,3±0,70 <sup>a</sup>	48,1±1,30 <sup>a</sup>	10,3±0,21 <sup>a</sup>	9,8±0,35 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 16 - Avaliação de cor (valores L\*, a\*, b\*), das formulações de CFMD com e sem pele (C/P; S/P) durante armazenamento sob congelamento (-18°C) - superfície externa**

Amostra	t = 0 mês			t = 3 meses			t = 6 meses		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
F <sub>1</sub> C/P	53,5±1,43 <sup>a</sup>	9,4±0,29 <sup>a</sup>	10,5±0,85 <sup>a</sup>	46,7±1,49 <sup>b</sup>	8,0±0,46 <sup>b</sup>	10,2±0,43 <sup>ab</sup>	42,2±1,24 <sup>c</sup>	6,8±0,71 <sup>c</sup>	9,5±0,42 <sup>b</sup>
S/P	48,6±1,23 <sup>a</sup>	11,3±0,55 <sup>b</sup>	9,5±0,33 <sup>a</sup>	40,5±1,39 <sup>b</sup>	9,7±0,50 <sup>b</sup>	9,1±0,21 <sup>a</sup>	36,3±1,53 <sup>c</sup>	7,8±0,54 <sup>c</sup>	8,6±0,36 <sup>b</sup>
F <sub>2</sub> C/P	50,7±2,87 <sup>a</sup>	8,7±0,76 <sup>a</sup>	10,3±0,46 <sup>a</sup>	48,6±2,01 <sup>b</sup>	7,9±0,45 <sup>b</sup>	10,1±0,91 <sup>a</sup>	46,7±1,53 <sup>c</sup>	7,0±0,78 <sup>c</sup>	9,3±0,34 <sup>b</sup>
S/P	44,6±1,24 <sup>a</sup>	10,8±0,56 <sup>a</sup>	9,7±0,68 <sup>a</sup>	41,3±2,32 <sup>b</sup>	9,1±0,42 <sup>a</sup>	9,3±0,55 <sup>a</sup>	39,8±1,34 <sup>c</sup>	7,9±0,42 <sup>c</sup>	8,3±0,28 <sup>b</sup>
F <sub>3</sub> C/P	51,3±1,31 <sup>a</sup>	9,0±0,72 <sup>a</sup>	10,0±0,41 <sup>a</sup>	47,6±1,48 <sup>b</sup>	8,3±0,32 <sup>a</sup>	9,8±0,87 <sup>a</sup>	45,2±1,21 <sup>c</sup>	6,9±0,44 <sup>b</sup>	9,7±0,94 <sup>a</sup>
S/P	46,7±2,35 <sup>a</sup>	11,8±0,69 <sup>b</sup>	9,3±0,57 <sup>a</sup>	44,2±1,67 <sup>b</sup>	10,5±0,33 <sup>a</sup>	9,5±0,81 <sup>a</sup>	42,1±1,35 <sup>c</sup>	7,3±0,35 <sup>b</sup>	9,0±0,24 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub> C/P	53,7±1,81 <sup>a</sup>	9,5±0,51 <sup>a</sup>	10,2±0,84 <sup>a</sup>	53,1±1,27 <sup>a</sup>	8,8±0,58 <sup>a</sup>	10,4±0,67 <sup>a</sup>	52,9±1,63 <sup>a</sup>	8,3±0,83 <sup>a</sup>	10,5±0,51 <sup>a</sup>
S/P	49,2±1,92 <sup>a</sup>	11,5±0,40 <sup>a</sup>	9,3±0,47 <sup>a</sup>	48,7±1,37 <sup>a</sup>	11,2±0,71 <sup>a</sup>	9,5±0,38 <sup>a</sup>	47,5±1,85 <sup>a</sup>	11,0±0,58 <sup>a</sup>	9,6±0,63 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub> C/P	51,3±1,67 <sup>a</sup>	9,1±0,34 <sup>a</sup>	10,1±1,85 <sup>a</sup>	51,1±1,87 <sup>a</sup>	8,9±0,83 <sup>a</sup>	9,8±0,43 <sup>a</sup>	50,8±1,41 <sup>a</sup>	8,8±0,37 <sup>a</sup>	9,9±0,27 <sup>a</sup>
S/P	48,4±2,01 <sup>a</sup>	10,9±0,53 <sup>a</sup>	9,5±0,46 <sup>a</sup>	48,9±1,46 <sup>a</sup>	10,6±0,61 <sup>a</sup>	9,3±0,24 <sup>a</sup>	48,2±1,51 <sup>a</sup>	10,4±0,86 <sup>a</sup>	9,3±0,72 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

Avaliação da cor externa dos blocos de CFMD congelada demonstrou que valores de L\*, indicador de luminosidade, mudaram significativamente durante armazenamento nas amostras controle e na formulação com fosfato, no material com pele e sem pele. Valores de a\*, os quais são tomados como índice de intensidade de cor vermelha, foram reduzidos significativamente (p<0,05) ao longo do armazenamento, nas mesmas amostras.

Para CFMD com nitrito, com pele e sem pele ( $F_3$ ), valores de  $L^*$  e  $a^*$  foram diferentes significativamente apenas no sexto mês de estocagem.

Formulações com ascorbato ( $F_4$ ) e mistura ( $F_5$ ) não tiveram seus valores de  $L^*$  e  $a^*$  alterados significativamente ao longo da estocagem ( $p < 0,05$ ). Avaliação visual demonstrou que CFMD com ascorbato esteve o mais próximo possível da cor vermelha do material recém-desossado. A formulação  $F_5$  contendo ascorbato, nitrito e fosfato apresentou-se ligeiramente mais opaca com menores valores de  $a$  (menos vermelha). A formulação com fosfato ( $F_2$ ) apresentou os menores valores de  $L^*$  e  $a^*$ , aparentando também uma coloração opaca. De acordo com Ambrosiadis & Wirth (1984), adição de fosfato em "batters" de salsicha levou a uma ligeira redução na intensidade da cor vermelha. Entretanto, enquanto na formulação  $F_2$ , o teor de vermelho ( $a^*$ ) decresceu com o tempo de estocagem, em  $F_5$ , valores de  $a^*$  mantiveram-se estáveis.

De um modo geral, tempo de armazenamento teve muito pouca influência nos valores de  $b^*$ , sendo que a análise de variância não acusou efeitos significativos. Valores mais altos de  $b^*$  são causados pela presença de pele na matéria-prima original e maior teor de gordura com essa cor típica.

A importância desses resultados está no fato de que um dos problemas mais críticos no emprego de CFMD a nível industrial é oxidação dos pigmentos da camada superficial, produzindo uma cor marrom escura, esverdeada, sem que a carne esteja deteriorada e ainda muitas vezes dentro do prazo previsto pela legislação para sua utilização. O que se costuma proceder nesses casos é a remoção dessa camada com coloração anormal, mas, além da mão-de-obra e inconvenientes envolvidos, é certo que a oxidação que induziu tal descoloração produziu malonaldeído e outros sub-produtos do processo de autoxidação os quais serão incorporados no processamento.

Avaliação de cor através dos valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  das camadas internas das diferentes formulações indicou que somente  $F_1$  (controle) e  $F_2$  (fosfato) tiveram perda de luminosidade significativa no tempo ( $t = 6$  meses). Deve-se considerar que as leituras foram realizadas nos centros dos blocos, região onde os pigmentos heme estão mais protegidos da catálise oxidativa.

Os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  para CFMD estão de acordo com vários trabalhos reportados na literatura (Dhillon & Maurer, 1975a; Mast & McNeil, 1976; Dawson *et al.*, 1988a).

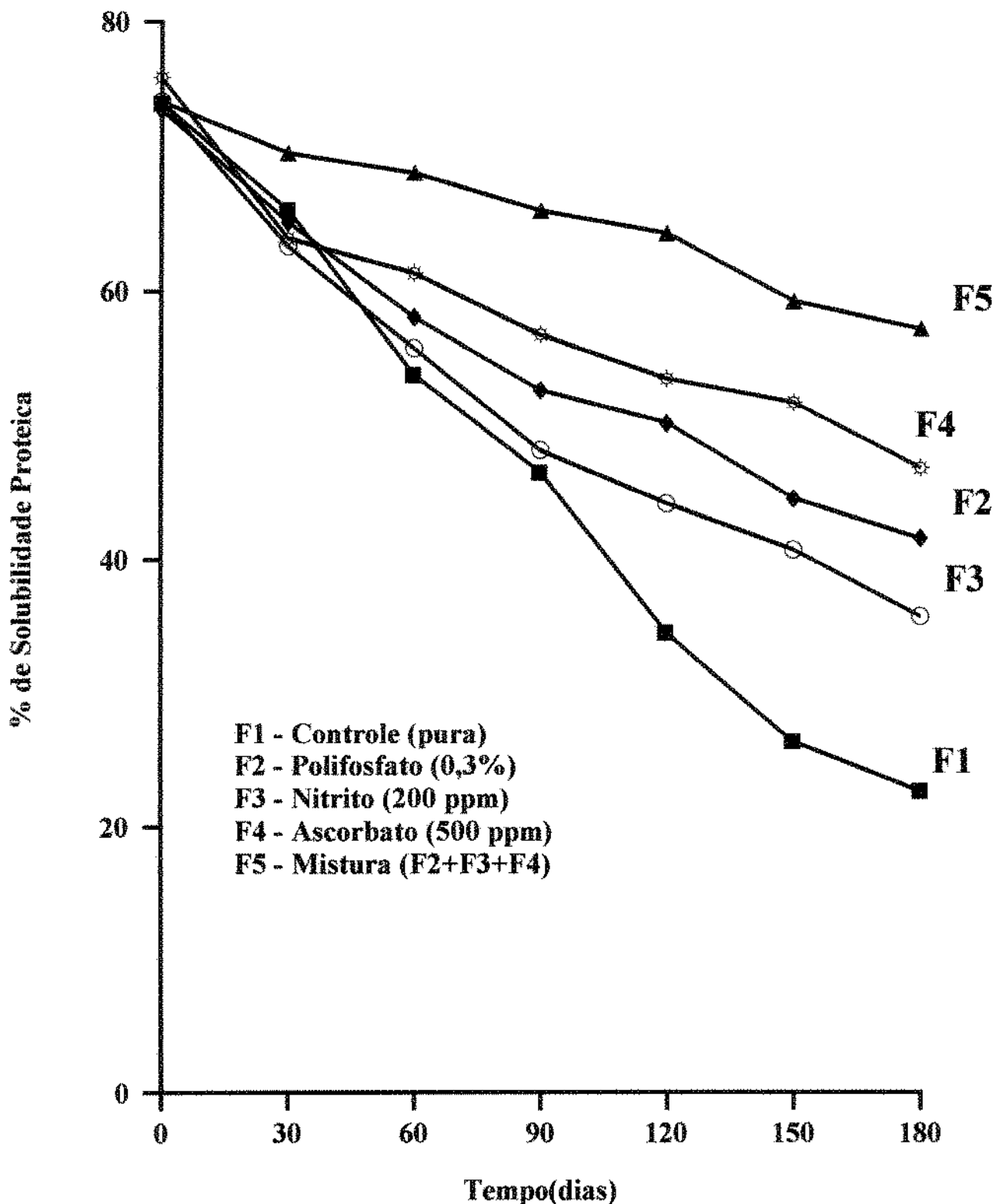
## **2. Avaliação das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares extraídas das diferentes misturas de CFMD e do grau de desnaturação protéica**

### **2.1. Solubilidade**

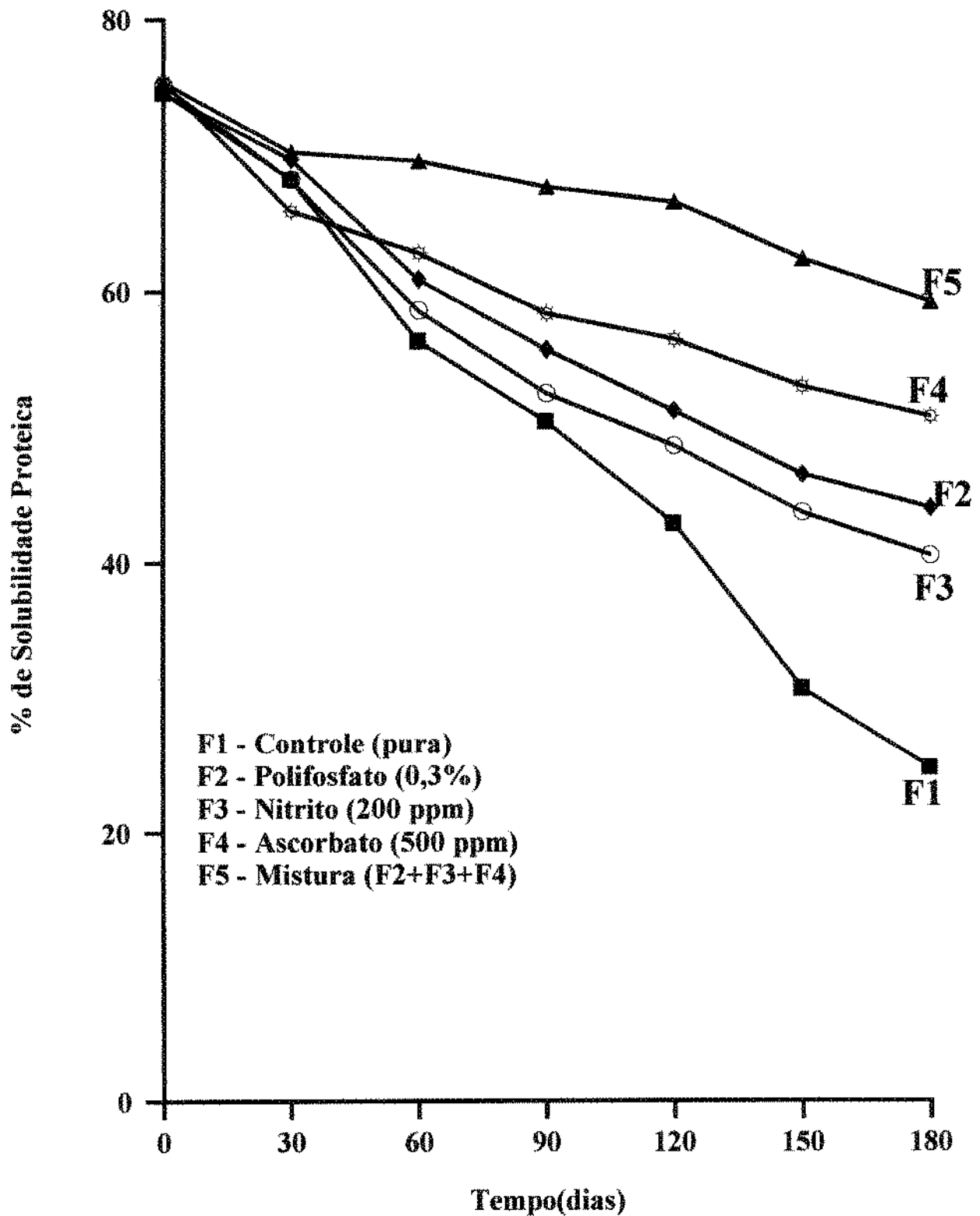
Os resultados apresentados nas Figuras 6 e 7 e nas Tabelas A1 e A2 (Apêndice) indicam que solubilidade inicial em todas as amostras não atingiu 100% ficando em torno de 75%. Isto pode ter sido causado pela contaminação com proteínas insolúveis durante a extração, bem como pela desnaturação nas etapas de precipitação e resolubilização ou ainda em função do próprio processo de desossa mecânica o qual rompe completamente as fibras musculares levando a uma insolubilização inicial parcial das proteínas miofibrilares (Smith & Brekke, 1985; Dawson *et al.*, 1988a).

Nas extrações realizadas logo após o preparo das formulações (no máximo até 24-36 horas de espera, sob refrigeração) não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores iniciais de solubilidade, que ficou ao redor de 75%. Ao final do período de armazenamento, CFMD com e sem pele controles ( $F_1$ ) apresentaram uma intensa redução na porcentagem de proteína solúvel, com valores, respectivamente, de 22,69 e 24,94%, indicando que a desnaturação protéica foi mais intensa quando nenhum ingrediente foi adicionado. A porcentagem de solubilidade protéica é o primeiro índice a ser determinado na avaliação do grau de desnaturação de uma proteína e está correlacionada com a maioria das outras propriedades funcionais (Kinsella, 1976).

Essa intensa redução na porcentagem de solubilidade foi simultânea à elevação nos valores de TBARS discutido previamente indicando que a presença de lipídios oxidados pode ter contribuído para a redução da solubilidade. De acordo com Karel (1973), a peroxidação de lipídios em músculos congelado pode levar a várias interações com proteínas, especialmente miosina. Anderson & Steinberg (1964) relataram que a concentração de ácidos graxos aumentou durante o armazenamento de peixe sob congelamento, o que foi correlacionado com perda de solubilidade protéica quando proteína reagiu com ácido linoleico e linolênico. Smith *et al.* (1990) determinaram que a solubilidade de miofibrilas de tecido muscular decresceu quando estas foram armazenadas em sistemas de metil linoleato e oxidadas a diferentes atividades de água, indicando que lipídios oxidados tiveram efeito prejudicial sobre a solubilidade das proteínas. Narayan *et al.* (1964) estudaram a interação entre lipídios-proteínas em sistemas modelos e descobriram que a formação de complexos ocorreu somente quando lipídios foram peroxidados.



**Figura 6. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio na % de solubilidade das proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC).**



**Figura 7.** Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio na % de solubilidade das proteínas miofibrilares de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC).

Nas amostras sem pele as porcentagens de solubilidade foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos valores encontrados nas amostras com pele (Tabelas A1 e A2 - Apêndice). O elevado teor de gordura da CFMD com pele pode ter sido responsável pelo decréscimo na porcentagem de solubilidade observada nessas amostras. Shenouda & Pigot (1974, 1976) reportaram que miosina e actina ligaram-se a lipídios durante extração do tecido muscular.

Entre as formulações estudadas, F<sub>5</sub> (mistura) foi a que resultou em maiores valores de solubilidade, indicando que ação conjunta dos três ingredientes apresentou ação sinérgica, uma vez que já no 2<sup>o</sup> mês de estocagem, as porcentagens de solubilidade foram diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ) e superiores às demais. Ao final do 6<sup>o</sup> mês de estocagem, a porcentagem de redução dos valores de solubilidade protéica em relação ao valor inicial foram respectivamente 22,50 e 21,90% para amostras com pele e sem pele, consideravelmente inferior à CFMD controle cujos valores foram de 69,28 e 66,57%.

Para os ingredientes adicionados individualmente, a análise de variância indicou que a adição de fosfato resultou em valores de % de solubilidade significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) em relação a nitrito a partir do 2<sup>o</sup> mês e ascorbato a partir do 3<sup>o</sup> mês.

A discussão previamente realizada correlacionando extensão da oxidação lipídica e alterações das propriedades funcionais, no caso de solubilidade, não é válida para formulações com fosfato, uma vez que tais amostras apresentaram altos valores de TBARS, apenas inferiores à formulação controle. Portanto, o mecanismo pelo qual fosfato evitou redução da solubilidade não esteve relacionado ao grau de oxidação lipídica. A hipótese proposta neste trabalho é que o fosfato deve ter-se ligado às proteínas impedindo formação, ou ao menos minimizando interação das proteínas miofibrilares com lipídios oxidados, exercendo, portanto, um efeito protetor sobre proteínas, sem, entretanto, atuar como antioxidante. A teoria envolvendo fosfatos e proteínas reforçam esta hipótese.

A solubilidade de uma proteína depende principalmente do pH, força iônica e temperatura. A dependência do pH está relacionada à carga líquida da proteína. A adição de tripolifosfato de sódio aumentou o pH da formulação F<sub>2</sub> e F<sub>5</sub> (mistura) em aproximadamente 0,4 unidades de pH. Amostras de CFMD com



fosfato apresentaram também maior rendimento de extração das proteínas miofibrilares.

Os fosfatos também aumentam a força iônica de soluções; quando a concentração de íons aumenta, aumenta também a ligação desses íons a grupos ionizados de cargas opostas nas moléculas de proteínas, alterando sua carga líquida (Mollins, 1991). Atrações eletrostáticas entre moléculas de proteínas decrescem, reduzindo agregação e aumentando solubilidade, um efeito comumente conhecido como "salting in". Portanto, adição de fosfatos à CFMD, através de aumento de pH e força iônica, contribuem para manter as proteínas dissociadas e mais solúveis. Hellendorn (1962) demonstrou que fosfatos foram capazes de abaixar o ponto isoelétrico das proteínas da carne, o que ele considerou ser indicador da ligação predominante dos ânions fosfato com proteínas miofibrilares.

Park & Lanier (1987) demonstraram que os fosfatos induziram à estabilização da miosina durante armazenamento sob congelamento, reduzindo consideravelmente insolubilização, fato que os autores atribuíram à formação de ligações hidrogênio, intermoleculares, hidrofóbicas e ligações dissulfídicas. De acordo com esses autores, actomiosina de carpa não foi completamente desnaturada quando congelada em solução tampão de fosfato. Siegel & Schmidt (1979) reportaram que fosfato (0,5% de tripolifosfato de sódio) induziram a um aumento linear na capacidade de ligação e gelatinização da miosina presente em seções de carne bovina fresca, cujo efeito foi atribuído à dissociação da actomiosina contaminante pelos fosfatos. Microscopia de varredura de géis de miosina contendo tripolifosfato aquecido a 90°C tiveram uma rede tridimensional nas quais as fibras se sobrepuseram; em contraste, uma microestrutura tipo esponja ocorreu na ausência desses sais.

Yasui *et al.* (1964) determinaram que a principal proteína extraída das miofibrilas por fosfatos foi idêntica à miosina B ou actomiosina. Através de análises cromatográficas e ultracentrifugação, estes pesquisadores determinaram que tripolifosfato levou a mudanças no tamanho e forma da molécula de miosina B, resultando em uma fração mais solúvel que miosina B original. Isto foi interpretado como uma indicação da dissociação da actomiosina em miosina A e actina. Kiellly & Martonosi (1968) teorizaram que polifosfatos ligam-se eletrostaticamente, isto é, não especificamente às moléculas de proteínas com carga da mesma forma que sais neutros o fazem. Em contraste, estes polifosfatos reagem especificamente com miosina nos mesmos sítios de ligação de actina ou

ATP e, portanto, estabilizam essa proteína. Saturação dos sítios específicos nas moléculas de miosina permite que o fosfato em excesso seja ligado não especificamente a outros sítios quando um valor maior que 0,5% de polifosfato é adicionado. Isto produz uma desestabilização térmica da miosina e fundamenta a idéia de que 0,25 - 0,50% constitui-se na faixa ótima de concentração a ser usada para melhorar propriedades químicas e físicas de proteínas do tecido muscular.

O nitrito de sódio é uma substância reativa em sistemas cárneos e a concentração livre decresce com processos de cura, cozimento e estocagem (Nordin, 1969). Parte do nitrito forma complexos com proteínas e tem sido demonstrado que esse aditivo liga-se tanto à mioglobina como a proteínas não-hemínicas (Sebranek *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1976). De acordo com Prusa & Browsers (1984), a associação de nitrito e proteínas podem causar uma mudança na extratibilidade de proteínas miofibrilares e podem influenciar textura de produtos cárneos processados. Os mesmos autores demonstraram que três proteínas de "batters" de músculo de peru extraídos com solução de nitrito tiveram maior peso molecular que os respectivos extratos em solução salina.

Finalmente, em relação ao ascorbato, seu efeito como antioxidante, demonstrado através dos baixos valores de TBARS ao longo do armazenamento foi o responsável pelos valores de porcentagem de solubilidade protéica superiores e significativamente diferentes das amostras controle e com nitrito.

Pelo fato da formulação F<sub>5</sub> (mistura) ter resultado, a partir do 2<sup>o</sup> mês de armazenamento, em % de solubilidade consideravelmente mais elevadas que as demais, conclui-se que os aditivos em conjunto exerceram ação sinérgica combinando principalmente os efeitos positivos de ascorbato e fosfato.

## **2.2. Gelatinização e sinerese de géis**

O processo de gelatinização constitui-se numa das etapas responsáveis pela estabilidade de produtos cominuídos após processamento térmico.

Géis formados com 20 mg/mL das proteínas miofibrilares extraídas das diferentes formulações foram submetidos à força centrífuga branda (2000 rpm) para determinação do volume de líquido liberado e portanto da estabilidade do gel. Vários autores recomendaram diferentes velocidades para esse teste Xiong &

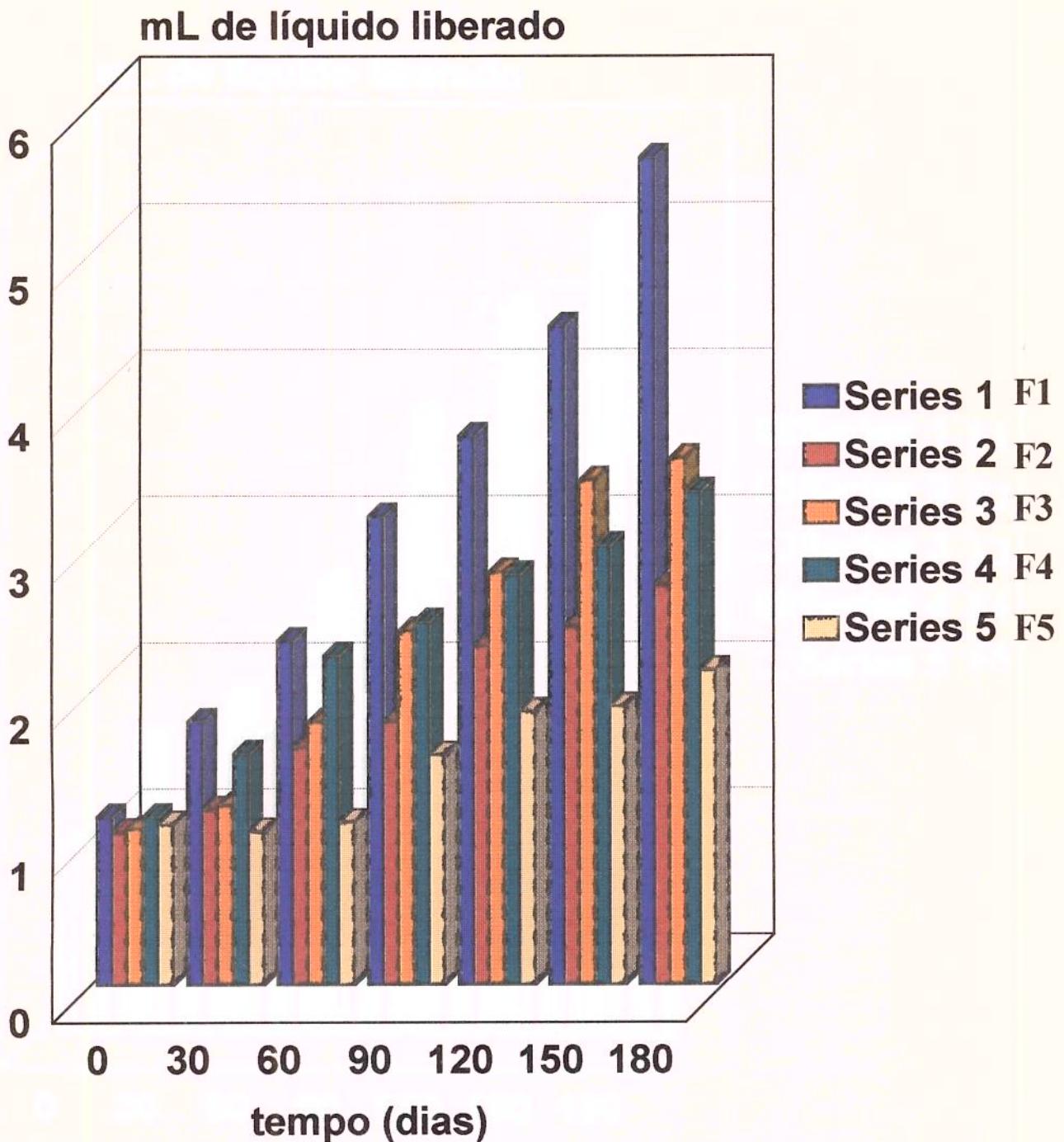
Breeke, 1989; Smith, 1987), mas de acordo com Fretheim *et al.* (1986) forças centrífugas brandas parecem ser mais eficientes.

Dados apresentados nas Figuras 8 e 9 e Tabelas A3 e A4, indicam que após 30 dias de estocagem as formulações F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> foram significativamente diferentes de F<sub>1</sub> (controle) ( $p < 0,05$ ), mas não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). A partir do 3<sup>o</sup> mês de estocagem, não houve diferença significativa entre as formulações contendo ascorbato e nitrito ( $p > 0,05$ ). Como ocorreu com os resultados de solubilidade, F<sub>5</sub> (mistura) foi a formulação que resultou em menores volumes de líquido liberado. Em seguida, amostras com fosfato (F<sub>2</sub>) mostraram menores valores de líquido liberado, diferentes significativamente das demais formulações desde o 3<sup>o</sup> mês.

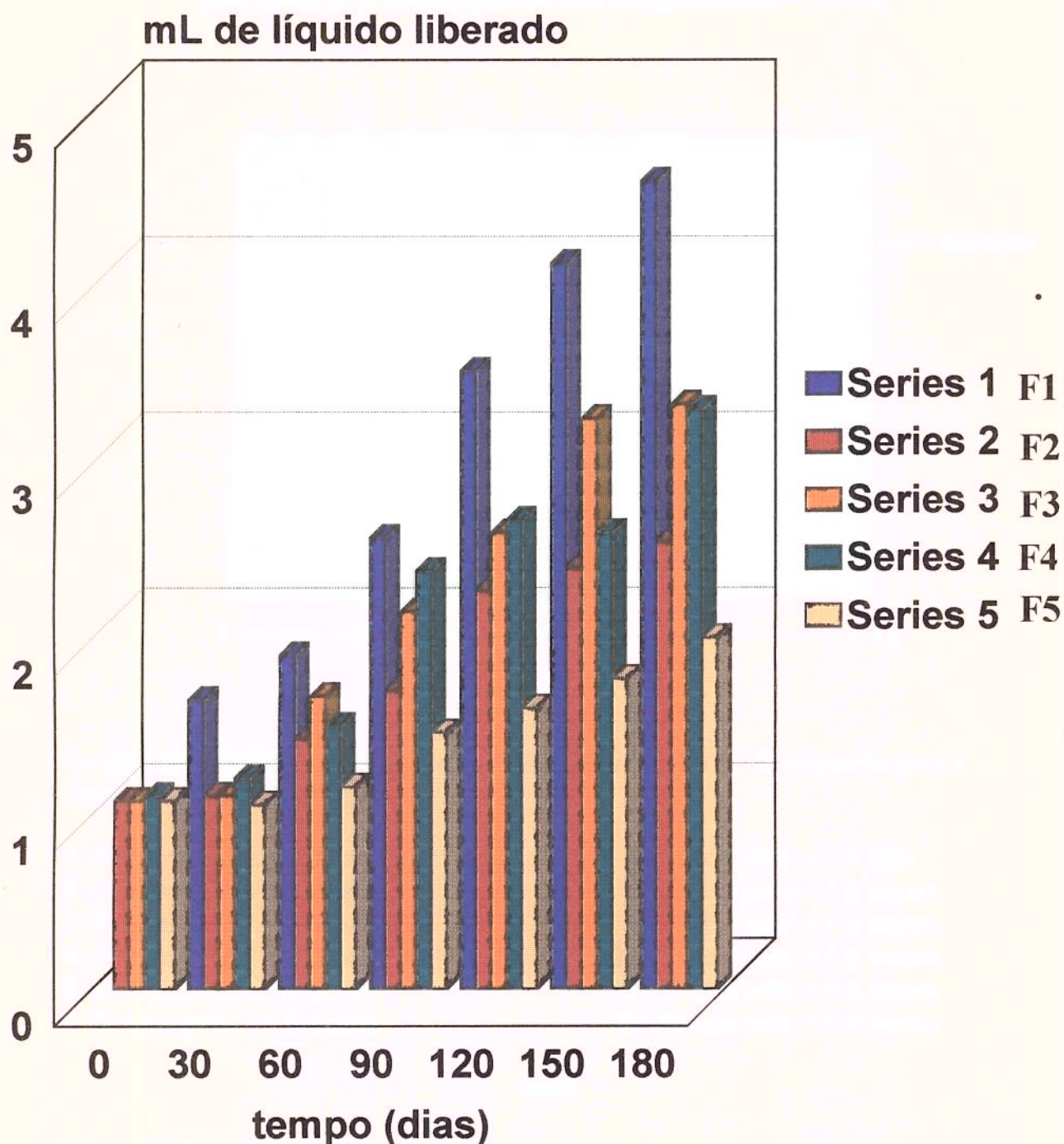
Foi observado também que volumes ligeiramente maiores de líquido foram liberados das amostras com pele, em comparação ao material sem pele (Tabelas A3 e A4 - Apêndice).

No fenômeno de formação de gel, proteínas formam uma rede ordenada através de orientação e agregação que podem levar ao desenvolvimento de turbidez ou mesmo precipitação se moléculas de proteínas forem suficientemente insolúveis. Gelatinização resulta em uma estrutura relativamente estável. Desnaturação protéica branda geralmente aumenta capacidade de gelatinização, mas desnaturação severa leva a géis fracos e instáveis, tais como aqueles obtidos ao final de 6 meses de estocagem com grande volume de líquido liberado mesmo a baixas forças centrífugas.

Vários autores têm reportado que força e estabilidade do gel variaram com a taxa de miosina e actina no sistema miofibrilar (Yasui *et al.*, 1980). Firmeza e coesão do gel decresceram intensamente nas amostras controle ao longo do armazenamento. A sinerese aumentou, indicando que os géis perderam gradualmente sua capacidade de ligação de água. Além disso, ao final do período de armazenamento, os géis tornaram-se bem escuros nas amostras controle e com nitrito de sódio. Smith (1987) também relatou a ocorrência de géis escuros a partir de miofibrilas de peru desossado mecanicamente durante estocagem congelada e atribuiu o fato às interações proteína-lipídios oxidados, as quais geralmente causam escurecimento em vários sistemas modelos. A importância desses dados está no fato de que produtos processados de carne congelada frequentemente apresentam rendimentos de cozimento e capacidade de



**Figura 8. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio no volume de líquido liberado (mL) de géis formados por proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC). F1 = Controle - pura; F2 = fosfato 0,3%, F3 = nitrito 200 ppm; F4 = ascorbato 500 ppm; F5 = F2+F3+F4**



**Figura 9. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio no volume de líquido liberado (mL) de géis formados por proteínas miofibrilares de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC). F1 = Controle - pura; F2 =- fosfato 0,3% F3 = Nitrito 200 ppm; F4 = Ascorbato 500 ppm; F5 = (F2+F3+F4)**

ligação de água menores quando comparados aos similares produzidos com carne fresca. Desnaturação protéica e interação com lipídios oxidados resultando em perda da integridade da matriz do gel, com conseqüente perda na força do gel podem justificar os resultados obtidos. Em sistemas contendo 20 mg/mL de proteínas miofibrilares, 0,6M KCl e pH 7,0, Samejima *et al.* (1969) reportaram que moléculas inteiras de miosina são requeridas para ótima formação de gel. Conforme será observado em relação ao perfil eletroforético das proteínas miofibrilares extraídas, a banda correspondente à miosina desapareceu ao final do período de armazenamento, o que vem justificar a instabilidade dos géis formados nesse mesmo período.

Siegel & Schmidt (1979) relataram que a adição de fosfato aumentou a capacidade da miosina ligar porções de carne e concluíram que o fosfato aumentou a força de ligação através da formação de gel, primariamente pela solubilização das proteínas miofibrilares e, em adição, pela dissociação do complexo actomiosina contribuindo ao processo de gelatinização. Barbut (1988) concluiu que o aumento na capacidade de ligação de proteínas da carne ocorreu quando fosfato foi introduzido no sistema. De acordo com Whitting (1987), fosfato aumentou a força do gel em "batters" de carne, minimizando perdas de água e exsudato de gordura após cozimento.

De uma maneira geral, as propriedades funcionais estão intimamente correlacionadas e, portanto, todos os aspectos descritos em relação ao efeito de fosfato, nitrito e ascorbato sobre porcentagem de solubilidade das proteínas miofibrilares de CFMD são válidas também para as propriedade de gelatinização determinada através do volume de líquido liberado, uma vez que a influência desses aditivos foi muito similar.

### **2.3. Índice de Atividade de Emulsão (IAE)**

O índice de atividade de emulsão é baseado na relação entre turbidez de uma emulsão e sua área interfacial, a qual por sua vez está relacionada à capacidade da proteína adsorver e estabilizar interface óleo-água (Pearce & Kinsella, 1978). Neste método, a relação de concentração proteína:óleo para formação da emulsão é constante para todas as amostras e o IAE é uma função da fração de volume de óleo, concentração de proteína e do tipo de equipamento usado para produzir a emulsão. Padronizando-se com cuidado tais condições, é

possível reproduzir e comparar os resultados obtidos. Entretanto, os valores de IAE assim obtidos somente são aplicados ao sistema previamente delineado e podem não ser relacionados ao processamento de alimento usando equipamentos industriais de formação de emulsão e um óleo diferente daqueles especificados no teste. De acordo com Pearce & Kinsella (1978), esse problema, entretanto, não é um sério inconveniente, já que se uma proteína tem alto IAE sob condições padrões, então é provável que será um bom agente emulsificante sob outras condições similares. A indicação real da utilidade de IAE em sistemas modelos vai depender de como o teste pode prever o comportamento funcional e qualidade do produto final. Vários testes preliminares foram realizados trabalhando-se com proteínas propositalmente desnaturadas de cada uma das 5 formulações e com aquelas recém obtidas de material fresco. Foram obtidos resultados estatísticos que permitiram a adoção desse método para avaliar a propriedade de emulsificação. Recentemente, têm-se observado que muitos trabalhos utilizam o método de IAE devido a sua simplicidade, rapidez e pequena quantidade de amostra requerida para o teste (Li-Chan *et al.*, 1984).

Os resultados de índice de atividade de emulsão apresentados nas Tabelas 17 e 18 indicam que não houve diferença significativa ao longo da estocagem entre as amostras de CFMD contendo fosfato, nitrito e ascorbato ( $p > 0,05$ ), mas as três foram significativamente diferentes de F<sub>5</sub> (mistura) e das amostras controle com pele e sem pele ( $p < 0,05$ ). Valores de IAE foram drasticamente reduzidos durante armazenamento indicando extensa redução na propriedade de emulsificação nas amostras controle com pele e sem pele.

**Tabela 17 - Valores de índice de atividade de emulsão (m<sup>2</sup>/g) das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18° C).**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	13,37±0,47 <sup>a</sup>	13,93±0,80 <sup>a</sup>	13,51±0,28 <sup>a</sup>	13,43±0,26 <sup>a</sup>	14,68±0,15 <sup>a</sup>
30	11,43±0,25 <sup>a</sup>	12,85±0,27 <sup>a</sup>	12,99±0,19 <sup>a</sup>	12,12±0,37 <sup>a</sup>	13,54±0,09 <sup>b</sup>
60	8,83±0,20 <sup>a</sup>	11,06±0,17 <sup>b</sup>	11,17±0,16 <sup>b</sup>	11,99±0,41 <sup>b</sup>	11,94±0,27 <sup>b</sup>
90	7,17±0,39 <sup>a</sup>	10,66±0,25 <sup>b</sup>	9,11±0,48 <sup>b</sup>	10,67±0,25 <sup>b</sup>	11,13±0,23 <sup>b</sup>
120	6,09±0,12 <sup>a</sup>	8,94±0,09 <sup>b</sup>	7,95±0,15 <sup>b</sup>	9,07±0,12 <sup>b</sup>	10,53±0,17 <sup>c</sup>
150	4,94±0,14 <sup>a</sup>	7,76±0,23 <sup>b</sup>	7,21±0,18 <sup>b</sup>	8,55±0,13 <sup>b</sup>	8,99±0,19 <sup>c</sup>
180	3,91±0,27 <sup>a</sup>	7,22±0,21 <sup>b</sup>	6,58±0,18 <sup>b</sup>	7,42±0,28 <sup>b</sup>	8,73±0,25 <sup>c</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c,d,e</sup> Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

**Tabela 18 - Valores de índice de atividade de emulsão (m<sup>2</sup>/g) das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	13,53±0,26 <sup>a</sup>	14,11±0,36 <sup>a</sup>	13,68±0,21 <sup>a</sup>	13,39±0,27 <sup>a</sup>	14,64±0,12 <sup>a</sup>
30	11,79±0,21 <sup>a</sup>	12,89±0,15 <sup>a</sup>	13,82±0,71 <sup>b</sup>	12,80±0,20 <sup>a</sup>	13,49±0,17 <sup>b</sup>
60	9,13±0,12 <sup>a</sup>	10,78±0,42 <sup>b</sup>	11,83±0,45 <sup>b</sup>	11,85±0,45 <sup>b</sup>	12,12±0,16 <sup>b</sup>
90	7,50±0,25 <sup>a</sup>	10,28±0,22 <sup>b</sup>	9,23±0,26 <sup>b</sup>	10,52±0,27 <sup>b</sup>	11,38±0,14 <sup>b</sup>
120	5,73±0,22 <sup>a</sup>	8,83±0,38 <sup>b</sup>	8,28±0,38 <sup>b</sup>	8,86±0,15 <sup>b</sup>	10,62±0,17 <sup>c</sup>
150	4,85±0,11 <sup>a</sup>	7,84±0,24 <sup>b</sup>	7,26±0,18 <sup>b</sup>	8,77±0,30 <sup>b</sup>	9,25±0,24 <sup>c</sup>
180	3,59±0,40 <sup>a</sup>	7,26±0,09 <sup>b</sup>	7,14±0,43 <sup>b</sup>	7,57±0,61 <sup>b</sup>	8,92±0,34 <sup>c</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

A formação e estabilização de emulsões por proteínas são possíveis devido à natureza anfótera e sua flexibilidade, características que permitem formar filmes coesos e fortes que recobrem partículas de gordura e atuam como emulsificantes. Uma positiva correlação tem sido observada por muitos autores entre solubilidade e a capacidade da proteína estabilizar emulsões (Crenwelge *et al.*, 1974; Volkert & Klein, 1979; Yasumatsu *et al.*, 1972). A importância do conteúdo de proteína solúvel na capacidade de emulsificação em produtos cárneos é bem estabelecida na literatura (Kinsella, 1976). Analisando-se os resultados, observa-se que maiores valores de solubilidade coincidiram com os mais altos índices de atividade de emulsão na formulação F<sub>5</sub>. Entretanto, as formulações com fosfato e ascorbato (F<sub>2</sub> e F<sub>4</sub>) tiveram valores de porcentagem de solubilidade significativamente mais elevados que as formulações com nitrito (F<sub>3</sub>) e os três (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>) não diferiram em relação ao IAE. De acordo com alguns autores, somente o perfil de solubilidade não é suficiente para explicar o comportamento de uma proteína na formação de emulsão, como demonstram os resultados aqui presentes.

Tem sido descrito que a hidrofobicidade de proteínas desempenha um papel determinante nas propriedades funcionais, especialmente na formação e estabilização de emulsão (Li-Chan *et al.*, 1984). A ligação dos aditivos estudados com as proteínas pode ter modificado propriedades de superfície e hidrofobicidade, tal como foi sugerido no caso de nitrito e fosfato.

Fosfatos têm sido citados na literatura como melhoradores da estabilidade de emulsões, especialmente em produtos com baixo teor de sódio. Barbut (1988) concluiu que maiores rendimentos de proteína extraída obtidas pelo



uso de fosfato permitiram um melhor englobamento de menores e mais numerosos glóbulos de gordura.

#### **2.4. Atividade de ATPase e perfil eletroforético das proteínas miofibrilares das diferentes misturas**

Tem sido relatado na literatura que armazenamento sob congelamento tem sido reportado na literatura alterar a atividade de ATPase de proteínas do tecido muscular. As Figuras 10 e 11 apresentam os resultados de atividade de ATPase ( $\mu\text{mol Pi/min/mg prot.}$ ) confirmando a afirmação acima. Nas amostras controle com pele e sem pele houve drástica redução nos valores de aproximadamente 0,070 para 0,014 e 0,076 para 0,016  $\mu\text{mol Pi/min/mg proteína}$  para amostras com pele e sem pele, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com Wagner & Anon (1985) os quais demonstraram que a atividade de ATPase de proteína miofibrilares de músculo bovino decresceu como consequência do congelamento. Segundo os autores, redução na atividade de ATPase foi relacionada a uma mudança produzida pelo congelamento na cabeça da miosina a qual contém ambos sítios de atividade da enzima e sítio de interação com actina.

A desnaturação observada nas amostras de CFMD controle pode ter sido resultado de desenrolamento parcial da molécula com exposição dos grupos hidrofóbicos induzindo à agregação protéica durante estocagem congelada, fundamentada pelo fato de que solubilidade também decresceu durante estocagem congelada.

Analisando-se os valores obtidos em porcentagem de redução de atividade de ATPase em relação ao valor inicial, CFMD com pele e sem pele apresentaram 80 e 78%, respectivamente, de redução em relação aos valores nos tempos zero. Para F<sub>5</sub> (mistura), as porcentagens de redução foram 36 e 29,7%. Ao final do período de armazenamento não houve diferença entre as amostras com fosfatos (F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>) ( $p > 0,05$ ), mas ambas foram menores que F<sub>3</sub> (nitrito) e F<sub>4</sub> (ascorbato), diferindo significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) (Tabelas A5 e A6 - Apêndice).

Atividade de ATPase (umol Pi/min/mg de proteína)

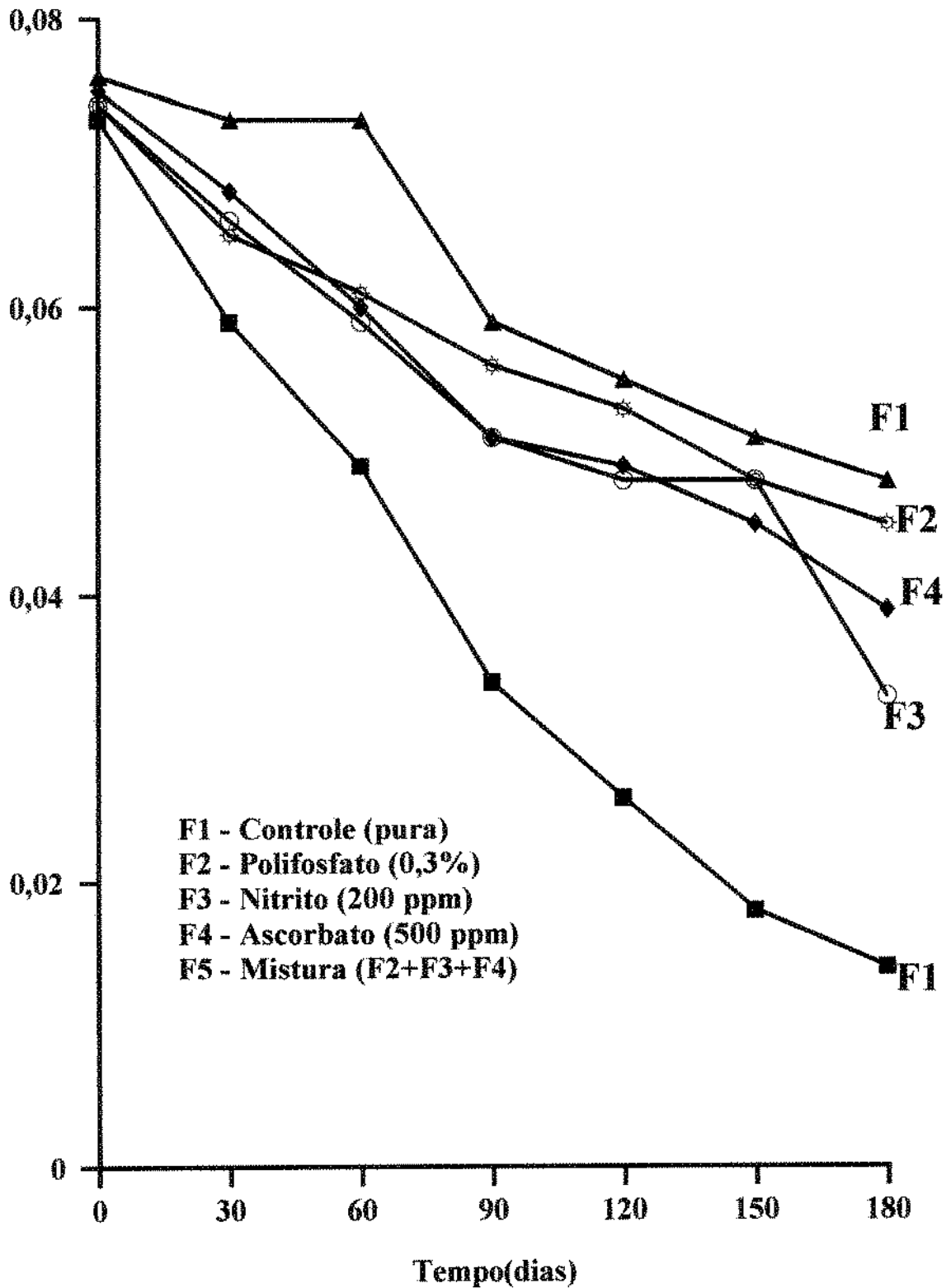
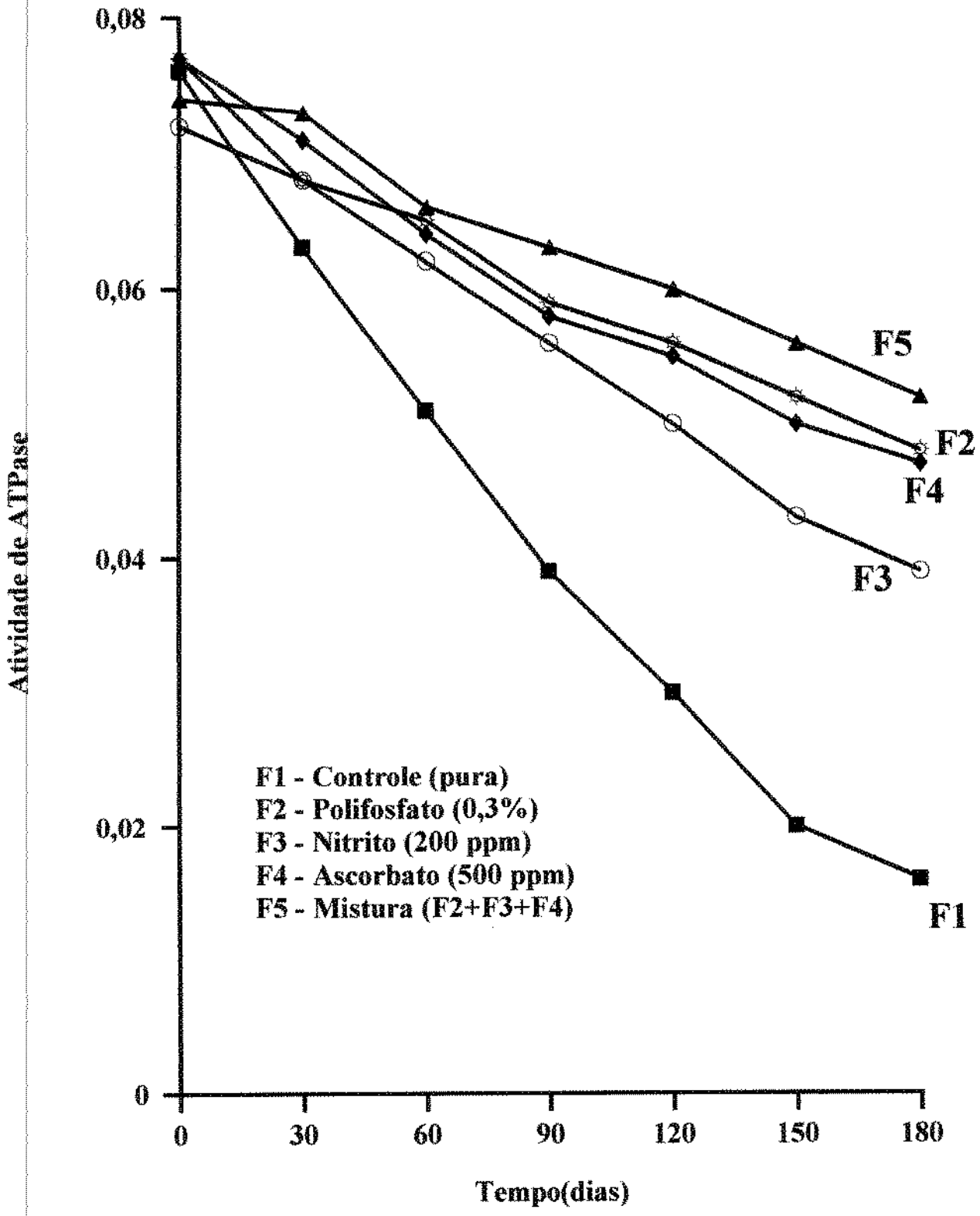


Figura 10. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio na atividade de ATPase (umol Pi/min/mg de proteína) das proteínas miofibrilares de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC).



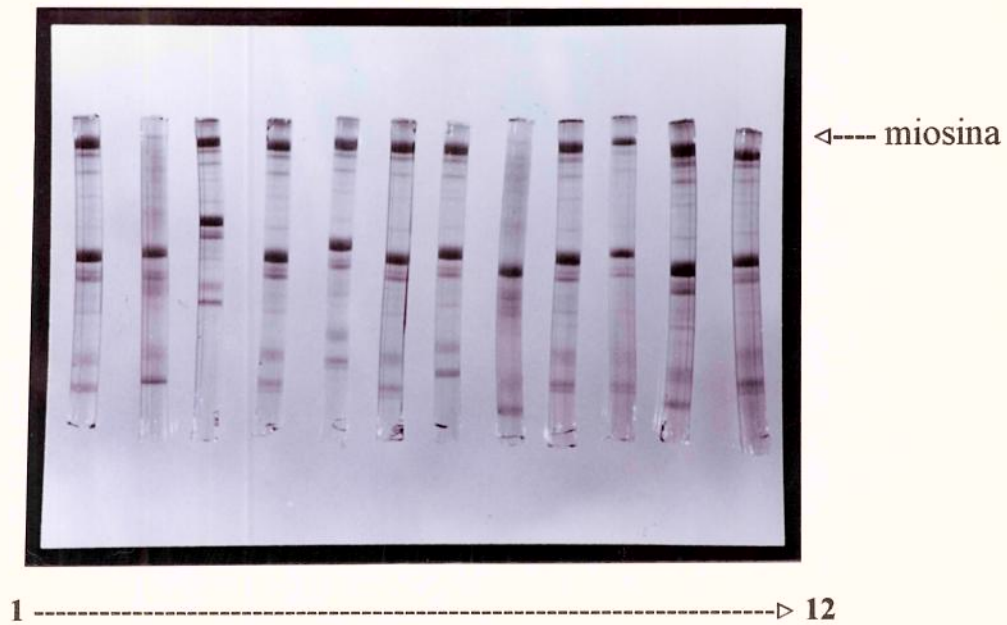
**Figura 11. Efeito da adição de polifosfato, nitrito e ascorbato de sódio na atividade de ATPase (umol Pi/min/mg de proteína) das proteínas miofibrilares de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18oC).**

Os resultados encontrados estão coerentes com o perfil eletroforético das proteínas (Figura 12) o qual foi determinado logo após a obtenção das matéria-primas e ao final do período de armazenamento. Avaliação das bandas obtidas pelas proteínas extraídas no tempo zero indica que fosfato, nitrito e ascorbato não alteraram o número de bandas de proteínas identificadas em relação ao controle. O resultado mais importante que justifica a maioria das observações realizadas é o desaparecimento da banda de miosina (cadeia pesada) nos géis nº 2 e 8, correspondendo às amostras controle com pele e sem pele após 6 meses de armazenamento. Tais resultados indicam desnaturação da proteína mais importante sob o aspecto funcional. Por outro lado, as amostras com aditivos adicionados não apresentaram diferença no número e localização das bandas em comparação ao tempo zero de extração. Esse fato vem explicar a drástica redução na atividade de ATPase que, na verdade, é uma medida direta da atividade de miosina.

Uma conclusão importante obtida a partir do perfil eletroforético é que não ocorreu cisão nas proteínas durante estocagem congelada. Grandes agregados de proteínas foram formados e presos no início do "stacking gel" das amostras controle após 6 meses indicando que complexos de alto peso molecular foram formados, os quais não se romperam com SDS ou mercapto-etanol.

Valores de solubilidade e atividade de ATPase correlacionaram-se positivamente e foram coerentes com vários autores. Khan & van den Berg (1967) e Wagner & Anon (1985) utilizaram valores de solubilidade e atividade de ATPase para determinar extensão da desnaturação protéica de proteínas miofibrilares. Connell (1960), citado em Mollins (1991), reportou que miosina de peixe foi completamente desnaturada e tornada insolúvel durante armazenamento congelado atingindo 55% da atividade de ATPase original.

Figura 12. Perfil eletroforético das proteínas miofibrilares de CFMD com e sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).



Os géis estão identificados seguindo a numeração de 1 a 12 da esquerda para a direita, com descrito a seguir:

- 1- F1 com pele; t = 0 mês
- 2- F1 com pele; t = 6 meses
- 3- F2 com pele; t = 6 meses
- 4- F3 com pele; t = 6 meses
- 5- F4 com pele; t = 6 meses
- 6- F5 com pele; t = 6 meses

- 7- F1 sem pele; t = 0 mês
- 8- F1 sem pele; t = 6 meses
- 9- F2 sem pele; t = 6 meses
- 10- F3 sem pele; t = 6 meses
- 11- F4 sem pele; t = 6 meses
- 12- F5 sem pele; t = 6 meses

onde,

- F1 = CFMD controle (pura)
- F2 = CFMD + Fosfato (0,3%)
- F3 = CFMD + Nitrito (200 ppm)
- F4 = CFMD + Ascorbato (500 ppm)
- F5 = CFMD + Fosfato (0,3%) + Nitrito (200 ppm) + Ascorbato (500 ppm)

### **3. Influência do conteúdo e liberação de ferro hemínico e não-hemínico nas diferentes misturas de CFMD no processo de oxidação lipídica durante congelamento e sob aquecimento**

#### **3.1. Comparação entre os diferentes métodos**

Os métodos mais comumente usados para determinação de ferro são através de absorção atômica. Em função da pouca disponibilidade de equipamento para esse fim nas condições práticas de trabalho, buscou-se uma metodologia alternativa, através de espectrofotometria na região visível a 510 nm com 1,10 o-fenantrolina. Para que isso pudesse ser realizado com segurança, a primeira etapa deste experimento comparou os resultados de ferro total pelos dois métodos.

O método de 1,10 o-fenantrolina tem sido usado como padrão em muitos tipos de amostras, produzindo cor estável e intensa o suficiente para que quantidades muito pequenas de ferro (abaixo de 0,1 ppm) possam ser estimados. A determinação tem como princípio a formação do complexo alaranjado  $(C_{12}H_8N_2)Fe^{++}$  formado por o-fenantrolina com íons ferroso (max. = 510 nm;  $E = 11.100 L. mol^{-1}.cm^{-1}$ ). O íon ferro deve ser solubilizado, reduzido ao estado ferroso com hidroxilamina a pH 3.2-3.3. Três moléculas 1,10 o-fenantrolina quelam cada átomo de ferro na forma ferrosa para formação do complexo. A solução colorida obedece a lei de Beer para 0,2 - 4  $\mu g/mL$  e a intensidade de cor é independente do pH na faixa de 3,0 - 9,0, com máximo e mais rápido desenvolvimento a pH 3,2 - 3,3. O método apresenta vários interferentes tais como fosfatos, o qual pode ser eliminado por aquecimento da amostra pelo menos por 15 minutos em ácido clorídrico para hidrólise a ortofosfato (Schilt, 1969).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 19 observa-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os teores de ferro total para os dois métodos, com exceção das amostras sem pele contendo fosfato ( $P < 0,05$ ) cujos valores significativamente diferentes, com menores resultados para o método de 1,10 o-fenantrolina. Essa interferência com fosfato não foi eliminada pelo aquecimento em ácido clorídrico, como descrito acima. A porcentagem de diferença entre os os dois métodos foi aproximadamente 8% e portanto para amostras sem pele contendo fosfato foi usado método de espectroscopia de

absorção atômica (EAA). Nessas amostras foram obtidas também as menores porcentagens de recuperação (94,77%).

**Tabela 19 - Comparação entre os métodos de espectroscopia de absorção atômica (EAA) e 1,10 o-fenantrolina para determinação de ferro total nas formulações de CFMD**

Amostra	Fe total ( $\mu\text{g/g}$ )		Fe total ( $\mu\text{g/g}$ ) após adição de 10 g de Fe iônico		% de recuperação	
	EAA	1,10 o-Fenan.	EAA	1,10 o-Fenan.	EAA	1,10 o-Fenan.
F <sub>1</sub> C/P <sup>(1)</sup>	0,21+0,64 <sup>a</sup>	10,06+0,70 <sup>a</sup>	20,35+0,40 <sup>a</sup>	19,84+0,69 <sup>a</sup>	101,43+2,41 <sup>a</sup>	97,80+1,83 <sup>a</sup>
S/P <sup>(2)</sup>	20,28+0,78 <sup>a</sup>	19,68+0,74 <sup>a</sup>	30,29+0,76 <sup>a</sup>	29,46+0,81 <sup>a</sup>	94,23+1,56 <sup>a</sup>	97,80+0,72 <sup>a</sup>
F <sub>2</sub> C/P	11,21+0,88 <sup>a</sup>	10,17+0,72 <sup>a</sup>	20,90+0,45 <sup>a</sup>	20,07+0,84 <sup>a</sup>	100,27+0,84 <sup>a</sup>	98,37+0,39 <sup>a</sup>
S/P	19,49+0,62 <sup>a</sup>	17,94+0,79 <sup>b</sup>	29,29+0,86 <sup>a</sup>	27,41+0,68 <sup>b</sup>	97,93+2,89 <sup>a</sup>	94,17+1,21 <sup>b</sup>
F <sub>3</sub> C/P	12,27+0,41 <sup>a</sup>	11,19+0,34 <sup>a</sup>	22,29+0,44 <sup>a</sup>	20,94+0,54 <sup>a</sup>	100,23+0,81 <sup>a</sup>	97,57+2,27 <sup>a</sup>
S/P	21,01+0,42 <sup>a</sup>	19,90+0,82 <sup>a</sup>	30,97+0,32 <sup>a</sup>	29,98+0,19 <sup>a</sup>	99,53+0,11 <sup>a</sup>	97,20+3,01 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub> C/P	11,20+0,66 <sup>a</sup>	10,78+0,59 <sup>a</sup>	21,19+0,57 <sup>a</sup>	20,55+0,63 <sup>a</sup>	99,80+1,34 <sup>a</sup>	98,40+0,61 <sup>a</sup>
S/P	20,15+0,22 <sup>a</sup>	19,66+0,40 <sup>a</sup>	30,19+0,30 <sup>a</sup>	29,39+0,42 <sup>a</sup>	100,47+1,11 <sup>a</sup>	97,33+1,33 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub> C/P	12,87+0,34 <sup>a</sup>	11,89+0,50 <sup>a</sup>	22,73+0,46 <sup>a</sup>	21,53+0,42 <sup>a</sup>	98,43+1,59 <sup>a</sup>	96,34+0,91 <sup>a</sup>
S/P	21,50+0,41 <sup>a</sup>	21,12+0,86 <sup>a</sup>	31,48+0,41 <sup>a</sup>	30,95+0,61 <sup>a</sup>	99,80+0,62 <sup>a</sup>	98,30+2,53 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

(1) com pele

(2) sem pele

Os resultados indicam também que os valores de ferro total para amostras sem pele foram consideravelmente mais elevados (praticamente o dobro), em comparação às amostras com pele. Esses dados já eram esperados, uma vez que a matéria-prima sem pele apresenta maior teor de pigmentos totais com substancial acréscimo no teor de ferro hemínico proveniente principalmente da hemoglobina, principal componente da medula óssea. Além disso, citocromos c, hematina e complexos de armazenamento de ferritina e hemosiderina, constituem-se nessas amostras de CFMD em fontes consideráveis (Hazell, 1982).

A análise estatística dos resultados de ferro total ( $\mu\text{g/g}$ ) para verificar a influência da adição dos diferentes componentes revelou que amostras controle (F<sub>1</sub>), com fosfato (F<sub>2</sub>), e ascorbato (F<sub>4</sub>) não diferiram entre si quanto ao conteúdo de ferro, tanto no método de EAA como em 1,10 o-fenantrolina ( $p < 0,05$ ). Tais amostras, entretanto, foram estatisticamente diferentes das formulações F<sub>3</sub> (nitrito) e F<sub>5</sub> (mistura) ( $p < 0,05$ ), as quais, por sua vez não diferiram significativamente entre si. Esses resultados podem ser explicados

verificando-se o conteúdo de ferro presente nesses aditivos, conforme descritos a seguir:

	$\mu\text{g Fe/g (EAA)}$	$\mu\text{g Fe/g (1,10 o-fen.)}$
tripolifosfato de sódio	68,32	60,15
nitrito de sódio	238,45	237,56
ascorbato de sódio	57,21	55,20

Verifica-se que tais compostos apresentam elevado teor de ferro, especialmente nitrito, contribuindo como fonte desse metal nos resultados finais. Na formulação F<sub>5</sub>, contendo mistura dos três aditivos, ocorreram os valores mais elevados já que apresentou a somatória do ferro presente nos três ingredientes. Deve-se ressaltar que os aditivos utilizados são aqueles comumente usados e permitidos pela legislação.

Dos resultados apresentados, conclui-se que o método de 1,10 o-fenantrolina pode ser usado com segurança em substituição ao método de EAA na determinação de ferro total.

A partir disso, investigou-se o efeito de fosfato, nitrito e ascorbato na liberação ou quelação do ferro hemínico e não-hemínico durante período de congelamento e sob aquecimento.

### **3.2. Variação dos teores de ferro hemínico e não-hemínico nas diferentes formulações durante armazenamento sob congelamento.**

Os resultados apresentados na Tabela 20 demonstram que o conteúdo de ferro total ( $\mu\text{g/g}$ ) não foi alterado durante o armazenamento sob congelamento, conforme o esperado. As pequenas variações que ocorreram foram provavelmente devidas à perdas de umidade na estocagem, mas não foram significativas ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 20 - Valores de ferro total<sup>(1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ ) para formulações de CFMD durante armazenamento sob congelamento ( $-18^\circ\text{C}$ ).**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	C/P <sup>(2)</sup>	S/P <sup>(3)</sup>	C/P	S/P	C/P	S/P	C/P	S/P	C/P	S/P
0	10,06±0,70 <sup>a</sup>	18,68±0,74 <sup>a</sup>	10,21±0,82 <sup>a</sup>	19,49±0,62 <sup>a</sup>	11,18±0,34 <sup>a</sup>	19,99±0,82 <sup>a</sup>	10,71±0,59 <sup>a</sup>	19,62±0,42 <sup>a</sup>	11,89±0,50 <sup>a</sup>	21,12±0,86 <sup>a</sup>
3	10,15±0,42 <sup>a</sup>	19,69±0,71 <sup>a</sup>	10,21±0,28 <sup>a</sup>	19,53±0,51 <sup>a</sup>	11,88±0,28 <sup>a</sup>	20,15±0,63 <sup>a</sup>	10,32±0,51 <sup>a</sup>	19,41±0,38 <sup>a</sup>	12,01±0,19 <sup>a</sup>	21,05±0,71 <sup>a</sup>
6	10,21±0,44 <sup>a</sup>	18,72±0,34 <sup>a</sup>	10,28±0,37 <sup>a</sup>	19,58±0,27 <sup>a</sup>	11,37±0,65 <sup>a</sup>	20,05±0,53 <sup>a</sup>	10,59±0,31 <sup>a</sup>	19,70±0,09 <sup>a</sup>	11,98±0,25 <sup>a</sup>	21,20±0,67 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

(1) realizado por 1,10  $\alpha$ -fenantrolina, com exceção de F<sub>2</sub> S/P por EAA.

(2) com pele

(3) sem pele

Durante o período de armazenamento, observou-se que houve variação significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de ferro hemínico e, conseqüentemente, no teor de ferro não-hemínico (ferro hemínico é calculado como a diferença entre o teor de ferro total e ferro não-hemínico assumindo que somente hemínico é insolúvel sob as condições ácidas descritas no método (Tabelas 21, 22, 23 e 24). Esse efeito foi observado, entretanto, somente após o 3<sup>o</sup> mês de estocagem nas amostras de CFMD com pele e sem pele, quando ocorreu uma redução significativa no teor de ferro hemínico e, simultaneamente, aumento no ferro não-hemínico. Ocorreu, portanto, degradação dos pigmentos heme com liberação de ferro iônico. Esse fato já havia sido previamente verificado na determinação das porcentagens dos pigmentos heme (Mb e Hb) na primeira etapa do trabalho.

**Tabela 21 - Valores de ferro hemínico ( $\mu\text{g/g}$ ) para formulações de CFMD com pele.**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
0	6,54±0,82 <sup>a</sup>	4,10±0,24 <sup>a</sup>	6,44±0,17 <sup>a</sup>	5,89±0,36 <sup>a</sup>	7,01±0,83 <sup>a</sup>	6,57±0,43 <sup>a</sup>	6,93±0,53 <sup>a</sup>	5,76±0,18 <sup>a</sup>	7,74±0,85 <sup>a</sup>	7,49±0,52 <sup>a</sup>
3	6,18±0,25 <sup>a</sup>	4,14±0,33 <sup>a</sup>	6,39±0,15 <sup>a</sup>	5,90±0,31 <sup>a</sup>	7,56±0,11 <sup>a</sup>	6,88±0,61 <sup>a</sup>	6,75±0,44 <sup>a</sup>	5,20±0,35 <sup>a</sup>	7,82±0,85 <sup>a</sup>	7,56±0,27 <sup>a</sup>
6	5,76±0,32 <sup>b</sup>	3,00±0,09 <sup>b</sup>	6,48±0,41 <sup>a</sup>	5,88±0,37 <sup>a</sup>	7,31±0,17 <sup>a</sup>	6,62±0,26 <sup>a</sup>	6,64±0,21 <sup>a</sup>	4,19±0,37 <sup>b</sup>	7,72±0,33 <sup>a</sup>	7,47±0,17 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

S/A - Sem aquecimento

C/A - Com aquecimento

**Tabela 22 - Valores de ferro hemínico ( $\mu\text{g/g}$ ) para formulações de CFMD sem pele.**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
0	12,99±0,42 <sup>a</sup>	8,71±0,27 <sup>a</sup>	17,86±0,61 <sup>a</sup>	12,06±0,61 <sup>a</sup>	13,35±0,26 <sup>a</sup>	12,59±0,41 <sup>a</sup>	12,98±0,36 <sup>a</sup>	11,44±0,38 <sup>a</sup>	13,72±0,40 <sup>a</sup>	13,29±0,27 <sup>a</sup>
3	12,45±0,57 <sup>a</sup>	8,15±0,18 <sup>a</sup>	12,77±0,24 <sup>a</sup>	11,96±0,27 <sup>a</sup>	15,24±0,32 <sup>a</sup>	13,34±0,14 <sup>a</sup>	12,60±0,19 <sup>a</sup>	11,03±0,42 <sup>a</sup>	13,55±0,64 <sup>a</sup>	13,15±0,22 <sup>a</sup>
6	11,18±0,23 <sup>b</sup>	6,91±0,42 <sup>b</sup>	12,83±0,25 <sup>a</sup>	11,97±0,28 <sup>a</sup>	15,21±0,19 <sup>a</sup>	12,55±0,30 <sup>a</sup>	12,81±0,45 <sup>a</sup>	8,47±0,28 <sup>b</sup>	12,68±0,30 <sup>a</sup>	13,27±0,15 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

S/A Sem aquecimento

C/A Com aquecimento

**Tabela 23 - Valores de ferro não-hemínico ( $\mu\text{g/g}$ ) para formulações de CFMD com pele.**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
0	3,52±0,21 <sup>a</sup>	5,65±0,38 <sup>a</sup>	3,73±0,24 <sup>a</sup>	4,28±0,26 <sup>a</sup>	4,16±0,21 <sup>a</sup>	4,62±0,23 <sup>a</sup>	3,78±0,37 <sup>a</sup>	4,95±0,45 <sup>a</sup>	4,15±0,19 <sup>a</sup>	4,40±0,23 <sup>a</sup>
3	3,97±0,56 <sup>ab</sup>	6,91±0,23 <sup>a</sup>	3,85±0,14 <sup>a</sup>	4,32±0,04 <sup>a</sup>	4,21±0,19 <sup>a</sup>	4,70±0,16 <sup>a</sup>	3,87±0,37 <sup>a</sup>	5,12±0,08 <sup>a</sup>	4,19±0,15 <sup>a</sup>	4,45±0,28 <sup>a</sup>
6	4,43±0,28 <sup>b</sup>	7,21±0,09 <sup>b</sup>	3,80±0,46 <sup>a</sup>	4,40±0,23 <sup>a</sup>	4,29±0,15 <sup>a</sup>	4,75±0,55 <sup>a</sup>	3,91±0,25 <sup>a</sup>	6,36±0,45 <sup>b</sup>	4,23±0,17 <sup>a</sup>	4,49±0,29 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

S/A Sem aquecimento

C/A Com aquecimento

**Tabela 24 - Valores de ferro não-hemínico ( $\mu\text{g/g}$ ) para formulações de CFMD sem pele.**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
0	6,69±0,31 <sup>a</sup>	10,87±0,46 <sup>a</sup>	6,63±0,27 <sup>a</sup>	7,42±0,32 <sup>a</sup>	6,57±0,19 <sup>a</sup>	7,31±0,19 <sup>a</sup>	6,60±0,41 <sup>a</sup>	8,69±0,49 <sup>a</sup>	7,40±0,39 <sup>a</sup>	7,83±0,18 <sup>a</sup>
3	7,15±0,18 <sup>a</sup>	11,47±0,63 <sup>a</sup>	6,76±0,28 <sup>a</sup>	7,87±0,17 <sup>a</sup>	6,81±0,28 <sup>a</sup>	7,40±0,27 <sup>a</sup>	6,81±0,56 <sup>a</sup>	8,72±0,18 <sup>a</sup>	7,40±0,27 <sup>a</sup>	7,99±0,83 <sup>a</sup>
6	8,34±0,47 <sup>b</sup>	13,71±0,11 <sup>b</sup>	6,75±0,34 <sup>a</sup>	7,61±0,13 <sup>a</sup>	6,84±0,32 <sup>a</sup>	7,50±0,20 <sup>a</sup>	6,89±0,34 <sup>a</sup>	11,23±0,41 <sup>b</sup>	7,52±0,28 <sup>a</sup>	7,93±0,21 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>a,b</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

S/A Sem aquecimento

C/A Com aquecimento

Os resultados obtidos estão de acordo com Gomez-Basauri & Regenstein (1992b), os quais reportaram significativo decréscimo de ferro hemínico em diferentes amostras de peixe após 60 dias de estocagem congelada, sugerindo quebra dos pigmentos heme.

Aquecimento das amostras controle (com pele e sem pele) aumentou consideravelmente o teor de ferro iônico em até 50%, indicando

desnaturação das estruturas porfirínicas com liberação do átomo de ferro ocorrendo nos tempos 0, 3 e 6 meses. Ao final do 6<sup>o</sup> mês de armazenamento, a taxa dessa desnaturação foi maior indicando que nesse período, os pigmentos heme estiveram mais susceptíveis à degradação. Liberação de ferro iônico sob aquecimento tem sido relatado por muitos autores como uma das principais causas da oxidação lipídica desenvolvida em carne cozida. O aumento significativo no teor de ferro não-hemínico após cozimento de carnes foi primeiramente observado por Igene *et al.* (1979) e confirmado por Schricker & Miller (1983) e Chen *et al.* (1984). A teoria da conversão de ferro hemínico a não-hemínico envolvendo oxidação do anel porfirínico é reforçada pela observação de Igene *et al.* (1979) mostrando que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente aumentou a concentração de Fe não-hemínico.

Recentemente Han *et al.* (1993) reportaram significativa variação na distribuição do ferro em músculo de frango aquecido, com decréscimo nas frações de ferro solúveis em H<sub>2</sub>O, com respectivo aumento das formas insolúveis. Conteúdo de ferro hemínico e ferritina decresceram com considerável aumento no teor de ferro iônico, o que os autores sugeriram ser responsável pelo rápido desenvolvimento de rancidez oxidativa em carne cozida.

Analisando-se o efeito dos diferentes compostos adicionados às formulações, verificou-se que polifosfato, nitrito e mistura de polifosfato, nitrito e ascorbato não alteraram significativamente os valores de ferro hemínico e não-hemínico após aquecimento a 75°C (P>0,05), ao contrário da CFMD controle e na formulação com ascorbato, nos quais a proporção dessas duas formas de ferro foi significativamente alterada. Esses resultados foram observados nos tempos 0, 3 e 6 meses de armazenamento, sugerindo que fosfato e nitrito, individualmente e em combinação, por algum tipo de mecanismo, preveniram a degradação de pigmentos heme e liberação de ferro iônico ou ainda, o elemento pode ter sido liberado, mas tornou-se indisponível através da formação de complexos com esses compostos. Analisando estatisticamente a variação dessa inibição da liberação de ferro iônico, observa-se que não houve diferença significativa no teor de ferro hemínico durante armazenamento para as formulações com fosfato, nitrito e mistura.

Ascorbato de sódio mostrou-se eficiente em prevenir a degradação de pigmentos heme somente nas amostras cruas, não apresentando diferença significativa nos teores de ferro hemínico e não-hemínico durante estocagem congelada (p>0,05), mas isso ocorreu sob efeito do aquecimento (p<0,05).

### 3.3. Efeito do aquecimento na estabilidade à oxidação lipídica nas diferentes formulações durante armazenamento sob congelamento:

Resultados apresentados nas Tabelas 25 e 26 fornecem as médias e desvios padrões para valores de TBARS dos diferentes tratamentos estudados. Análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos e tempo de estocagem, demonstrando eficiência de nitrito, fosfato, ascorbato e mistura como agentes oxidantes, porém em situações diferentes.

**Tabela 25 - Efeito do aquecimento no valor de TBARS nas formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
0	0,36±0,02 <sup>a</sup>	2,60±0,04 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>	1,30±0,05 <sup>a</sup>	0,36±0,03 <sup>a</sup>	1,33±0,25 <sup>a</sup>	0,34±0,02 <sup>a</sup>	1,31±0,02 <sup>a</sup>	0,38±0,03 <sup>a</sup>	0,95±0,05 <sup>a</sup>
3	2,42±0,05 <sup>b</sup>	4,76±0,10 <sup>b</sup>	1,75±0,06 <sup>b</sup>	2,15±0,30 <sup>b</sup>	1,07±0,02 <sup>b</sup>	1,70±0,02 <sup>ab</sup>	0,61±0,09 <sup>b</sup>	2,87±0,15 <sup>b</sup>	0,57±0,03 <sup>a</sup>	1,15±0,02 <sup>a</sup>
6	6,83±0,20 <sup>c</sup>	10,71±0,62 <sup>c</sup>	4,50±0,15 <sup>c</sup>	4,69±0,10 <sup>c</sup>	1,85±0,06 <sup>c</sup>	2,11±0,13 <sup>b</sup>	0,85±0,03 <sup>b</sup>	3,65±0,25 <sup>c</sup>	0,80±0,02 <sup>b</sup>	1,21±0,08 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

a,b,c Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

S/A Com aquecimento

C/A Sem aquecimento

**Tabela 26 - Efeito do aquecimento no valor de TBARS nas formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>		F <sub>5</sub>	
	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A
0	0,32±0,04 <sup>a</sup>	3,35±0,30 <sup>a</sup>	0,34±0,05 <sup>a</sup>	1,32±0,21 <sup>a</sup>	0,36±0,02 <sup>a</sup>	1,56±0,13 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>a</sup>	1,42±0,17 <sup>a</sup>	0,30±0,03 <sup>a</sup>	1,05±0,04 <sup>a</sup>
3	2,33±0,03 <sup>b</sup>	5,21±0,17 <sup>b</sup>	1,60±0,03 <sup>b</sup>	2,65±0,52 <sup>b</sup>	0,95±0,03 <sup>b</sup>	1,85±0,03 <sup>ab</sup>	0,55±0,02 <sup>a</sup>	2,95±0,33 <sup>b</sup>	0,47±0,02 <sup>a</sup>	1,23±0,12 <sup>a</sup>
6	6,68±0,05 <sup>c</sup>	12,08±0,41 <sup>c</sup>	4,21±0,15 <sup>c</sup>	4,87±0,16 <sup>c</sup>	1,67±0,05 <sup>c</sup>	1,85±0,02 <sup>b</sup>	0,91±0,02 <sup>b</sup>	3,83±0,34 <sup>c</sup>	0,78±0,04 <sup>b</sup>	1,32±0,07 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

a,b,c Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

S/A Sem aquecimento

C/A Com aquecimento

Aquecimento das amostras controle (com pele e sem pele) induziu a um considerável aumento na taxa de oxidação lipídica, com valores de TBARS variando de 2,60 (t=0) a 10,71 (t = 6 meses) para amostras com pele. CFMD sem pele apresentou resultados significativamente mais elevados (p<0,05), variando de 3,35 a 12,08, nos mesmos extremos de tempo de armazenamento, apresentando uma maior tendência à oxidação quando aquecidas. Nas amostras cruas, entretanto,

valores de TBARS de CFMD com pele e sem pele não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), como previamente reportado. Tais valores podem ser explicados em função da maior concentração de ferro total, no material sem pele, devido ao aumento no teor de medula óssea, levando a maior liberação do ferro iônico sob ação do calor.

Resultados de oxidação lipídica e de ferro hemínico e não-hemínico em CFMD, com os diferentes aditivos estão altamente correlacionados. Amostras que preveniram efetivamente o aumento no número de TBARS, também inibiram liberação de ferro não-hemínico.

Conforme discutido previamente, polifosfato de sódio não preveniu autooxidação nas amostras com pele e sem pele cruas com alto valores de TBARS durante período de armazenamento. Com aquecimento, no 3<sup>o</sup> mês houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na taxa de oxidação lipídica, mas os valores de TBARS foram muito menores em comparação às respectivas amostras controle. Ao final do 6<sup>o</sup> mês, valores de TBARS não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) demonstrando o efeito antioxidante de fosfato em sistemas sob aquecimento. De acordo com Tim & Watts (1958) e Sato & Hegarty (1971), fosfatos sequestraram íons de ferro e outros metais que catalisam oxidação lipídica somente após aquecimento. Segundo Shahid & Hong (1991) adição de tripolifosfato em sistemas modelos de carne de porco cozidas contendo compostos porfirínicos e íons de ferro adicionados, significativamente decresceu o número de TBARS, efeito atribuído à ação sequestrante do fosfato. Em amostras similares, Shahidi *et al.* (1987) encontraram uma ação antioxidante sinérgica quando tripolifosfato de sódio foi usado em combinação com ascorbato de sódio.

O nitrito de sódio preveniu a oxidação lipídica tanto nas amostras aquecidas como nas cruas, resultando em valores no número de TBARS consideravelmente menores que as amostras controle. De acordo com Tarladgis (1961) pigmentos heme foram catalisadores ativos do processo de oxidação lipídica quando presentes na forma oxidada (férica). O nitrito ligou-se ao grupo heme, mantendo ferro na forma reduzida, inativa como catalisador da oxidação lipídica. Sato & Hegarty (1971), por outro lado, concluíram que hemoglobina e mioglobina tiveram pouca importância na peroxidação de lipídios, sugerindo que o rompimento do sistema de membranas celulares resultou em exposição dos componentes lipídicos lábeis ao oxigênio e outras reações de oxidação. Segundo esses autores, nitrito reage com os lipídios levando à estabilização das membranas,

retardando autoxidação. Zipser *et al.* (1964) propuseram que nitrito forma um complexo estável com porfirinas contendo ferro em carnes desnaturadas pelo calor, inibindo rancidez oxidativa. Igene & Pearson (1979) e Igene *et al.* (1985) sugeriram que nitrito atua como antioxidante pela conversão dos pigmentos da carne a formas cataliticamente inativas, e estabiliza ácidos graxos insaturados. De acordo com Apte & Morrissey (1987), o nitrito em carnes cozidas é responsável pelo término no estágio de propagação das reações de autoxidação ou pela neutralização de radicais livres. Morrissey & Tichivangana (1985) postularam que nitrito provavelmente formou quelatos inativos ou complexos com ferro não-hemínico inibindo sua ação catalítica. A alta reatividade no nitrito com ferro foi demonstrado também por Reddy *et al.* (1983), os quais relataram que complexos enxofre-ferro, especialmente ferredozina reagem com nitrito formando compostos de ferronitrosil, os quais inibem crescimento de *Clostridium botulinum*, o que pode ser uma evidência da ligação de nitrito com elementos traços no tecido muscular, originando atividade antioxidante.

Ascorbato atuou como antioxidante somente nas amostras cruas. De acordo com Gomez-Basauri & Regenstein (1992b), ascorbato protegeu pigmentos heme da degradação em amostras de peixe ao longo da estocagem congelada. Os autores reportaram também baixos níveis de liberação de Fe não-hemínico durante armazenamento. De acordo com Sato e Hegarty (1971) ascorbato adicionado a níveis acima de 500 ppm reduziu os valores de TBARS, entretanto, baixos níveis foram pró-oxidantes. Os autores propuseram que ascorbato atua como antioxidante pela manutenção do equilíbrio das formas férricas e ferrosa. No experimento, tratamento com ascorbato, agente redutor, produziu uma cor de CFMD mais vermelha, muito próxima da cor da matéria-prima recém-desossada, o que foi demonstrado também através dos maiores valores de  $L^*$  e  $a^*$ , os quais praticamente não mudaram durante armazenamento, indicando preservação dos pigmentos heme. Deng *et al.* (1978) encontraram que ascorbato comportou-se como antioxidante em peixes a concentrações próximas de 1000 ppm e como pró-oxidante a níveis inferiores a 100 ppm. Dos resultados aqui obtidos, conclui-se que ascorbato a 500 ppm atuou com antioxidante em CFMD com pele e sem pele nas matéria-primas cruas e sinergisticamente com fosfato e nitrito nas amostras cozidas. De acordo com Liu & Watts (1970) substâncias tais como de ferro não-hemínico, alfa-tocoferol, ácido cítrico e aminoácidos, os quais estão naturalmente

presentes no tecido muscular, podem mudar a ação antioxidante de ascorbato para um composto pró-oxidante.

Em resumo, os resultados indicam o ferro não-hemínico como principal responsável pelo processo de oxidação nas amostras de CFMD sob aquecimento e ferro hemínico na matéria-prima armazenada congelada. De acordo com Ahn *et al.* (1993), ferro iônico livre é também o mais importante na catálise da oxidação lipídica. Os aditivos incorporados à matéria-prima durante armazenamento previnem liberação dessa forma de ferro e, portanto, podem aumentar o tempo de conservação dessa matéria-prima durante armazenamento congelado.

#### 4. Avaliação de salsichas de frango processadas com adição das formulações de CFMD durante armazenamento congelado

As salsichas elaboradas de acordo com a metodologia descrita previamente foram avaliadas com relação à estabilidade à oxidação lipídica através da determinação do número de TBARS cujos valores são apresentados nas Tabelas 27 e 28. Resultados indicam que oxidação lipídica ocorrida na matéria-prima ao longo da estocagem influenciou os valores de TBARS, resultando em teores consideravelmente mais elevados para as amostras F<sub>1</sub> (pura) após 3 e 6 meses, respectivamente 1,31 e 2,36 para amostras com pele e 1,29 e 2,57 para amostras sem pele em relação a 0,40 e 0,37 para amostras controle. Embora em pequena extensão, salsichas processadas logo após o 1<sup>o</sup> mês com adição de 20% da formulação F<sub>1</sub> apresentou resultados significativamente diferentes em comparação às amostras controle.

**Tabela 27 - Valores de TBARS de salsichas elaboradas com adição de 20% das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	Controle <sup>(1)</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
1	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,57±0,02 <sup>b</sup>	0,48±0,02 <sup>a</sup>	0,37±0,01 <sup>a</sup>	0,33±0,04 <sup>a</sup>	0,36±0,02 <sup>a</sup>
3	0,40±0,02 <sup>a</sup>	1,31±0,12 <sup>b</sup>	1,25±0,03 <sup>b</sup>	0,92±0,03 <sup>c</sup>	0,38±0,05 <sup>a</sup>	0,39±0,03 <sup>a</sup>
6	0,37±0,02 <sup>a</sup>	2,36±0,24 <sup>b</sup>	1,68±0,04 <sup>c</sup>	0,96±0,05 <sup>d</sup>	0,45±0,06 <sup>a</sup>	0,44±0,05 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b,c,d</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 28 - Valores de TBARS de salsichas elaboradas com adição de 20% das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	Controle <sup>(1)</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
1	0,37±0,03 <sup>a</sup>	0,61±0,03 <sup>b</sup>	0,51±0,03 <sup>cb</sup>	0,38±0,03 <sup>a</sup>	0,38±0,04 <sup>a</sup>	0,33±0,02 <sup>a</sup>
3	0,40±0,01 <sup>a</sup>	1,29±0,03 <sup>b</sup>	1,17±0,09 <sup>b</sup>	0,96±0,07 <sup>c</sup>	0,41±0,05 <sup>a</sup>	0,41±0,03 <sup>a</sup>
6	0,38±0,02 <sup>a</sup>	2,57±0,17 <sup>b</sup>	1,73±0,20 <sup>c</sup>	1,02±0,13 <sup>d</sup>	0,43±0,04 <sup>a</sup>	0,43±0,05 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b,c,d</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)



Formulações com pele e sem pele contendo fosfato acompanharam a tendência das matéria-primas cruas em relação ao processo de oxidação lipídica, elevando significativamente os valores TBARS das salsichas processadas ao final do período de armazenamento. CFMD com pele e sem pele com adição de 200 ppm de nitrito de sódio, resultaram em salsichas com valores de TBARS significativamente mais baixos ( $p < 0,05$ ) que as amostras puras e com adição de fosfato, entretanto, maiores que as formulações  $F_4$  e  $F_5$ .

Amostras de salsichas com adição de ascorbato ( $F_4$ ) e mistura ( $F_5$ ) dos três ingredientes não foram diferentes significativamente ( $p > 0,05$ ) das amostras controle em relação ao número de TBARS indicando completa inibição do processo de oxidação lipídica causado pela adição de CFMD. Estes resultados são coerentes mais uma vez com os menores valores de TBARS encontrados nessas matéria-primas durante armazenamento congelado.

Os resultados demonstram a importância e o risco da utilização de matéria-primas oxidadas em produtos processados, as quais podem comprometer a qualidade do produto final mesmo quando adicionada em pequena porcentagem, como no caso do experimento. De acordo com Pikul *et al.* (1984) os níveis absolutos de malonaldeído gerado pelo processamento de carne são fortemente dependentes dos níveis de malonaldeído iniciais da carne antes do processo.

Entre as propriedades físicas de salsichas processadas, dados de rendimento estão entre os mais importantes tanto pelo aspecto econômico como pelas características sensoriais do produto (Ladwig *et al.*, 1989).

Em relação aos valores de porcentagem de rendimento de processamento, resultados apresentados nas Tabelas 29, 30, 31 e 32 indicam que perdas de água na formulação controle com pele e sem pele ficaram em torno de 10%, o que era esperado (adicionou-se 10% de gelo para ser perdido durante cozimento). Somente nas CFMD com pele e sem pele puras ( $F_1$ ) houve diminuição significativa nas porcentagens de rendimento de processamento após 30 e 60 meses com valores atingindo 12 e 15% respectivamente, demonstrando perda da capacidade desses "batters" em reter água após cozimento. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as formulações contendo CFMD com nitrito, ascorbato e fosfato. Esses resultados podem ser relacionados com o efeito protetor desses ingredientes observado nas propriedades funcionais. CFMD com pele e sem pele

apresentaram intensa redução da solubilidade protéica, índice de atividade de emulsão e enfraquecimento dos géis.

**Tabela 29 - Valores de rendimento de processamento de salsichas com envoltório de celulose elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	Controle <sup>(1)</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
1	89,42±1,15 <sup>a</sup>	88,33±1,27 <sup>a</sup>	89,35±1,23 <sup>a</sup>	89,72±1,38 <sup>a</sup>	89,15±1,27 <sup>a</sup>	90,73±1,15 <sup>a</sup>
3	89,62±1,52 <sup>a</sup>	87,21±1,32 <sup>b</sup>	89,22±1,40 <sup>a</sup>	90,16±1,21 <sup>a</sup>	89,54±1,15 <sup>a</sup>	89,37±1,31 <sup>a</sup>
6	89,48±1,31 <sup>a</sup>	86,30±1,72 <sup>b</sup>	89,68±1,53 <sup>a</sup>	89,53±1,18 <sup>a</sup>	89,26±1,26 <sup>a</sup>	89,13±1,36 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b,c,d</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 30 - Valores de rendimento de processamento de salsichas com envoltório de celulose elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	Controle <sup>(1)</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
1	88,21±1,03 <sup>a</sup>	88,52±1,43 <sup>a</sup>	89,15±1,14 <sup>a</sup>	89,85±1,25 <sup>a</sup>	89,63±1,42 <sup>a</sup>	89,24±1,17 <sup>a</sup>
3	89,32±1,34 <sup>a</sup>	87,37±1,49 <sup>b</sup>	89,62±1,56 <sup>a</sup>	89,86±1,35 <sup>a</sup>	89,75±1,03 <sup>a</sup>	89,81±1,43 <sup>a</sup>
6	88,92±1,26 <sup>a</sup>	85,21±1,60 <sup>b</sup>	88,74±1,17 <sup>a</sup>	89,83±1,37 <sup>a</sup>	90,36±1,81 <sup>a</sup>	89,55±1,16 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b,c,d</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 31 - Valores de porcentagem de rendimento após reaquecimento de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	Controle <sup>(1)</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
1	97,65±1,32 <sup>a</sup>	97,85±1,85 <sup>a</sup>	97,53±1,27 <sup>a</sup>	97,36±1,15 <sup>a</sup>	97,38±1,92 <sup>a</sup>	97,53±1,36 <sup>a</sup>
3	97,15±1,28 <sup>a</sup>	95,21±1,41 <sup>b</sup>	97,23±1,65 <sup>a</sup>	97,56±1,15 <sup>a</sup>	97,31±1,78 <sup>a</sup>	97,63±1,84 <sup>a</sup>
6	97,17±1,02 <sup>a</sup>	93,34±1,48 <sup>b</sup>	97,95±1,24 <sup>a</sup>	97,82±1,67 <sup>a</sup>	97,81±1,31 <sup>a</sup>	97,14±1,23 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b,c,d</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 32 - Valores de porcentagem de rendimento após reaquecimento de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (meses)	Controle <sup>(1)</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
1	97,65±1,52 <sup>a</sup>	97,72±1,25 <sup>a</sup>	97,25±1,48 <sup>a</sup>	97,71±1,09 <sup>a</sup>	97,15±1,40 <sup>a</sup>	97,42±1,10 <sup>a</sup>
3	97,42±1,21 <sup>a</sup>	95,43±1,17 <sup>b</sup>	97,65±1,81 <sup>a</sup>	97,33±1,58 <sup>a</sup>	97,75±1,57 <sup>a</sup>	97,91±1,64 <sup>a</sup>
6	97,94±0,92 <sup>a</sup>	93,56±1,35 <sup>b</sup>	97,21±1,61 <sup>a</sup>	97,28±1,70 <sup>a</sup>	97,19±1,76 <sup>a</sup>	97,82±1,01 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b,c,d</sup> Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

Resultados de % de rendimento após reaquecimento são muito similares aos reportados previamente. Não houve diferença significativa entre as amostras das formulações com pele e sem pele (p>0,05). As perdas de peso nas amostras F<sub>1</sub> (pura) ficaram em torno de 3-7% e aproximadamente 2-3% nas demais e no controle. Tais resultados podem também ser correlacionados com propriedades funcionais e oxidação lipídica ocorrida na matéria-prima, como discutido em relação à porcentagem de rendimento de processamento (Tabelas 31 e 32).

A avaliação de cor através dos valores L\*, a\*, b\* indicou que salsichas com CFMD sem pele apresentaram valores ligeiramente superiores à salsichas com pele, especialmente para os dados de a, os quais são indicação de cor vermelha (Tabelas 33, 34, 35 e 36). Não houve variação significativa para os valores de L\* (luminosidade) e b\* (amarelo) (p>0,05) em todas as amostras. Entretanto, valores de a\* (vermelho) foram significativamente reduzidos nas formulações de salsichas contendo CFMD pura (F<sub>1</sub>) após 6 meses de estocagem, tanto interna como externamente. Após 3 meses, observou-se uma redução nos valores de a, a qual não foi significativa estatisticamente. Esses dados podem ser relacionados à degradação dos pigmentos heme ocorrido ao longo do período de estocagem congelada, reportado previamente. Desenvolvimento de cor em "batters" contendo matéria-primas com pigmentos oxidados fica prejudicado, resultando em produtos de qualidade inferior. Froning *et al.* (1971) descreveram que salsichas contendo 15% de CFMD estocada por mais de 90 dias apresentou elevados valores de TBARS e mais baixos índices de L\* em comparação ao processamento realizado com matérias-primas recém-desossadas, sugerindo em função disso, desenvolvimento de especificações de embalagens e parâmetros de

tempo e temperatura para armazenamento de CFMD. O efeito benéfico com uso de fosfato, nitrito e ascorbato em relação à qualidade geral das salsichas processadas constitui-se numa resposta a alguns dos principais problemas encontrados na manipulação dessa matéria-prima por tempo prolongado.

**Tabela 33 - Avaliação de cor (valores L\*, a\*, b\*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (superfície interna).**

Amostra	t = 1 mês			t = 3 meses			t = 6 meses		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Controle <sup>(1)</sup>	72,3±0,3 <sup>a</sup>	6,4±0,7 <sup>a</sup>	10,1±0,7 <sup>a</sup>	72,5±0,3 <sup>a</sup>	6,6±0,4 <sup>a</sup>	9,8±0,4 <sup>a</sup>	73,0±0,3 <sup>a</sup>	6,8±0,3 <sup>a</sup>	10,2±0,7 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub>	72,3±1,3 <sup>a</sup>	6,5±0,8 <sup>a</sup>	9,7±0,4 <sup>a</sup>	71,3±0,5 <sup>a</sup>	5,3±0,5 <sup>a</sup>	9,3±0,4 <sup>a</sup>	71,2±0,3 <sup>a</sup>	4,1±0,3 <sup>b</sup>	10,3±0,4 <sup>a</sup>
F <sub>2</sub>	73,4±0,3 <sup>a</sup>	6,4±0,2 <sup>a</sup>	9,5±0,4 <sup>a</sup>	72,3±0,6 <sup>a</sup>	6,2±0,4 <sup>a</sup>	9,3±0,7 <sup>a</sup>	71,1±0,8 <sup>a</sup>	6,5±0,4 <sup>a</sup>	10,8±0,6 <sup>a</sup>
F <sub>3</sub>	72,3±0,9 <sup>a</sup>	6,3±0,3 <sup>a</sup>	9,7±0,9 <sup>a</sup>	72,7±0,5 <sup>a</sup>	6,6±0,3 <sup>a</sup>	9,7±0,7 <sup>a</sup>	72,4±0,5 <sup>a</sup>	6,4±0,5 <sup>a</sup>	10,5±1,0 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub>	71,9±1,4 <sup>a</sup>	6,6±0,9 <sup>a</sup>	9,8±0,5 <sup>a</sup>	72,5±0,4 <sup>a</sup>	6,7±0,3 <sup>a</sup>	9,8±0,6 <sup>a</sup>	71,4±0,7 <sup>a</sup>	6,3±0,4 <sup>a</sup>	10,5±0,8 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub>	72,6±1,3 <sup>a</sup>	6,8±0,2 <sup>a</sup>	9,6±0,9 <sup>a</sup>	72,4±0,8 <sup>a</sup>	6,5±0,3 <sup>a</sup>	9,5±0,2 <sup>a</sup>	72,5±0,6 <sup>a</sup>	6,9±0,5 <sup>a</sup>	10,7±0,5 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> Controle CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b</sup> Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 34 - Avaliação de cor (valores L\*, a\*, b\*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento (superfície externa).**

Amostra	t = 1 mês			t = 3 meses			t = 6 meses		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Controle <sup>(1)</sup>	69,3±0,9 <sup>a</sup>	7,4±0,4 <sup>a</sup>	13,0±0,5 <sup>a</sup>	69,5±0,3 <sup>a</sup>	6,8±0,5 <sup>a</sup>	12,2±0,7 <sup>a</sup>	69,7±0,4 <sup>a</sup>	7,2±0,3 <sup>a</sup>	12,5±0,7 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub>	69,1±0,6 <sup>a</sup>	7,3±0,6 <sup>a</sup>	13,1±0,4 <sup>a</sup>	69,3±1,2 <sup>a</sup>	7,0±0,9 <sup>a</sup>	13,6±0,7 <sup>a</sup>	67,8±0,5 <sup>a</sup>	5,3±0,6 <sup>b</sup>	14,1±0,6 <sup>a</sup>
F <sub>2</sub>	68,9±0,2 <sup>a</sup>	7,2±0,3 <sup>a</sup>	13,3±0,7 <sup>a</sup>	69,3±0,4 <sup>a</sup>	7,3±0,5 <sup>a</sup>	13,3±0,6 <sup>a</sup>	68,1±0,4 <sup>a</sup>	7,5±0,4 <sup>a</sup>	13,3±0,3 <sup>a</sup>
F <sub>3</sub>	69,3±0,7 <sup>a</sup>	7,3±0,5 <sup>a</sup>	13,3±0,6 <sup>a</sup>	69,4±0,8 <sup>a</sup>	7,0±0,3 <sup>a</sup>	12,9±0,3 <sup>a</sup>	68,3±0,5 <sup>a</sup>	7,5±0,5 <sup>a</sup>	13,5±0,9 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub>	69,4±0,6 <sup>a</sup>	7,0±0,4 <sup>a</sup>	12,9±0,3 <sup>a</sup>	68,1±0,4 <sup>a</sup>	7,5±0,4 <sup>a</sup>	13,3±0,5 <sup>a</sup>	68,4±0,8 <sup>a</sup>	7,3±0,3 <sup>a</sup>	13,5±0,8 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub>	69,2±0,8 <sup>a</sup>	6,9±0,5 <sup>a</sup>	13,7±0,4 <sup>a</sup>	68,0±0,9 <sup>a</sup>	7,5±0,5 <sup>a</sup>	14,0±0,7 <sup>a</sup>	68,3±0,7 <sup>a</sup>	7,1±0,4 <sup>a</sup>	13,2±0,5 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

<sup>(1)</sup> Controle CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b</sup> Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 35 - Avaliação de cor (valores L\*, a\*, b\*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (superfície interna).**

Amostra	t = 1 mês			t = 3 meses			t = 6 meses		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Controle <sup>(1)</sup>	69,9±0,5 <sup>a</sup>	7,5±0,3 <sup>b</sup>	10,1±0,6 <sup>a</sup>	68,9±0,7 <sup>a</sup>	7,8±0,4 <sup>a</sup>	9,5±0,3 <sup>a</sup>	69,1±0,4 <sup>a</sup>	7,5±0,6 <sup>a</sup>	10,3±0,3 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub>	69,2±0,8 <sup>a</sup>	7,4±0,2 <sup>b</sup>	10,3±0,6 <sup>a</sup>	69,3±0,7 <sup>a</sup>	6,5±0,7 <sup>d</sup>	9,4±0,6 <sup>b</sup>	71,3±0,3 <sup>a</sup>	5,0±0,3 <sup>b</sup>	10,2±0,3 <sup>a</sup>
F <sub>2</sub>	68,7±0,6 <sup>a</sup>	7,5±0,5 <sup>a</sup>	10,2±0,1 <sup>a</sup>	68,9±0,3 <sup>a</sup>	6,7±0,3 <sup>a</sup>	9,3±0,7 <sup>a</sup>	68,7±0,5 <sup>a</sup>	7,3±0,4 <sup>a</sup>	10,2±0,5 <sup>a</sup>
F <sub>3</sub>	69,5±0,7 <sup>a</sup>	7,3±0,9 <sup>b</sup>	10,5±0,5 <sup>a</sup>	68,7±0,9 <sup>a</sup>	7,5±1,1 <sup>b</sup>	9,3±0,5 <sup>a</sup>	69,4±0,5 <sup>a</sup>	7,2±0,3 <sup>a</sup>	10,4±0,6 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub>	68,3±0,6 <sup>a</sup>	7,5±0,3 <sup>a</sup>	10,5±0,7 <sup>a</sup>	69,3±0,6 <sup>a</sup>	6,9±0,3 <sup>b</sup>	9,3±0,7 <sup>a</sup>	69,5±0,5 <sup>a</sup>	7,3±0,2 <sup>a</sup>	10,3±0,3 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub>	68,8±0,2 <sup>a</sup>	7,5±0,5 <sup>a</sup>	10,3±0,8 <sup>a</sup>	69,2±0,7 <sup>a</sup>	7,5±0,4 <sup>a</sup>	9,1±0,5 <sup>a</sup>	69,3±0,8 <sup>a</sup>	7,1±0,4 <sup>a</sup>	10,4±0,5 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

(<sup>1</sup>) Controle CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b</sup> Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela 36 - Avaliação de cor (valores L\*, a\*, b\*) de salsichas elaboradas com adição de 20% das misturas de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento (superfície externa).**

Amostra	t = 1 mês			t = 3 meses			t = 6 meses		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Controle <sup>(1)</sup>	64,8±0,8 <sup>a</sup>	9,3±0,8 <sup>b</sup>	12,5±0,3 <sup>a</sup>	63,7±0,6 <sup>a</sup>	10,1±0,8 <sup>a</sup>	13,3±0,4 <sup>a</sup>	65,4±0,5 <sup>a</sup>	9,5±0,3 <sup>a</sup>	12,9±0,8 <sup>a</sup>
F <sub>1</sub>	64,3±1,2 <sup>a</sup>	9,5±0,8 <sup>a</sup>	12,9±0,5 <sup>a</sup>	64,8±0,7 <sup>a</sup>	8,3±0,3 <sup>a</sup>	12,7±0,6 <sup>a</sup>	64,1±0,3 <sup>a</sup>	5,9±0,3 <sup>b</sup>	13,5±0,7 <sup>a</sup>
F <sub>2</sub>	64,5±0,5 <sup>a</sup>	9,4±0,6 <sup>a</sup>	12,6±0,5 <sup>a</sup>	64,2±0,8 <sup>b</sup>	8,9±0,3 <sup>a</sup>	13,3±0,6 <sup>a</sup>	65,3±0,8 <sup>a</sup>	8,4±0,3 <sup>b</sup>	13,6±0,4 <sup>a</sup>
F <sub>3</sub>	63,6±0,7 <sup>a</sup>	9,6±0,8 <sup>a</sup>	12,8±0,9 <sup>a</sup>	63,4±1,2 <sup>a</sup>	8,8±0,5 <sup>a</sup>	12,7±1,3 <sup>a</sup>	64,9±0,8 <sup>a</sup>	8,9±0,3 <sup>a</sup>	13,0±0,5 <sup>a</sup>
F <sub>4</sub>	64,1±0,8 <sup>a</sup>	9,5±0,3 <sup>a</sup>	12,2±0,6 <sup>a</sup>	64,5±1,3 <sup>a</sup>	9,5±0,7 <sup>a</sup>	12,9±0,8 <sup>a</sup>	65,2±0,8 <sup>a</sup>	9,8±0,4 <sup>a</sup>	13,4±0,4 <sup>a</sup>
F <sub>5</sub>	65,5±0,9 <sup>a</sup>	9,3±0,6 <sup>a</sup>	12,5±0,7 <sup>a</sup>	63,7±0,8 <sup>a</sup>	9,5±0,8 <sup>a</sup>	13,5±0,7 <sup>a</sup>	65,3±0,3 <sup>a</sup>	9,9±0,6 <sup>a</sup>	13,2±0,5 <sup>a</sup>

F<sub>1</sub> - Controle; F<sub>2</sub> - Fosfato; F<sub>3</sub> - Nitrito; F<sub>4</sub> - Ascorbato; F<sub>5</sub> - Mistura

(<sup>1</sup>) Controle CFMD C/P e matérias-primas obtidas dentro de 48 horas antes do processamento.

<sup>a,b</sup> Médias dentro das colunas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

## 5. Efeito da adição de medula óssea à carne de peito e coxa submetida a diferentes processos de moagem.

O alto conteúdo de gordura da medula óssea (43,51%) causou um significativo aumento no conteúdo de gordura total das amostras de peito e coxa de frango. Para carne de peito, por exemplo, quando o nível de pigmentos totais alcançou o valor de 8mg/g, o conteúdo de gordura elevou-se de 2,52% (amostra controle) para 11,72%; para carne de coxa, o conteúdo de gordura total subiu de 5,16% para 12,79% (Tabela 37). Uma vez que os lipídios de medula óssea contêm uma considerável proporção de ácidos graxos polinsaturados, isto constituiu-se num importante fator que determinou a instabilidade à oxidação lipídica durante armazenamento congelado. Embora tais resultados já fossem esperados, com o presente experimento, foi possível determinar se o processo de oxidação lipídica foi proporcional ao aumento da adição de medula óssea, especialmente em relação ao aumento do teor de pigmentos heme, quantificando-se esse efeito.

**Tabela 37 - Caracterização química de carne de peito<sup>(1)</sup> e coxa<sup>(2)</sup> de frango, adicionada de diferentes níveis de medula óssea.**

		Controle*	2*	4*	6*	8*
Gordura (%)	1	2,52±.14	5,58±.10	8,24±.09	9,85±.10	11,72±.21
	2	5,16±.03	6,78±.02	10,24±.05	11,75±.24	12,79±.21
Cinzas (%)	1	0,39±.01	0,58±.02	0,71±.05	0,90±.03	1,17±.10
	2	0,48±.03	0,63±.02	0,75±.01	0,86±.05	1,22±.05
Pig. Totais (mg/g)	1	0,52±.01	2,24±.07	4,29±.07	6,27±.14	8,43±.18
	2	0,80±.02	2,31±.02	4,34±.24	6,18±.06	8,26±.14
Mb (mg/g)	1	0,33±.02	0,98±.01	1,67±.02	2,99±.23	3,29±.02
	2	0,58±.04	0,89±.01	1,84±.01	2,66±.03	3,33±.22
Hb (mg/g)	1	0,09±.01	1,26±.07	2,62±.09	3,29±.08	5,14±.19
	2	0,22±.02	1,42±.07	2,50±.25	3,52±.10	5,04±.08

\* Níveis de medula óssea adicionada = 0, 2, 4, 6 e 8 mg de medula óssea/g de carne

Para as amostras controle, as quais contiveram somente os pigmentos heme naturalmente presentes nos músculos, os valores de TBARS aumentaram levemente, não diferindo significativamente entre as amostras moídas convencionalmente, e aquelas passadas pelo desossador. Os resultados foram mais altos para as amostras de coxa, as quais apresentaram um valor maior de

pigmentos totais (0,42 mg/g e 0,80 mg/g, respectivamente para peito e coxa) (Tabela 38).

A adição de medula óssea para atingir uma concentração de pigmentos totais de 2 mg/g alterou muito pouco os valores de TBARS em relação às amostras controle (Tabela 39). Não houveram diferenças significativas para as amostras moídas em equipamento Hobart e naquelas passadas pelo desossador mecânico.

Quando os níveis de pigmentos totais foram superiores a 4 mg/g (Tabela 40), os valores de TBARS começaram a aumentar após 90 dias de estocagem congelada. É importante ressaltar que amostras comerciais de carne de frango mecanicamente desossada, contém cerca de 4 mg de pigmentos totais/g de amostra.

**Tabela 38 - Valores de TBARS (mg malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	PMM	PMC	CMM	CMC
0	0,24±0,03 <sup>ab</sup>	0,24±0,03 <sup>ab</sup>	0,29±0,02 <sup>a</sup>	0,20±0,02 <sup>b</sup>
15	0,31±0,01 <sup>ab</sup>	0,24±0,03 <sup>b</sup>	0,36±0,04 <sup>a</sup>	0,26±0,02 <sup>b</sup>
30	0,39±0,03 <sup>a</sup>	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,34±0,01 <sup>a</sup>	0,33±0,01 <sup>a</sup>
45	0,37±0,02 <sup>b</sup>	0,44±0,02 <sup>ab</sup>	0,50±0,04 <sup>a</sup>	0,42±0,02 <sup>ab</sup>
60	0,34±0,02 <sup>a</sup>	0,73±0,02 <sup>b</sup>	0,46±0,01 <sup>a</sup>	0,47±0,02 <sup>a</sup>
75	0,45±0,02 <sup>a</sup>	0,45±0,03 <sup>a</sup>	0,46±0,05 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>b</sup>
90	0,41±0,01 <sup>a</sup>	0,53±0,02 <sup>a</sup>	0,50±0,02 <sup>a</sup>	0,44±0,02 <sup>a</sup>
105	0,48±0,03 <sup>a</sup>	0,59±0,02 <sup>a</sup>	0,56±0,02 <sup>a</sup>	0,55±0,01 <sup>a</sup>
120	0,43±0,02 <sup>a</sup>	0,50±0,02 <sup>a</sup>	0,54±0,03 <sup>a</sup>	0,56±0,02 <sup>a</sup>
135	0,53±0,01 <sup>a</sup>	0,59±0,01 <sup>a</sup>	0,57±0,02 <sup>a</sup>	0,61±0,02 <sup>a</sup>
150	0,56±0,02 <sup>a</sup>	0,61±0,03 <sup>a</sup>	0,66±0,03 <sup>a</sup>	0,61±0,01 <sup>a</sup>
165	0,64±0,03 <sup>a</sup>	0,64±0,03 <sup>a</sup>	0,89±0,02 <sup>b</sup>	0,89±0,01 <sup>b</sup>
180	0,74±0,07 <sup>a</sup>	0,71±0,03 <sup>a</sup>	1,33±0,01 <sup>b</sup>	1,00±0,02 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes.

PMM - carne de peito passada pelo equipamento de desossa mecânica

PMC - carne de peito moída convencionalmente (equipamento Hobart)

CMM - carne de coxa passada pelo equipamento de desossa mecânica

CMC - carne de coxa moída convencionalmente (equipamento Hobart)

**Tabela 39 - Valores de TBARS para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 2 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	PMM	PMC	CMM	CMC
0	0,26±0,01 <sup>b</sup>	0,29±0,02 <sup>ab</sup>	0,34±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>b</sup>
15	0,29±0,02 <sup>b</sup>	0,29±0,02 <sup>b</sup>	0,39±0,02 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>b</sup>
30	0,36±0,04 <sup>a</sup>	0,42±0,02 <sup>b</sup>	0,46±0,01 <sup>b</sup>	0,34±0,01 <sup>a</sup>
45	0,54±0,03 <sup>b</sup>	0,46±0,02 <sup>a</sup>	0,56±0,02 <sup>a</sup>	0,35±0,02 <sup>b</sup>
60	0,64±0,03 <sup>a</sup>	0,47±0,02 <sup>b</sup>	0,61±0,02 <sup>a</sup>	0,42±0,01 <sup>b</sup>
75	0,83±0,01 <sup>a</sup>	0,51±0,03 <sup>b</sup>	0,89±0,01 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>c</sup>
90	0,88±0,04 <sup>a</sup>	0,64±0,03 <sup>b</sup>	0,74±0,03 <sup>a</sup>	0,55±0,02 <sup>b</sup>
105	1,29±0,02 <sup>a</sup>	1,29±0,06 <sup>a</sup>	1,33±0,02 <sup>a</sup>	0,57±0,02 <sup>b</sup>
120	1,75±0,02 <sup>a</sup>	1,36±0,04 <sup>b</sup>	1,43±0,03 <sup>ab</sup>	0,64±0,02 <sup>c</sup>
135	1,80±0,01 <sup>a</sup>	1,48±0,21 <sup>a</sup>	1,36±0,05 <sup>a</sup>	0,69±0,02 <sup>b</sup>
150	2,17±0,01 <sup>a</sup>	1,98±0,20 <sup>a</sup>	1,75±0,02 <sup>b</sup>	0,89±0,01 <sup>b</sup>
165	2,72±0,02 <sup>a</sup>	2,22±0,05 <sup>b</sup>	2,44±0,27 <sup>ab</sup>	1,17±0,05 <sup>c</sup>
180	2,93±0,09 <sup>a</sup>	2,80±0,06 <sup>a</sup>	2,78±0,07 <sup>a</sup>	2,00±0,06 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes.

PMM - carne de peito passada pelo equipamento de desossa mecânica

PMC - carne de peito moída convencionalmente (equipamento Hobart)

CMM - carne de coxa passada pelo equipamento de desossa mecânica

CMC - carne de coxa moída convencionalmente (equipamento Hobart)



**Tabela 40 - Valores de TBARS (ml malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 4 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	PMM	PMC	CMM	CMC
0	0,37±0,01 <sup>b</sup>	0,23±0,04 <sup>c</sup>	0,48±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,02 <sup>c</sup>
15	0,36±0,01 <sup>b</sup>	0,24±0,03 <sup>c</sup>	0,45±0,02 <sup>a</sup>	0,26±0,02 <sup>c</sup>
30	0,42±0,02 <sup>b</sup>	0,32±0,02 <sup>c</sup>	0,51±0,01 <sup>a</sup>	0,35±0,01 <sup>c</sup>
45	0,65±0,01 <sup>a</sup>	0,45±0,02 <sup>b</sup>	0,66±0,02 <sup>a</sup>	0,44±0,01 <sup>b</sup>
60	1,09±0,05 <sup>a</sup>	0,53±0,02 <sup>c</sup>	0,89±0,03 <sup>b</sup>	0,61±0,01 <sup>c</sup>
75	2,17±0,01 <sup>a</sup>	0,56±0,03 <sup>b</sup>	1,08±0,04 <sup>c</sup>	0,71±0,03 <sup>b</sup>
90	1,80±0,02 <sup>a</sup>	0,71±0,03 <sup>b</sup>	1,36±0,05 <sup>b</sup>	0,88±0,02 <sup>c</sup>
105	2,72±0,02 <sup>a</sup>	1,73±0,05 <sup>b</sup>	3,02±0,06 <sup>a</sup>	0,89±0,01 <sup>c</sup>
120	3,35±0,08 <sup>a</sup>	2,69±0,03 <sup>b</sup>	3,43±0,15 <sup>a</sup>	2,53±0,09 <sup>b</sup>
135	3,26±0,16 <sup>a</sup>	3,22±0,21 <sup>a</sup>	3,26±0,18 <sup>a</sup>	2,93±0,13 <sup>b</sup>
150	3,94±0,47 <sup>a</sup>	3,35±0,08 <sup>bc</sup>	4,45±0,04 <sup>a</sup>	2,65±0,03 <sup>c</sup>
165	5,02±0,14 <sup>a</sup>	4,97±0,09 <sup>c</sup>	5,11±0,05 <sup>a</sup>	3,22±0,21 <sup>b</sup>
180	6,11±0,04 <sup>a</sup>	5,82±0,14 <sup>b</sup>	6,97±0,09 <sup>c</sup>	5,13±0,24 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes.

PMM - carne de peito passada pelo equipamento de desossa mecânica

PMC - carne de peito moída convencionalmente (equipamento Hobart)

CMM - carne de coxa passada pelo equipamento de desossa mecânica

CMC - carne de coxa moída convencionalmente (equipamento Hobart)

**Tabela 41 - Valores de TBARS (mg malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 6 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	PMM	PMC	CMM	CMC
0	0,42±0,01 <sup>b</sup>	0,25±0,01 <sup>c</sup>	0,51±0,03 <sup>a</sup>	0,24±0,03 <sup>b</sup>
15	0,43±0,01 <sup>a</sup>	0,27±0,01 <sup>b</sup>	0,51±0,02 <sup>a</sup>	0,29±0,02 <sup>b</sup>
30	0,52±0,02 <sup>a</sup>	0,36±0,02 <sup>b</sup>	0,56±0,01 <sup>a</sup>	0,53±0,01 <sup>a</sup>
45	0,71±0,03 <sup>b</sup>	0,49±0,02 <sup>c</sup>	0,88±0,04 <sup>a</sup>	0,63±0,02 <sup>ab</sup>
60	1,15±0,04 <sup>a</sup>	0,66±0,02 <sup>b</sup>	1,11±0,02 <sup>a</sup>	0,73±0,02 <sup>a</sup>
75	2,78±0,08 <sup>a</sup>	0,73±0,03 <sup>b</sup>	2,25±0,03 <sup>b</sup>	1,17±0,06 <sup>b</sup>
90	3,19±0,08 <sup>a</sup>	1,25±0,02 <sup>b</sup>	4,45±0,04 <sup>c</sup>	2,00±0,06 <sup>a</sup>
105	4,65±0,23 <sup>a</sup>	3,06±0,05 <sup>b</sup>	4,81±0,25 <sup>a</sup>	3,73±0,06 <sup>a</sup>
120	5,11±0,04 <sup>ab</sup>	4,65±0,24 <sup>b</sup>	4,97±0,09 <sup>c</sup>	5,47±0,11 <sup>a</sup>
135	7,75±0,06 <sup>a</sup>	5,11±0,04 <sup>b</sup>	7,75±0,06 <sup>a</sup>	7,53±0,17 <sup>a</sup>
150	8,44±0,40 <sup>a</sup>	7,76±0,06 <sup>b</sup>	9,86±0,02 <sup>c</sup>	7,58±0,23 <sup>a</sup>
165	10,29±0,43 <sup>a</sup>	8,44±0,40 <sup>b</sup>	10,46±0,25 <sup>a</sup>	8,44±0,40 <sup>b</sup>
180	11,21±0,49 <sup>a</sup>	7,81±0,23 <sup>b</sup>	12,84±0,41 <sup>c</sup>	9,14±0,09 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes.

PMM - carne de peito passada pelo equipamento de desossa mecânica

PMC - carne de peito moída convencionalmente (equipamento Hobart)

CMM - carne de coxa passada pelo equipamento de desossa mecânica

CMC - carne de coxa moída convencionalmente (equipamento Hobart)

**Tabela 42 - Valores de TBARS (mg malonaldeído/kg de amostra) para carne de peito e coxa (PMM, PMC, CMM, CMC) contendo 8 mg de pigmentos totais/g de amostra durante armazenamento sob congelamento (-18°C).**

Tempo (dias)	PMM	PMC	CMM	CMC
0	0,41±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,50±0,03 <sup>a</sup>	0,26±0,02 <sup>b</sup>
15	0,39±0,01 <sup>a</sup>	0,27±0,02 <sup>b</sup>	0,53±0,02 <sup>c</sup>	0,27±0,01 <sup>b</sup>
30	0,46±0,01 <sup>a</sup>	0,49±0,02 <sup>a</sup>	0,59±0,02 <sup>b</sup>	0,42±0,02 <sup>a</sup>
45	0,85±0,01 <sup>a</sup>	0,65±0,05 <sup>b</sup>	0,92±0,03 <sup>a</sup>	0,66±0,01 <sup>b</sup>
60	1,88±0,04 <sup>a</sup>	1,25±0,05 <sup>b</sup>	2,16±0,02 <sup>c</sup>	0,91±0,01 <sup>d</sup>
75	3,06±0,05 <sup>a</sup>	1,75±0,05 <sup>c</sup>	3,71±0,15 <sup>b</sup>	1,90±0,09 <sup>c</sup>
90	4,41±0,07 <sup>a</sup>	2,65±0,01 <sup>b</sup>	5,24±0,05 <sup>c</sup>	3,19±0,08 <sup>d</sup>
105	5,11±0,27 <sup>b</sup>	4,36±0,21 <sup>c</sup>	7,07±0,12 <sup>a</sup>	5,70±0,12 <sup>b</sup>
120	7,46±0,11 <sup>a</sup>	6,14±0,09 <sup>b</sup>	10,34±0,24 <sup>c</sup>	8,08±0,15 <sup>d</sup>
135	8,24±0,05 <sup>a</sup>	7,70±0,15 <sup>b</sup>	12,84±0,41 <sup>c</sup>	8,33±0,06 <sup>d</sup>
150	10,20±0,41 <sup>a</sup>	9,07±0,23 <sup>b</sup>	14,41±0,22 <sup>c</sup>	11,09±0,13 <sup>d</sup>
165	12,84±0,40 <sup>a</sup>	11,82±0,23 <sup>a</sup>	16,71±0,36 <sup>b</sup>	12,35±0,17 <sup>a</sup>
180	16,67±0,25 <sup>a</sup>	11,82±0,42 <sup>b</sup>	18,50±0,21 <sup>c</sup>	16,51±0,23 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes.

PMM - carne de peito passada pelo equipamento de desossa mecânica

PMC - carne de peito moída convencionalmente (equipamento Hobart)

CMM - carne de coxa passada pelo equipamento de desossa mecânica

CMC - carne de coxa moída convencionalmente (equipamento Hobart)

O efeito da adição de medula óssea na estabilidade à oxidação lipídica tornou-se mais evidente quando os níveis de pigmentos totais alcançaram valores de 6 mg e 8 mg/g de amostra. Nestes níveis de pigmentos, os valores de TBARS foram sempre mais altos para as amostras processadas através do equipamento de desossa mecânica (Tabelas 41 e 42).

O presente experimento demonstrou que rompimento celular promovido pela passagem no desossador mecânico tornaram a carne de frango mais susceptível à oxidação em relação àquela moída em equipamento convencional (moedor Hobart).

## CONCLUSÕES

No estudo das propriedades funcionais das proteínas miofibrilares e oxidação lipídica de CFMD com adição de fosfato, nitrito e ascorbato ao longo do armazenamento sob congelamento, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. Carne de frango mecanicamente desossada com pele e sem pele, adicionadas de fosfato, nitrito e ascorbato de sódio apresentaram-se estáveis à oxidação lipídica durante armazenamento sob congelamento, resultando em valores de TBARS significativamente menores, quando comparadas às respectivas matérias-primas sem aditivos.
2. Durante o período de armazenamento sob congelamento, as amostras controle (F<sub>1</sub>) apresentaram expressiva degradação de pigmentos heme, o que foi considerado como fator determinante no desenvolvimento da oxidação lipídica. As formulações F<sub>5</sub> (mistura de polifosfato, nitrito e ascorbato) e F<sub>4</sub> (ascorbato) evitaram a oxidação de pigmentos heme e mantiveram a cor dos blocos congelados de CFMD muito próxima das amostras recém-desossadas.
3. Em relação às propriedades funcionais, observou-se que a solubilidade, índice de atividade de emulsão e volume de líquido liberado de géis obtidos das proteínas miofibrilares foram reduzidos durante armazenamento sob congelamento nas matérias-primas puras com pele e sem pele (F<sub>1</sub>), indicando desnaturação protéica, o que foi confirmado pelos dados de atividade de ATPase e eletroforese em gel de poliacrilamida.
4. Entre as formulações estudadas, proteínas extraídas de CFMD contendo fosfato resultou em maior solubilidade, índice de atividade de emulsão e atividade de ATPase, seguido por ascorbato e nitrito (F<sub>4</sub> e F<sub>3</sub>). A formulação F<sub>5</sub> (mistura), entretanto, levou a resultados significativamente superiores nas determinações acima, indicando que aditivos em conjunto exerceram ação sinérgica combinando os efeitos positivos de ascorbato e fosfato principalmente.

5. Estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida indicaram que adição de fosfato, nitrito e ascorbato não alterou o número de bandas protéicas identificadas ao longo do período de armazenamento, em comparação com amostras recém desossadas. Entretanto, nas amostras de CFMD puras com pele e sem pele (F<sub>1</sub>) ocorreu desaparecimento da banda de miosina ao final de 6 meses de armazenamento, indicando desnaturação da mais importante proteína sob o aspecto de funcionalidade da fração miofibrilar. Portanto, o uso de fosfato, nitrito e ascorbato, individualmente ou em conjunto, atuaram favoravelmente na prevenção das desnaturação protéica durante estocagem congelada.
6. Durante armazenamento sob congelamento, após o 3<sup>o</sup> mês ocorreu redução significativa nos teores de ferro hemínico, com respectivo aumento do teor de ferro iônico nas amostras controle (F<sub>1</sub>) com pele e sem pele, indicando degradação dos pigmentos heme com liberação de ferro não-hemínico. Sob aquecimento o teor de ferro iônico aumentou em até 50% nas amostras puras.
7. O uso de polifosfato, nitrito e combinação de fosfato, nitrito e ascorbato (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>5</sub>) não alterou significativamente os valores de ferro hemínico e não-hemínico após aquecimento. Ascorbato de sódio, adicionado isoladamente, mostrou-se ineficiente em prevenir a degradação de pigmentos heme sob aquecimento, entretanto foi um efetivo antioxidante nas amostras cruas.
8. Em relação ao efeito do aquecimento sobre os valores do número de TBARS, observou-se que os tratamentos que inibiram liberação de ferro iônico também evitaram a oxidação lipídica. Novamente, o ascorbato de sódio atuou como antioxidante somente nas amostras cruas, não evitando a oxidação lipídica sob aquecimento.
9. A avaliação de salsichas processadas com 20% de adição das diferentes formulações armazenadas sob congelamento, indicou que oxidação lipídica ocorrida nas matérias-primas influenciou marcadamente os valores de TBARS dos produtos finais, com maiores índices de TBARS para as salsichas contendo CFMD pura (F<sub>1</sub>) com pele e sem pele sem os aditivos adicionados. Houve

redução significativa do rendimento de processamento e reaquecimento das salsichas processadas somente nas amostras controle (F<sub>1</sub>), cujos resultados foram correlacionados com perda de funcionalidade das proteínas miofibrilares dessas amostras. Avaliação de cor resultou em diminuição dos valores de a\* (intensidade de vermelho), somente após 3 meses de armazenamento e apenas para F<sub>1</sub>.

10. Em relação ao efeito da adição de medula óssea à carne de frango moída por diferentes processos, os resultados indicaram que rompimento celular causado pelo desossador tornou as amostras mais susceptíveis à oxidação lipídica em comparação com a mesma matéria-prima moída em moedor convencional Hobart. Os valores de TBARS de ambas carnes de peito e coxa foram sempre mais altos para as amostras passadas através do desossador quando comparados aos valores para carne moída em moedor Hobart quando a concentração de pigmentos totais foi superior a 4 mg/g de carne.

## BIBLIOGRAFIA

- Acton, J.C.; Ziegler, G.R. & Burge Jr., D.L. 1983. Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, **18**(2): 99-121.
- Ahn, D.U.; Wolfe, F.H.; Sim, J.S. & Kim, D.H. 1992. Packaging cooked turkey meat patties with hot reduces lipid oxidation. **Poultry Sci.**, **57**(5): 1077, 1175.
- Ahn, D.U.; Wolfe, F.H. & Sim, J.S. 1993. Three methods for determining nonheme iron in turkey meat. **J. Food Sci.**, **58**(2): 288-291.
- Ahn, D.U.; Wolfe, F.H. & Sim, J.S. 1993. The effect of free and bound iron on lipid peroxidation in turkey meat. **Poultry Sci.**, **72**(1): 209-215.
- Allen, C.E. & Foegeding, A.E. 1981. Some lipids characteristics and interactions in muscle foods - a review. **Food Technol.**, **35**(5): 253-257.
- Ambrosiadis, I. & Wirth, F. 1984. Comminution of connective tissue and temperature pattern in the manufacture of frankfurter - type sausages. **Fleischwirtsch.**, **64**(8): 945-950.
- Anderson, M.L. & Steinberg, M.A. 1964. Effect of lipid content on protein - sodium linoleate interaction in fish muscle homogenates. **J. Food Sci.**, **29**: 327-330.
- Ang, C.Y.W. & Hamm, D. 1986. Effect of salt and sodium tripolyphosphate and shear, thiobarbituric acid, sodium phosphorus values of hot-stripped broiler breast meat. **Poultry Sci.**, **65**(8): 1532-1538.
- Ang, C.Y.W. & Young, L.L. 1989. Factors relating to oxidative stability of cooked broiler breast patties treated with sodium tripolyphosphate. **J. Food Sci.**, **54**(5): 1151-1159.
- A. O. A. C. 1984. Official Methods of Analysis, 14th ed. Association Of Official Analytical Chemists. Washington. D. C.

- Apte, S. & Morrysey, P.A. 1987. Effect of water - soluble haem and non-haem iron complexes on lipid oxidation of heated muscle systems. **Food Chem.**, **26**(3): 213-222.
- Asghar, A.; Samejima, K. & Yasui, T. 1985. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, **22**(1): 27-106.
- Barbut, S. 1988. Microstructure of reduced salt meat batters as affected by polyphosphates and chopping time. **J. Food Sci.**, **53**(5): 1300-1304.
- Beraquet, N. J. 1990. CMS: Caminho para o aproveitamento integral de carne de aves. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola. APINCO: 103-111.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipids extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, **37**: 911-917.
- Buttukus, A. 1967. The reaction of myosin with malonaldehyde. **J. Food Sci.**, **32**(4): 432-4345
- Catsimpoolas, H. & Meyer, E.W. 1970. Gelation phenomena of soybean globulins. I. Proteins-proteins interactions. **Am. Assoc. Cereal Chem.**, **47**(3): 550-555.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J.L. & Lorient, D. 1986. Aminoacids, peptides and proteins. In: **Food Chemistry**, 2<sup>nd</sup> ed., Fennema, O.R. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 245 p.
- Chen, C.C.; Pearson, A.M.; Gray, J.I.; Fooladi, M.H. & Ku, P.K. 1984. Some factors influencing the non heme iron content of meat and its implications in oxidation. **J. Food Sci.**, **49**(2): 581-584.
- Clegg, G.A.; Fitton, J.E.; Harrison, P.M. & Treffrey, A. 1980. A ferritin molecular structure and iron-storage mechanism. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, **36**(4): 30-83.
- Cross, C.K. & Ziegler, P. 1965. A comparison of the volatile, fractions from cured and incured meat. **J. Food Sci.**, **36**(4): 610-615.



- Crenwelge, D.D.; Dill, C.W.; Jybor, P.T. & Landmann, W.A. 1974. A comparison of the emulsification capacities of some protein concentrates. **J. Food Sci.**, **39**(1): 175-179.
- Dawson, L.E. & Gartner, R. 1983. Lipid oxidation in mechanically deboned poultry. **Food Technol.**, **37**(7): 112-116.
- Dawson, P.L.; Sheldon, B.W. & Ball, H.R.Jr. 1988a. Extraction of lipid and pigment components from mechanically deboned chicken meat. **J. Food Sci.**, **53**(6): 1615-1617.
- Dawson, P.L.; Sheldon, B.W.; Larick, D.W. & Ball, H.R.Jr. 1988b. Changes in the phospholipid and neutral lipid fractions of mechanically deboned chicken meat due to washing, cooking and refrigerated storage. **Poultry Sci.**, (Suppl. 1) **67**: 73.
- Degenhardt, J. 1988. Aspectos tecnológicos da utilização de carne de frango separada mecanicamente. In: Apostila do Seminário sobre produção e utilização de carne de frango separada mecanicamente. p. 49-57. ITAL, Campinas.
- Decker, E.A. & Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid peroxidation catalyst in muscle food. **J. Agric. Food Chem.**, **38**(3): 674-678.
- Deng, J.C.; Watson, M.; Bates, R.P. & Schroeder, E. 1978. Ascorbic acid as an antioxidant in fish flesh and its degradations. **J. Food Sci.**, **43**(3): 457-460.
- Deng, J.C.; Matthews, R.R. & Watson, M. 1977. Effect of chemical and physical treatments on rancidity development of frozen mullet (*Mugil cephalus*) fillets. **J. Food Sci.**, **42**(2): 344-348.
- Deng, J.C.; Watson, M.; Bates, R.P. & Schroeder, E. 1978. Ascorbic acid as an antioxidant in fish flesh and its degradation. **J. Food Sci.**, **43**(2): 457-460.
- de Rham, O. & Chanton, S. 1983. Role of ionic environment in insolubilization of whey proteins during heat treatments of whey products. **J. Dairy Sci.**, **67**(5): 939-943.

- Dhillon, A.S. & Maurer, A.J. 1975a. Utilization of mechanically deboned chicken meat in the formulation of summer sausages. **Poultry Sci.**, **54**(4): 1164-1174.
- Dhillon, A.S. & Maurer, A.J. 1975b. Stability study of comminuted poultry meats in frozen storage. **Poultry Sci.**, **54**(5): 1407-1414.
- Dockerty, T.R.; Scott-Kline, D.L.; Baker, R.C.; MacBridge, M.A. & Fishell, U.K. 1986. Emulsification of chickens frankfurters manufactured by different production systems. **Poultry Sci.**, **65**(9): 1693-1697.
- Drabkin, D. L. 1950. The distribution of the chromoproteins, hemoglobin, myoglobin and cytochrome c in the tissues of different species, and the relationship of the total content of each chromoprotein to body mass. **J. Biol. Chem.** **182**(3): 317-320.
- Eisele, T.A. & Brekke, C.J. 1981. Chemical modification and functional properties of acylated beef heart myofibrillar proteins. **J. Food Sci.**, **46**(4): 1095-1102.
- Egelandsdal, B.; Fretheim, K. & Harbitz, O. 1985. Fatty acids salts and analogs reduce thermal stability and improve gel formability of myosin. **J. Food Sci.**, **50**(6): 1399-1402.
- Ellinger, R.H. 1972. Phosphates in food processing. In: "Handbook of food additives", 2nd ed. CRC Press, Cleveland, 04.
- Essary, D.O. 1979. Moisture, fat, protein and mineral content of mechanically deboned poultry meat. **J. Food Sci.**, **44**(5): 1070-1073.
- Ericksson, C. 1975. Aroma compounds derived from oxidized lipid. Some biochemical and analytical aspects. **J. Agric. Food Chem.**, **23**(1): 126-128.
- Farr, A.J. & May, K.N. 1970. The effect of polyphosphates and sodium chloride on cooking yields and oxidative stability of chickens. **Poultry Sci.**, **49**(1): 268-271.

- Fleming, H.P.; Blumer, T.N. & Craig, H.B. 1960. Quantitative estimations of myoglobin and haemoglobin in beef muscle extracts. **J. Anim. Sci.**, **19**(4): 1164-1171.
- Foegeding, E.A. 1987. Functional properties of turkey salt-soluble proteins. **J. Food Sci.**, **52**(6): 1495-1499.
- Fong, K.L.; McCray, P.B.; Polyer, J.L.; Kiele, B.B. & Mesra, H. 1973. Evidence that peroxidation of lysosomal membranes initiated by hydroxyl free radicals produced during flaveny. **J. Biol. Chem.**, **248**(22): 7792-7797.
- Fooladi, M.H.; Pearson, A.M.; Coleman, T.H. & Merkel, R.A. 1979. The role of nitrite in preventing development of warmed over flavor. **Food Chem.**, **4**(3): 283-292.
- Fox, J.B.Jr. & Benedict, R.C. 1987. Role of heme pigments and nitrite in oxidative processes. **In: Warmed-over-flavour of meat.** St. Angelo, A.J. & Bailey, M.E. (eds.), p. 119-139.
- Fretheim, K.; Samejima, K. & Egelanddal, B. 1986. **Food Chem.**, **22**(1): 107-121.
- Froning, G.W. 1976. Mechanically deboned poultry meat. **Food Technol.**, **30**(7): 50-63.
- Froning, G.W. 1970. Poultry meat sources and their emulsifying characteristics as related to processing variables. **Poultry Sci.**, **49**(1): 6-13.
- Froning, G. W.; Arnold, R. G. ; Mandigo, R.; Neth, C. E. & Hartung, T. E. 1971. Quality and storage stability of frankfurters containing 15% of mechanically deboned turkey meat. **J. Food Sci.**, **36**(9): 974-978.
- Fukuzawa, T.; Hashimoto, Y. & Yasui, T. 1961. Effect of some proteins on the binding quality of an experimental sausage. **J. Food Sci.**, **26**(5): 541-549.

- Funes, J. A.; Weiss, V. & Karell, M. 1982. Effects of reaction conditions and reactant concentrations on polymerization of lysozyme reacted with peroxidizing lipids. **J. Agric. Food Chem.**, **30**(10): 1204-1208.
- Galvão, T. M. E. L. 1994. Recuperação de proteína de resíduos da desossa mecânica de dorsos de frango e sua utilização na elaboração de salsicha. Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas, SP.
- Gardner, H.W. 1979. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and aminoacids: a review. **J. Agric. Food Chem.**, **27**(2): 220-229.
- Golkap, H.Y.; Ockerman, H.W.; Plimpton, R.F. & Harper, W.F. 1983. Fatty acids of neutral and triglycerides phospholipids, rancidity and TBA values as influenced by packaging and storage. **J. Food Sci.**, **48**(3): 829-834.
- Gomez-Basauri, J. V. & Regenstein, J. M. 1992. Processing and frozen effects on iron content of cod and mackerel. **J. Food Sci.**, **57**(6): 1332-1336.
- Gomez-Basauri, J.V. & Regenstein, J.M. 1992. Vaccum packaging, ascorbic acid and frozen storage effects on heme and non heme iron content of mackerel. **J. Food Sci.**, **57**(6):1337-1339.
- Goutefongea, R.; Cassens, R.G. & Woodford, G. 1977. Distribution of sodium nitrite in adipose tissue during curing. **J. Food Sci.**, **42**(6): 1637-1641.
- Gray, J.I. 1978. Measurement of lipid oxidation. A review. **J. Am. Oil Chem.**, **55**(7): 539-546.
- Gray, J.I. & Pearson, A.M. 1987. Rancidity and warmed-over-flavor, **In**: Advances in Meat Research, vol. 3. Restructured meat and poultry products. Pearson, A.M. & Dutson, T.R. (eds.). AVI Book, N.Y.
- Greene, B.E. 1969. Lipid oxidation and pigments changes in raw beef. **J. Food Sci.**, **34**(1): 110-113.

- Greene, B. E. & Price, L. G. 1975. Oxidation-induced color and flavor changes in meat. **J. Agric. Food Chem.**, **23**(2): 164-167.
- Grunden, L.P.; MacNeil, J.H. & Dimick, P.S. 1972. Poultry product quality: Chemical and physical characteristics of mechanically deboned poultry meat. **J. Food Sci.**, **37**(2): 247-249.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. **Methods Enzymol.**, **186**(1): 1-85.
- Hamm, R. 1970. Interactions between phosphates and meat proteins. In "Symposium: Phosphates in Food Processing", Ed. Melnychyn. AVI Publishing Co., Westport, C.T.
- Hamm, R. 1975. On the rheology of minced meat. **J. Texture Studies**, **6**(2): 281-286.
- Hamm, R. & Deatherage, F.E. 1960. Changes in hydration, solubility and changes of muscle proteins during heating of meat. **Food Res.**, **25**: 587.
- Han, D.; McMillen, K.W.; Godber, J.S.; Bidner, T.D.; Younanthan, M.T.; Marshal, D.L. & Hart, L.T. 1993. Iron distribution in heated beef and chicken muscles. **J. Food Sci.**, **58**(4): 697-700.
- Harget, S.M.; Blumer, T.M.; Hamann, D.D.; Keeton, J.T. & Monroe, R.J. 1980. Effect of sodium acid pyrophosphate on sensory chemical and physical properties of frankfurters. **J. Food Sci.**, **45**(5): 905-911.
- Hartman, L. & Lago, R.C.A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Practice**, **22**: 475-494.
- Hazell, T. 1982. Iron and zinc compounds in the muscle meats of beef, lamb, pork and chicken. **J. Sci. Food Agric.**, **33**(10): 1049-1056.

- Hawrowitz, F.; Schrwerin, P. & Yenson, M. 1941. Destruction of hemin and hemoglobin by the action of unsaturated fatty acids and oxygen. **J. Biol. Chem.**, **140**(2): 353-360.
- Hay, J.D.; Currie, R.W. & Wolfe, F.H. 1972. The effect of aging and physicochemical properties of actomyosin from chicken breast and leg muscle. **J. Food Sci.**, **37**(2): 346-350.
- Hellendoorn, B.W. 1962. Water binding capacity of meat as affected by phosphates. I. Influence of sodium chloride and phosphates on the water-retention of comminuted meat at various pH values. **Food Technol.**, **16**(9): 119-123.
- Hermansson, A.M. 1982. Gel characteristics - structured as related to texture and water binding of blood plasma gels. **J. Food Sci.**, **47**(6): 1965-1972.
- Hermansson, A.M. & Lucisano, M. 1982. Gel characteristics, water binding properties of blood plasma gels and methodological aspects of the water binding of gel systems. **J. Food Sci.**, **47**(6): 1955-1959, 1964.
- Hirano, Y.H. & Olcott, H.S. 1971. Effect of haem compounds on lipid oxidation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **48**: 523-524.
- Hoke, I.M.; McGeary, B.K. & Lakshmanan, F. 1968. Muscle protein composition and eating quality of fresh and frozen turkeys. **J. Food Sci.**, **33**(2): 566-572.
- Igene, J. O. & Pearson, A. M. 1979. Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over-flavor development in meat model system. **J. Food Sci.**, **44**(12): 1285-1288.
- Igene, J.O.; King, S.A.; Pearson, A.M. & Gray, J. 1979. Influence of heme pigments, nitrite and non-heme iron in development of warmed-over-flavor (WOF) in cooked meat. **J. Agric. Food Chem.**, **27**(4): 838-842.
- Igene, J.O.; Yamauchi, K.; Pearson, A.M. & Gray, J. 1985. Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over-flavor in cured meat. **Food Chem.**, **18**(1): 1-18.

- Ishioroshi, M.; Samejima, K. & Yasui, T. 1981. Further studies on the roles of the head and tail regions of the myosin molecule in heat-induced gelation. **J. Food Sci.**, **47**(1): 114-118.
- Jarenback, L. & Liljemark, A. 1975. Ultrastructural changes during frozen storage of cod. III. Effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxides on myofibrillar proteins. **J. Food Technol.**, **10**(3): 437-441.
- Johnson, P.G.; Cunningham, F.E. & Bowers, J.A. 1974. Quality of mechanically deboned turkey meat. Effect of storage time and temperature. **Poultry Sci.**, **53**(3): 732-739.
- Kanner, J. 1979. S-nitrosocysteine (RSNO), an effective antioxidant in cured meat. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **56**(1): 74-76.
- Kanner, J. & Doll, L. 1991. Ferritin in turkey muscle tissue: a source of catalytic iron ions for lipid peroxidation. **J. Agric. Food Chem.**, **39**(2): 247-249.
- Kanner, J. & Harel, M. 1976. Changes in lysozyme due to reactions with peroxidizing methyl linoleat in a dehydrated model system. **J. Agric. Food Chem.**, **24**(3): 468-472.
- Kanner, J.; Hazan, B. & Doll, L. 1988. Catalytic "free" iron ions in muscle foods. **J. Agric. Food** **36**(3): 412-415.
- Kanner, J.; Salan, M.A.; Harel, S. & Shegalovich, I. 1991. Lipid peroxidation of muscle membrane residues cytosolic effects. **J. Agric. Food Chem.**, **39**(1): 242-245.
- Karel, M.; Scharck, K. & Roy, R. 1975. Interaction of peroxidizing methyl-linoleate with some proteins and aminoacids. **J. Agric. Food Chem.**, **23**(1): 159-162.
- Karel, M. 1973. Symposium: Protein interactions in biosystems protein-lipid. **J. Food Sci.**, **38**(5): 756-763.

- Keller, J.D. & Kinsella, J.E. 1973. Phospholipid changes and lipid oxidation during cooking and frozen storage of raw ground beef. **J. Food Sci.**, **38**: 1200-1204.
- Kendrick, J. & Watts, B. 1969. Acceleration and inhibition of lipid oxidation by heme compounds. **Lipids**, **4**: 454.
- Khan, A.W. & van den Berg, L. 1967. Biochemical and quality changes occurring during freezing of poultry meat. **J. Food Sci.**, **32**(1): 148-152.
- Khan, A.W.; van den Berg, L. & Lentz, C.P. 1963. Effects of frozen storage on chicken muscle proteins. **J. Food Sci.**, **28**: 425-429.
- Kiely, B. & Martosoni, A. 1968. Kinetics and substrate binding of myosin adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, **243**: 2273-2278.
- King, A.J. & Earl, L.A. 1988. Effect of selected sodium and potassium salts on TBA values of dark meat turkey patties. **J. Food Sci.**, **53**(3): 723-726.
- Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of protein in foods: a survey. **CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, **77**:219-280.
- Knipe, C.L.; Olson, D.G. & Rust, R.E. 1985. Effect of selected inorganic phosphates, phosphate levels and reduced sodium chloride levels on protein solubility, stability and pH of meat emulsions. **J. Food Sci.**, **50**(4): 1010-1013.
- Knipe, C.L.; Rust, R.E. & Olson, D.G. 1990. Some physical parameters in the addition of inorganic phosphates to reduced sodium meat emulsions. **J. Food Sci.**, **55**(1): 23-25.
- Kondaiah, W. & Panda, B. 1989. Effect of phosphate and spent hen yolk on the quality of chicken sausages from spent hens. **Poultry Sci.**, **68**(3): 393-398.
- Kubberold, G.; Cassens, R.G. & Greaser, M.L. 1974. Reaction of nitrite with sulfhydryl groups of myosin. **J. Food Sci.**, **39**(6): 1228-1230.



- Ladikos, D. & Lougovois, V. 1990. Lipid oxidation in muscle in muscle foods: a review. **Food Chem.**, **35**(3): 295-314.
- Ladwing, C.L.; Knipe, C.L. & Sebranek, J.G. 1989. Effects of tripolyphosphates on the physical, chemical and textured properties of high-collagen frankfurters. **J. Food Sci.**, **54**(3): 505-508.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**(5259): 680-685.
- Lampilla, L.E.; Froning, G.W. & Acton, J.C. 1985. Restructured turkey products from texturized mechanically-deboned turkey. **Poultry Sci.**, **64**(4): 653-659.
- Landes, D.R. 1972. The effect of polyphosphates on several organoleptic physical and chemical properties of stored precooked frozen chicken. **Poultry Sci.**, **51**(4): 641-645.
- Lawrie, R.A. 1981. *Developments in Meat Science*. London, Applied Science Publishers, 296p.
- Lee, Y.B.; Hargus, G.L.; Kirkpatrick, J.A.; Berner, D.L. & Forsythe, R.H. 1975. Mechanism of lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat. **J. Food Sci.**, **40**(5): 964-967.
- Lee, C. 1985. Microstructure of meat emulsions in relation to fat stabilization. **Food Microstruct.**, **4**(1): 63-70.
- Lee, S.H.; Cassens, R.G. & Fennema, O.R. 1976. Effect of muscle type on residual nitrite in cured meat. **J. Food Sci.**, **41**(1): 100-103.
- Lesiów, T. 1990. Comparison of changes occurring in rheological properties of gelled tissue and model sausage prepared from duck breast muscle stored at -2 °C e -18°C. **Die Nahrung.**, **34**(10): 927-933.
- Li-Chan, E.; Nakai, S. & Wood, D.F. 1984. Hydrophobicity and their relationship to emulsifying properties. **J. Food Sci.**, **49**(2): 345-350.

- Linder, M.C.; Glenn, M.N.; Roboz, M. & Hungerford, D.M.Jr. 1981. The size and shape of heart and muscle ferritins analyzed by sedimentation, gel filtration and electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, **256**(17): 9104-9110.
- Little, C. & O'Brien, P. J. 1968. The effectiveness of a lipid peroxide in oxidizing protein and non-protein thiols. **Biochem. J.**, **106**(30): 419-423.
- Liu, H.P. 1970a. Catalysts of lipid peroxidation in meats. 1. Linoleate peroxidation catalyzed by metMb or Fe (II)-EDTA. **J. Food Sci.**, **35**(5): 590-592.
- Liu, H.P. 1970b. Catalysts of lipid peroxidation in meats. 2. Linoleate oxidation catalyzed by tissues homogenates. **J. Food Sci.**, **35**(5): 593-595.
- Liu, H. & Watts, B.M. 1970. Catalysts of lipid peroxidation in meats. 3. Catalysts of oxidative rancidity in meats. **J. Food Sci.**, **35**(5): 596-598.
- Livingston, J.D. & Brown, W.D. 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technol.**, **35**(5): 244-249.
- Love, J.D. 1983. The role of heme iron in the oxidation of lipids in read meats. **Food Technol.**, **37**(7): 117-121.
- Love, J.D. 1987. Mechanisms of iron catalysts of lipid oxidation in warmed-over-flavor of meat. In: Warmed-over-flavour of meat. St. Angelo, A.J. & Bailey, M.E. (eds.), p. 19-39. AP, New York.
- Love, J.D. & Pearson, A.M. 1974. Metmyoglobin and non-heme iron as prooxidants in cooked meat. **J. Agric. Food Chem.**, **22**(6): 1031-1034.
- Lumry, R. 1973. Some recent ideas about the nature of the interactions between proteins and liquid water. **J. Food Sci.**, **38**(5): 744-755.
- MacDonald, B.; Gray, J.I.; Stanley, D.N. & Usborn, W.R. 1980. The role of nitrite in cured meat flavor. I. Sensory analysis. **J. Food Sci.**, **45**(4): 885-889.

- Marion, W.W. & Forsythe, R.H. 1962. Protection afforded lipids of turkey meat by butylated hydroxy anisole, egg white solids, gelatin and polyphosphates (kenas). **Poultry Sci.**, **41**(10): 1663-1669.
- Mast, M.G. & MacNeill, J.H. 1976. Physical and functional properties of heat pasteurized mechanically-deboned poultry meat. **Poultry Sci.**, **55**(4): 1207-1213.
- Matlock, R.G.; Terrel, R.N.; Savell, J.W.; Rhee, K.S. & Dutson, T.R. 1984. Factors affecting properties of raw-frozen pork sausage patties made with various NaCl/phosphate combinations. **J. Food Sci.**, **49**(5): 1363-1367.
- Maurer, A.J.; Baker, R.C. & Vadehra, D.V. 1969. The influence of type of poultry and carcass part on the extractability and emulsifying of salt-soluble proteins. **Poultry Sci.**, **48**(4): 994-999.
- McMahon, E.F. & Dawson, L.E. 1976. Effects of salt and phosphates on some functional characteristics of hand and mechanically deboned turkey meat. **Poultry Sci.**, **55**(3): 573-578.
- McNeill, J.H.; Kakuda, Y. & Findlay, C. 1988. Influence of carcass parts and food additives on the oxidative stability of frozen mechanically separated and hand-deboned chicken meat. **Poultry Sci.**, **67**(2): 270-274.
- Mittal, G.S. & Usborne, W.R. 1986. Meat emulsion functionality related to fat - protein ratio and selected dairy and cereal products. **Meat Sci.**, **18**(1): 1-21.
- Moerck, K.E. & Ball Jr., H.R. 1973. Lipids and fatty acids of chicken bone marrow. **J. Food Sci.**, **38**(6): 978-980.
- Moerck, K.E. & Ball Jr., H.R. 1974. Lipid autoxidation in mechanically deboned chicken meat. **J. Food Sci.**, **39**(5): 876-879.
- Moledina, K.H.; Regenstein, J.M.; Baker, R.C. & Steinkraus, K.H. 1977. Effects of antioxidants and chelators on the stability of frozen stored mechanically deboned flounder meat from racks after filleting. **J. Food Sci.**, **42**(3): 759-762.

- Mollins, R.A.; Kraft, A.A. & Olson, D.G. 1987. Insolubilization of orthophosphates in fresh or cooked ground pork. **J. Food Sci.**, **52(6)**: 1486-1489.
- Mollins, R.A.; Kraft, A.A.; Walter, H.W.; Rust, R.E.; Olson, D.G. & Merkenich, K. 1987. Effect of inorganic polyphosphates on ground beef characteristics: some chemical, physical and sensory effects on frozen beef patties. **J. Food Sci.**, **52(1)**: 50-53.
- Mollins, R.A. 1991. Phosphates in Food. CRC Pres. Boca Raton, Florida, USA.
- Morrissey, P. A. & Tichivangana, J. Z. 1985. The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats. **Meat Sci.**, **14(2)**: 175-190.
- Melton, S.L. 1983. Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. **Food Technol.**, **37(7)**: 105-111.
- Nakai, S.; Li-Chan, E. & Haykawa, S. 1986. Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. **Die Nahrung.**, **30(3)**: 327-331.
- Nakhost, Z. & Karel, M. 1984. Measurement of oxidation in related changes in proteins of freeze-dried meats. **J. Food Sci.**, **49(4)**: 1171-1173.
- Nakhost, Z. & Karel, M. 1985. Effect of salt, tripolyphosphate and tertiary butyl hydroquinone on myoglobin - lipid oxidation indicators in freeze-dried meats. **J. Food Sci.**, **50(6)**: 1748-1749.
- Narayan, K.A. & Kummerov, F.A. 1963. Factors influencing the formation of complexes between oxidized lipids and proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **40(8)**: 339-342.
- Narayan, K.A.; Sugai, M. & Kummerov, F.A. 1964. Complex formation between oxidized lipids and egg albumens. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **41(1)**: 254-257.

- Newbold, R.P. & Scopes, R.K. 1971. Post mortem glycolysis in skeletal muscle. Effect of adding nicotinamide-adenine dinucleotide to dilute mince preparations. **J. Food Sci.**, **36**(1): 215-220.
- Nielsen, H. 1978. Reaction between peroxidized phospholipid and protein. I. Covalent binding of peroxidized cardiolipin to albumin. **Lipids**, **13**(4): 253-258.
- Nuckles, R. O.; Smith, D. M. & Merckel, R. A. 1990. Meat by-product composition and functional properties in model systems. **J. Food Sci.**, **55**(3): 640-643, 682.
- Nordin, N.R. 1969. The depletion of added sodium nitrite in ham. **Can. Inst. Food Technol. J.**, **2**(2): 79-82.
- O'Brien, P.J. 1966. The effects of hydrogen peroxide or lipid peroxide on cytochrome C. **Biochemical J.**, **101**(2): 12 p.
- O'Connell, M.J.; Ward, R.J.; Baum, H. & Peters, T.J. 1985. The role of iron in ferritin and haemosiderin - mediated lipid peroxidation in liposomes. **Biochemical J.**, **229**: 135.
- Orr, H.L. & Wogar, W.G. 1979. Emulsifying characteristics and composition of mechanically deboned chicken necks and backs from different sources. **Poultry Sci.**, **58**(3): 577-579.
- Park, J.W. & Lanier, T.C. 1987. Combined effects of phosphates and sugar or polyol on protein stabilization of fish myofibrils. **J. Food Sci.**, **52**(6): 1509-1515.
- Pearce, K.N. & Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **J. Agric. Food Chem.**, **26**(3): 716-722.
- Pearson, A.M.; Gray, J.I.; Arlene, M. & Horenstein, N.A. 1983. Safety implication of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technol.**, **37**(7): 121-125.
- Pearson, A. M.; Love, J. D. & Shorland, F. B. 1977. "Warmed-over-flavor" in meat, poultry and fish. **Adv. Food Res.**, **23**: 1-27

- Pearson, A.M. & Tauber, F.W. 1984. Processed meats. 2<sup>nd</sup> ed. AVI Publishing Co., Westport, CT.
- Peterson, D.W. 1977. Effect of polyphosphates on tenderness of hot cut chicken breast meat. **J. Food Sci.**, 42(1): 100-104.
- Pikul, J. & Kummerov, F.A. 1990. Effect of microwave cooking and refrigerated storage of main broiler parts on lipid oxidation in chicken muscle and skin. **Poultry Sci.**, 69(5): 833-837.
- Pikul, J.; Leszczynski, D.E.; Niewiarowicz, A. & Kummerov, F.A. 1984. Lipid oxidation in chicken breast and leg meat after sequential treatments of frozen storage, cooking, refrigerated storage and reheating. **J. Food Technol.**, 19(5): 575-584.
- Pollonio, M.A.R. & Antunes, A.J. 1993. Effect of chicken bone marrow addition to breast and leg meat subjected to different grinding processes. **Arq. Biol. Technol.**, 36(1): 29-35.
- Price, L.G. & Greene, B.E. 1978. Factors affecting panelists perception of cured meat flavor. **J. Food Sci.**, 43(2): 319-326.
- Price, J.E. & Schweigert, B.S. 1971. The science of meat and meat products. Freeman, W.H. & Company. 660 p..
- Prusa, K.J. & Bowers, J.A. 1984. Protein extraction from frozen thawed turkey muscle with sodium nitrite, sodium chloride and selected sodium phosphate salts. **J. Food Sci.**, 49(3): 709-713, 722.
- Rao, Ch.S.; Dilworth, B.C.; Day, E.J. & Chen, T-C. 1975. Effects of polyphosphates on the flavor volatiles of poultry meat. **J. Food Sci.**, 40(4): 847-849.
- Rao, Ch.S.; Day, E.J. & Chen, T-C. 1978. Effects of storage and polyphosphates on the flavor volatiles of canned poultry meat. **J. Food Sci.**, 43(2): 515-519.

- Reddy, D.; Lancaster, J.R. & Conforth, D.P. 1983. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: electron spin resonance detection of iron nitric oxide complexes. **Science**, **221**: 769-770.
- Rhee, K.S. & Ziprin, Y.A. 1987. Modification of the Schricker non heme iron method to minimize pigments effects for red meats. **J. Food Sci.**, **52**(5): 1174-1176.
- Rickansrud, D.A. & Henrickson, R.L. 1967. Total pigments and myoglobin concentration in four bovine muscles. **J. Food Sci.**, **32**(1): 57-61.
- Roubal, W.T. & Tappel, A.L. 1966. Damage to proteins, enzymes and aminoacids by peroxidizing lipids. **Arch. Biochem. Biophys.**, **113**(1): 5-13.
- Saleh, B. & Watts, B.M. 1968. Substrates and intermediates in the enzymatic reduction of metmyoglobin in ground beef. **J. Food Sci.**, **33**(4): 353-358.
- Samejima, K.; Ishioroshi, M. & Yasui, T. 1981. Relative roles of head and tail portions of the molecule in heat induced gelation of myosin. **J. Food Sci.**, **46**(5): 1412-1414.
- Samejima, K.; Hashimoto, Y.; Yasui, T. & Fukazawa, T. 1969. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin and myosin-subunits in a saline model system. **J. Food Sci.**, **34**(2): 242-244.
- Samejima, K.; Yamaguchi, K.; Yamamoto, K.; Asghar, A. & Yasui, T. 1984. Role of myosin heavy chain from rabbit skeletal muscle in the heat-induced gelation mechanism. **Agric. Biol. Chem.**, **48**(8): 2225-2230.
- Sato, K. & Hegarty, G.R. 1971. Warmed-over-flavor in cooked meats. **J. Food Sci.**, **36**(7): 1098-1101.
- Schaich, K. M. 1980. Free radical initiation in proteins and aminoacids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation. Part III. Free radical transfer from oxidizing lipids. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, **13**: 198-221

- Schaich, K.M. & Karel, M. 1976. Free radicals reactions of peroxidizing lipids with aminoacids and proteins: An ESR-study. **Lipids**, **11**(5): 392-400.
- Schricker, B.R.; Miller, D.D. & Stoffer, J.R. 1982. Measurement and content of non heme and total iron in muscle. **J. Food Sci.**, **47**(3): 740-743.
- Schricker, B.R. & Miller, D.D. 1983. Effects of cooking and chemical treatment on heme and non heme iron meat. **J. Food Sci.**, **48**(5): 1340-1343.
- Schmidt, G.R. & Trout, G.R. 1986. Chemistry of meat binding. **Proc. Int. Symp. Meat Sci.**
- Sebranek, J.G.; Cassens, R.G.; Hoeskstra, W.G.; Winder, W.C.; Podebradsky, E.V. & Kielsmeir, E.W. 1973. <sup>15</sup>N tracers studies of nitrite added to a comminuted meat product. **J. Food Sci.**, **38**(6): 1220-1223.
- Shahidi, F.; Rubin, L.J.; Diosady, L.L.; Kasan, N. & LiSuiFong, J.C. 1986. Effect of sequestering agents on lipid oxidation in cooked meats. **Food Chem.**, **21**(2): 145-149.
- Shahidi, F.; Rubin, L.J. & Wood, D.F. 1987. Control of lipid oxidation in cooked meats by combinations of antioxidants and chelators. **Food Chem.**, **23**(2): 151-155.
- Shahidi, F. & Hong, C. 1991. Evaluation of malonaldehyde as a marker of oxidative rancidity in meat products. **J. Food Biochem.**, **21**(2): 145-149
- Sherman, P. 1961. The water binding capacity of fresh pork. I. The influence of sodium chloride, pyrophosphate and polyphosphate on water absorption. **Food Technol.**, **15**(2): 79-87.
- Shenouda, S. & Pigot, G. 1974. Lipid-protein interaction during aqueous extraction of fish protein: myosin-lipid interaction. **J. Food Sci.**, **39**: 726-734.
- Shenouda, S. & Pigot, G. 1976. Electron paramagnetic resonance studies of actin-lipid interaction in aqueous media. **J. Agric. Food Chem.**, **24**(1): 11-16.



- Shults, G.W. & Wierbick, E. 1973. Effects of sodium chloride and condensed phosphates on the water-holding capacity, pH and swelling of chicken muscle. **J. Food Sci.**, **38(5)**: 991-994.
- Schilt, A.A. 1969. Analytical applications of 1,10 o-phenantroline and related compounds. Pergamon Press. Ltda, 1<sup>a</sup> ed.
- Siegel, D.G. & Schmidt, G.R. 1979. Ionic, pH and temperature effects on the binding ability of myosin. **J. Food Sci.**, **44(6)**: 1686-1691.
- Smith, D.M. & Breekke, A.J. 1985. Enzymatic modification of the structure and functional properties of mechanically deboned fowl proteins. **J. Agric. Food Chem.**, **33(4)**: 631-637.
- Smith, D.M. 1988. Meat proteins: functional properties in comminuted meat products. **Food Technol.**, **42(5)**: 116-121.
- Smith, D.M. 1987. Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. **J. Food Sci.**, **52(1)**: 22-27.
- Smith, D.M.; Noormayi, S.H.; Price, J.F.; Bennink, M.R. & Herard, T.J. 1990. Effect of lipid oxidation on the functional and nutritional properties of washed chicken myofibrils stored at different water activities. **J. Agric. Food Chem.**, **38(6)**: 1308-1311.
- Smith, K.T. 1983. Effects of chemical environment on iron bioavailability measurements. **Food Technol.**, **37(10)**: 115-120.
- Sofos, J.N. 1986. Use of phosphates in low sodium meat products. **Food Technol.**, **40(9)**: 52-69.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry. 3<sup>h</sup> Ed. W. H. Freeman and Company. New York.
- Stewart, M.R.; Hutchkins, B.H.; Zipser, M.W. & Watts, B.M. 1965. Enzymic reduction of metmyoglobin by ground beef. **J. Food Sci.**, **30(3)**: 487-491.

- Tappel, A.L. 1962. Heme compounds and lipoxidase as biocatalyst. In: Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation. Schultz, H.W.; Day, E.A. & Sinnhuber, R.O. (Eds.). AVI Publishing Co. Westport, CT. 1.
- Tarladgis, B.G.; Watts, B.M. & Younnathan, M.T. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **37**(1): 44-48.
- Tarladgis, B.G. 1961. An hypothesis for the mechanisms of the heme catalyzed lipid oxidation in animal tissues. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **38**(1): 479-483.
- Tichivangana, J.Z. & Morrissey, P.A. 1985. Metmyoglobin and inorganic metals as pro-oxidants in raw to cooked muscles systems. **Meat Sci.**, **15**: 107-116.
- Tellefson, C.S. & Bowers, J.A. 1981. Effects of ascorbate and nitrite concentrations in turkey frankfurter - type products. **Poultry Sci.**, **60**(3): 579-583.
- Tenhet, T.; Finne, G.; Nickelson, R. II & Toloday, D. 1981. Phosphorus levels in peeled and deveined shimp treated with sodium tripolyphosphate. **J. Food Sci.**, **46**(2): 350-352, 356.
- Thomas, L.C. & Chamberlin, G.R. 1980. Colorimetric chemical analytical methods. The Tintometer Ltd. Salisburg, England, 9<sup>th</sup> Ed. p. 201-218.
- Tim, M.J. & Watts, B.M. 1958. Protection of cooked meats with phosphates. **Food Technol.**, **12**: 240-243.
- Trout, G.R. & Schmidt, G.R. 1984. Effect of phosphate type and concentration, salt level and method of preparation on binding in restructured beef rolls. **J. Food Sci.**, **49**(3): 687-694.
- Trout, G.R. & Schmidt, G.R. 1986. Effect of phosphate on the functional properties of restructured beef rolls: the role of pH, ionic strength and phosphate type. **J. Food Sci.**, **51**(6): 1416-1422.

- Trout, G.R. & Schmidt, G.R. 1987. Non protein additives. **In: Advances in Meat Research: Restructured Meat and Poultry Products.** Pearson, A.M. & Dutson, T.R. (Eds.). New York, AVI. 308-318.
- Ulvik, R.J. 1982. Relevance of ferritin-binding sites on isolated mitochondria to the mobilization of iron from ferritin. **Biochem Biophys. Acta**, **715**(1): 42-51.
- Volkert, M.A. & Klein, B.P. 1979. Protein dispersibility and emulsion characteristics of flower soy products. **J. Food Sci.**, **44**(1): 93-96.
- Xiong, Y.L. & Brekke, C.J. 1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during storage. **J. Food Sci.**, **54**(5): 1141-1146.
- Wagner, J.R. & Anon, M.C. 1985. Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. **J. Food Technol.**, **20**(5): 735-744.
- Wagner, J.R. & Anon, M.C. 1986. Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. I. Myofibrillar ATPase activity and differential scanning calorimetric studies. **J. Food Technol.**, **21**(1): 9-14.
- Watts, B.M. 1954. Oxidative rancidity and discoloration in meat. **Adv. Food Res.**, **5**: 1-52.
- Watts, B.M.; Kendrick, J.; Zipser, M.; Hutchins, B. & Saleh, B. 1966. Enzymatic reducing pathways in meat. **J. Food Sci.**, **31**(7): 855-859.
- Whiting, R.C. 1988. Ingredients and processing factors that control muscle protein functionality. **Food Technol.**, **42**: 104-114, 210.
- Whiting, R.C. 1987. Influence of various salts and water-soluble compounds on the water and fat exsudation and gel strength of meat batters. **J. Food Sci.**, **52**(5): 1130-1132.
- Wilding, P.; Hedges, N. & Lillford, P.J. 1986. Salt induced swelling of meat: The effect of storage time, pH, ion, type and concentration. **Meat Sci.**, **18**(1): 55-61.

- Wills, E.D. 1966. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissue. **Biochem. J.**, **99**(3): 667-676.
- Wilson, B.R.; Pearson, A.M. & Shorland, B.F. 1976. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. **J. Agric Food Chem.**, **24**(1): 7-11.
- Wolford, G.; Cassens, R.G.; Greaser, M.L. & Sebranek, J.G. 1976. The fat of nitrite: reaction with protein. **J. Food Sci.**, **41**(3): 585-588.
- Yamamoto, K.; Samejima, W.G. & Yasui, T. 1977. A comparative study of the changes in hen pectoral muscle during storage at 4°C and -20°C. **J. Food Sci.**, **42**(6): 1642-1644.
- Yasui, T.; Ishioroshi, M.; Nakano, H. & Samejima, K. 1980. Heat induced gelation of myosin in the presence of actin. **J. Food Biochem.**, **4**(1): 61-65.
- Yasui, T.; Sakanishi, M. & Hashimoto, Y. 1964. Phosphate effects on meat. Effect of inorganic polyphosphate on the solubility and extractability of myosin B. **J. Agric. Food Chem.**, **12**(2): 392-396.
- Yates, L.D. & Greaser, M.L. 1983. Troponin subunit stoichiometric and content in rabbit skeletal muscle and myofibrils. **J. Biol. Chem.**, **258**(9): 5770-5774.
- Yasumatsu, K.; Sawada, K.; Moritaka, S.; Misaki, M.; Toda, S.; Wada, T. & Ishii, K. 1972. Whipping and emulsifying properties of soybean products. **Agric. Biol. Chem.**, **36**(6): 719-723.
- Younathan, M.T. & Watts, B.M. 1959. Relationship of meat pigments to lipid oxidation. **Food Res.**, **24**: 728.
- Zipser, M.W. & Watts, B.M. 1962. A modified 2-thiobarbituric acid (TBA) method for the determination of malonaldehyde in cured meats. **Food Technol.**, **16**(7): 102-104.
- Zipser, M.W.; Kwon, T.W. & Watts, B.M. 1964. Oxidative changes in cured and uncured frozen cooked pork. **J. Agric. Food Chem.**, **12**(1): 105-109.
- Zubillaga, M.P.; Moercker, G. & Foglia, T.A. 1984. Antioxidant activity of sodium nitrite in meat. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **61**(4): 772-776.

## APÊNDICE

**Tabela A1 - Valores de porcentagem de solubilidade proteica das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento.**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	73,88±0,45 <sup>a</sup>	75,80±0,48 <sup>a</sup>	74,02±0,77 <sup>a</sup>	73,39±1,09 <sup>a</sup>	74,02±0,67 <sup>a</sup>
30	65,98±1,45 <sup>a</sup>	63,87±1,39 <sup>a</sup>	63,31±0,96 <sup>a</sup>	65,07±0,30 <sup>a</sup>	70,21±0,80 <sup>b</sup>
60	53,84±0,58 <sup>a</sup>	61,37±0,65 <sup>b</sup>	55,84±0,61 <sup>a</sup>	58,13±0,29 <sup>b</sup>	68,75±0,53 <sup>c</sup>
90	46,51±1,08 <sup>a</sup>	56,85±0,64 <sup>b</sup>	48,17±0,48 <sup>c</sup>	52,69±0,84 <sup>c</sup>	65,97±0,95 <sup>d</sup>
120	34,64±0,82 <sup>a</sup>	53,60±0,53 <sup>b</sup>	44,20±0,58 <sup>c</sup>	50,23±0,43 <sup>b</sup>	64,33±1,00 <sup>d</sup>
150	26,48±1,09 <sup>a</sup>	51,80±0,99 <sup>b</sup>	40,79±1,06 <sup>c</sup>	44,60±1,16 <sup>d</sup>	59,39±0,66 <sup>e</sup>
180	22,69±0,64 <sup>a</sup>	46,93±0,68 <sup>b</sup>	35,90±0,96 <sup>c</sup>	41,66±1,19 <sup>d</sup>	57,36±0,67 <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela A2 - Valores de porcentagem de solubilidade proteica das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento.**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	74,64±1,06 <sup>a</sup>	75,44±0,83 <sup>a</sup>	75,19±1,09 <sup>a</sup>	74,58±1,17 <sup>a</sup>	75,39±0,50 <sup>a</sup>
30	68,21±0,88 <sup>a</sup>	65,86±1,56 <sup>a</sup>	68,18±0,63 <sup>a</sup>	69,68±1,07 <sup>a</sup>	70,22±0,74 <sup>a</sup>
60	56,45±1,26 <sup>a</sup>	62,88±0,48 <sup>b</sup>	58,69±0,39 <sup>a</sup>	60,96±0,50 <sup>b</sup>	69,57±0,58 <sup>c</sup>
90	50,54±0,95 <sup>a</sup>	58,48±0,87 <sup>b</sup>	52,63±0,70 <sup>c</sup>	55,84±0,45 <sup>b</sup>	67,70±0,42 <sup>c</sup>
120	42,95±1,11 <sup>a</sup>	56,59±0,83 <sup>b</sup>	48,75±0,49 <sup>c</sup>	51,35±1,07 <sup>d</sup>	66,59±0,67 <sup>e</sup>
150	30,85±0,24 <sup>a</sup>	53,17±0,67 <sup>b</sup>	43,79±0,31 <sup>c</sup>	46,64±0,62 <sup>d</sup>	62,51±0,77 <sup>e</sup>
180	24,94±1,15 <sup>a</sup>	50,96±0,37 <sup>b</sup>	40,61±1,01 <sup>c</sup>	44,16±0,94 <sup>d</sup>	59,41±1,02 <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela A3 - Volume de líquido liberado (mL) de géis formados pelas proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento.**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	1,15±0,08 <sup>a</sup>	1,05±0,05 <sup>a</sup>	1,07±0,08 <sup>a</sup>	1,15±0,05 <sup>a</sup>	1,10±0,05 <sup>a</sup>
30	1,80±0,05 <sup>a</sup>	1,20±0,05 <sup>b</sup>	1,23±0,06 <sup>b</sup>	1,58±0,07 <sup>a</sup>	1,05±0,05 <sup>b</sup>
60	2,35±0,05 <sup>a</sup>	1,62±0,10 <sup>b</sup>	1,80±0,05 <sup>b</sup>	2,25±0,13 <sup>a</sup>	1,11±0,07 <sup>c</sup>
90	3,20±0,25 <sup>a</sup>	1,80±0,13 <sup>b</sup>	2,42±0,08 <sup>c</sup>	2,48±0,10 <sup>c</sup>	1,57±0,08 <sup>d</sup>
120	3,75±0,18 <sup>a</sup>	2,32±0,15 <sup>b</sup>	2,82±0,08 <sup>c</sup>	2,80±0,20 <sup>c</sup>	1,87±0,08 <sup>d</sup>
150	4,50±0,31 <sup>a</sup>	2,45±0,10 <sup>b</sup>	3,45±0,13 <sup>c</sup>	3,00±0,12 <sup>c</sup>	1,90±0,10 <sup>d</sup>
180	5,65±0,15 <sup>a</sup>	2,73±0,15 <sup>b</sup>	3,60±0,10 <sup>c</sup>	3,37±0,15 <sup>c</sup>	2,15±0,10 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela A4 - Volume de líquido liberado (mL) de géis formados pelas proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento.**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	1,07±0,08 <sup>a</sup>	1,07±0,06 <sup>a</sup>	1,07±0,08 <sup>a</sup>	1,10±0,08 <sup>a</sup>	1,07±0,08 <sup>a</sup>
30	1,65±0,05 <sup>a</sup>	1,10±0,05 <sup>b</sup>	1,10±0,05 <sup>b</sup>	1,20±0,05 <sup>b</sup>	1,17±0,08 <sup>b</sup>
60	1,90±0,05 <sup>a</sup>	1,42±0,10 <sup>b</sup>	1,67±0,08 <sup>b</sup>	1,50±0,10 <sup>b</sup>	1,15±0,10 <sup>c</sup>
90	2,57±0,18 <sup>a</sup>	1,70±0,10 <sup>b</sup>	2,15±0,17 <sup>c</sup>	2,38±0,22 <sup>c</sup>	1,46±0,10 <sup>d</sup>
120	3,52±0,25 <sup>a</sup>	2,27±0,18 <sup>b</sup>	2,60±0,05 <sup>c</sup>	2,67±0,25 <sup>c</sup>	1,60±0,05 <sup>d</sup>
150	4,13±0,21 <sup>a</sup>	2,40±0,17 <sup>b</sup>	3,25±0,20 <sup>c</sup>	2,60±0,08 <sup>c</sup>	1,77±0,08 <sup>c</sup>
180	4,60±0,20 <sup>a</sup>	2,55±0,13 <sup>b</sup>	3,33±0,21 <sup>c</sup>	3,30±0,07 <sup>c</sup>	2,00±0,10 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela A5 - Valores de atividade de ATPase<sup>(1)</sup> ( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD com pele durante armazenamento sob congelamento.**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	0,073±0,002 <sup>a</sup>	0,074±0,004 <sup>a</sup>	0,075±0,003 <sup>a</sup>	0,075±0,003	0,076±0,002
30	0,059±0,001 <sup>a</sup>	0,065±0,002 <sup>b</sup>	0,066±0,003 <sup>a</sup>	0,068±0,003	0,073±0,003
60	0,049±0,003 <sup>a</sup>	0,061±0,001 <sup>b</sup>	0,059±0,002 <sup>b</sup>	0,060±0,002	0,063±0,002
90	0,034±0,003 <sup>a</sup>	0,056±0,002 <sup>b</sup>	0,051±0,002 <sup>b</sup>	0,052±0,003	0,059±0,003
120	0,026±0,003 <sup>a</sup>	0,053±0,003 <sup>b</sup>	0,048±0,002 <sup>c</sup>	0,049±0,001	0,055±0,002
150	0,018±0,001 <sup>a</sup>	0,048±0,004 <sup>b</sup>	0,048±0,003 <sup>c</sup>	0,045±0,002	0,051±0,001
180	0,014±0,002 <sup>a</sup>	0,045±0,003 <sup>b</sup>	0,033±0,002 <sup>c</sup>	0,039±0,003	0,048±0,002

<sup>(1)</sup> (1 mM ATP; 20 mM KCl; 20 mM Tris-acetato; mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0)

a,b,c,d,e Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)

**Tabela A6 - Valores de atividade de ATPase ( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) das proteínas miofibrilares extraídas das formulações de CFMD sem pele durante armazenamento sob congelamento.**

Tempo (dias)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
0	0,076±0,002 <sup>a</sup>	0,077±0,001 <sup>a</sup>	0,072±0,002 <sup>a</sup>	0,077±0,001 <sup>a</sup>	0,074±0,003 <sup>a</sup>
30	0,063±0,004 <sup>a</sup>	0,068±0,001 <sup>b</sup>	0,068±0,002 <sup>b</sup>	0,071±0,002 <sup>c</sup>	0,073±0,002 <sup>c</sup>
60	0,051±0,002 <sup>a</sup>	0,065±0,002 <sup>b</sup>	0,062±0,002 <sup>b</sup>	0,064±0,002 <sup>b</sup>	0,066±0,002 <sup>b</sup>
90	0,039±0,002 <sup>a</sup>	0,059±0,005 <sup>b</sup>	0,056±0,002 <sup>b</sup>	0,058±0,002 <sup>b</sup>	0,063±0,002 <sup>c</sup>
120	0,030±0,002 <sup>a</sup>	0,056±0,002 <sup>b</sup>	0,050±0,002 <sup>b</sup>	0,055±0,002 <sup>b</sup>	0,060±0,001 <sup>c</sup>
150	0,020±0,002 <sup>a</sup>	0,052±0,002 <sup>b</sup>	0,043±0,003 <sup>c</sup>	0,050±0,002 <sup>b</sup>	0,056±0,002 <sup>d</sup>
180	0,016±0,002 <sup>a</sup>	0,048±0,002 <sup>b</sup>	0,039±0,003 <sup>c</sup>	0,047±0,002 <sup>b</sup>	0,052±0,003 <sup>d</sup>

a,b,c,d,e Médias dentro das linhas com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05)