

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PROTEÍNAS DE SOJA E COLÁGENO: VALIDAÇÃO DAS
METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO
TECNOLÓGICA DO USO EM PRODUTOS CÁRNEOS**

JUSSARA CARVALHO DE MOURA DELLA TORRE

Engenheira de Alimentos

Mestre em Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr NELSON JOSÉ BERAQUET

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

D38p

Della Torre, Jussara Carvalho de Moura

Proteínas de soja e colágeno: validação das metodologias de quantificação e avaliação tecnológica do uso em produtos cárneos / Jussara Carvalho de Moura Della Torre. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Nelson José Beraquet

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Carnes – Produtos. 2.Colágeno. 3.Soja. 4.Proteínas.
5.Legislação. I.Beraquet, Nelson José. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Nelson José Beraquet
FEA-UNICAMP – Campinas
Presidente

Dr. Jaim Lichtig
IQ-USP – São Paulo
Membro

Dra. Eunice A Yamada
CTC - ITAL – Campinas
Membro

Dra. Flávia Maria Netto
FEA-UNICAMP – Campinas
Membro

Dr. Pedro Eduardo de Felício
FEA-UNICAMP – Campinas
Membro

Dr. José Luiz Pereira
FEA-UNICAMP – Campinas
Membro

Dr. Massami Shimokomaki
UEL – Londrina
Membro

*Dedico este trabalho com muito carinho à
minha amada família, pela confiança,
incentivo e presença, principalmente nos
momentos mais difíceis.*

*Minhas filhas,
Mariana e Isabela*

*Meu marido,
Ricardo*

*Meus pais,
Idalina e Abel (in memoriam)*

*Minha sogra e sogro
Therezinha e Benedito (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. Agradeço profundamente a contribuição que recebi de todos os envolvidos neste projeto.

Agradeço em especial a meu orientador, Dr. Nelson José Beraquet, chefe do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL, não apenas pela orientação, mas por seu incentivo, paciência e apoio na realização desta tese.

À banca examinadora desta tese, pelas opiniões e correções, que em muito valorizaram este trabalho.

Ao Dr. Odair Zenebon, Diretor da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz (IAL), por acreditar e confiar em meu trabalho, disponibilizando parte de seu tempo na coordenação do projeto FAPESP.

À Deise A. P. Marsiglia, Diretora do Serviço de Alimentos, pela ajuda e estímulo na continuidade deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jaim Lichtig (USP e IAL), que muito me auxiliou com seus conhecimentos de química, pelo incentivo e pelas discussões, sugestões, correções e colaborações.

À pesquisadora Sônia França Correia Barbosa, da Seção de Imunologia do IAL, pela amizade e orientação quanto às técnicas imunoquímicas (projeto FAPESP).

Aos amigos da Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, Mário, Márcia, Emy, Cássia, Rosymaura, Vera, Nair, Sandra, Josefa e, especialmente, Regina (chefe da Seção), pela compreensão, carinho, amizade e apoio no decorrer destes anos.

Às minhas amigas e colaboradoras Maria Auxiliadora e Nice, do Laboratório de Análise Sensorial, por me apoiarem e ajudarem nas horas difíceis.

À Seção de Doces e Amiláceos, em especial ao Edson Marciano, pela realização das inúmeras análises de protídios.

À amiga Viviane Rodrigues Ferracioli, pela colaboração na execução das análises.

À amiga Dra. Cristiane Bonaldi Cano, pela inestimável ajuda computacional.

À Dra. Carmen Tadini da Poli-USP, pela valiosa colaboração.

Aos amigos Dr. Afonso de Liguori Oliveira, Dr. Pedro Eduardo de Felício e Dra. Susana Cardoso, que sempre me ajudaram nas correções referentes à área veterinária.

Ao Henri de Kerchove, pelas informações relativas a proteínas de soja.

Ao Dr Tadeu F. da Silveira, do CTC/ITAL e à firma Elanco-El Lilly do Brasil Ltda pelo fornecimento dos animais suínos utilizados neste estudo.

Ao Dr Flávio Schmidt, do Centro de Tecnologia de Hortifrutículas do ITAL, por estar sempre pronto a me ajudar com a recravação e esterilização das conservas enlatadas.

Às empresas Yoki Alimentos S.A.; Kraki & Lopesco; Ceval Alimentos S.A.; Protein Technologies International do Brasil Ltda.; Frigorífico Porto Ltda.; e Companhia Metalúrgica Prada, pelo fornecimento de ingredientes e insumos utilizados no presente trabalho.

Ao Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL e seus funcionários, especialmente, Márcia Harada, Kátia, Ângela, Rivaldo, Célia, Tânia, Mariana e Fabiana, pelas muitas colaborações na execução deste trabalho.

À amiga Maria Teresa Esteves Lopez Galvão, da Frigobrás-Sadia, pelo auxílio nas análises objetivas de cor.

Ao Rogério Tumelero, da Sadia, pela importação e fornecimento de uma unidade de *kit* teste para quantificação de proteína de soja.

Ao Marcelo Rouanet, pelas rápidas traduções.

À Secretaria da Divisão de Bromatologia e Química do IAL, nas pessoas de Marilda, Gema e Maria Helena, pela ajuda.

À Secretaria de Pós-Graduação da FEA, especialmente, ao Cosme, André, Ricardo e Jaime, por tantos telefonemas e perguntas.

Às bibliotecárias e amigas da USP, Silvia, Cidinha e Cristina, pela ajuda na importação de livro e revisão bibliográfica.

À Dalva pela valiosa ajuda na rotina doméstica.

Aos meus queridos familiares, Jurema e Guido, Cezarino, Mônica e Iara, Ubirajara e Márcia, Guaraciaba e Rui, Silvia e Benê, Márcia e Acir, Maura e Pedro, Roberto e Denise, Wanda e Badih, Judy e Milton, Neusa (in memoriam) e Jamil (in memoriam), Jeanete e Vicente (in memoriam), Farid (in memoriam), Bechara, Anete (in memoriam) e Ragi; aos meus afilhados Bruno, Giancarlo e Fernanda; primos, sobrinhos e tios, pelo apoio, incentivo e compreensão.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processos 01/03499-9 e 00/06438-8).

Agradeço a Deus pela vida, oportunidade de crescimento e por me proporcionar momentos únicos com cada uma destas pessoas, que, mesmo por pouco tempo, participaram desta minha história.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS (TABLES)	xiii
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS (FIGURES)	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	 9
1. Proteínas de soja	11
2. Identificação e quantificação de proteínas de soja	16
3. Tecidos conjuntivos, colágeno e elastina.....	22
4. Validação de metodologia analítica	33
5. Legislação	38
5.1. Proteínas de soja	38
5.2. Tecido conjuntivo, gordura e água	41
6. Referências	48
 CAPÍTULO 2 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA EM PRODUTOS CÁRNEOS EMULSIONADOS	 61
Quantitative determinations of commercial soy proteins in emulsion-type meat products using an ELISA assay kit	63
Background	65
Objectives	65
Methods	66
Results and Discussion	67
Conclusions	69
References	70
Quantitative determinations of commercial soy proteins in emulsion-type meat products by official ELISA procedure	75
Background	77
Objectives	77
Methods	78
Results and Discussion	80
Conclusions	81
References	82

Quantitative determinations of commercial soy proteins in emulsion-type meat products by modified official ELISA	87
Background	89
Objectives	90
Methods	90
Results and Discussion	91
Conclusions	92
References	93
 CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DO USO DE PROTEÍNAS DE SOJA EM PRODUTOS CÁRNEOS EMULSIONADOS	97
Características físicas e sensoriais de salsichão Lionês com proteínas de soja	99
Introdução	101
Objetivos	101
Materiais e métodos	101
Resultados e discussão	103
Conclusões	104
Referências bibliográficas	105
Composição e estabilidade da emulsão de salsichão Lionês com proteínas de soja ..	109
Introdução	111
Objetivos	111
Materiais e métodos	111
Resultados e discussão	113
Conclusões	115
Referências bibliográficas	115
 CAPÍTULO 4 – QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA E COLÁGENO EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS.....	119
Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carnes	121
Resumo	123
Introdução	124
Material e métodos	131
Resultados e discussão	136
Conclusão	140
Abstract	141
Referências	142
Composição centesimal e teor de colágeno de carne bovina moída	147

Resumo	149
Introdução	150
Material e métodos	155
Resultados e discussão	157
Conclusão	165
Abstract	165
Referências	167
Composição centesimal e teor de colágeno de cortes cárneos de bovinos e suínos	171
Resumo	173
Summary	174
1 - Introdução	175
2 - Material e métodos	180
3 - Resultados e discussão	182
4 - Conclusões	188
5 - Referências bibliográficas	188
Chemical composition and collagenous connective tissue evaluation of commercial frankfurter-type sausages	191
Background	193
Objectives	194
Methods	194
Results and Discussion	195
Conclusions	196
References	196
Chemical composition and collagenous connective tissue evaluation of commercial fresh ground sausages	201
Background	203
Objectives	204
Methods	204
Results and Discussion	205
Conclusions	206
References	206
Effects of connective tissue proteins on chemical composition and sensory properties of ground beef	211
Background	213
Objectives	214
Methods	214
Results and Discussion	216
Conclusions	217

References	218
CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DO USO DE COLÁGENO EM PRODUTOS CÁRNEOS EMULSIONADOS	223
Effects of connective tissue proteins on chemical composition and emulsion stability of Lyoner type sausage	225
Background	227
Objectives	228
Methods	228
Results and Discussion	229
Conclusions	231
References	232
Effects of connective tissue proteins on texture, color and sensory properties of Lyoner type sausage	237
Background	239
Objectives	239
Methods	240
Results and Discussion	241
Conclusions	243
References	243
CONCLUSÕES	249
ANEXOS – MÉTODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA E COLÁGENO EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS	253
ANEXO 1 - Determinação de proteína de soja pelo método ELISA	255
Material	258
Reagentes	258
Procedimento	262
Cálculos	267
Referências bibliográficas	269
ANEXO 2 - Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina	271
Material	273
Reagentes	273
Procedimento	275
Cálculos	276
Referências bibliográficas	277

LISTA DE TABELAS (TABLES)

		Página
TABELA 1	Legislação da Alemanha para produtos cárneos crus e cozidos	46
TABELA 2	Legislação da Alemanha para produtos cárneos cozidos	47
TABLE 3	Percentage of soy protein in emulsion-type meat products determined using ELISA-TEK kit	71
TABLE 4	Percentage of soy proteins in emulsion-type meat products determined using official ELISA procedure	83
TABLE 5	Percentage of soy proteins in emulsion-type meat products determined using modified official ELISA procedure	94
TABELA 6	Resultados da análise das soluções padrão de hidroxiprolina segundo método espectrofotométrico AOAC	137
TABELA 7	Taxas de recuperação dos padrões de hidroxiprolina adicionados em amostras de conserva de carne FAPAS	139
TABELA 8	Resultados das participações no controle interlaboratorial FAPAS	140
TABELA 9	Parâmetros físico-químicos de composição, colágeno e pH de cortes cárneos comerciais de bovino	163
TABELA 10	Parâmetros físico-químicos e sensoriais de carne moída bovina comercial	164
TABELA 11	Parâmetros físico-químicos de cortes cárneos de bovinos	186

TABELA 12	Parâmetros físico-químicos de cortes cárneos de suínos	187
TABLE 13	Chemical parameters means for commercial emulsion type sausages ..	197
TABLE 14	Chemical means and appearance parameters for fresh ground sausage	207
TABLE 15	Chemical composition and physical parameters means for ground meat containing beef connective tissue	219
TABLE 16	Mean sensory scores for beef hamburgers	220
TABLE 17	Laboratory consumer test for ground beef meat added with beef connective tissue	220
TABLE 18	Chemical and physical parameters means for Lyoner type sausage containing connective tissue proteins	233
TABLE 19	Mean sensory scores for Lyoner type sausage control and containing connective tissue	244
TABLE 20	Mean values for color and texture measurements of Lyoner type sausage control and formulated with connective tissue	244
TABLE 21	Laboratory consumer test for Lyoner type sausage control and containing connective tissue proteins	245
TABELA 22	Modelo padrão recomendado para os microtubos e cavidades correspondentes na placa de ELISA, no ensaio com 7 amostras	265

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Avaliação sensorial de salsichões com incrementos de proteínas de soja	106
QUADRO 2 Parâmetros físicos de cor e força de compressão de salsichões com incrementos de proteínas de soja.	107
QUADRO 3 Composição centesimal e valores de pH das carnes e proteínas de soja utilizadas nas formulações	116
QUADRO 4 Composição centesimal, valores de pH e estabilidade da emulsão de salsichões adicionados de proteínas de soja	117
QUADRO 5 Nômina anatômica de cortes comerciais de dianteiro e carne industrial de bovinos	179
QUADRO 6 Nômina anatômica de cortes comerciais de suínos	179

LISTA DE FIGURAS (FIGURES)

	Página
FIGURA 1 Tecidos conjuntivos do músculo	23
FIGURE 2 Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of texturate (SPT), texturate concentrate (SPTC) and isolate (SPI) soy protein in emulsion-type meat products using ELISA-TEK kit	73
FIGURE 3 Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products using ELISA-TEK kit	73
FIGURE 4 Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of texturate (SPT), texturate concentrate (SPTC) and isolate (SPI) soy protein in emulsion-type meat products using official ELISA procedure	85
FIGURE 5 Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products using official ELISA procedure	85
FIGURE 6 Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of texturate (SPT), texturate concentrate (SPTC) and isolate (SPI) soy protein in emulsion-type meat products using modified official ELISA procedure	95
FIGURE 7 Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products using modified official ELISA procedure	95
FIGURA 8 Mecanismo proposto para a oxidação da hidroxiprolina a pirrol	130
FIGURA 9 Amostra de conserva de carne para estudo de controle interlaboratorial FAPAS na quantificação de hidroxiprolina	131
FIGURA 10 Curva analítica de determinação do aminoácido hidroxiprolina	138
FIGURA 11 Carne moída bovina (N14, marca I)	161

FIGURA 12	Distribuições de frequências dos teores de colágeno (COL) e relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) de amostras de carne moída bovina adquirida no varejo (patinho, coxão mole, lagarto, maminha, picanha, coxão duro, contrafilé, alcatra e músculo) e da rotina de análise laboratorial (N1 a N20)	162
FIGURE 13	Collagenous connective tissue frequency distribution for commercial emulsion type sausages	199
FIGURE 14	Collagenous connective tissue frequency distribution for commercial fresh ground sausage	209
FIGURE 15	Linear regression curve for predicting measured collagenous connective tissue for amount of beef connective tissue added	221
FIGURE 16	Relationship between predicted connective tissue and collagenous connective tissue determined in Lyoner type sausage containing amounts of bovine connective tissue (BCT) and cooked pork rind (CPR)	235
FIGURE 17	Relationship between predicted connective tissue added and collag. connective tissue per crude protein determined in Lyoner type sausage containing amounts of bovine connective tissue (BCT) and cooked pork rind (CPR)	235
FIGURE 18	Consumer purchase intent scale for Lyoner added with 15% cooked pork rind (CPR) or 15% beef connective tissue (BCT)	247
FIGURA 19	Procedimento esquemático ilustrando as etapas individuais do método ELISA para determinação de proteína de soja	268
FIGURA 20	Curva-padrão evidenciando a relação entre absorbância e concentração de proteína de soja da solução padrão pelo método ELISA	269

RESUMO

Salsichas, lingüiças e hambúrgueres são produtos cárneos cominuídos susceptíveis à fraude pelo uso de extensores protéicos dos tipos colágeno e soja, utilizados pelos benefícios tecnológicos e de redução de custos de processo, sendo, contudo considerados limitantes pelos teores em aminoácidos essenciais e efeitos adversos que produzem nas características sensoriais. O efetivo controle dos teores adicionados não se realiza na rotina dos órgãos de vigilância do Brasil, pela falta de metodologia analítica validada para a quantificação das proteínas de soja e por não haver limites legislativos máximos de colágeno, junto aos parâmetros físico-químicos regulatórios. Visando apresentar subsídios para o estabelecimento de teores máximos e o efetivo controle da presença de proteínas de soja e colágeno, o presente projeto objetivou: a) validar intralaboratorialmente as metodologias oficiais da AOAC na quantificação de hidroxiprolina (colágeno) e proteínas de soja em produtos cárneos; b) avaliar a composição e influência tecnológica destes extensores em salsichão Lionês; e c) apresentar resultados sensoriais e físico-químicos de produtos comerciais tipo salsicha, lingüiça e carne bovina moída, obtidos na rotina de análise do Instituto Adolfo Lutz.

Os processamentos da massa tipo emulsão, salsichão Lionês e conserva enlatada seguiram formulações e processos comerciais. Os teores de carne bovina, toucinho e gelo foram balanceados na formulação de modo a manter a relação umidade: proteína em 4,7 e teor de gordura em 20%, em substituição às proteínas de soja texturizada (PTS, Maxten E-100), concentrada texturizada (PCS, Proteimax TR-120) e isolada (PIS, Supro 500E), adicionadas na concentração de 0% a 6%, ou do tecido conjuntivo de couro suíno cozido ou

do tecido conjuntivo cru, que recobrem os cortes cárneos de bovino, obtidos através do equipamento esfolador Skyner, na concentração de 0% a 15%. Os parâmetros de cor L* (luminosidade), a* (vermelho) e b* (amarelo) foram avaliados em espectrofotômetro (Minolta) e a firmeza por compressão em texturômetro (TAXT2i/25). Os procedimentos das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz foram seguidos nas determinações de composição centesimal e pH. A estabilidade da emulsão foi avaliada pela porcentagem de gelatina e gordura separadas em conservas cárneas esterilizadas. Nove julgadores treinados avaliaram os atributos sensoriais utilizando escala linear não-estruturada de 10 cm, segundo delineamento experimental de blocos completos casualizados, com repetição. Procedeu-se teste de aceitação em laboratório utilizando escala hedônica. Os resultados foram tratados pela ANOVA e teste de médias de Tukey ($p=0,05$).

A validação intralaboratorial do método de análise do aminoácido hidroxiprolina, em conservas cárneas de controle interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK, revelou sensibilidade (limite de quantificação 0,0075g/100g), precisão (CV inferiores a 4%), exatidão (recuperação 90% – 95%) e simplicidade na operação.

O imunoensaio ELISA oficial AOAC na quantificação de proteínas de soja em massa tipo emulsão crua, salsichão Lionês pasteurizado, e conserva esterilizada, adicionados de PTS, PCS e PIS, totalizando 39 tratamentos, revelou especificidade, precisão intra-ensaio (CV inferiores a 6%), linearidade da curva de calibração ($r=0,980$), sensibilidade (limite de quantificação de proteína de soja 0,14g/100g na amostra), contudo baixa exatidão, sendo necessária a padronização do método, uma vez que os ensaios comparativos utilizando o *kit* ensaio ELISA-TEK permitiram uma extração aquosa rápida das amostras cárneas e resultados com maior exatidão.

O uso de 0% a 6% de produtos de soja, em salsichão Lionês, demonstrou a influência da PTS na intensificação da cor vermelha, sem alteração da firmeza e sabor, com redução dos teores de umidade e proteína, ligeiro acréscimo do teor de cinzas e pH, estabilizando a emulsão. O uso de PCS reduziu a umidade e a intensidade da cor vermelha, não alterou a firmeza e sabor, aumentou o pH e estabilizou a emulsão. A presença de PIS resultou em salsichão com tonalidade vermelha, firmeza e sabor característico reduzidos, com menor porcentagem de umidade e maior pH, sem, contudo, proporcionar melhora na estabilidade da emulsão.

A utilização de 0% a 15% de couro suíno ou tecido conjuntivo bovino em salsichão Lionês revelou aumento da firmeza e quantidade de tecido residual na boca, acréscimos lineares dos teores de colágeno ($r=0,99$ e $0,97$, respectivamente) e menor estabilidade da emulsão. Os atributos de sabor e cor característicos foram reduzidos pela adição de couro suíno, resultando em menor aceitabilidade. As salsichas comerciais revelaram valores de colágeno 1,7% e as linguiças 1,8%, correspondentes às medianas, de um total de 103 amostras avaliadas.

A análise de rotina de carne bovina moída comercial revelou alterações na aparência pela elevada proporção de tecido conjuntivo, apresentando valores de colágeno correspondentes às medianas 123% maiores quando comparado à carne moída comercializada no varejo. A adição de fibras de tecido conjuntivo de bovino em carne moída fresca apontou aumento linear de colágeno ($r=0,986$) e gordura, e redução dos valores de umidade, cinzas, pH e cor vermelha, conferindo ao produto menor aceitação. O hambúrguer formulado apresentou-se mais firme, necessitando maior número de mastigações e sabor característico menos intenso.

ABSTRACT

Comminuted meat products, such as frankfurters, fresh ground sausages and hamburgers are exposed to fraud by the abusive use of protein extensors of the types collagen and soy proteins, used in meat products because of their technological benefits, with reduced processing costs, although they are considered limiting, with regard to essential amino-acids, and producing adverse effects in sensory characteristics. The effective control of addition levels is not properly controlled by the Sanitary Surveillance bodies in Brazil, due to the lack of a validated quantitative analytical methodology for soy proteins and because there are no legal limits to collagen inclusion in meat products. As a contribution to the establishment of maximum contents and effective control of soy proteins and collagen, this project sought: a) to validate intra-laboratorially the official AOAC methodologies in the quantification of hydroxyproline (collagen) and soy proteins in meat products; b) to evaluate proximate composition and technological influence of extensors addition to Lyoner sausage, and c) to present both sensorial and physicochemical Adolfo Lutz Institute analytical routine results of commercial products like frankfurters, fresh ground sausages and minced beef meat.

The formulation and processes were those commercially used for meat emulsion batter, Lyoner sausage and canned emulsion. Beef meat, pork backfat and ice quantities were balanced in order to keep constant the 4.7 humidity : protein ratio as well as the 20% lipid level, replaced with either texturized soy proteins (TSP, Maxten E-100), texturized concentrated (CSP, Proteimax TR-120) and isolated (ISP, Supro 500E) in concentration of

0 to 6% or connective tissue from cooked pork rind or fresh beef connective tissue recovered from cuts obtained by use of Skyner machine, in the range 0 to 15%. The color parameters L^* (luminosity), a^* (red) and b^* (yellow) were measured using a spectrophotometer (Minolta) and compression hardness was measured using a Texture Analyser (TAXT2i/25). The proximate composition and pH were carried out according to Adolfo Lutz Institute's Analytical Norms. Emulsion stability was reported as percent fat and gelatin released from sterilized canned emulsion. A trained 9-member panel evaluated the sensory attributes using an unstructured 10 cm line scale, following the randomized complete block design, with replicate judgments. Laboratorial consumer acceptance test was carried out using hedonic scale. The results were analyzed by ANOVA and Tukey test ($p=0.05$).

The intra-laboratorially validation of aminoacid hydroxyproline analysis methodology, using FAPAS/MAFF/UK inter-laboratorial control canned meat conserve revealed sensibility (quantification limit 0.0075g/100g), precision (CV below 4%), accuracy (recovery rates 90-95%) and operation simplicity.

The ELISA immunoassay for soy protein quantification using raw batter emulsion, pasteurized Lyoner sausage and sterilized canned meat added with TSP, CSP and ISP, totalizing 39 treatments, revealed specificity, intra assay precision (CV bellow 6%), calibration curve linearity ($r=0.980$), sensibility (quantification limit of 0.14g/100g for soy protein in sample), however low accuracy, making necessary the standardization of the method, since the comparatives assays using kit ELISA-TEK allowed rapid aqueous extraction of meat samples into a liquid form suitable for the assay, with higher accuracy results.

The utilization of 0 to 6% soy proteins in Lyoner sausage revealed the influence of TSP on red color improvement, with no influence on final product firmness and flavor. Moisture and protein decreased, with slight increase on ash and pH, improving emulsion stability. The use of CSP reduced moisture and red color intensity, without changes in firmness and flavor, increased pH and stabilized emulsion. The presence of ISP resulted product's decreased red color intensity, firmness and characteristic flavor, with lower moisture level and higher pH, without improvement in the emulsion stability.

The utilization of 0 to 15% pork rind and beef connective tissue to Lyoner sausage resulted an increase on toughness and residual connective tissue remaining at the end of mastication, as well as linear increases on collagen levels ($r=0.97$ and 0.99 , respectively) and decrease on emulsion stability. The characteristic flavor and color attributes were decreased by the pork rind replacement, resulting in lower consumer's acceptability. The commercial frankfurter-type sausages revealed collagen median value of 1.7% and commercial fresh ground sausages 1.8%, from total 103 samples analyzed.

The routine analysis of beef minced meat revealed appearance alterations due to connective tissue at high amounts, presenting collagen median values 123% higher compared with beef minced meat bought in meat stores. Beef connective tissue fibers addition in fresh minced beef meat revealed linear increase in collagen ($r=0.986$) and fat, and decrease in moisture, ash, pH and red color values, causing lower product acceptance. The formulated hamburger revealed itself firmer, demanding a greater number of mastications and presenting a less intense characteristic flavor.

INTRODUÇÃO

Nos produtos cárneos cominuídos, por vezes, tem se revelado abusiva a utilização de proteínas de soja e matérias-primas cárneas ricas em colágeno, como aparas, retalhos, pele, tendões, cartilagens, miúdos e vísceras comestíveis, acima dos limites permitidos pela legislação vigente ou em categorias não autorizadas, com a intenção de reduzir custos. Geralmente, os adulterantes são muito similares na aparência, composição química e propriedades sensoriais dificultando a sua identificação. A fraude ou adulteração de produtos cárneos deve ser monitorada pelos órgãos fiscalizadores por razões de ordem nutricional, sensorial, econômica e de saúde do consumidor (DESHPANDE, 1994). As regulamentações visam impedir as adulterações, e métodos analíticos devem ser desenvolvidos e validados para a implementação de regulamentos e normas.

De acordo com o Artigo 879 do RIISPOA (BRASIL, 1997), considera-se adulteração quando são empregadas substâncias de qualquer qualidade, tipo e espécie diferente da composição normal do produto, sem prévia autorização do órgão competente. É considerada fraude quando há alteração ou modificação total ou parcial de um ou mais elementos normais do produto, de acordo com os padrões estabelecidos ou fórmulas aprovadas, ou quando há supressão de um ou mais elementos e substituição por outros, visando ao aumento de volume ou de peso, em detrimento de sua composição normal ou do valor nutritivo intrínseco.

As proteínas são os principais componentes funcionais da tecnologia de produtos cárneos, apresentando grande influência nas características sensoriais de aparência, odor, textura e sabor, determinando os aspectos nutricionais e preço.

Há atualmente, no Brasil, uma disponibilidade muito grande de resíduos protéicos, principalmente colágeno, em face da produção de animais de corte (OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2002). O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada em todos os organismos animais multicelulares. É a mais abundante das proteínas animais, constituindo um quarto do total, sendo o principal elemento fibroso da pele, ossos, tendões, cartilagens e dentes dos mamíferos. Está presente em quantidades variáveis em quase todos os órgãos, e contribui para exercer ação de suporte na estrutura geral dos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990).

Cortes cárneos de baixo valor comercial e subprodutos, normalmente, apresentam elevado teor de tecido conjuntivo (LEE et al., 1978). Os componentes do tecido conjuntivo colagenoso possuem baixos teores em aminoácidos essenciais e ausência de triptofano, podendo influenciar a qualidade nutricional da carne, se presente em elevadas proporções (BAILEY; LIGHT, 1989). O colágeno em carnes e produtos cárneos cominuídos pode afetar o rendimento, textura, estabilidade da emulsão, cor, sabor, vida-de-prateleira e valor nutricional.

O elevado custo das proteínas animais de alto valor biológico desperta o interesse para a fabricação de alimentos com proteínas de origem vegetal de menor custo. As proteínas de soja são as mais utilizadas pela indústria da carne, tendo propriedades emulsificante,

estabilizante, texturizante e de hidratação, apresentando grande valor tecnológico na elaboração de produtos cárneos emulsionados, tipo salsicha e mortadela (SILVA, 1998).

As proteínas de soja nas formas isolada, concentrada e texturizada, com teores mínimos de protídios em base seca de 88%, 68% e 50% (BRASIL, 1978b; SÃO PAULO, 1978), respectivamente, são incorporadas aos produtos cárneos com a finalidade de melhorar as características funcionais e reduzir custos. O interesse comercial estimula o incremento da porcentagem de adição destas proteínas em produtos cárneos. A porcentagem máxima de adição de proteína texturizada de soja nos embutidos emulsionados, tipo salsicha e mortadela, que era de 3,5% (BRASIL, 1978a) passou, pela legislação vigente, a 4% (BRASIL, 2000), como proteína não-cárnea agregada, exceto nas salsichas frankfurt, viena, mortadelas bologna e italiana. No entanto, a verificação de que os produtos cárneos oferecidos no mercado atendem a essa especificação não ocorre rotineiramente, pela não disponibilidade de um método quantitativo para a determinação da soja.

O imunoensaio ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilizado para a determinação da concentração de soja em produtos cárneos, em vários países, ainda não foi validado e implantado na rotina de análise dos laboratórios nacionais brasileiros.

Validar é provar a “adequação ao uso”, determinar o rigor ou exatidão de um método analítico, e prover confiança de que os dados gerados são significativos. A validação de um método analítico é considerada o principal requisito de qualidade para laboratórios, tanto para análises de rotina, como para pesquisa e desenvolvimento.

A validação intralaboratorial de métodos analíticos de quantificação de proteínas de soja e colágeno, em produtos cárneos, e a caracterização química, física e sensorial do uso destas proteínas visam auxiliar o estabelecimento de padrões de identidade e qualidade de produtos cárneos e contribuir para a efetiva implementação dos limites impostos pela legislação no uso dessas proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYLEY, A. J.; LIGHT, N. D. Connective tissue in meat and meat products. **England : Elsevier Science Publishers**, 1989. 355p.

BRASIL. Decreto nº 30.691, 29 mar 1952 alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25 jun 1962, nº 1.236 de 02 set 1994, nº 1.812 de 08 fev 1996 e nº 2.244 de 04 jun 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/riispoa.htm> Acesso em: 27 out. 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº4, 31 mar 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 abr. 2000a. Seção 1, p.6-10.

BRASIL. Portaria nº 115/78. Dispõe sobre a permissão do emprego de proteína texturizada de soja em produtos cárneos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1º ago. 1978a. Seção 1, Parte 1, p.12020-21.

BRASIL. Resolução CNNPA nº14/78. Padrão de Identidade e Qualidade para Farinha Desengordurada de Soja, Proteína Texturizada de Soja, Proteína Concentrada de Soja, Proteína Isolada de Soja e Extrato de Soja. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 28 jun. 1978b. Seção I, Parte I, p.9896-900.

DESHPANDE, S. S. Immunodiagnostics in agricultural, food, and environmental quality control. **Food Technology**, v. 48, n. 6, p.136-41, 1994.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990. p.65-100.

LEE, Y. B.; ELLIOTT, J. G.; RICKANSRUD, D. A.; HAGBERG, E. C. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 5, p. 1359-62, 1978.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: no caminho da pesquisa**. 2.ed. Cocal do Sul: IMPRINT, 2002. 155p.

SÃO PAULO (Estado). Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (NTA). **Diário Oficial [do Estado de São Paulo]**, São Paulo, n.200, 21 out 1978. Seção I, NTA 36, p. 17-9.

SILVA, A. M. **Quantificação de proteína texturizada de soja e identificação de carne por espécie animal em hambúrguer, empregando o ELISA e o dot-ELISA**. São Paulo, 1998. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

OBJETIVOS

Geral

Validar metodologias de quantificação de proteínas de soja e colágeno e avaliar parâmetros tecnológicos do uso em produtos cárneos, visando ao estabelecimento de teores máximos, e efetivo controle da presença dos mesmos.

Específicos

- 1) Validar intralaboratorialmente os métodos oficiais da AOAC n. 988.10 e 990.26, na quantificação de proteína de soja e hidroxiprolina em produtos cárneos.
- 2) Caracterizar química (umidade, lipídios, proteínas totais e colágeno), física (estabilidade da emulsão, textura e cor) e sensorialmente: a) embutido tipo emulsão, pasteurizado, acrescido de 0% a 6% de proteínas de soja texturizada, isolada ou texturizada concentrada; b) embutido tipo emulsão, pasteurizado, adicionado de 0% a 15% de couro suíno ou tecido conjuntivo aponevrótico bovino; e c) carne moída e hambúrguer acrescidos, respectivamente, de 0% a 50% e 10% a 30% de tecido conjuntivo aponevrótico bovino.
- 3) Avaliar a composição centesimal e teor de colágeno de cortes cárneos de suínos e dianteiros de bovinos, para uso como matérias-primas na indústria da carne.
- 4) Avaliar a composição centesimal e teor de colágeno de produtos cárneos comerciais dos tipos salsicha, lingüiça frescal e carne moída, recebidos na rotina de análises do Instituto Adolfo Lutz. Comparar resultados com os padrões de identidade e qualidade vigentes, na detecção de fraudes e fornecer subsídios ao estabelecimento de teores máximos de colágeno.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Proteínas de soja

O grão de soja (*Glycine* sp) é atualmente a mais importante fonte de proteína vegetal para a nutrição humana e animal. A soja é uma leguminosa anual originada no nordeste da China, que hoje cresce em várias partes do mundo, inclusive nas regiões temperadas. A proteína de soja como de outras muitas leguminosas, apresenta baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, sendo o aminoácido metionina considerado o mais limitante (RAKOSKY, 1970; BROOKS; MORR, 1985; ZARKADAS; KARATZAS; KHANIZADEH, 1993).

A atenção do mundo industrializado tem se voltado para as alternativas de fontes protéicas com baixos teores de gordura e colesterol. O conteúdo de aproximadamente 20% de fibras alimentares nos concentrados protéicos de soja tem um significativo impacto nutricional. As fibras são constituídas de 40 – 50% de fibras solúveis, que estão relacionadas ao efeito positivo de redução do nível de colesterol no sangue. A proteína de soja é fonte protéica que combina elevada qualidade funcional, valor nutricional e baixo custo. Segundo o CODEX ALIMENTARIUS os produtos protéicos de soja são ingredientes alimentícios (PEDERSEN, 1995).

A maior parte das proteínas da soja são classificadas como globulinas. São insolúveis em água em seu ponto isoeletrico (pH 4,5), mas são solúveis em água ou soluções salinas diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoeletrico. A ultracentrifugação separa as proteínas da soja em quatro frações com velocidades de sedimentação equivalentes a 2, 7, 11 e 15S. A fração 2S é composta por vários inibidores de tripsina, citocromo C, alantoinase, mais duas globulinas (2,3S e 2,8S) isentas de

atividade biológica. A fração 7S, que representa mais de um terço do total das proteínas da soja, é formada de pelo menos quatro proteínas importantes: beta-amilase, lectina, lipoxigenase e globulina 7S (peso molecular 180.000). Embora desprovida de atividade biológica, a globulina 7S, da mesma forma que as lectinas, são classificadas como glicoproteínas. A globulina 11S, também denominada glicinina representa cerca de um terço do total das proteínas da soja. A fração 15S não tem sido isolada e caracterizada, apresentando peso molecular acima de meio milhão com base na velocidade de sedimentação. As frações 7S e 11S perfazem 70% do total protéico da soja. O restante sedimenta com as frações 2S e 15S (SGARBIERI, 1996).

A proteína de soja como extensor é adicionado aos embutidos por uma ou mais das seguintes razões: 1) melhorar a estabilidade da emulsão; 2) aumentar a capacidade de retenção de água; 3) diminuir as perdas no processo de cozimento; 4) melhorar a fatiabilidade; 5) diminuir os custos de formulação (HEDRICK et al., 1994).

A expansão do uso de proteínas de soja em produtos cárneos é limitada devido aos sabores indesejáveis amargos de feijão (beany), de soja (soybean) e a sensação bucal adstringente, que resultam em efeitos adversos na qualidade sensorial do produto final (KINSELLA, 1979; PEDERSEN, 1995). Estudos sensoriais tem indicado que o concentrado protéico de soja pode ser utilizado no teor máximo de 3%, sem alterar significativamente o sabor característico do produto pelo sabor indesejado da soja (PEDERSEN, 1995).

Segundo Ambrosiadis (1994), salsichão emulsionado cozido adicionado de 6% de proteína texturizada de soja (PTS) revelou aroma e sabor característicos fracos, não havendo detecção de aroma ou sabor de soja, sendo a condimentação considerada

demasiadamente suave comparado ao produto controle. A cor resultou desfavoravelmente mais clara devido à diminuição da tonalidade vermelha e aumento da amarela. Um incremento no teor de adição de PTS para 12%, revelou neste tipo de produto, odor e sabor não característicos, típicos a proteína de soja, demasiadamente fracos de carne, com extrema suavidade na condimentação. Não obstante, a adição de PTS resultou em incremento no valor de pH do embutido, que se deveu obviamente ao pH mais elevado da proteína de soja (6,35 a 6,40), resultou em menores perdas de peso do produto final cozido pela melhor incorporação da água, e apresentou menor resistência à compressão (maior maciez), uma vez que falta estrutura fibrilar característica.

Segundo Pedersen (1995), as proteínas de soja isolada e texturizada concentrada, adicionadas em carnes moídas e pedaços inteiros de carne, resultaram numa maior estabilidade no cozimento, assegurando retenção do suco natural da carne, maior rendimento, produtos cárneos mais suculentos e melhor textura após o cozimento.

No Brasil, Vega e Felício (1987) avaliando o efeito da substituição parcial da carne de frango por isolado protéico de soja (IPS), nas características físicas e sensoriais de hambúrguer, nos níveis de substituição 0, 5 e 10%, observaram que a proteína vegetal contribuiu para reduzir a perda de peso e praticamente não influenciou na retração. O IPS prejudicou a suculência, aumentou a força máxima de cisalhamento do produto cozido, aumentou a luminosidade no produto cru sem, contudo, afetar a aceitação. A incorporação de IPS deu origem a um sabor estranho detectável, porém de baixa intensidade, de modo que todos os tratamentos foram aceitáveis. Ficou evidente a possibilidade de se substituir até 10% a carne de frango por proteínas de soja, sem prejudicar a qualidade do hambúrguer.

Os estudos de Rakosky (1970); Smith et al. (1973); Goltry, Stringer e Baldwin, (1976); Sofos, Noda e Allen (1977); Terrell, Brown e Carpenter (1979); Penna et al. (1992); Kaya e Gökalp (1992); Yetim et al. (1992); Hoogekamp (1994); Pedersen (1995); Kerry, Morrissey e Buckley (1998); Creedon et al. (1998); Makala, Olkiewica e Borys (1998); Porcella et al. (1999); Chin et al. (1999); Porcella et al. (2001) concentraram-se na avaliação dos efeitos da incorporação de derivados protéicos da soja, nas características químicas, físicas e sensoriais dos produtos cárneos crus e cozidos. Dependendo do tipo de derivado protéico utilizado, pode haver influência na retenção de água e gordura, capacidade de emulsificação, textura, cor, odor e sabor.

Castelanos Molina (1977) estudando (no Brasil) o efeito da substituição parcial da carne por proteína texturizada de soja (PTS) hidratada, nos teores 0, 6, 12, 18, 24 e 30% em hambúrguer, observou que o conteúdo de proteína em todas as misturas foi praticamente constante ao variar a porcentagem de PTS nas formulações. O conteúdo de gordura foi diminuindo e o conteúdo de carboidratos foi aumentando à medida que se incrementava a proporção de PTS nas misturas. Os hambúrgueres elaborados somente com carne, ao serem fritos, diminuíram seus volumes em até 32%, enquanto que os hambúrgueres que continham PTS sofreram redução de volume no máximo de 14%. Esta menor redução de volume pela fritura foi interpretada, como consequência da propriedade funcional da proteína de soja em aumentar a retenção de água e sucos da carne. Este fato foi de grande importância, implicando na retenção de nutrientes da carne durante a fritura, além de melhorar a aparência, suculência e sabor. A medida objetiva da textura (força de cisalhamento - Warner Bratzler) revelou menor resistência ao corte com o aumento na porcentagem de PTS. Neste estudo, até níveis de 24% de substituição de carne por PTS,

não houve deficiência em aminoácidos essenciais quando os hambúrgueres foram comparados com a proteína referência FAO-OMS 1973. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que uma substituição de 18% de carne por PTS resultou num valor PER (protein efficiency ratio) equivalente a 92% do valor PER da caseína. As misturas com 0 e 6% de soja resultaram valores de PER ligeiramente superiores ao encontrado para caseína, e a mistura com 12% de soja ligeiramente inferior. Com a adição de 30% de PTS o valor PER de 1,9 equivaleu a 76% do valor PER da caseína, 2,5.

Os estudos de Yetim et al. (1992) revelam a possibilidade do uso da farinha de soja desengordurada (49% de protídios) na substituição de 5, 10 e 20% da carne em frankfurters estilo turco sem alteração significativa dos resultados sensoriais comparados aos do controle. Os resultados da análise de aminoácidos e PER (calculado por fórmula) também indicaram que a utilização de farinha de soja não alterou significativamente o valor nutricional dos embutidos.

Segundo Pedersen (1995), tempos atrás, a qualidade dos alimentos era avaliada com base no valor PER, revelando baixos índices para as proteínas vegetais comparado com as tradicionais proteínas animais. Atualmente, diversos estudos clínicos envolvendo humanos têm revelado informações referentes ao verdadeiro valor nutricional dos concentrados protéicos de soja. A avaliação de alimentos protéicos pelo valor PDCAAS (Protein Digestibility Corrected by the Amino Acid Score) resulta no valor 0,99 para a proteína concentrada de soja comparado ao valor 1,00 da caseína e albumina do ovo, e valores 0,92 para o isolado de soja e 0,83 para a farinha de soja. Segundo Zarkadas (1993), os métodos de ensaios biológicos tendem a superestimar a qualidade protéica de algumas proteínas animais para humanos, enquanto subestimam o valor de algumas proteínas vegetais, uma

vez que ratos possuem maiores requerimentos relativos para alguns aminoácidos essenciais comparados aos humanos.

2. Identificação e quantificação de proteínas de soja

As globulinas glicinina, ou fração 11S, e β -conglucina, ou fração 7S, representam dois terços das proteínas no grão de soja. A glicinina representa mais da metade do total das globulinas, compreendendo uma mistura heterogênea de polipeptídeos numa estrutura hexamérica (PM~360.000) com uma subunidade molecular de peso de aproximadamente 60.000. Esta subunidade associa um polipeptídeo ácido (PM ~ 40.000) e um polipeptídeo básico (PM ~ 20.000) ligados um ao outro por ponte dissulfeto. A β -conglucina (fração 7S) consiste de duas subunidades ácidas (α e α') e uma básica (β) de peso 76.000, 72.000 e 53.000, que formam trímeros de peso 150.000 – 200.000. Esta globulina perfaz 20 – 30% da proteína do grão (TUKUR et al., 1996).

Vários métodos para detecção e quantificação de proteínas de soja em produtos cárneos têm sido publicados nas últimas três décadas, incluindo: **a) técnicas histoquímicas** (COOMARASWAMY; FLINT, 1973; CASSENS; TERREL; COUCH, 1975; BERGERON; DURAND, 1977; FLINT; MEECH, 1978; ELDRIDGE, 1981; RODRIGUES; PENTEADO, 1989; HECKMANN; NEUMANN; TSCHIRDEWAHN, 1992), **b) cromatografia líquida de alta eficiência** (GRIFFITH; BILLINGTON; GRIFFITHS, 1981), **c) espectrofotometria de fluorescência** (ELDRIDGE; HOLMES, 1979), **d) análise de reflectância no infravermelho próximo – NIR** (BERKOWITZ; WEBERT, 1987), **e) eletroforese** (PARSONS; LAWRIE, 1972; GUI et al., 1973; LEE et

al., 1975; LEE et al., 1976; HOMAYOUNFAR, 1977; POLI et al., 1979; MORI et al., 1981; ARMSTRONG; RICHERT; RIEMANN, 1982; GERMAN; DAMODARAN; KINSELLA, 1982; PENG et al., 1982; OLSMAN; DOBBELAERE; HITCHCOCK, 1985; RODRIGUES, 1986), **f) eletroforese com imunoblotting** (JANSSEN; VOORTMAN; BAAIJ, 1987; ABDEL-AZIZ et al., 1997), **g) imunoeletroforese** (KAMM, 1970), **h) imunodifusão dupla de Ouchterlony** (HAMMOND et al., 1976, BRAUNER-GLAESNER; RISTOW, 1990, HECKMANN; NEUMANN; TSCHIRDEWAHN, 1992), **i) ensaio imunoenzimático ELISA** (HITCHCOCK et al., 1981; GRIFFITH; BILLINGTON; GRIFFITHS, 1981; CRIMES; HITCHCOCK; WOOD, 1984; GRIFFITHS et al., 1984; OLSMAN; DOBBELAERE; HITCHCOCK, 1985; RAVESTEIN; DRIEDONKS, 1986; RITTENBURG et al., 1987; RING, 1987; MEDINA, 1988; McNEAL, 1988; YASUMOTO, 1990; GAZZAZ; RASCO; DONG, 1992; BREHMER; SCHLEICHER; BOROWSKI, 1999), **j) análise de peptídeos ou aminoácidos** (BAILEY, 1976; LLEWELLYN et al., 1978; GRIFFITH; BILLINGTON; GRIFFITHS, 1981; AGATER et al., 1986; ZARKADAS, 1993) e **k) métodos indiretos baseado na determinação de carboidratos** (BERKOWITZ; WEBERT, 1987), **esteróis e fitato** (CRIMES; HITCHCOCK; WOOD, 1984).

A microscopia quantitativa ou estereológica compreende um conjunto de métodos que, aplicados nas secções bidimensionais, possibilita o conhecimento da estrutura interna de uma amostra, obtendo-se informações de suas características tridimensionais. Pode-se dizer que Flint e Meech (1978) foram um dos primeiros a utilizá-la na quantificação da proteína texturizada de soja em sistemas modelos de carne e soja (RODRIGUES, 1986). Esta técnica, contudo apresentou problemas devido à baixa exatidão na determinação de

certos tipos de produtos de soja, sendo muito demorada, resultando um elevado custo por determinação (GRIFFITH; BILLINGTON; GRIFFITHS, 1981). A mesma técnica foi testada colaborativamente em 1980/81 não sendo considerada precisa, por isto, o método imunoenzimático ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) foi investigado como um procedimento alternativo para determinação de proteínas de soja em alimentos (CRIMES; HITCHCOCK; WOOD, 1984).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis - PAGE) na presença de sulfato dodecil de sódio (sodium dodecyl sulphate – SDS), segundo Armstrong, Richert e Riemann (1982), foi um método amplamente utilizado na determinação de proteína de soja em produtos cárneos. Após remoção dos lipídios e água com acetona (“pó de acetona”), a amostra foi extraída com solução tampão contendo SDS. As proteínas foram separadas em gel eletroforético, em função da carga elétrica e peso molecular e as bandas protéicas obtidas reveladas com corante Coomassie Blue R-250. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi utilizada para separar e quantificar, por densitometria, a proteína de soja em produtos cárneos (OLSMAN; DOBBELAERE; HITCHCOCK, 1985).

A determinação de proteína de soja em produtos cárneos pode ser realizada por análise de peptídeos após hidrólise enzimática e o produto caracterizado pelo analisador de aminoácidos. É uma técnica demorada (5 a 6 dias) que utiliza equipamento especializado, não estando disponível nos laboratórios de análise de rotina, que requerem rapidez para um grande número de amostras (BAYLEY, 1976; AGATER et al., 1986).

As técnicas imunológicas se baseiam na especificidade dos anticorpos em reagir com um determinado antígeno. Várias técnicas existem para determinar essa reação. ELISA

é uma dessas técnicas que foi utilizada para quantificar soja em produtos cárneos. No método ELISA não se tem a precipitação do complexo antígeno – anticorpo. A presença do complexo é quantitativamente monitorada pela medida colorimétrica da atividade da enzima ligada ao complexo. Hitchcock et al. (1981) aplicou a técnica com sucesso para a determinação quantitativa de proteína de soja em alimentos. O método revelou ser muito sensível e diferentemente das técnicas imunológica clássicas, aplicável mesmo a produtos cárneos termicamente processados (OLSMAN; DOBBELAERE; HITCHCOCK, 1985).

Griffiths et al. (1984) avaliaram os imunoreagentes comerciais (soro anti-proteína de soja e conjugado) na determinação de proteína de soja em produtos de carne, empregando o teste ELISA desenvolvido por Hitchcock et al. (1981). Os autores utilizaram hambúrgueres de carne bovina (“beefburgers”), substituindo a carne com 0, 2, 4, 8, 16, 24 e 32% de isolado proteico de soja (Unisol), que foram submetidos aos tratamentos térmicos de 100°C/30 min e 121°C/30min. Os autores concluíram que os soros comerciais respondiam de forma satisfatória, similarmente ao soro padronizado utilizado como padrão. Os hambúrgueres “in natura” apresentaram recuperações que variaram de 65% a 126%, os produtos tratados a 100°C/30min de 69% a 110% e nos esterilizados a variação foi de 70% a 90% (este último nos teores de adição de 8% a 24%).

Crimes, Hitchcock e Wood (1984) reportaram que, os resultados de um estudo colaborativo com 22 laboratórios do Reino Unido e Irlanda utilizando o método ELISA desenvolvido por Hitchcock et al. (1981), revelou valor de repetitividade da ordem de 30% do valor determinado de proteína de soja, para as amostras de embutidos crus adicionados com farinha de soja nos níveis de 0 a 7%, e repetitividade de 60% para as amostras de embutidos com concentrado texturizado de soja. Os valores de reprodutibilidade foram da

ordem de 70% do valor de proteína de soja determinado nos embutidos para os dois produtos de soja.

Olsman, Dobbelaere e Hitchcock (1985) verificaram o desempenho do ELISA padronizado segundo Hitchcock et al. (1981), e do SDS-PAGE segundo Armstrong, Richert e Riemann (1982), na avaliação quantitativa de proteína de soja em produtos cárneos. Este trabalho foi o resultado de um estudo colaborativo envolvendo 10 países e 26 laboratórios da Europa. Segundo os autores, a aplicabilidade e o desempenho dos métodos para análise de proteína de soja em produtos cárneos depende de vários fatores, os mais importantes sendo: **a)** o tipo de produto de soja; **b)** o teor de proteína de soja no produto cárneo; **c)** o tipo e a composição do produto cárneo; **d)** o processamento do produto cárneo final, especialmente o seu tratamento térmico. Não sendo possível avaliar todos os fatores ao mesmo tempo, foi escolhido a) e b) para variação. As amostras utilizadas foram conservas cárneas enlatadas de 200g, cozidas em água a 80°C/60min, adicionadas de 5 produtos comerciais de soja: farinha (Cargill B.V., 200/70), concentrado (Unimills, Único 75), isolado protéico (Purina, 500E), farinha texturizada (Cargill, 4N textratein) e concentrado texturizado (Unimills, Único), perfazendo um total de 5 amostras contendo diferentes teores e tipos de proteínas soja, juntamente com um branco e 2 controles. A concentração de proteína de soja (Nx6,25) nas amostras foi calculado de acordo com o teor de cada ingrediente de soja adicionado na composição das formulações, variando de 1,5 a 2,8%. De acordo com os autores, ambos os métodos podiam ser utilizados qualitativamente, mas somente o ELISA mostrou-se adequado para a quantificação de proteína de soja.

Após os trabalhos de Hitchcock et al. (1981), Griffiths et al. (1984) e os estudos colaborativos de Crimes, Hitchcock e Wood (1984) e Olsman, Dobbelaere e Hitchcock

(1985), considerou-se comprovada a eficiência do método imunoenzimático ELISA descrito por estes autores para detectar proteína de soja em produtos de carne, sendo endossado pela AOAC como um método oficial semiquantitativo na determinação de proteínas de soja em produtos crus e processados termicamente.

Ravestein e Driedonks (1986) também desenvolveram um procedimento ELISA para análise quantitativa de proteínas de soja nos produtos “beef patties” e “luncheon meats” fortificados com 1,5 a 4,25%. O ensaio foi aplicável para produtos crus e esterilizados, não dependendo do ingrediente de soja (concentrado, isolado, etc.). O limite de detecção do ELISA foi 0,5% de proteína de soja. Os anticorpos utilizados eram específicos para subunidades de proteína de soja desnaturada com SDS. Os produtos cárneos foram extraídos com SDS e 2-mercaptoetanol, que garantiram uma ótima recuperação dos componentes da proteína.

Nos ensaios ELISA empregando anticorpos anti-proteína de soja desnaturada pela uréia e renaturada pela diálise ou diluição (HITCHCOCK et al., 1981) ou anti-proteína “in natura” (MEDINA, 1988), não foram verificadas reações cruzadas com outras proteínas, indicando alta especificidade dos ensaios. Segundo Medina (1988), as preparações das amostras antes da análise de ELISA reportada nos trabalhos de Ravestein e Driedonks (1986) e Crimes, Hitchcock e Wood (1984) são demoradas e podem ser simplificadas.

Ring, Jennissen e Puff (1988) detectaram 0,25% de soja em salsicha. Brehmer, Schleicher e Borowski (1999) apresentaram como limite de detecção o intervalo de 0,05 a 0,1% em embutido tipo Frankfurt e concluíram que a técnica ELISA utilizando anti soros e padrões apropriados pode ser utilizada na determinação quantitativa de proteína

de soja em embutidos tratados termicamente tipo salsicha Frankfurt. O método foi altamente sensível e provou ser prático e seguro na rotina de análise.

3. Tecidos conjuntivos, colágeno e elastina

Os tecidos conjuntivos caracterizam-se, morfológicamente, por apresentarem diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por elas. A riqueza em material intercelular é uma de suas características mais importantes. Esse material é representado por uma parte com estrutura microscópica definida, as fibras do conjuntivo, e por uma parte não estruturada, a substância fundamental amorfa. Há uma pequena quantidade de fluido, o plasma intersticial, banhando as células, as fibras e a substância amorfa. As fibras do conjuntivo são de três tipos principais, colágenas, reticulares e elásticas. Os tecidos desse grupo desempenham as funções de sustentação, preenchimento, defesa e nutrição. As funções de sustentação e preenchimento são tão óbvias que tendem a obscurecer as outras. As cápsulas que revestem os órgãos e a malha tridimensional interna que suporta suas células são constituídas por tecido conjuntivo. Este forma também os tendões, ligamentos e o tecido areolar que preenche os espaços entre os órgãos. Os tecidos ósseo e cartilaginoso, principais responsáveis pela sustentação do corpo humano, são variedades de conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

No músculo, presente na forma de rede de fibras do tecido conjuntivo, perfaz de 1 a 9% da matéria seca desengordurada (LAWRIE, 1979 apud ETHERINGTON; SIMS, 1981). A força de contração é transmitida aos tendões através dos feixes de tecido conjuntivo intramuscular que envolve as fibras musculares individuais.

Três estruturas colagenosas podem ser morfologicamente distinguidas – endomísio, envolvendo cada fibra, perimísio, recobrindo feixes destas fibras, e epimísio, circundando o músculo inteiro (*Figura 1*).

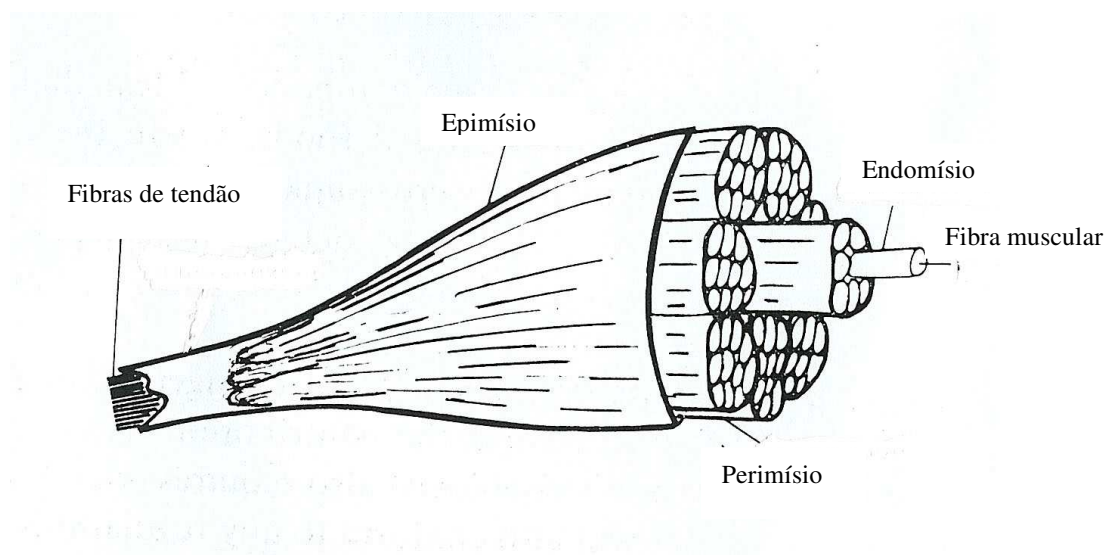


Figura 1. Tecidos conjuntivos do músculo. Cada fibra muscular está envolvida por uma delicada membrana colagenosa, o endomísio. Feixes destas fibras musculares, fascículos, estão circundados por uma bainha mais espessa de tecido conjuntivo, o perimísio. A camada resistente de tecido conjuntivo externo, epimísio, recobre vários feixes de fibras. As fibras de colágeno no tendão parecem conectar com ambos, o perimísio e o endomísio (ETHERINGTON; SIMS, 1981).

As fibras colágenas são as mais freqüentes no tecido conjuntivo; quando fervidas em água por longo tempo formam gelatina. A estriação transversal das fibrilas colágenas formando duas faixas, uma clara e outra escura, é consequência do arranjo das moléculas de tropocolágeno. No estado fresco são brancas, conferindo essa cor aos tecidos nos quais predominam (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

O colágeno está presente na maioria dos tecidos encontrando-se principalmente em tendões, músculos, pele, cartilagens, ossos, córnea e sistema vascular. O termo colágeno

deriva das palavras gregas KOLLA (cola) e GENNO (produção), e literalmente tem sido empregado como matéria-prima na produção de cola animal (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002).

São conhecidos até o presente dezenove diferentes tipos de colágeno os quais variam consideravelmente no comprimento de sua tríplice hélice e a sua função varia de acordo com a sua localização. O tipo I é o mais abundante, sendo o maior constituinte da pele (80% da matéria seca da pele adulta), tendões (90% da matéria seca), ligamento e ossos (90% da matéria seca). O colágeno do tendão, constituído do tipo I é do tipo cordel, porque as fibras são paralelas e densamente empacotadas, disposição necessária para oferecer a função de conectar o tecido muscular ao osso e de transmitir força mecânica necessária ao movimento. Na pele, por outro lado, o colágeno existe numa camada flexível e entrelaçada aleatoriamente (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002).

Os tendões são estruturas cilíndricas alongadas que ligam os músculos esqueléticos aos ossos. Devido à sua riqueza em fibras colágenas, são brancos e inextensíveis. Os feixes colágenos de tendão (feixes primários) formam conjuntos (feixes secundários) envolvidos por tecido conjuntivo frouxo que contém vasos sanguíneos e nervos. Finalmente, o tendão é envolvido externamente por uma bainha de conjuntivo denso. Em alguns tendões essa bainha é dividida em duas camadas: uma presa ao tendão e outra ligada às estruturas vizinhas. O colágeno é sintetizado por diversos tipos celulares, como fibroblasto, osteoblasto, odontoblasto, condrócito e célula muscular lisa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

Os aminoácidos glicina (percentual molar 33,0%), prolina (12,2%), hidroxiprolina (9,4%) e alanina (10,7%) perfazem 65% dos aminoácidos do colágeno. Essa proteína é

totalmente carente de cisteína e triptofano. Sua unidade molecular é o tropocolágeno, o fio protéico mais longo que se conhece (PM 300.000) com 15 Å de diâmetro e 2.800 Å de comprimento, onde três hélices esquerdas se entrelaçam formando uma super-hélice direita (FARFÁN, 1994).

A elasticidade de certos tecidos deve-se à proteína elastina. Nos preparados obtidos por distensão de tecido conjuntivo, as fibras elásticas distinguem-se facilmente das colágenas por serem mais delgadas e não apresentarem estriação longitudinal. Ramificam-se e ligam-se umas às outras, formando uma trama de malhas muita irregulares. Em virtude da presença de um pigmento, as fibras elásticas, quando vistas a fresco em grande quantidade, têm uma cor amarelada. Essa cor é característica do tecido elástico, variedade de conjuntivo com grande abundância de fibras elásticas. Devido à sua cor, são chamadas fibras amarelas do conjuntivo, em comparação com as colágenas, que são as fibras brancas. As fibras elásticas cedem facilmente mesmo às trações mínimas, porém retomam sua forma inicial tão logo cessem as forças deformantes. As fibras elásticas são sintetizadas por células diversas: fibroblastos, condrócitos e células musculares lisas. O componente principal das fibras elásticas é a proteína elastina. Trata-se de uma escleroproteína muito mais resistente aos processos extrativos do que o colágeno. Resiste à fervura e aos ácidos e álcalis diluídos. Resiste, também, à digestão pela tripsina. É atacada muito lentamente pela pepsina (pH 2), mas é hidrolisada facilmente por uma enzima pancreática, a elastase. O tecido elástico é pouco freqüente, sendo encontrado, por exemplo, nos ligamentos amarelos da coluna vertebral. A elastina apresenta-se também na parede de alguns vasos sangüíneos de grosso calibre (aorta, por exemplo), sob a forma de extensas lâminas ou folhas perfuradas, conhecidas como membranas fenestradas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

A elastina é uma proteína muito próxima do colágeno, em constituição e atuação, apresentando ainda muito maior elasticidade e resistência à deformação devido a interligações de lisinonorleucina e desmosina (FARFÁN, 1994).

O tecido cartilaginoso, também chamado de cartilagem, tem consistência rígida, embora seja menos rígido do que o tecido ósseo. Sua superfície é ligeiramente elástica e muito lisa, facilitando os deslizamentos. Desempenha a função de suporte, reveste superfícies articulares e é essencial para a formação e crescimento dos ossos longos. As propriedades do tecido cartilaginoso, relacionadas ao seu papel fisiológico, dependem da estrutura da matriz, que é constituída por colágeno ou colágeno mais elastina, em associação com macromoléculas de proteoglicanas (proteínas + glicosaminoglicanas). Como o colágeno e a elastina são flexíveis, a consistência firme das cartilagens se deve às ligações eletrostáticas entre as glicosaminoglicanas das proteoglicanas e o colágeno, e à grande quantidade de moléculas de água presas (água de solvatação) a estas glicosaminoglicanas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

Segundo Shimokomaki (1992), o colágeno poderia ter uma aplicação muito mais nobre nas áreas farmacêutica, médica, cosmética e de alimentos. Devido às suas propriedades como extensor, umidificante, emulsificante, potenciador da textura e valor nutritivo, o colágeno tem um enorme potencial de aplicação em alimentos. Na indústria de carnes, as potencialidades funcionais do colágeno poderiam ser melhor aproveitadas em produtos reestruturados e emulsionados, conferindo melhores resultados tecnológicos e econômicos a esses produtos (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002).

São conhecidos poucos detalhes sobre o exato mecanismo de interação do colágeno com outros ingredientes das emulsões cárneas. O tecido conjuntivo pode ser utilizado

vantajosamente em carnes processadas, no entanto, consideráveis pesquisas são necessárias para se conhecer o impacto da fonte de tecido conjuntivo e fatores de processo (pH, sal, fosfatos, aquecimento, etc) na funcionalidade do colágeno (KENNEY; KASTNER; KROPF, 1992 apud OLIVO, 1995).

Para Rao e Henrickson (1983), os fabricantes de embutidos usam carne contendo elevada proporção de tecido conjuntivo (colágeno) para reduzir custos de processo. No entanto, todos eles sabem que é necessário limitar a quantidade de colágeno para impedir os principais defeitos no produto final como as bolsas e capas de gelatina, difícil descasque, etc. Segundo os autores, o colágeno é uma proteína não balanceada e pode ser utilizado na substituição da carne gorda ou magra em embutidos suínos ou bovinos até o nível de 20%, sem prejudicar as propriedades funcionais do produto final e os requerimentos nutricionais da dieta. Em produto emulsionado, a adição de colágeno pode aumentar o rendimento e sua rigidez, contudo, altos teores podem reduzir a estabilidade da massa, causando defeitos no produto, com liberação de gelatina e gordura. Foi também observado que os embutidos contendo mais colágeno eram menos vermelhos na cor devido à diluição da mioglobina.

Os músculos inteiros contendo elevados teores de tecido conjuntivo podem ser inaceitavelmente duros. Mesmo quando o tecido conjuntivo está presente em produtos finamente cominuídos, pode haver problemas de textura. Diferentemente das proteínas miofibrilares, o colágeno não forma um gel estável ao calor e a textura é alterada. Outros problemas com o uso de tecido conjuntivo, quando o produto é aquecido acima de 60°C, é que o colágeno encolhe causando perda de fluído e distorção da forma do produto. Com a extensão do cozimento, o colágeno encolhido tende a solubilizar e formar gelatina que se separa. O tecido conjuntivo freqüentemente contém considerável quantidade de gordura.

Esta gordura, juntamente com a adicionada na formulação, escapam do tecido conjuntivo e é visível como gordura separada pelo cozimento. O aumento na substituição do tecido cárneo magro pela forma fibrosa de tecido conjuntivo, tendão, resultou numa diminuição da textura desejável, sabor e aceitação global. Estas perdas foram minimizadas pelo pré-aquecimento do tendão. Um pré-aquecimento a 60°C, ao invés de 100°C como antigamente os autores procediam, foi suficiente para os tecidos de animais jovens. Por causa da vantagem no custo do tecido conjuntivo, há um considerável incentivo da sua inclusão como extensor em produtos cominuídos (SADLER; YOUNG,1993).

Os experimentos de Ambrosiadis e Wirth (1984), avaliando os efeitos do tempo de cominuição no cutter e teores de tecido conjuntivo nos produtos emulsionados tipo salsicha frankfurt, salsichão calibre 60mm (semi-conserva, 75°C) e enlatado ¾ de conserva (110°C, $F_0 = 1,2-1,5$) revelaram que um aumento no conteúdo de tecido conjuntivo resultou maior depósito de gelatina e gordura e portanto declínio na capacidade de retenção de água, coloração ligeiramente mais clara com menor valor de a^* (vermelho) e maior valor de L^* (luminosidade), aumento da firmeza instrumental e sensorial, particularmente quando o embutido é ingerido frio. Os autores recomendam uma separação manual ou mecânica cuidadosa entre carne limpa com baixos teores de tecido conjuntivo e carne rica em tecido conjuntivo (aponevrose), devendo-se proceder inicialmente uma cominuição intensa da carne limpa adicionando o gelo. Se o aditivo fosfato não for adicionado, a temperatura final da emulsão de carne magra não deverá exceder 2°C e melhor será se permanecer a 0°C, já quando fosfato é adicionado, não deverá ser superior a 5°C. A carne rica em tecido conjuntivo é então adicionada ao cutter, e por último o tecido gorduroso. A temperatura

final da mistura não deverá ser maior que 10-12°C quando não há adição de fosfato e 15-18°C com adição de fosfato.

Segundo Wiley et al. (1979), as carnes com altos teores de colágeno devem ser limitadas ao máximo de 15% do bloco cárneo, prevenindo a quebra da emulsão e formação de bolsas de gelatina.

Cross et al. (1976) avaliaram o uso dos cortes cárneos acém/coração da paleta (“chuck”) e carne de costela (“short plate”) de carcaças de bovinos de diferentes graus de qualidade, na produção de hambúrgueres de 75g, padronizado para 24% de gordura. Para todos os atributos de aceitabilidade avaliados, os resultados foram satisfatórios com notas maiores ou iguais a 5, numa escala de 9 pontos, quando utilizado os cortes cárneos dos graus “Prime”, “Choice” e “Good”, enquanto que os hambúrgueres preparados com carnes dos graus “Utility” e “Cutter” foram classificados com notas iguais ou menores a 4 para maciez, quantidade de tecido conjuntivo e aceitação global. Diferenças na suculência e sabor não foram significativamente afetadas pela qualidade. Hambúrgueres formulados com acém/paleta foram mais desejáveis na maciez, sabor, teor de tecido conjuntivo e aceitação global que hambúrgueres produzidos com carne de costela. Diferenças na palatabilidade, devido ao grau de qualidade, foram maiores que aquelas devido aos tipos de cortes cárneos. Portanto, os autores concluem que, o tecido conjuntivo foi e é o maior problema associado com a aceitação de carne bovina moída e que a carne da categoria “U.S. Utility” ou de mais baixa qualidade, ou de cortes inferiores, produziam um produto moído que era inaceitavelmente elevado em tecido conjuntivo.

Nos trabalhos de Gillett, Tantikarnjathep e Andrew (1976), o desnervamento de cortes cárneos para uso em salame resultou em redução na formação de bolsas de gelatina e melhora da aparência e textura.

Hauser (1975) apud Board et al.(1978) reportou resultados de corned beef onde o teor de proteína livre de colágeno na proteína total variou de 65 – 90%. Os valores médios para colágeno na proteína total foram 26,7% (s.d. 6,7%, n=39) para os produtos estilo europeu e 17,5% (s.d. 4,6%, n=35) para os produtos sul americanos.

No Brasil, os estudos de Olivo (1995) revelaram que o colágeno participa benéficamente em emulsões cárneas na faixa de 15% a 18% de seu peso em relação à fração protéica ou aproximadamente 2% em relação ao peso total da massa. Acima desse teor, apesar de continuar auxiliando na textura, o colágeno passa a prejudicar a estabilidade da massa, quando em sistemas com alto teor de gordura.

A baixos níveis, o colágeno pode ser vantajoso na estabilização do encolhimento do produto. Mesmo que todos os estudos não sejam concordantes, a adição de colágeno geralmente aumenta a dureza e a suculência de salsichas. Em elevadas proporções, eventualmente causam liberação de gelatina e gordura, difícil descasque, encolhimento na fervura e textura granulosa (WHITING, 1989 apud OLIVO, 1995).

Com relação à qualidade nutricional, Dvorák e Vognarová (1969) mostraram que a proporção de aminoácidos essenciais em diferentes cortes de vitela, bovino e suíno decrescia linearmente quando o logaritmo do teor de hidroxiprolina aumentava.

Bender e Zia, (1976) avaliaram o NPU (Net Protein Utilization) e o teor de hidroxiprolina de 2 cortes de carne bovina com diferentes teores de colágeno. A amostra de músculo onde 23,6% da proteína era colágena apresentou NPU de 69 e a amostra de filé,

que tinha 2,5% de colágeno, revelou NPU de 82. O NPU aumentou respectivamente para 89 e 98 após suplementação com metionina.

O colágeno contém apenas a metade do teor médio de aminoácidos essenciais encontrado em proteínas não colágenas e o aminoácido hidroxiprolina é utilizado para indicar o teor de colágeno porque o mesmo, comumente, não está presente em proteínas não colágenas (SWAN; TORLEY; 1991 apud OLIVO, 1995).

Uma vez que o teste biológico que mede a qualidade protéica pelo valor de PER descrito pela AOAC é demorado e custoso, muitos investigadores têm trabalhado para desenvolver metodologia mais rápida e mais barata para determinar o valor de PER. Segundo Lee et al. (1978), existe uma correlação negativa estatisticamente significativa entre teores de colágeno em carnes, aves e seus produtos e o conteúdo de aminoácidos essenciais de uma proteína ($r^2=-0,99$), bem como, entre o conteúdo de colágeno e os valores de PER ($r^2=-0,98$). Um aumento na taxa específica de colágeno em produtos cárneos reduz o número absoluto de aminoácidos essenciais e desequilibra seu balanço, diminuindo a qualidade do sistema protéico (LEE et al., 1978; ZARKADAS, 1992).

O conteúdo de tecido conjuntivo de carnes pode ser um índice útil para avaliar a sua qualidade protéica. As vantagens do uso da determinação de colágeno para predizer PER de amostras de carne são: (1) não é necessário equipamento sofisticado como um analisador de aminoácidos; (2) é mais simples e mais barato; e (3) pequenos fabricantes podem facilmente proceder a análise nos seus laboratório de controle de qualidade (ZARKADAS et al., 1993).

A influência do tecido conjuntivo na qualidade sensorial (aparência, odor, textura e sabor), nutricional e preço, parece ter sido a base para a introdução de regulamentos

técnicos estabelecendo limites mínimos para proteína cárnea não conjuntiva e limites máximos para proteínas colágenas do tecido conjuntivo em produtos cárneos (BOARD; MONTGOMERY; RUTLEDGE, 1978).

A detecção e a determinação acurada de colágeno é um requerimento essencial para a ciência e tecnologia de carnes que buscam explicar a verdadeira contribuição do tecido conjuntivo para a estrutura e qualidade da carne. O tecnólogo de alimentos também requer técnicas analíticas confiáveis para auxiliar na verificação da uniformidade do produto no processamento, que também esteja de acordo com a legislação vigente quanto a sua composição. Segundo Etherington e Sims (1981), dependendo da natureza da investigação, há vários métodos experimentais para a detecção e quantificação de colágeno.

A identificação e quantificação de colágeno podem ser realizadas através dos métodos: **a) espectrometria de ressonância magnética nuclear** (JOSEFOWICZ; O'NEILL; PROSSER, 1977), **b) técnica ELISA** para a determinação dos vários componentes do tecido conjuntivo incluindo os colágenos tipo I, II, III e IV (ETHERINGTON; SIMS, 1981); **c) métodos histoquímicos** (BENTLER, 1977; HILDEBRANDT et al., 1977; HILDEBRANDT, 1979; SWASDEE et al., 1982; FLINT; FIRTH, 1983; FLINT; PICKERING, 1984; HILDEBRANDT; HIRST, 1985), **d) cromatografia em fase gasosa com detector de massa** (JOHSON, 1988), **e) cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC** (SMITH; JUDGE, 1991); **f) espectroscopia de transmissão no infravermelho próximo – NIT** (BERG; KOLAR, 1991); **g) análise de aminoácidos** (ASHWORTH, 1987; ZARKADAS et al., 1988; NGUYEN; ZARKADAS, 1989; KARATZAS; ZARKADAS, 1988; KHALILI; ZARKADAS, 1988; GRUBER, et al., 1990; ZARKADAS et al., 1992; ZARKADAS et al.,

1995) e **h) determinação colorimétrica** (BERGMAN; LOXLEY, 1963; ARNETH; HAMM, 1971; WYLER, 1972; CROSS; CARPENTER; SMITH, 1973; JONAS; WOOD, 1983; MURRAY; JEREMIAH, 1983; KOLAR, 1990; REIS et al., 1999; FRANÇA; WASZCZYNSKYJ, 2002). Alguns dos métodos citados podem ser tão acurados quanto os colorimétricos, contudo muitos deles necessitam operadores e equipamentos especializados resultando custo elevado, não sendo apropriados para um grande número de amostras (ETHERINGTON; SIMS, 1981).

Na determinação colorimétrica do teor de tecido conjuntivo colagenoso, os produtos cárneos são primeiramente hidrolisados com ácido para liberar a hidroxiprolina da ligação peptídica (HCl 6M a 110° C por 8-24h) em tubos fechados ou sob refluxo com auxílio de condensador. O aminoácido livre é determinado colorimetricamente após oxidação a pirrol com cloramina T, o qual reage especificamente com *p*-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Ehrlich) para alcançar uma coloração avermelhada. O método colorimétrico é o mais utilizado na quantificação do aminoácido hidroxiprolina e colágeno pelos laboratórios de análise de rotina devido a sua precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez (ETHERINGTON; SIMS, 1981).

4. Validação de metodologia analítica

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados ao objetivo pretendido. Há razões científicas e comerciais que justificam a validação de métodos analíticos. Métodos validados e

resultados confiáveis são pré-requisitos para mútuo reconhecimento de certificados de análises de livre comércio.

Validação em análise química é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido para se obter o resultado. É o processo que confere validade a um valor e cujas indicações são aceitas como corretas, se foi analisado de acordo com as seqüências analíticas preestabelecidas. Ter validado um resultado é ter equipamento e seqüência analítica aceitas como corretas (LEITE, 1996).

O analista no seu dia a dia preocupa-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida razoável com respeito a sua exatidão e que possuam uma precisão adequada para a finalidade a que se destinam. Para que esta confiabilidade seja atingida, algumas etapas são necessárias, e estarão incluídas em qualquer bom programa de controle e segurança de qualidade analítica: uso de métodos analíticos validados, confirmação da identidade do composto de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, emprego de amostras de referência e testes de recuperação na rotina de controle de qualidade e participação em testes de proficiência (VALENTE SOARES, 2001).

Ao empregar material de referência certificado, deve-se escolher aqueles cujas matrizes (tudo que o material contém menos o composto de interesse) mais se aproximem do tipo de amostra para o qual o método será usado. Cada laboratório pode criar seus próprios materiais de referência para o controle de qualidade rotineiro, contudo para a validação de métodos emprega-se material de referência certificado, o qual é um material de referência onde teores de uma ou mais propriedades estão certificados por um procedimento tecnicamente válido, acompanhado por um certificado proveniente de um organismo certificador acreditado (VALENTE SOARES, 2001).

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade (ABRANTES, 2003; INMETRO, 2003).

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo. Ambas repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida (INMETRO, 2003). A precisão será maior quanto menor for a amplitude das medidas e maior for a concordância entre os vários valores experimentais obtidos, ou seja, quanto mais próximos estiverem entre si (LEITE, 1996).

Segundo INMETRO (2000) repetitividade de resultados e medições é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição. As condições de repetitividade incluem: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento de medição, utilizado nas mesmas condições; mesmo local; repetição em curto período de tempo. Repetitividade pode ser expressa quantitativamente, em função das características da dispersão dos resultados. Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados

das medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição. As condições podem incluir: princípio de medição; método de medição; observador; instrumento de medição; padrão de referência; local; condições de utilização e tempo. A reprodutibilidade pode ser expressa, quantitativamente, em função das características da dispersão dos resultados.

Baseado em exatidão e precisão surge a expressão erro analítico. Qualquer medida experimental está sujeita a erro, ou seja, haverá sempre uma diferença entre o valor verdadeiro e o valor medido. Considera-se para estudar os erros as classificações: erros sistemáticos e erros indeterminados. Erros sistemáticos são erros que a princípio pode-se “aliviá-lo” nas medidas, ou seja, eliminá-los ou aplicar fatores de correção desde que constantes. Entre os erros sistemáticos mais comuns tem-se: erros instrumentais, erros devido à presença de impurezas, erros de operação, erros pessoais, erros de método. Dos citados, os erros de método são os mais graves, pois não pode ser eliminado por um bom operador ou um bom equipamento, pois o erro está na química aplicada para a obtenção do resultado. Erros indeterminados são erros devido a variações ao acaso, de causas não conhecidas exatamente, em geral irregulares e de difícil controle do operador como umidade, temperatura, iluminação, pureza dos reagentes, etc (LEITE, 1996).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2003).

A seletividade analítica representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em estudo em misturas complexas, sem a interferência de outros componentes da mistura. A não seletividade é a interferência por outra substância, que não seja o analito de interesse, na medição pelo detector (ABRANTES, 2003).

A robustez é a capacidade de um método de ensaio de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros (ABRANTES, 2003). Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações (pH, tempo, temperatura, tamanho da amostra, agitação) que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

O processo de validação exige, além do conhecimento da exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, também a determinação do alcance em termos de matrizes diferentes, sobre as quais o método pode ser aplicado na determinação de um mesmo analito. Deve ser efetuado um estudo sobre diferentes matrizes para se estabelecer o alcance do método, no que diz respeito à sua versatilidade na dosagem do analito. Em geral o método é submetido a um teste completo com uma única matriz, e os resultados obtidos serão, então, comparados com os de diversas matrizes, que foram submetidas a testes em estudos de validação simplificados.

O laboratório, ao utilizar métodos analíticos validados, cumpriu apenas uma etapa no seu controle de qualidade interno. Além de métodos confiáveis, terá que demonstrar que em seu dia-a-dia produz resultados confiáveis. Isto é conseguido com a inclusão de materiais de referência (doméstico), execução de análises em duplicata no trabalho de rotina e a participação em estudos colaborativos para teste de proficiência do laboratório (VALENTE SOARES, 2001).

5. Legislação

5.1 Proteínas de soja

Segundo a Resolução nº14/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (BRASIL, 1978b) em vigor até a presente data, também transcrita pela NTA 36 das Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (SÃO PAULO, 1978), estabeleceu-se os padrões de identidade e qualidade relativos aos teores mínimos de proteínas ($N \times 6,25$) para a farinha desengordurada de soja no valor de 50%, proteína texturizada de soja 50,0% (base seca), proteína concentrada de soja 68,0% (base seca) e proteína isolada de soja 88,0% (base seca).

Pela Portaria nº115/78 (BRASIL, 1978a) ficou autorizado o uso de proteína texturizada de soja em produtos cárneos no teor máximo de 7,5% em base seca ou 22,5% em base hidratada, calculado sobre o total da massa no produto final. Ficaram excluídos desta permissão presuntos cozidos, salame, lingüiça calabresa, lingüiça toscana e “corned beef”. O emprego simultâneo de proteína de soja e matérias primas animais constituídas de órgãos e outros tecidos (estômagos, emulsão de pele, etc) não devendo exceder 22,5% do total da massa do produto final. Ficaram estabelecidos para o produto final, os percentuais máximos de órgãos e outros tecidos de 10% e mínimo de carne de 55%. Sempre que a proteína texturizada de soja excedesse a fórmula do produto cárneo a 3,5% na base seca ou 10,5% na base hidratada exigia-se a declaração do percentual na rotulagem.

A Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2000a) em vigor até a presente data, estabeleceu o limite de 4% de adição de proteínas não cárneas (vegetal ou animal), como proteína agregada nos produtos cárneos como mortadelas e salsichas (exceto mortadelas bologna e italiana e salsichas frankfurt e viena onde permite-se somente a adição das proteínas lácteas). Também ficou autorizado o uso de 2,5% de proteínas não cárneas nas lingüiças frescas, cozidas ou dessecadas, excetuando a adição nas lingüiças calabresa, portuguesa, blumenau e colonial. Pela Instrução Normativa nº 20 (BRASIL, 2000b) ficou autorizado a adição de proteínas não cárneas nos teores máximos de 4% para os produtos cárneos tipo almôndega, hambúrguer e kibe, 2,5% para apresuntado e fiambre, 2% para presunto cozido e outros presuntos, 1% para presunto tenro e, quando se tratar de presunto cozido superior, é proibida a utilização de qualquer proteína que não aquela proveniente da massa muscular do pernil, exceto o caseinato de sódio no limite máximo de 1%. Ficaram estabelecidos pela Instrução Normativa nº 21 (BRASIL, 2000c) os limites de 3% para o patê e 2% para o bacon, barriga defumada e produtos de lombo (cozido, temperado, curado e dessecado e tipo canadense). Segundo a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2000d), não podem ser acrescidos de proteína vegetal tipo soja os produtos crus como copa, jerked beef, presunto cru, presunto tipo Parma, lingüiça colonial, pepperoni e todas as variedades de salames (BRASIL, 2000d).

Segundo a Portaria nº15 (BRASIL, 2000e) ficaram suspensas as autorizações de uso de Proteína de Soja nas formas “isolada” e “concentrada” e misturas de proteínas e outros ingredientes com a mesma finalidade isolada ou em conjunto, nas “carcaças” e “cortes” de animais de açougue de carnes comercializadas na forma “in natura”. O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) deve elaborar estudos para a fixação de

critérios e procedimentos relativos ao uso de “Proteínas de Soja” em produtos de origem animal industrializado.

Está aprovado pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar dos Estados Unidos o uso dos extensores como a proteína isolada de soja no teor máximo de 2%, a farinha de soja 3,5%, a proteína de soja concentrada 3,5%, devendo estar relacionado na lista de ingredientes na rotulagem do alimento, pelo seu nome comum (ESTADOS UNIDOS, 2001a).

Isolados protéicos de soja texturizados ou não podem ser utilizados nos produtos cárneos argentinos como ligantes ou extensores até um máximo de 2% do peso do produto terminado. Esta adição deve constar qualitativamente e quantitativamente na lista de ingredientes declaradas no rótulo, com caracteres de bom tamanho, realce e visibilidade. Permite-se a adição de soja texturizada como extensor, até o máximo de 10% em base seca no produto terminado, devendo essa adição ser declarada na denominação do produto (por exemplo, salsicha com soja, hambúrguer com soja) com caracteres de tamanho igual, e sua porcentagem na lista de ingredientes, com caracteres de bom tamanho, realce e visibilidade. Exceção desta autorização aos presuntos, paletas, “bondiola” e lombo de porco (ARGENTINA, 1969).

Não há padrões de legislação para uso de proteínas de soja em produtos cárneos na Comunidade Européia (somente os aditivos foram harmonizados). Desde 29 de janeiro de 1998 está permitido o uso de ingredientes de soja na Alemanha, sem limite de adição, para todos os produtos cárneos, desde que rotulados com os dizeres “com proteína de soja” (ALEMANHA, 1998).

5.2 Tecido conjuntivo, gordura e água

De acordo com o Artigo nº879 do RIISPOA (BRASIL, 1997), segundo o tipo de embutido e suas peculiaridades, podem entrar em sua composição tendões e cartilagens.

As Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (SÃO PAULO, 1978) estabelecem segundo a NTA 3 para carne bovina moída a ausência de cartilagens, de ossos e os teores máximos de 3% de aponevrose e 10% de gordura.

De acordo com a Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2000a), os embutidos dos tipos salsicha e mortadela podem ser acrescidos de miúdos e vísceras comestíveis, pele e tendões na proporção de 10%, exceto para mortadela bologna, mortadela italiana, salsicha viena e salsicha frankfurt. Os miúdos comestíveis de carne de aves (fígado, moela e coração) podem ser adicionados na proporção de 5% em mortadela de carne de ave e 10% em salsicha de carne de ave (BRASIL, 2000a).

Segundo a Instrução Normativa nº83 (BRASIL, 2003) que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída de Bovino, entende-se por carne moída o produto obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos (aplica-se também ao produto obtido da carne de búfalos), seguidos de imediato resfriamento ou congelamento, com teor máximo de 15% de gordura. A matéria-prima a ser utilizada deverá estar isenta de tecidos inferiores como ossos, cartilagens, gordura parcial, aponevroses, tendões, coágulos, nodos linfáticos etc. A água no teor máximo de 3% consta como ingrediente opcional. Permite-se a utilização de carne industrial de matança, desde que as mesmas sejam previamente lavadas, escorridas, e submetidas a processo de resfriamento ou congelamento.

Segundo a Directiva 2000/13/EC (COMUNIDADE EUROPEIA, 2000), ficou estabelecido o conteúdo máximo de gordura para os ingredientes designados pelo termo “carne ... (nome da espécie animal)” não devendo exceder 15% para a carne de aves e coelhos, 30% para carne de suínos e 25% para carne de outros mamíferos. O conteúdo de tecido conjuntivo que é calculado com base na relação entre o teor de colágeno (hidroxiprolina x 8) e o teor de proteína cárnea, não deve exceder 10% para as carnes de aves e coelhos, 25% para a carne suína e outros mamíferos. Se os limites máximos são excedidos, mas todos os outros critérios para a definição de carne são satisfeitos, o conteúdo de carne deve ser adequado e a lista de ingredientes deve mencionar, em adição ao termo “carne ...”, a presença de gordura e ou tecido conjuntivo. Os produtos englobados pela definição de “carne mecanicamente separada” estão excluídos do escopo desta definição (difere significativamente da “carne” como percebida pelos consumidores).

Para o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (Food Safety and Inspection Service) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a grande diferença entre carne moída e hambúrguer é que a gordura poder ser adicionada ao segundo. É aceito o teor máximo de 30% de gordura para ambos. Os produtos podem conter condimentos, mas não devendo ser acrescidos de água, fosfatos, aglutinantes, substâncias ligadoras ou extensoras. Quando a carne de bochecha é utilizada na preparação de carne moída, a quantidade deve ser limitada a 25%, quando em excesso, a presença deve ser declarada no rótulo, na lista de ingredientes (ESTADOS UNIDOS, 2001b).

Nos Estados Unidos, os produtos cárneos dos tipos “frankfurter, hotdog, weiner, vienna, bologna, knockwurst” e embutidos cozidos similares são produtos cominuídos semi-sólidos preparados de um ou mais tipos de carne de músculos esqueléticos,

condimentados, curados, defumados ou não. Os produtos terminados não podem conter mais que 30% de gordura. Gelo ou água, ou ambos, podem ser utilizados, mas o produto deverá conter no máximo 40% da combinação de gordura e água. Os embutidos desta categoria rotulados junto ao nome do produto “com subprodutos” consistem de não menos que 15% de um ou mais tipos de carne de músculo esquelético cru com subprodutos cárneos crus (ESTADOS UNIDOS, 2001b).

A legislação da Austrália e Nova Zelândia (2001) estabelece que a carne moída deve constituir de 100% de carne e nenhum aditivo está permitido, podendo conter quantidades significativas de gordura. Não é necessária a declaração do teor de gordura da carne moída embalada ou não embalada, se não é feita alguma referência ao teor de gordura. No entanto, o uso da terminologia “magra” ou “limpa” traduz a necessidade da declaração do teor de gordura. A carne é liberada das informações de rotulagem nutricional se embalada na presença do consumidor. No entanto, se houver um chamamento nutricional para alguma carne, incluindo a carne moída, uma informação nutricional completa será requerida. Esta informação deve constar no rótulo da carne embalada, ou no caso de carne não embalada deverá ser exibida sobre ou em conexão à exposição do alimento; ou provida ao consumidor quando solicitada.

A legislação da Austrália e Nova Zelândia (2001) considera também que adultos e crianças consomem quantidades significativas de produtos cárneos processados (incluindo embutidos), freqüentemente utilizando-os como substitutos para a carne muscular. Por esta razão, é importante manter o perfil nutricional destes produtos. Por isto, a legislação requer que embutidos devam conter pelo menos 50% de carne muscular livre de gordura e um teor máximo de gordura de 50% do conteúdo da carne muscular livre de gordura. Por exemplo,

se o embutido é produzido com 600 g de carne muscular livre de gordura por Kg do embutido final, está permitido acrescentar até 300 g por Kg de gordura no embutido final. Não há restrições específicas sobre o uso de subprodutos como parte do conteúdo de carne de embutidos, uma vez que a presença destes ingredientes esteja claramente declarada na rotulagem ou pelo nome de classe ou nome específico (caso do cérebro, coração, rim, fígado, língua e bucho) ou somente pelo nome específico do subproduto (caso do sangue, pâncreas, baço e timo que não são permitidos a menos que rotulados pelo nome). Quando o produto não necessita rotulagem, ou se o produto é vendido não embalado, há o requerimento de que a presença do subproduto seja declarada ao consumidor.

O teor mínimo de carne (todas as partes da carcaça, incluindo os subprodutos e gordura) na categoria das carnes processadas é de 30%. Exemplos de carnes processadas contendo entre 30% e 66% de carne inclui alguns embutidos, salsicha Frankfurt, algumas pastas cárneas e patês, enquanto que os presuntos são exemplos de carnes processadas com teor de carne maior que 66% (podendo também incluir algumas pastas, patês e embutidos). Produtos contendo menos que 300g/Kg de carne, isto é hambúrgueres ou bolos de carne, não são proibidos, eles são considerados alimentos mistos e devem seguir o padrão geral de alimentos (AUSTRÁLIA; NOVA ZELÂNDIA, 2001).

Desde de 1975, até a presente data, a Alemanha apresenta legislação para embutidos cárneos crus e emulsionados cozidos quanto aos teores máximos de proteína do tecido conjuntivo – BE (Bindegewebsprotein) e teores mínimos de proteína cárnea livre de proteína do tecido conjuntivo – BEFFE (Bindegewebsproteinfreies Fleischprotein), esta última obtida indiretamente pela determinação da proteína total subtraído a proteína do

tecido conjuntivo (teor de hidroxiprolina multiplicado pelo fator 8) e proteínas estranhas e/ou vegetais. As *Tabelas 1 e 2* relacionam porcentagens mínimas de BEFFE (valores absoluto e relativo) e porcentagens máximas de BE (valor relativo) para embutidos crus, produtos emulsionados cozidos e produtos de carne moída (ALEMANHA, 1975; ALEMANHA, 2003). Os produtos denominados “simples” (“einfach”), mediante declaração, podem ser adicionados de componentes cárneos ricos em tecido conjuntivo (carne de cabeça, couro, músculo etc.), revelando produtos com elevados valores relativos de BE (35-40%) e baixos valores absolutos de BEFFE (6,0-10,0%). Os produtos especiais com pedaços de carne inseridos na massa ou designados como “**Ia**”, apresentam baixos valores relativos de BE (12-15%) e uma maior porcentagem de BEFFE absoluto (12-14,5%). Portanto, na Alemanha, a própria designação do nome do produto ou a inserção das especificações “Ia” (especial) ou “einfach” (simples) juntamente com o nome, estabelecem a qualidade relativa do mesmo, segundo o teor de carne ou tecido conjuntivo, possibilitando a escolha pela aquisição de um produto de maior ou menor preço.

Tabela 1. Legislação da Alemanha para produtos cárneos crus e cozidos

Produto cárneo	BEFFE absoluto ¹ mínimo (%)	BEFFE relativo ² mínimo (%)	BE relativo ³ máximo (%)
Embutido cru firme ao corte			
Salami ungarischer Art	14	85	15

Italianische Salami, Salami Italienischer Art	14,5	85	15
Schinkenplockwurst, Rohe Schinkenwurst	13,5	85	15
Salami Ia , Salami fein	14	85	15
Salami, Katenrauchwurst, Mettwurst, Salametti	11,5/12 ⁴	80	20
Schlackwurst	12/12,5 ⁵	85	15
Cervelatwurst Ia , Cervelatwurst fein	12	85	15
Cervelatwurst	11/11,5 ⁶	80	20
Schinkenmettwurst	12,5	80	20
Westfälische grobe Mettwurst	12	75	25
Aalrauchmettwurst	10	75	25
Plockwurst	11	75	25
Plockwurst einfach	10	65	35
Rohe Knoblauchwurst, Rohe Krakauer, Touristenwurst, Mettwurst in Enden, Räucherenden, Colbassa	10	75	25
Knoblauchwurst einfach , Touristenwurst einfach , Räucherenden einfach , Mettwurst in Enden einfach	9	65	35
Polnische, Berliner Knacker, Bauernbratwurst, Geräucherte Bratwurst, Debrecziner, roh, Rote Wurst, Dürre Runde, Thüringer Knackwurst, ...	12	75	25
Landjäger, Peperoni, Kaminwürzen, Bauernschübling, Rauchpeitschen	10	65	35
Embutido cru pastoso			
Teewurst, Teewurst Rügenwalder Art, Grobe Teewurst, Mettwurst Ia , Streichmettwurst Ia , Rindwurst, Hofer Rindfleischwurst.	10/11 ⁷	85	15
Mettwurst, Streichmettwurst, Braunschweiger Mettwurst, Braunschweiger, ...	7,5	75	25
Grobe mettwurst, Zwiebelwurst, Zwiebelmettwurst, Frühstückswurst, ...	8,5	75	25
Schmierwurst, fette Mettwurst	6,5	70	30
Mettwurst einfach , Streichmettwurst einfach	7	70	30
Embutido tipo emulsão cozido (fino calibre)			
Würstchen nach Frankfurter Art, Schinkenwürstchen	8/9 ⁸	75	25
Wiener, Bockwurst, Würstchen, Saftwürstchen, Cocktailwürstchen, Halberstädter würstchen, Dünne, Münchner Dampfwurst, Saitenwürstchen, Bouillonwürstchen, Fleischwürstchen, Jauersche, Knobländer	8	75	25
Pfälzer, Augsburger, Regensburger, Debrecziner, Jagdwurstchen, Brühpolnische, Bauerwürstchen, Krainer, Schützenwurst, ...	8	75	25
Dicke, Knackwurst, Rote, Servela, Klöpfer, Knacker, Rindswurst, Schüblinge	7,5	75	25
Knacker einfach , Schüblinge einfach , Servela einfach , Klöpfer einfach	6,5	60	40
Kalbsbratwurst, Weißwurst	7,5	80	20
Wollwurst, Geschwollene	6,5	80	20
Münchner weißwurst	6,5	70	30
Stockwurst, Weißwurst einfach , Rindsbratwurst, Lungenwurst, Berliner Dampfwurst, Kümmelwurst	6	65	35
Grobe Bratwurst, Schweinsbratwürstchen, Schweinswürstchen, Fränkische Bratwurst, Pfälzer Bratwurst, Hessische Bratwurst, Rostbratwurst, Nürnberger Rostbratwurst, Treuchtlinger, Rheinische Bratwurst, ...	8,5	75	25
Bratwurst, Rheinische Bratwurst, Schlesische Bratwurst, Rostbratwurst	8	75	25

Fonte: ALEMANHA (2003)

¹BEFFE = proteína cárnea livre de proteína do tecido conjuntivo BEFFE abs (%) = Proteína cárnea (%) – BE (%)

²BEFFE rel. (%) = [BEFFE (%) / proteína cárnea (%)] x 100 ³BE = proteína do tecido conjuntivo BE rel. (%) =

[proteína do tecido conjuntivo (%) / proteína total (%)] x 100 ⁴Calibre < 70mm: BEFFE min. 12%, calibre >70mm: BEFFE

min. 11,5% ⁵Calibre < 70mm: BEFFE min. 12,5%, calibre >70mm: BEFFE min. 12% ⁶Calibre < 70mm: BEFFE min. 11,5%,

calibre >70mm: BEFFE min. 11% ⁷Produto finamente cominuído: BEFFE min. 10%, produto com porção cánea cominuída:

BEFFE min. 11% ⁸Produto semi-manufaturado conservado cru: BEFFE min. 9%, produto escaldado: BEFFE min. 8%

Tabela 2. Legislação da Alemanha para produtos cárneos cozidos

Produto cárneo	BEFFE absoluto ¹ mínimo (%)	BEFFE relativo ² mínimo (%)	BE relativo ³ máximo (%)
Embutido tipo emulsão finamente cominuído cozido			
Lyoner, Schinkenwurst, Norddeutsche Mortadella, Pariser Fleischwurst,	8	75	25

Rheinische Fleischwurst, Frankfurter Fleischwurst, Kalbfleischwurst, Kalbfleischkäse, Breslauer, Sardellenwurst			
Fleischwurst, Stadtwurst, Fleischkäse, Leberkäse, Leberrolle, Knoblauchwurst	7,5	75	25
Fleischwurst einfach , Stadtwurst einfach , Fleischkäse einfach	6,5	65	35
Mosaikpastete, Schachbrettpastete und andere Brühwurstpasteten und rouladen ohne grobe Fleischeinlagen sowie feingekutterte Grundmasse für Brühwurstpasteten und rouladen mit groben Fleischeinlagen (z.B. Zungenpastete, Filetpastete)	8,5	82	18
Fleischsalatgrundlage	7	70	30
Gelbwurst, Kalbskäse, Weißer Fleischkäse	7,5	80	20
Weißer im Ring, Weißer Lyoner	7	80	20
Embutido tipo emulsão cozido (cárnea moída adicionada à massa)			
Bierwurst Ia, Bayerische Bierwurst, Göttinger Blasenwurst, Kochsalami, Tiroler, Krakauer, Jagdwurst (süddeutsche Art), Celler, Gekochte Ia, ...	9,5	80	20
Jagdwurst norddeutsche Art, Grobe Schinkenwurst, Gefüllte Schweinsbrust, Gefüllter Schweinsfuß, Gefüllter Schweinskopf, Grobe Lyoner, Stuttgarter, Bierwurst, Hildesheimer, Grobe Stadtwurst, Nürnberg Stadtwurst, Frühstücksfleisch, Schweinskäse, Stuttgarter Leberkäse	8	80	20
Gröber Leberkäse, Grober Fleischkäse, Roter Fleischkäse, Grobe Fleischwurst	8	75	25
Gebrühte Knoblauchwurst, Gebrühte Krakauer, Cabanossi, Touristenwurst	8	70	30
Gebrühte Touristenwurst einfach, Gebrühte Krakauer einfach	6,5	65	35
Schweinskopfwurst	8	65	35
Weißer Schweinskäse, Weißer grobe Lyoner	8	80	20
Embutido tipo emulsão cozido com pedaços de carne na massa			
Beirschinken, Schinkenpastete, Rinder-Bierschinken, Geflügel-Bierschinken	13	88	12
Filetpastete, Imitierte Wildschweinpastete und andere Brühwurstpasteten und rouladen mit bindegewebsarmen Fleischeinlagen	9	82	12
Preßkopf, Eisbeinpastete und andere Brühwurstpasteten und -rouladen mit deklarierten bindegewebsreichen Fleischeinlagen, Ansbacher, Saure-Rolle	7,5	65	35
Süddeutsche Mortadella, Zungenwurst, Zungenpastete, Zungenroulade, Herzwurst	8	80	20
Italienische Mortadella, Mortadella italienischer Art	9	80/70 ⁹	20/30 ⁹
Zigeunerwurst, Paprikaspeckwurst	12	75	25
Milzwurst	8	80	20
Produto de carne moída ou semelhante cominuído			
Hambúrguer, Beefburger	13,5	75	25
Schabefleisch, Beefsteakhack, Tatar	18	90	10
Hacksteak	12	80	20
Deutsches Beefsteak, Hackbeefsteak	14	85	15

Fonte: ALEMANHA (2003)

¹BEFFE = proteína cárnea livre de proteína do tecido conjuntivo

²BEFFE rel. (%) = [BEFFE (%) / proteína cárnea (%)] x 100

[proteína do tecido conjuntivo (%) / proteína total (%)] x 100

80%, produto com miúdos: BEFFE na prot. cárnea min. 70%

BEFFE abs (%) = Proteína cárnea (%) – BE (%)

³BE = proteína do tecido conjuntivo BE rel. (%) =

⁹Produto sem os miúdos: BEFFE na prot.cárnea min.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, S. A.; ESMAIL, S. A.; HUSSEIN, L.; JANSSEN, F. Chemical composition and levels of non-meat proteins in meat brands extended with soy protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 389-395, 1997.

ABRANTES, S. M. P. **Curso de validação de metodologia na área química**. In: V Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2003.

AGATER, I. B.; BRIANT, K. J.; LLEWELLYN, J. W.; SAWYER, R.; BAILEY, F. J.; HITCHCOCK, H. S. The determination of soya and meat protein in raw and processed meat products by specific peptide analysis. An evaluation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 37, n. 3, p. 317-331, 1986.

ALEMANHA. Fleisch-Verordnung. **Bundesgesetzblatt I**, S.230, vom 29 januar 1998.

ALEMANHA. Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse. **Bundesanzeiger** Nr. 134, vom 26 juli 1975.

ALEMANHA. Leitsätze für Fleisch und Fleischzeugnisse. **Bundesanzeiger** Nr.199, vom 24.10.2001, 66p.

ALEMANHA. Leitsätze 2003. Verkersbezeichnung, Qualität und Zusammensetzung. **Deutsches Lebensmittel buch**. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. 404p.

AMBROSIADIS, I. Frankfurter-type sausages. The effect of textured soya protein on their technological and sensory properties. **Fleischwirtschaft**, v. 74, n. 4, p. 401-403, 1994.

AMBROSIADIS, I; WIRTH, F. Comminution of connective tissue and temperature pattern in the manufacture of frankfurter-type sausages. **Fleischwirtschaft**, v. 64, n. 8, p. 945-950, 1984.

ARGENTINA. Lei 18.284, de 18/06/1969. Código Alimentário Argentino. Capitulo VI, Ministerio de Salud y Acción Social. 1969. Disponível em: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0-3/normativa/normas_01.htm . Acesso em: 11/10/2003)

ARMSTRONG, D. J.; RICHERT, S. H.; RIEMANN, S. M. The determination of isolated soybean protein in raw and pasteurized meat products. **J. Fd Technol.**, v. 17, p.327-337, 1982.

ARNETH, W.; HAMM, R. Untersuchungen zur methodik der hydroxyprolinbestimmung in fleisch und fleischwaren. **Die Fleischwirtschaft**, v. 51, n. 10, p. 1523-1526, 1971.

ASHWORTH, R. B. Amino acid analysis for meat protein evaluation. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, n. 1, p. 80-85, 1987.

AUSTRALIA NOVA ZELÂNDIA. **Food Standards**. User guide to Standard 2.2.1 – Meat and Meat Products. July 2001. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/mediareleasespublications/factsheets/industryfactsheetsfsc/meateggsandfish> Acesso em: 23 jun. 2003.

BAILEY, F. J. A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis. **J. Sci. Fd Agric.**, v. 27, n. 9, p. 827-830, 1976.

BAYLEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. England : Elsevier Science Publishers, 1989. 355p.

BENDER, A. E.; HUSAINI. Nutritive value of proteins in a canned meat products. **J. Fd Technol.**, v. 11, n. 5, 499-503, 1976.

BENTLER, W. Kasseler kochwurst: eine nordhessische brühwurstspezialität und die leitsätze für fleisch und fleischerzeugnisse. **Die Fleischwirtschaft**, v. 57, n. 12, p. 2178-2183, 1977.

BERG, H; KOLAR, K. Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the infratec food and feed analyzer. **Fleischwirtschaft**, v. 71, n. 7, p. 787-789, 1991.

BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Anal. Chem**, v. 35, n. 12, p. 1961-1963, 1963.

BERGERON, M.; DURAND, P. Identification histologique des differentes formes de soja dans les produits carnés. **Ann. Nutr. Alim.**, v. 31, n. 2, p. 261-70, 1977.

BERKOWITZ, D. B.; WEBERT, D. W. Determination of soy in meat. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, n. 1, p. 80-85, 1987.

BOARD, P. W.; MONTGOMERY, W.; RUTLEDGE, P. J. Collagen content of some Australian Canned Meats. **J Sci. Fd Agric.** v. 29, n. 6, p. 569-573.

BRASIL. Decreto nº 30.691, 29 mar 1952 alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25 jun 1962, nº 1.236 de 02 set 1994, nº 1.812 de 08 fev 1996 e nº 2.244 de 04 jun 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/riispoa.htm> Acesso em: 27 out. 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº4, 31 mar 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 abr. 2000a. Seção 1, p.6-10.

BRASIL. Instrução Normativa nº20, 31 jul 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de

Presunto cozido. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, nº149, 03 ago. 2000b. Seção 1, p.7-12.

BRASIL. Instrução Normativa nº21, 31 jul 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Patê, de Bacon ou Barriga Defumada e de Lombo Suíno. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, nº149, 03 ago. 2000c. Seção 1, p.12-15.

BRASIL. Instrução Normativa nº22, 31 jul 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colônia e Pepperoni.. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, nº149, 03 ago. 2000d. Seção 1, p.15-28.

BRASIL. Instrução Normativa nº 83, 21 de nov. 2003. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (Corned Beef) e Carne Moída de Bovino. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 03 dez 2003. Seção I, p.13. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/> Acesso em: 9 dez. 2003.

BRASIL. Portaria nº 15, 26 de abr 2000. Ficam suspensas nas “Autorizações de Uso de Produto” – AUP – emitidas pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, a utilização de Proteína de Soja nas formas “Isolada” e “Concentrada” e misturas de proteínas de proteínas e outros ingredientes com a mesma finalidade isolados ou em conjunto, nas “carcaças” e “cortes” de animais de açougue de carnes, comercializadas na forma “in natura”. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 28 abr. 2000e. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/portaria15.htm> Acesso em: 30 ago. 2002.

BRASIL. Portaria nº 33, 17 de jul 2002. Submeter a consulta pública o Projeto de Instrução Normativa e seus anexos que tratam dos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (Corned Beef) e Carne Moída de Bovino. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 26 jul 2002. Seção I, p.53-55. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/portaria33.htm> Acesso em: 11 nov. 2002.

BRASIL. Portaria nº 115/78. Dispõe sobre a permissão do emprego de proteína texturizada de soja em produtos cárneos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1º ago. 1978a. Seção 1, Parte 1, p.12020-12021.

BRASIL. Resolução CNNPA nº14/78. Padrão de Identidade e Qualidade para Farinha Desengordurada de Soja, Proteína Texturizada de Soja, Proteína Concentrada de Soja, Proteína Isolada de Soja e Extrato de Soja. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 28 jun. 1978b. Seção I, Parte I, p.9896-9900.

BRAUNER-GLAESNER, G.; RISTOW, R. Fleischfremde proteine. Ergebnisse von ringversuchen zur prüfung von nachweismethoden in fleischerzeugnissen. **Fleischwirtschaft**, v. 70, n. 7, p. 824-830, 1990.

BREHMER, H.; SCHLEICHER, S.; BOROWSKI, U. Nachweis von sojaprotein, erbsenprotein und gluten in brühwurstherzeugnissen mittels ELISA. **Fleischwirtschaft**, v. 79, n.8, p. 74-78, 1999.

BROOKS, J. R.; MORR, C. V. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. **JAOCs**, v. 62, n. 9, p. 1347-1354, 1985.

CASSENS, R. G.; TERREL, R. N.; COUCH, C. The effect of textured soy flour particles on the microscopic morphology of frankfurters. **J. Food Sci.**, v. 40, n. 5, p. 1097-8, 1975.

CASTELANOS MOLINA, R. **Contribuição ao estudo de substituição parcial de carne por proteína texturizada de soja na elaboração de "Hamburguer"**. Campinas, 1977. 78p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CHIN, K. B.; KEETON, J. T.; LONGNECKER, M. T.; LAMKEY, J. W. Utilization of soy protein isolate and konjac blends in a low-fat bologna (model system). **Meat Science**, v. 53, p. 45-57, 1999.

COMUNIDADE EUROPEIA. Directiva 94/65/CE, de 14 de Dezembro de 1994. Institui os requisitos de produção e de colocação no mercado de carnes picadas e de preparados de carnes. **Conselho da União Européia**. Jornal Oficial nº L 368 de 31/12/1994 p. 0010 - 0031. Disponível em: <http://europa.eu.int/eur-lex/>. Acesso em: 22 out. 2003.

COMUNIDADE EUROPEIA. Directiva 2000/13/CE, de 20 de Março de 2000. Relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. **Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial nº L 109 de 06/05/2000 p. 0029 - 0042. Disponível em: <http://europa.eu.int/eur-lex/>. Acesso em: 06 ago. 2003.

COOMARASWAMY, M.; FLINT, F. O. The histochemical detection of soya "novel proteins" in comminuted meat products. **Analyst**, v. 98, n. 1168, p. 542-5, 1973

CREEDON, G. A.; KERRY, J. F.; DAY, J. A.; BUCKLEY, D. J. Optimization of added non-meat proteins in the manufacture of preformed emulsions using response surface methodology. . In 44th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 1998. **Proceedings**...Barcelona, 1998. p. 418-419.

CRIMES, A. A.; HITCHCOCK, C. H. S.; WOOD, R. Determination of soya protein in meat products by an enzyme-linked immunosorbent assay procedure: collaborative study. **J. Assoc. Publ. Analysts**, v.22, p. 59-78, 1984.

CROSS, H. R.; CARPENTER, Z. L.; SMITH, G. C. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. **J. of Food Science**, v. 38, n. 6, 1973.

CROSS, H. R.; GREEN, E. C.; STANFIELD, M. S.; FRANKS JR, W. J. Effect of quality grade and cut formulation on the palatability of ground beef patties. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 1, p. 9-11, 1976.

DESHPANDE, S. S. Immunodiagnosics in agricultural, food, and environmental quality control. **Food Technology**, v. 48, n. 6, p.136-141, 1994.

EILERT, S. J.; BLACKMER, D. S.; MANDIGO, R. W.; CALKINS, C. R. Meat batters manufactured with modified beef connective tissue. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 691-696, 1993.

EL, S. N. Evaluating protein quality of meats using collagen content. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 209-210.

ELDRIDGE, A. C. Determination of soya protein in processed foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 483-485, 1981.

ELDRIDGE, A. C.; HOLMES, L. G. Evaluation of a fluorometric technique for quantitative determination of soy flour in meat-soy blends. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 3, p. 763-764, 1979.

ESTADOS UNIDOS. Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture. **Code of Federal Regulations**. Food Ingredients and Sources of Radiation. Revised as of January 1, 2001a. From the U.S. Government Printing Office via GPO Access. CITE: 9CFR424.21. Page 627-649. Disponível em: <http://www.acess.gpo.gov/nara/cfr/index.html>. Acesso em: 21 jun. 2002.

ESTADOS UNIDOS. Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture. **Code of Federal Regulations**. Definitions and Standards of Identity or Composition. Revised as of January 1, 2001b. From the U.S. Government Printing Office via GPO Access. CITE: 9CFR319Page 294-312. Disponível em: <http://www.acess.gpo.gov/nara/cfr/index.html>. Acesso em: 21 jun. 2002.

ETHERINGTON, D. J.; SIMS, T. J. Detection and estimation of collagen. **J. Sci. Food Agric.**, v. 32, n. 6, p.539-546, 1981.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998. 652p.

FARFÁN, J. A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. 2. ed. (Série Manuais) Campinas: Ed. da UNICAMP, 1994. 134p.

FLINT, F. O.; FIRTH, B. M. Histochemical demonstration of collagen in comminuted meat products. **Analyst**, v. 108, n. 6, 757-759, 1983.

FLINT, F. O.; MEECH, M. V. Quantitative determination of texturised soya protein by a stereological technique. **Analyst**, v. 103, n. 1224, p. 252-258, 1978.

FRANÇA, J. M.; WASZCZYNSKYJ, N. Teor de hidroxiprolina em peles de frango submetidas à tratamento térmico. **B. CEPPA**, v. 20, n.1, p.19-28, 2002.

GAZZAZ, S. S.; RASCO, B. A.; DONG, F. M. Application of immunochemical assays to food analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 197-229, 1992.

GERMAN, B.; DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 30, n. 5, p. 807-811, 1982.

GILLET, T. A.; TANTIKARNJATHEP, K.; ANDREW, S. J. Mechanically desinewed meat: its yield, composition and effect on palatability of cooked salami. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 4, p.766-769, 1976.

GOLTRY, S. J.; STRINGER, W. C.; BALDWIN, R. E. Sensory evaluation of pork sausage containing textured vegetable protein. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 4, p. 973-974, 1976.

GRIFFITHS, N. M., BILLINGTON, M. J.; CRIMES, A. A; HITCHCOCK, C. H. S. An assessment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of soya protein in meat products. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 35, n. 11, p. 1255-1260, 1984

GRIFFITHS, N. M., BILLINGTON, M. J.; GRIFFITHS, W. A review of three modern techniques available for the determination of soya protein in meat products. **Journal of the Association of Public Analysts**, v. 19, n. 4, p. 113-119, 1981.

GRUBER, H. A.; KRONICK, P. L.; BUECHLER, P. R.; HANNIGAN, M. V. Determination of connective-tissue components in beef using simultaneous equations based on amino-acid analyses. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1506-1509, 1990.

HAMMOND, J. C.; COHEN, I. C.; EVERARD, J.; FLAHERTY, B. A critical assessment of Ouchterlony's immunodiffusion technique as a screening test for soya protein in meat products. **J. Assoc. Publ. Analysts**, v. 14, n. 4, p. 119-126, 1976.

HECKMANN, T.; NEUMANN, B.; TSCHIRDEWAHN, B. Sojaprotein – Nachweis in Rohwurst und Brühwurst. **Fleischwirtschaft**, v. 72, n. 10, p. 1426-1427, 1992.

HEDRICK, H. B.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; JUDGE, M. D.; MERKEL, R. A. Principles of Meat Science. 3.ed. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Co., 1994. p.157.

HELEN, A. G.; KRONICK, P. L.; BUECHLER, P. R.; HANNIGAN, M. V. Determination of connective-tissue components in beef using simultaneous equations based on amino-acid analyses. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1506-1509, 1990.

HILDEBRANDT, G. Stellungnahme zu den "richtlinien für die einheitliche durchführung der histologischen untersuchung von fleischzeugnissen". **Fleischwirtschaft**, v. 59, n. 4, p. 521-528, 1979.

HILDEBRANDT, G.; HIRST, L. Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analysis. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 3, p. 568-572, 1985.

HILDEBRANDT, G.; KÖNIGSMANN, R.; KRETSCHMER, F.-J.; VON RENNER, H. Die eignung der fernsehbild-computer-analyse zur histometrischen kollagenbestimmung. **Die Fleischwirtschaft**, v. 57, n. 4, p. 689-697, 1977.

HITCHCOCK, C. H. S.; BAILEY, F. J. B.; CRIMES, A; DEAN, D. A. G.; DAVIS, P. J. Determination of soya proteins in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 32, n. 2, p. 157-165, 1981.

HOMAYOUNFAR, H. Identification électrophorétique des proteíns étrangères et en particulier des proteíns de soja dans les produits alimentaires carnés frais ou en conserve. **Ann. Nutr. Aliment.**, v. 31, n. 2, p. 187-92, 1977.

HOOGENKAMP, H. W. Meat emulsion variables. Influence of some compositional ingredients. **Fleischwirtschaft**, v. 74, n. 11, p. 1198-1200, 1994

INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 2. ed. Brasília: SENAI/DN, 2000. 75p.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01. Março 2003. 35p.

JANSSEN, F. W.; VOORTMAN, G.; BAAIJ, J. A. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovoalbumin and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting and immunoperoxidase staining. **J. Agric. Food Chem.**, v. 35, n. 4, p. 563-567, 1987.

JOHSON, S. K. The determination of hydroxyproline in meat using gas chromatography-mass spectrometry. **Meat Science**, v. 22, n. 3, p. 221-227, 1988.

JONAS, D. A.; WOOD, R. Determination of hydroxyproline in meat products: collaborative study. **J. Assoc. Publ. Analysts**, v. 21, n. 4, p. 113-121, 1983.

JOSEFOWICZ, M. L.; O'NEILL, I. K.; PROSSER, H. J. Determination of L-hydroxyproline in meat protein by quantitative Carbon-13 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Analytical Chemistry**, vol. 49, n. 8, p. 1140-1143, 1977.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990. p.65-100.

KAMM, L. Immunochemical quantification of soybean protein in raw and cooked meat products. **Journal of the AOAC**, v. 53, n. 6, p. 1248-1252, 1970.

KARATZAS, C. N.; ZARKADAS, C. G. Determination of the myofibrillar and connective tissue protein contents and amino acid composition of selected composite meat products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, n. 6, p. 1109-1121, 1988.

KATSARAS, K.; PEETZ, P. The functional properties of soy products. **Fleischwirtschaft**, v. 74, n. 1, p. 66-68, 1994.

KAYA, M.; GÖKALP, H. Y. Influencia de la proteína de soja texturizada sobre las propiedades del "Köfte". **Fleischwirtschaft, español**, v. 1, p. 41-43, 1992.

KHALILI, A. D.; ZAKADAS, C. G. Determination of myofibrillar and connective tissue protein contents of young and adult avian (*Gallus domesticus*). Skeletal muscles and the N-methylhistidine content of avian actins. **Poultry Science**, v. 67, n. 11, p. 1593-1614, 1988.

KENNEY, P. B.; HENRICKSON, R. L.; CLAYPOOL, P. L.; RAO, B. R. Influence of temperature, time and solvent on the solubility of corium collagen and meat proteins. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 2, p. 277-280, 1986.

KENNEY, P. B.; KASTNER, C. L.; KROPF, D. H. Raw and preheated epimysium and gelatin affect properties of low-salt, low-fat, restructured beef. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 551-554, 1992.

KERRY, J. F.; MORRISSEY, P. A.; BUCKLEY, D. J. Assessment of non-meat proteins in the manufacture of reformed cured meat products. In 44th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 1998. **Proceedings**...Barcelona, 1998. p. 414-415.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **JAACS**, v. 56, n. 3, p. 242-258, 1979.

KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **J. Asooc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 1, p. 54-57, 1990.

LEE, Y. B.; ELLIOTT, J. G.; RICKANSRUD, D. A.; HAGBERG, E. C. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 5, p. 1359-1362, 1978.

LEE, Y. B.; RICKANSRUD, D. A.; HAGBERG, E. C.; BRISK, E. J.; GREAK, M. L.. Quantitative determination of soybean protein in fresh and cooked meat-soy blends. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 380-383, 1975.

LEE, Y. B.; RICKANSRUD, D. A.; HAGBERG, E. C.; FORSYTHE, R. H. Detection of various nonmeat extenders in meat products. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 3, p. 589-593, 1976.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 1.ed. Campinas: Editora Átomo, 1996. 120p.

LLEWELLYN, J. W.; DEAN, A. C.; SAWYER, R.; BAILEY, F. J.; HITCHCOCK, C. H. S. Technical note: the determination of meat and soya proteins in meat products by peptide analysis. **J. Fd Technol.**, v. 13, n. 3, p. 249-252, 1978.

MAKALA, H.; OLKIEWICA, M.; BORYS, A. Sensory and instrumental methods for evaluation of texture of finely disintegrated meat product with the additive of soya isolate protein. In 44th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 1998. **Proceedings**...Barcelona, 1998. p. 782-783.

McNEAL, J. E. Semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assay of soy protein in meat products: summary of collaborative study. **J. Assoc. Off. Chem**, v. 71, n. 2, p. 443, 1988.

MEDINA, M. Extraction and quantification of soy protein in sausages by ELISA. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 766-771, 1988.

MORI, T.; UTSUMI, S.; INABA, H.; KITAMURA, K.; HARADA, K. Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v. 29, n. 1, p. 20-23, 1981.

MURRAY, A. C. JEREMIAH, L. E. Toluene as an alternative to benzene in the Woessner determination of hydroxyproline. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, n. 6, p. 1368-1369, 1983.

NGUYEN, Q.; ZARKADAS, C. G. Comparison of the amino acid composition and connective tissue protein contents of selected bovine skeletal muscles. . **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 5, p. 1279-1286, 1989.

OLIVO, R. **Uso do colágeno em emulsões cárneas**. São Paulo, 1995. 120p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: no caminho da pesquisa**. 2.ed. Cocal do Sul: IMPRINT, 2002. 155p.

OLSMAN, W. J.; DOBBELAERE, S.; HITCHCOCK, C. H. S. The performance of an SDS-PAGE and an ELISA method for the quantitative analysis of soya protein in meat products: an international collaborative study. **J. Sci. Food Agric.**, v. 36, p. 499-507, 1985.

PARSONS, A. L.; LAWRIE, R. A. Quantitative identification of soya protein in fresh and heated meat products. **J. Fd Technol.**, v. 7, n. 3, p. 455-462, 1972.

PEDERSEN, H. E. Application of soya protein concentrates in processed meat products. Experience from different countries. **Fleischwirtschaft**, v. 75, n. 6, p. 798 – 802, 1995.

PENG, I. C.; DAYTON, W. R.; QUASS, D. W.; ALLEN, C. E. Investigations of soybean 11S protein and myosin interaction by solubility, turbidity and titration studies. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 6, p. 1976-1983, 1982

PENNA, E. W. de; LILIENFELD, C.; VINAGRE, J.; FUENTES, A. Utilization de extensores carneos en formulaciones de mortadela lisa. **Fleischwirtschaft**, español v. 1, p.30-32, 1992.

POLI, G.; BALSARI, A.; PONTI, W.; CANTONI, C.; MASSARO, L. Crossover electrophoresis with indirect immunofluorescence in the detection of soya protein in heated meat products. **J. Fd Technol.** v. 14, n. 5, p. 483-491, 1979.

PORCELLA. M. I.; SANCHEZ, G.; VAUDAGNA, S. R.; MEICHTRI, L. H.; DESCALZO, A. M.; GALLINGER, M. M. Effect of refrigerated storage time on quality characteristics and microbial stability of vacuum-packaged “chorizos” with soy protein isolate added. . In 45th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 1999. **Proceedings**... p. 144-145.

PORCELLA. M. I.; SÁNCHEZ, G.; VAUDAGNA, S. R.; ZANELLI, M. L.; DESCALZO, A. M.; MEICHTRI, L. H.; GALLINGER, M. M; LASTA, J. A. Soy protein isolate added to vacuum-packaged chorizos: effect on drip loss, quality characteristics and stability during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 57, p. 437-443, 2001.

RAKOSKY, J. Jr. Soy Products for the Meat Industry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 18, n. 6, 1005-1009, 1970.

RAO, B. R.; HENRICKSON, R. L. Food grade hide collagen in bologna effect on functional properties, texture and color. **J. Food Qual.**, Westport, v. 6, n. 1, p. 1-10, 1983.

RAVESTIN, P.; DRIEDONKS, R. A. Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products. **Journal of Food Technology**, v. 21, n. 1, 19-32, 1986.

REIS, R. A. A.; SANTOS, W. L. M.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, R. M.; VELOSO, C. R. V. Quantificação da hidroxiprolina como índice de qualidade de salsicha comercializada em Belo Horizonte – MG. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 6, p. 589-94, 1999.

RING, C. Quantitativer nachweis von sojaprotein in brühwurst. Nachweis mittels ELISA. **Fleischwirtschaft**, v. 67, n. 2, p. 203-204, 1987.

RING, C.; JENNISSEN, H. P.; PUFF, A. Affinity chromatography. A reliable method for purification of anti-soy protein serum. **Fleischwirtschaft**, v. 69, p. 1206-1207, 1988.

RITTENBURG, J. H., ADAMS, A, PALMER, K., ALLEN, J. C. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, n. 3, p. 582- 587, 1987.

RODRIGUES, R. M. M. S. **Deteção e quantificação de proteína texturizada de soja em salsichas**. São Paulo, 1986. 95p. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, R. M. M. S.; PENTEADO, M. V. C. Métodos de inclusão em parafina e resina para análise microscópica de salsichas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, v. 25, n.1, p.27-28, 1989.

ESTADOS UNIDOS, 2001A, I. A.; TOKAEV, E. S.; KOVALEV, Y. I. Collagen and its rational content in meat products: Part 1. Analytical Studies. **Meat Science**, v. 31, n. 1, 35-42, 1992.

SADLER, D. H. N.; YOUNG, O. A. The effect of preheated tendon as a lean meat replacement on the properties of fine emulsion sausages. **Meat Science**, v. 35, n. 2, p. 259-268.

SÃO PAULO (Estado). Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (NTA). **Diário Oficial [do Estado de São Paulo]**, São Paulo, n.200, 21 out 1978. Seção I, NTA 3, p.3-4, NTA 36, p. 17-19.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em produtos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996. p. 216-230.

SHIMOKOMAKI, M. Aproveitamento de sub-produtos nas indústrias de carnes para a produção de colágeno e suas aplicações. **Rev. Nac. Carne**, São Paulo, v. 16, n. 187, p. 32-34, 1992.

SILVA, A. M. **Quantificação de proteína texturizada de soja e identificação de carne por espécie animal em hambúrguer, empregando o ELISA e o DOT- ELISA.** São Paulo, 1998. 80p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SMITH, S. H.; JUDGE, M. D. An HPLC method using FMOC-ADAM for determination of hydroxyproline in muscle. **Meat Science**, v. 30, n. 4, p. 351-357, 1991.

SMITH, G. C.; JUHN, H.; CARPENTER, Z. L.; MATTIL, K. F.; CATER, C. M. Efficacy of protein additives as emulsion stabilizers in frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 5, p. 849-855, 1973.

SOFOS, J. N.; NODA, I.; ALLEN, C. E. Effects of soy proteins and their levels of incorporation on the properties of wiener-type products. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 4, p. 879-884, 1977.

SWASDEE, R. L.; TERRELL, R. N.; DUTSON, T. R.; LEWIS, R. E. Ultrastructural changes during chopping and cooking of a frankfurter batter. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 1011-1013, 1982.

TERRELL, R. N.; BROWN, J. A.; CARPENTER, Z. L. Effects of oilseed proteins, at two replacement levels, on chemical, sensory and physical properties of frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 3, p. 865-868, 1979.

TUKUR, H. M.; LALLÈS, J. P.; PLUMB, G. W.; MILLS, E. N. C.; MORGAN, M. R. A.; TOULLEC, R. Investigation of the relationship between *in vitro* ELISA measures of immunoreactive soy globulins and *in vivo* effects of soy products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 8, p. 2155-2161, 1996.

VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n.2, 79-84, 2001.

VEGA M., J. A. de la; FELÍCIO, P. E. Substituição parcial de carne por plasma bovino desidratado e isolado protéico de soja em hambúrguer de frango. **Ciência Tecnol. Aliment.**, v.7, n.2, p.123-144, 1987.

VOGNAROVÁ, I.; DVORÁK, Z.; BOHM, R. Collagen and elastin in different cuts of veal and beef. **Journal of food Science**, v.33, n. 4, 339-343, 1968.

WILER, O. D. Routine-untersuchungsmethoden für Fleisch und Fleischwaren. **Die Fleischwirtschaft**, v.52, n. 1, p. 42-44, 1972.

WILEY, E. L.; REAGAN, J. O.; CARPENTER, J. A.; CAMPION, D. R. Connective tissue profiles of various raw sausage materials. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 918-921, 1979.

YASUMOTO, K.; SUDO, M.; SUZUKI, T. Quantification of soya protein by enzyme linked immunosorbent assay of its characteristic peptide. **J. Sci. Food Agric.**, v. 50, p. 377-389, 1990.

YETIM, H.; GOKALP, H.Y.; KAYA, M.; YANAR, M.; OCKERMAN, H. W. Physical, chemical and organoleptic characteristics of Turkish style frankfurtes made with an emulsion containing Turkish soy flour. **Meat Science**, v. 31, n. 1, 43-56, 1992.

ZARKADAS, C. G. Assessment of the protein quality of selected meat products based on their amino acid profiles and their myofibrillar and connective tissue protein contents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, n. 5, p. 790-800, 1992.

ZARKADAS, C. G.; KARATZAS, C. N.; KHALILI, A. D.; KHANIZADEH, S.; MORIN, G. Quantitative determination of the myofibrillar proteins and connective tissue content in selected porcine skeletal muscles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, n. 6, p. 1131-1146, 1988.

ZARKADAS, C. G.; KARATZAS, C. N.; KHANIZADEH, S. Evaluation protein quality of model meat/soybean blends using amino acid compositional data. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 4, p. 624-632, 1993.

ZARKADAS, C. G.; MARLISS, E. B.; ZARKADAS, G. C.; YU, Z.; MINERO-AMADOR, A. Amino acid composition and protein contents of selected very low energy reducing diets. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, n. 11, p. 2198-2207, 1992.

ZARKADAS, C. G.; ZIRAN, Y.; ZARKADAS, G. C.; MINERO-AMADOR, A. Assessment of the protein quality of beefstock bone isolates for use as an ingredient in meat and poultry products. **Agric. Food Chem.**, v. 43, n. 1, p. 77-83, 1995.

CAPÍTULO 2

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA EM PRODUTOS EMULSIONADOS

Quantitative determinations of commercial soy proteins in emulsion-type meat products using an ELISA assay kit¹

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)- 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.403-404.
--

Background

Soy proteins are often added to meat products to improve texture, to act as binders, to aid in the retention of water and fat and to extend or substitute meat proteins (KINSELLA, 1979). Soy protein products are cheaper than meat proteins. This economic standpoint clearly stimulated efforts to replace some of the meat by soy proteins. In Brazil, up to 4% soy proteins can be added to finely comminuted meat products such as frankfurter-type sausages and hot dogs, up to 2.5% to tradeless raw sausages; therefore, they cannot be added to frankfurters, wieners, portuguese and calabrian types raw sausages (BRASIL, 2000). Presently, there is no routine method used for the measurement of the amount of this protein. The ELISA-TEK assay kit employs the principle of enzyme immunoassay for soy proteins in the presence of other vegetable and meat proteins. The kit is intended to be used for soy protein at levels between 1 to 10% of the total wet weight of raw or processed mixed meat products. Samples containing levels of soy protein outside this range can be measured by altering the ratio of meat to buffer used to prepare the meat slurry (ELISA Technologies, 2000). This analysis, including sample preparation, can be completed within a workday, and immunoassay in less than 60 min (RITTENBURG, 1987).

Objectives

Quantification of soy protein isolate (SPI), texturate concentrate (SPTC) and texturate (SPT) at levels 0.5; 2.0; 4.0; and 6.0% of the total wet weight added to raw, pasteurized (Lyoner sausage) and sterilized (canned conserve) emulsion-type meat products utilizing ELISA-TEK soy protein assay kit.

Methods

Meat formulations each weighting 8Kg consisted of 56.2% beef, 12.5% mechanically deboned poultry meat, 17.25% pork backfat, 9.18% crushed ice, 1.5% salt, 0.015% sodium nitrite, 0.3% sodium tripolyphosphate, 0.05% sodium erythorbate, 1% spices and 2% manioc starch. The formulations with 0.5; 2.0; 4.0 and 6.0% soy protein isolate (Supro 500E, natural color powder), texturate concentrate (Proteimax TR-120, natural color texturate) or texturate (Maxten E-100, powder coloured with erythrosine) were adjusted altering beef, ice and backfat resulting in a relation moisture/protein 4.7 and 20% fat, approximately. Soy materials were incorporated in a form of powder or texturate (as received). The products were prepared in the Meat Technology Centre of the Institute of Food Technology according to industrial standards, i.e. chopped until an emulsion was formed, stuffed into casing (K plus - CaseTech – water and vapor barrier, Ø=60mm) for Lyoner-type sausage and cooked to 72°C internal temperature. A portion of each formulation was retained as raw (500g) and the remaining portion was sterilized under conditions of commercial canning at 121°C (~150g cylindrical cans, nominal process value $F_0 = 6.41$). The ELISA-TEK soy protein assay kit was used according to the manufacturer's instructions (ELISA Technologies, 2000). This assay is an indirect competitive enzyme immunoassay. Meat samples are homogenized and then extracted (solubilized) in a urea-dithiothreitol buffer at 100°C followed by rapid renaturation in a cystine containing diluent. This assay is performed in plastic microwells that have been pre-coated with a purified preparation of soy protein. In the initial competition reaction, a fixed amount of the diluted extract of the meat sample is added into the soy protein coated microwell along with a fixed volume of specific rabbit anti-soy protein. With increasing concentrations of soy

in the diluted extract, the amount of rabbit anti-soy protein binding to the soy protein attached to the microwell will decrease. The amount of rabbit anti-soy protein remaining to the soy protein coated microwell is determined by reacting a fixed amount of peroxidase conjugated swine anti-rabbit globulin. Bound peroxidase activity is determined by adding a fixed amount of TMB substrate which develops a blue color (subsequently changing to yellow) in the presence of peroxidase. Color development is inversely proportional to the original soy protein concentration in the diluted extract. The concentration of soy protein in the meat product can be determined by reading off a calibration curve derived from standards of known soy protein concentrations. The ELISA-TEK soy protein assay kit has been standardized using a soy protein isolate (Purina PP500E soy isolate). Other types of soy preparations may react somewhat differently in the assay. The kit manual recommends that if the type of soy preparation, which is being assayed for, is known, then a sample of that soy powder should be included in the assay and run in parallel to the soy protein control. The recovery factor obtained with the test soy preparation can then be applied as a correction factor to the test samples.

Results and Discussion

The kit assay utilizes 5 soy protein standards at concentrations of 3.5; 7.0; 15.0; 35.0 and 70.0 µg/mL. The response curve using soy protein standards exhibited a good linear response within the above concentration range ($y=0.645\log x+1.342$; $r=0.980$). The assay performance was monitored through the internal control measurements of maximum binding, substrate blank, and soy protein control. The maximum binding microwell gave an absorbance value of 1.498 at 450 nm (should lie in the range of 1.4 to 2.0 absorbance units). The absorbance ratio

of the 3.5µg/mL standard to the maximal binding microwell absorbance was 0.69 (it should lie between 0.50 and 0.70), indicating that assay components are performing within specifications (standard curve displacement). The response for soy protein kit control, SPT, SPTC and SPI was 74; 91; 75 and 88% respectively, indicating that the extraction procedure and the immunoassay were performed satisfactorily. The expected values given for the soy products in Table 3 are the recipe (formulation) values corrected for the response factors of the soy materials (SPT, SPTC and SPI) used in this particular experiment. Once these corrections have been made, the expected values and the determined values corresponded very closely. The recovery results for 6.0; 4.0; 2.0 and 0.5% soy material added to emulsion-type products ranged from 89 – 137%; 87 – 164%; 77 – 142% and 104 – 194% respectively. The samples without soy protein were characterized as containing no soy, or only insignificant amounts. Meat products added with SPT, SPTC and SPI showed intervals recovery of 89 – 142%, 112 – 164% and 77 – 121% respectively, excluding 0.5% soy added, which is out of the experimental spectrum predicted by the ELISA-TEK manual. In Figure 2, responses were linear for soy products with correlation coefficient of 0.95; 0.95 and 0.96 for SPT ($y=0.97x+0.13$), SPTC ($y=1.33x+0.06$) and SPI ($y=1.08x-0.01$) respectively. The observed levels of soy protein (y) agreed with expected soy proteins (x) in meat products within experimental error. The response for products with soy protein texturate concentrate (SPTC) was still linear but with greater slope; the observed results for all samples were found to be somewhat higher than the expected content. These results can be explained by the known high response of some soy ingredients, particularly texturates, that are highly denatured protein and have varying degrees of antigenic response depending upon its processing treatment. In this

case, the recovery results would be minor (25%) if no correction factor was used. Considering heat treatments (Table 3), the intervals recovery were 87 – 148% for raw, 95 – 164% for pasteurized and 77 – 157% for sterilized emulsion-type meat products. In Figure 3, the responses were still linear when considering heat treatments with correlation coefficient of 0.95; 0.95 and 0.91 respectively for raw ($y=1.11x+0.08$), pasteurized ($y=1.14x+0.09$) and sterilized ($y=1.01x+0.15$) emulsion-type meat products. The best slope was for sterilized products however with greater results variability (minor correlation coefficient). The recovery of sterilized products with soy protein isolate (SPI) was somewhat underestimate. Since legal limits of soy proteins are based on total weight of sausage product, it is practical to analyze and measure soy protein on a wet basis. Directed analysis of wet samples eliminated the need for determination of total protein or total nitrogen from which the amount of soy protein is extrapolated.

Conclusions

The ELISA-TEK soy assay kit offers a simple and rapid extraction of soy proteins in meat products. There was good agreement between expected and determined levels of texturate, texturate concentrate and isolate soy proteins. The assay was suitable for use with raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products. Unfortunately, there are differences in responses from different soy texturates, texturate concentrates or isolates to the same ELISA procedure and soy standard. This is one of the inherent weaknesses of the method in the present form. The procedure is in fact a quantitative method if the type and protein content of the added soy protein are known (must be declared on the product label) and especially if a

sample of the specific soy type is available for calibration. The method was easy to work. Because of assay's high cost, its use is quite limited in developing countries.

References

BRASIL. Instrução Normativa nº4, 31 de março de 2000. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura do Abastecimento aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 05 de abr. de 2000. Seção 1, p.6-10.

ELISA Technologies. Inc. **ELISA-TEK Microwell Kits** - Cat.nº.510841 - Soya Protein Assay - rev.01/13/2000 www.elisa-tek.com

KINSELLA, J.E. Functional properties of soya proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 56(3):242-258,1979.

RITTENBURG, J.H.; ADAMS, A; PALMER, J.; ALLEN, J.C. Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Soy Protein in Meat Products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 70 (3):582-587, 1987.

Acknowledgements: This work was supported by FAPESP project nº 01/03499-9.

Table 3. Percentage of soy protein in emulsion-type meat products determined using ELISA-TEK kit.

Type of soy product	Soy product added ^a (%)	Soy protein content ^b (%)	Expected	Raw	Pasteurized at 72°C	Sterilised at 121°C	Soy protein determined (%)	Percent of expected value	Soy protein determined (%)	Percent of expected value	
			value of soy protein ^c (%)	Soy protein determined (%)	Percent of expected value	Soy protein determined (%)					Percent of expected value
	0.00	0.00	0.00	<0.35	-	<0.35	-	<0.35	-		
Soy protein texturate (SPT)	0.50	0.25	0.23	0.24	104	0.28	122	0.33	143		
	2.00	1.02	0.92	1.08	117	0.97	105	1.31	142		
	4.00	2.04	1.85	1.84	99	2.03	110	1.93	104		
	6.00	3.06	2.77	3.30	119	2.64	95	2.47	89		
Soy protein texturate concentrate (SPTC)	0.50	0.32	0.24	0.36	150	0.26	108	0.31	129		
	2.00	1.26	0.94	1.30	138	1.09	116	1.22	130		
	4.00	2.53	1.89	2.80	148	3.10	164	2.97	157		
	6.00	3.79	2.83	3.17	112	3.87	137	3.76	133		
Soy protein isolate (SPI)	0.50	0.41	0.36	0.55	153	0.70	194	0.38	106		
	2.00	1.63	1.43	1.62	113	1.55	108	1.10	77		
	4.00	3.25	2.86	2.49	87	3.26	114	2.66	93		
	6.00	4.88	4.29	5.19	121	4.89	114	4.33	101		

^a Recipe values

^b SPT, SPTC and SPI contained 50.92, 63.15 and 81.30% of protein by Kjeldahl analysis (Nx 6.25), respectively.

^c Soy protein after correction for response to standard / Response of SPT, SPTC and SPI to soy Kit ELISA-TEK standard (Purina PP500E soy isolate) was 90.6; 74.7 and 88.0%.

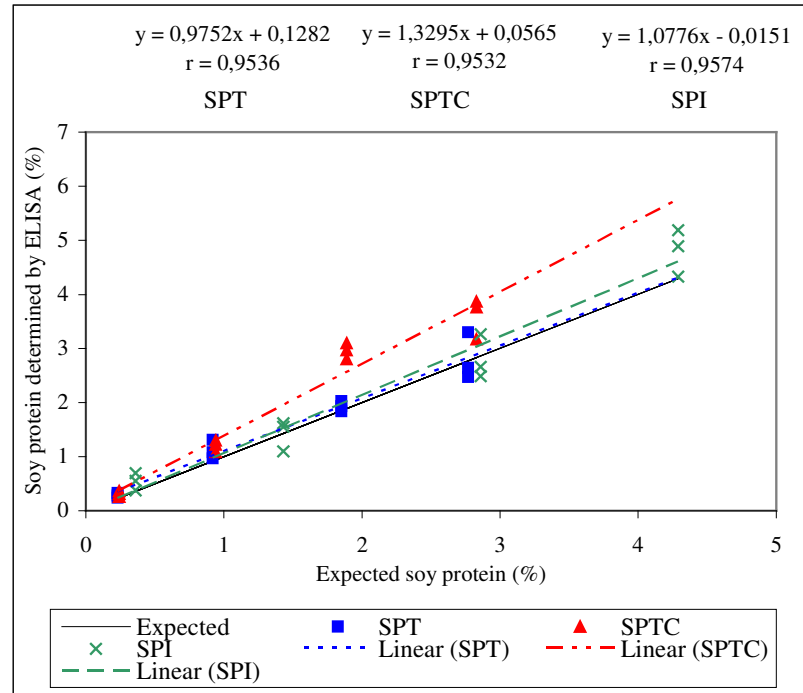


Figure 2. Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of texturate (SPT), texturate concentrate (SPTC) and isolate (SPI) soy protein in emulsion-type meat products using ELISA-TEK kit.

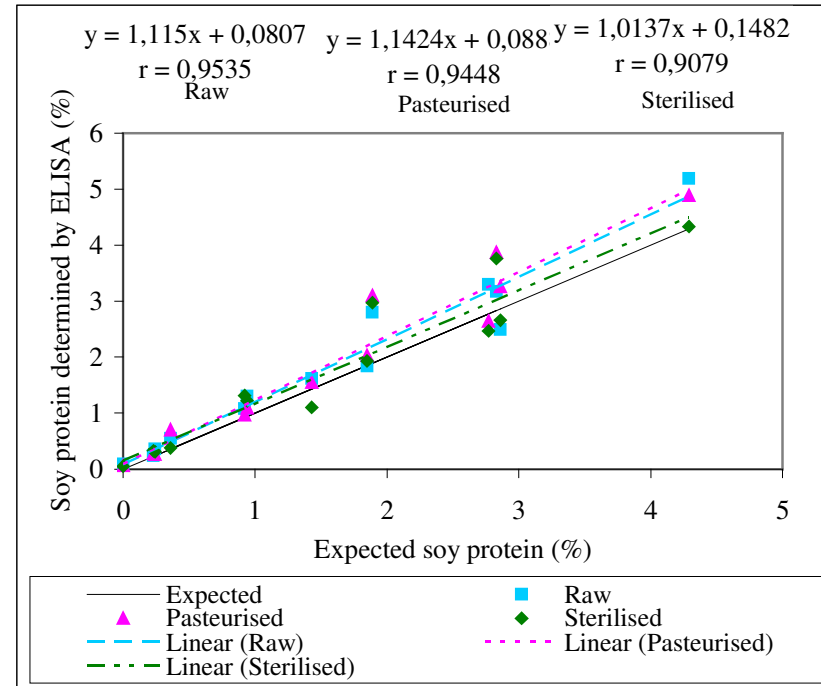


Figure 3. Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products using ELISA-TEK kit.

Quantitative determinations of commercial soy proteins in emulsion-type meat products by official ELISA procedure¹

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) - 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.405-406.

Background

Soy proteins as flour, texturate, concentrate, texturate concentrate or isolate are being applied extensively in meat products that may be raw, cooked, canned or dried as a partial replacement for animal proteins. The increasing use of soy proteins demands adequate control of their levels, which can be a problem to the analyst. Nowadays in Brazil, whether or not any of these proteins is illegally used remains obscure because adequate analytical methods to detect them in meat products are scarce. The applicability and performance of method for analyzing soy proteins in meat products depend on various factors, the most important of them being the type of soy used; soy protein rate in the meat product; type and composition of the meat product; the processing of the final meat product, especially its heat treatment. The most desirable analyte for determination of soy in meat products is the protein itself. Soybeans contain 2 principal storage proteins, glycinin (11S protein) and β -conglycinin (7S protein). The fraction 7S appears to be most antigenic after renaturation (BERKOWITZ; WEBERT, 1987). Hitchcock and co-workers (1981) developed a competitive ELISA with polyclonal antibodies. This assay was subjected to collaborative studies by Crimes et al (1984) and Olsman et al. (1985) and endorsed by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995) as an official method.

Objectives

Quantification of soy protein isolate (SPI), texturate concentrate (SPTC) and texturate (SPT) at levels 0.5; 2.0; 4.0 and 6.0% of the total wet weight added to raw (fresh), pasteurized (Lyoner sausage) and sterilized (canned conserve) emulsion-type meat products utilizing AOAC official procedure.

Methods

Three types of soy products were used in the preparing of emulsion-type meat products: soy protein isolate (Supro 500E, natural color powder), texturate concentrate (Proteimax TR-120, natural color texturate) or texturate (Maxten E-100, powder coloured with erythrosine). Thirteen emulsion-type formulations (8Kg each) were prepared; control ingredient compositions are summarized in: 56,2% beef, 12.5% mechanically deboned poultry meat, 17.25% pork back fat, 9.18% crushed ice, 1.5% salt, 0.015% sodium nitrite, 0.3% sodium tripoliphosphate, 0.05% sodium erythorbate, 1% spices and 2% manioc starch. The formulations with 0.5; 2.0; 4.0 and 6.0% SPI, SPTC or SPT were adjusted altering beef, ice and pork fat resulting in a relation moisture/protein 4.7 and 20% fat, approximately. The soy products were incorporated as received in a powder or texturate form. The products were prepared in the Meat Technology Centre of the Institute of Food Technology according to industrial standards, i.e. chopped until an emulsion was formed, stuffed into casing (K plus - CaseTech – gases and steam barrier, Ø=60mm) and cooked to 72°C internal temperature. A portion of each formulation was retained as raw (500g) and another (1.5Kg) sterilized under conditions of commercial canning at 121.1°C ($F_0 = 6.41$, ~150g cylindrical cans). Thus, the test samples to be analyzed were 13 raw, 13 cooked and 13 sterilized (total, 39 products). The protocol of the AOAC (1997) procedure was followed. The

samples were macerated in a sequence of organic solvents. The observed level of total protein ($N \times 6,25$) in the acetone powder was used to calculate an appropriate weight to be taken for the determination of soy protein. The acetone powders of the samples were solubilised in hot aqueous urea solution. After dilution, the “renatured” protein was analyzed by ELISA. An inhibition mode of ELISA was applied in which the soy protein analyte (antigen) reacted with a fixed volume of appropriate antiserum (rabbit antiserum to soy protein - Sigma-Aldrich S-2519) in excess, while the unreacted antibody was determined after isolation on an immunosorbent (F96 Maxisorp 442404 – Nunc Immuno Plate); in this case, the inside surface of a sensitized plasticmicrowell onto which antigen (Purina Supro 500E soy protein isolate) has been passively immobilized. The captured antibody was determined after adding a second antibody to which an enzyme had been covalently attached (goat anti-rabbit IgG – alkaline phosphatase conjugate – Sigma-aldrich A-7539). The captured enzyme was determined by adding chromogenic substrate (p-nitrophenyl phosphate – Sigma-Aldrich 104-105). The absorbance at 405nm of the solution in each microwell was measured and recorded using an automatic ELISA Reader (Multiskan Ascent - Labsystems). Washing steps (Wellwash 4 - Labsystems) were incorporated after each interaction stage to remove any non-immobilized species. ELISA protocol was designed with four blanks (substrate, conjugate, antibody-positive and antibody-negative) as quality checks to determine nonspecific color formation of enzyme substrate attributed to nonspecific binding of first or second antibodies adsorbed directly onto the solid phase. Total soy protein in meat product could be determined directly from the equation of the line derived from the calibration curve on a semi-logarithmic scale. The complete ELISA assay (since sample dilution) was repeated for three days. The cross-reactivity of anti-soy protein with whole milk protein powder, wheat flour and egg albumin was also determined.

Results and Discussions

Studies on optimum binding conditions revealed antibody and anti-globulin phosphatase conjugate dilutions of 1:3000 both. Antibody to soy protein showed no cross-reactivity or detectable binding with spices and other protein species (beef, pork, chicken, whole milk powder, wheat and egg albumin). False positives resulting from nonspecific binding of immunochemicals were not observed in this assay. The assay utilized soy protein standards at concentrations of 0.41; 1.23; 3.70; 11.11; 33.33; 100.00 and 300.00 µg/mL. Assay precision determined as the coefficient of variation for absorbance values of the antigen standard curve (Supro 500E), over nine separate standard curves runned simultaneously, was good (coefficients of variation, 2.4 – 5.8%); the regression equation and correlation was as follows: $y = -0.543 \log x + 1.3871$; $r = 0.980$. The assay exhibited a good linear response within a wide concentration range. The maximum binding well gave absorbance value of 2.456 at 405 nm. Between-assay repeatability (four different days) had a CV of 27.2 – 36.5% for absorbance values. Common to all ELISA systems, our assay exhibits a day-to-day variation, which makes daily measurement of standards necessary. The protein contents (N*6.25) ranged from 11.9 – 13.8% for 39 meat products and 69.3 – 78.0% for respective acetone powders. The expected values given for the soy sample concentrations in Table 4 are the recipe (formulation) values corrected for soy protein content of the products used. The control sample was characterized as containing no soy, or only insignificant amounts. The observed recovery results for emulsion-type products with 6.0; 4.0; 2.0; and 0.5% soy material were respectively 15 - 80%; 34 – 100%; 63 – 124% and 74 – 325% higher than the expected content. The expected values and the determined values for 0.5% soy products corresponded not closely for ELISA results;

discrepancies in small concentrations result from greater relative error. The meat products added with SPT, SPTC and SPI showed intervals recovery of 143 - 197% (351), 115 - 206% (425) and 115 - 224% (394) respectively (results for 0.5% soy added between brackets). In Figure 4, the data showed linearity for soy products with correlation coefficient of 0.98; 0.85 and 0.85 for SPT ($y=1.40x+0.38$), SPTC ($y=1.17x+0.93$) and SPI ($y=1.23x+1.01$) respectively. Considering heat treatments (Table 4), the intervals recovery were 121 - 224% (425) for raw, 124 - 203% (401) for pasteurized and 115 - 192% (302) for sterilized emulsion-type meat products. In Figure 5, the responses were linear when considering heat treatments with correlation coefficient of 0.92; 0.93 and 0.94 respectively for raw ($y=1.51x+0.50$), pasteurized ($y=1.31x+0.68$) and sterilized ($y=1.13x+0.59$) emulsion-type meat products. The best correlation coefficients were for meat products with soy protein texturate (SPT) and sterilized, indicating minor results variability. The observed results for all samples were found to be somewhat higher than the expected content, principally for raw products (greater slope). High values ($>100\%$) would indicate high levels of 7S protein or the exposure of extra antigenic sites in the sample. The fibrous nature of the raw product acetone powder was noted, as well as some problem of homogeneity when acetone powders were sampled. The quantity of solvents and labor time required to prepare each acetone powder make the assay long and laborious. Sample extraction merits further investigation.

Conclusions

The ELISA showed a high detection level (0.41 $\mu\text{g/mL}$ of soy protein), precision (low intra-assay CV), being applicable even to severely heat-processed meat products. The ELISA was highly specific for soy; no interference by other sausage ingredients was founded; the assay

can be used to detect soy proteins in meat products. The ELISA procedure gave somewhat high responses, principally for raw products, with low agreements for all treatments with 0.5% soy proteins. In general, the values obtained for 4.0 and 6.0% soy protein added to sterilized comminuted meat products were consistent within the limits expected for this type of assay. The results indicate that no strong dependence on different types of soy ingredients exists. This study demonstrated that significant progress has been made in the difficult area of the quantitative determination of soy proteins in meat products. ELISA AOAC Official method, that offers high sensitivity, specificity and large sample throughput is worth further refinement to make it fully acceptable for general product surveillance purposes.

References

- BERKOWITZ, D. ; WEBERT, D.W. Determination of soy in meat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1):85-90,1987
- A.O.A.C. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., Chapter 39, p.16-19, 1995.
- CRIMES, A. A.; HITCHCOCK, C. H. S.; WOOD, R. *J. Assoc. Publ. Analysts*, 22, 59-78, 1984.
- HITCHCOCK, C.H.S.; BAILEY, F.J.; CRIMES, A.A; DEAN, D.A.G.; DAVIS, P.J. *J. Sci. Food Agric.* 132 (2): 157-165, 1981.
- OLSMAN, W.J.; DOBBELAERE, S.; HITCHCOCK, H.S. *J. Sci. Food Agric.* 36, 499-507, 1985.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP project nº 01/03499-9.

Table 4. Percentage of soy proteins in emulsion-type meat products determined using official ELISA procedure.

Type of soy product	Soy product added / recipe values (%)	Soya protein content / expected values ^a (%)	R a w			P a s t e u r i z e d a t 72°C			S t e r i l i z e d a t 121°C		
			Soy protein determined ^b (%)	S.D.	Percent of soy protein content	Soy protein determined ^b (%)	S.D.	Percent of soy protein content	Soy protein determined ^b (%)	S.D.	Percent of soy protein content
	0.0	0.00	0.01	0.00	-	0.00	0.01	-	0.01	0.01	-
SPT	0.5	0.25	0.49	0.07	194	0.89	0.27	351	0.44	0.06	174
	2.0	1.02	1.92	0.30	188	2.01	0.41	197	1.86	0.29	182
	4.0	2.04	3.21	0.52	157	3.48	0.78	171	3.30	0.66	162
	6.0	3.06	4.94	1.22	162	4.38	0.39	143	4.38	0.93	143
SPTC	0.5	0.32	1.34	0.35	425	1.27	0.09	401	0.95	0.24	302
	2.0	1.26	2.61	0.74	206	2.57	0.36	203	2.31	0.58	183
	4.0	2.53	4.03	0.87	160	4.66	0.95	184	3.39	0.77	134
	6.0	3.79	4.58	0.45	121	6.83	1.67	180	4.34	0.30	115
SPI	0.5	0.41	1.60	0.25	394	1.35	0.60	332	0.92	0.13	225
	2.0	1.63	3.64	0.80	224	2.65	0.88	163	3.12	0.75	192
	4.0	3.25	6.51	1.53	200	4.78	2.01	147	4.79	1.14	147
	6.0	4.88	8.53	2.04	175	6.07	1.20	124	5.60	1.32	115

^a Soy protein texturate (SPT), soy protein texturate concentrate (SPTC) and soy protein isolate (SPI) contained 50.92; 63.15 and 81.30% of protein by Kjeldahl analysis (Nx6.25), respectively.

^b Averages of three different days are recorded relative to SPI (Supro 500E)

SD = Standard deviation

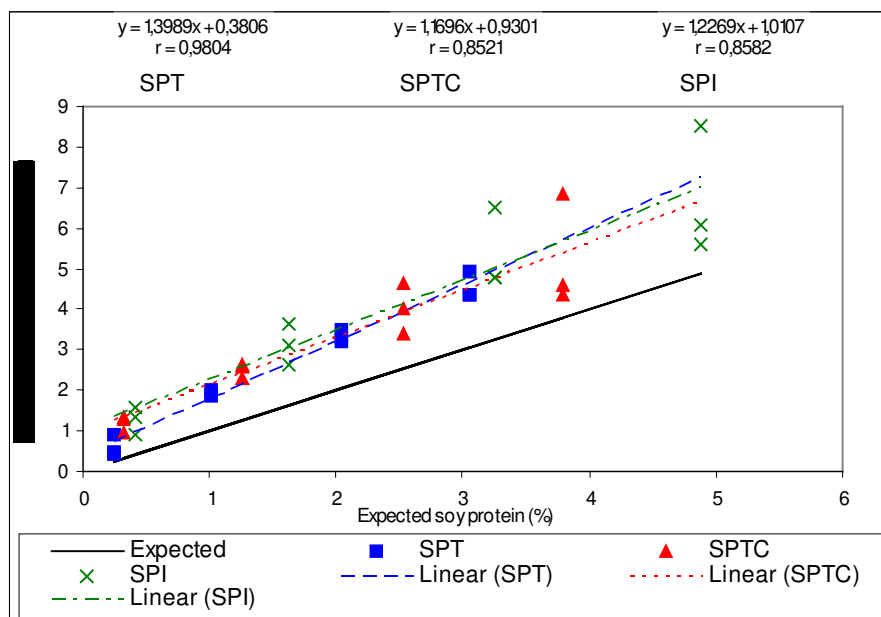


Figure 4. Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of texturate (SPT), texturate concentrate (SPTC) and isolate (SPI) soy protein in emulsion-type meat products using official ELISA procedure.

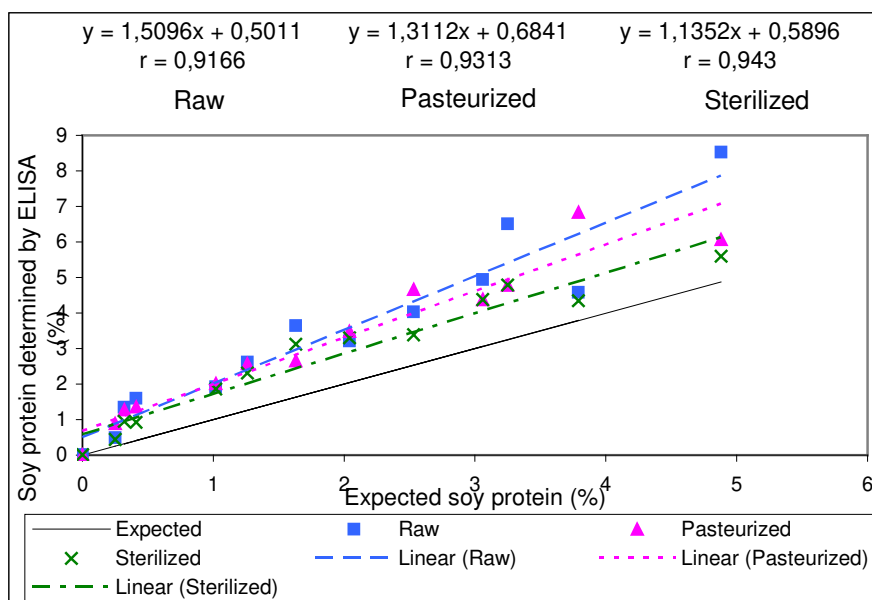


Figure 5. Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products using official ELISA procedure.

**Quantitative determinations of commercial soy proteins in
emulsion-type meat products by modified official ELISA
procedure¹**

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)- 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.407-408.
--

Background

The utilization of soy proteins in various meat products optimizes functional parameters such as water-binding, fat-binding, emulsification capability, texture and contribute to improving economy. These soy proteins can be used as meat extenders (part of the meat can be replaced by adding nonmeat protein and water) representing more than 88% of the weight of isolates (dry basis), 68% of concentrates, and 50% of texturates (BRASIL, 1978). An important chemical property of soy proteins is their amino acid composition, which determines the nutritional value of the proteins. Soy proteins contain significant amounts of all amino acids commonly found in proteins; except for methionine, that is the first limiting amino acid in soy proteins (WOLF, 1970), followed by triptophan (ZARKADAS et al., 1994). This limitation must be considered when the proteins are added for nutritional purposes rather than simply for functionality (WOLF, 1970). The increasing use of soy proteins by the food industry has been followed by increasing demands for effective methods of both detection and quantification of these extenders. Many approaches for their determination were investigated, such as stereological technique, electrophoresis, immunoassays, peptide analysis, and indirect methods based on determination of particular metals, carbohydrates, sterols or phytates. Presently, a very attractive technique is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The official ELISA (AOAC, 1995) steps for meat extraction employ a large quantity of solvents, making the assay long and laborious: at least several days are needed to prepare reagents and samples in order to perform the assay; the fibrous nature of the raw product acetone-dried powder (prepared to eliminate any fat interference) results in homogeneity problems. Rittenburg et al. (1987) described a rapid and simplified sample extraction procedure with urea-dithiothreitol buffer suitable for assay that complements the rapid ELISA immunoassay.

Objectives

Quantification of soy protein isolate (SPI), texturate concentrate (SPTC) and texturate (SPT) at the levels of 0.5; 2.0; 4.0 and 6.0% of the total wet weight added to raw (fresh), pasteurized (Lyoner sausage) and sterilized (canned conserve) emulsion-type meat products following the official ELISA procedure modified by sample extraction.

Methods

Thirteen emulsion-type formulations, each weighting 8kg were prepared by typical production methods. The control composition was 56.2% beef, 12.5% mechanically deboned poultry meat, 17.25% pork backfat, 9.18% crushed ice, 1.5% salt, 0.015% sodium nitrite, 0.3% sodium tripolyphosphate, 0.05% sodium erythorbate, 1% spices and 2% manioc starch. The types of soy products used were: soy protein isolate (Supro 500E, natural color powder), texturate concentrate (Proteimax TR-120, natural color texturate) or texturate (Maxten E-100, powder coloured with erythrosine). The formulations added with 0.5; 2.0; 4.0 and 6.0% of SPI, SPTC and SPT were adjusted altering beef, ice and backfat to provide constant moisture/protein relation (4.7) and 20% fat. Soy materials were incorporated as received (powder or texturate). The products were prepared in the Meat Technology Centre of the Institute of Food Technology according to industrial standards. To determine the effect of thermal processing, the emulsion-type formulation was divided into three lots. One lot remained raw, one was filled into water-vapour impermeable casing (K plus - CaseTech – size 60mm) and normally pasteurized (72°C internal temperature), and one was canned and retorted at 121°C (~150g cylindrical cans, $F_0=6.41$). The official method for soy protein determination in raw and heat-processed meat products (AOAC, 1995) was followed, except

for the preparation of meat sample, that was performed according to Rittenburg et al. (1987). Meat samples were homogenized and extracted (solubilized) in a urea-dithiothreitol [13.3M urea, 18.8mM dithiothreitol (DTT), 0.05M Tris, pH 8.6] buffer at 100°C followed by rapid renaturation in a cystine containing diluent [7.5mM cystine, 0.06M NaCl, pH 9.0]. The cystine serves to remove the excess DTT and also provides the oxidizing conditions that are necessary for the reformation of disulfide linkages. Commercial protein isolate (Purina - supro 500E) extracted according to AOAC (1995) was used as reference standard. The complete ELISA assay (since sample dilution) was repeated for three days.

Results and Discussions

Studies on optimum binding conditions revealed antibody (Sigma-Aldrich S-2519) and anti-globulin phosphatase conjugate (Sigma-aldrich A-7539) dilutions of 1:3000 both. The expected values given for the soy sample concentrations in Table 5 are the recipe (formulation) values corrected for soy protein content of the products used. The control product, which contained no soy protein, showed only insignificant amounts. The observed recovery results for emulsion-type products with 6.0% soy materials were 7 to 32% higher than the expected content and agreed well with the expected content. For 4.0; 2.0; and 0.5% soy material added, the results were respectively 13 - 77%, 25 - 107% and 8% (minor) - 205% higher than the expected content. In general, values under 100% would occur when the soy protein does not interact quantitatively with the antibodies under test conditions; this could be caused by the epitopes being rendered unavailable during processing. The results showed good agreements for raw and sterilized products with 0.5% soy texturate protein (SPT). Discrepancies in small concentrations result from greater relative error. Meat products added with SPT, SPTC and

SPI showed intervals recovery of 92 – 180 (196), 109 – 182% (194) and 107 – 207% (305) respectively (results for 0.5% soy added between brackets). In Figure 6, the data showed somewhat linearity for soy products with correlation coefficients of 0.95; 0.88 and 0.87 for SPT ($y=1.23x+0.15$), SPTC ($y=1.10x+0.54$) and SPI ($y=1.06x+0.78$) respectively. The addition of SPT to comminuted meat products showed minor results variability (greater correlation coefficient). It is evident that the solubilisation-renaturation procedure does not always convert the soy protein in all samples to quite the same antigenic form. Considering heat treatments (Table 5), the intervals recovery were 107 – 164% (211) for raw, 113 – 207% (305) for pasteurized and 107 – 169% (194) for sterilized emulsion-type products. In Figure 7, the responses were linear when considering heat treatments with correlation coefficient of 0.95; 0.91 and 0.94 respectively for raw ($y=1.14x+0.29$), pasteurized ($y=1.27x+0.54$) and sterilized ($y=1.08x+0.29$) products. The minor correlation coefficient for pasteurized meat products, indicate greater results variability. The observed results were found to be somewhat higher than the expected content, mainly for pasteurized products (greater slope). A shorter sample preparation procedure according to Rittenburg et al. (1987) showed to be suitable for a quantitative ELISA. The authors explain that the performance of an immunoassay largely depends on the characteristics of the antibody and antigen used. By immunizing rabbits with soy protein that has been denatured by a combination of heat, urea and DTT, the antibodies obtained can recognize the modified form of soy protein. Thus, when various types of meat samples containing soy are solubilized using heat, urea and DTT, similar forms of modified soy protein are produced, helping to normalize the analysis of different types of samples.

Conclusions

The procedure described offers a simple and rapid extraction of proteins for ELISA to quantify soy protein in cooked and uncooked emulsion-type products. The methodology allowed rapid aqueous extraction of meat samples into a liquid form suitable for assay. Since the soy antibody presents no cross-reactivity with sausage ingredients, this assay can be used to detect soy proteins in these mixtures. The results showed good agreements for 6.0% SPT, SPTC or SPI added. The assay was applicable to raw, cooked and sterilized meat emulsions. The results indicated that no strong dependence on different types of soy ingredients exists. It is necessary to continue the study for bettering the quantitative aspects of the methodology to perform the method.

References

A.O.A.C. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., Chapter 39, p.16-19, 1995.

BRASIL. Resolução nº14/78. Padrões de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja *Diário Oficial*, Brasília, 28 de junho de 1978. Seção 1, p.9896-9900.

RITTENBURG, J.H.; ADAMS, A; PALMER, J.; ALLEN, J.C. Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Soy Protein in Meat Products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (3):582-587, 1987.

ZARKADAS, C.G.; YU, Z.; VOLDENG, H.D.; HOPE, H.J.; MINERO-AMADOR, A.; ROCHEMONT, J.A. Comparision of the protein-bound free amino acid contents of two northern adapted soybean cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 42(1):21-33, 1994.

WOLF, W.J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. *J. Agr. Food Chem.*, 18(6):969-976, 1970.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP project nº 01/03499-9.

Table 5. Percentage of soy proteins in emulsion-type meat products determined using modified official ELISA procedure.

Type of soy product	Soy product added / recipe values (%)	Soya protein content / expected value ^a (%)	R a w			P a s t e u r i z e d a t 72°C			S t e r i l i z e d a t 121°C		
			Soy protein determined ^b (%)	S.D.	Percent of soy protein content	Soy protein determined ^b (%)	S.D.	Percent of soy protein content	Soy protein determined ^b (%)	S.D.	Percent of soy protein content
	0.0	0.00	0.02	0.02	-	0.02	0.02	-	0.00	0.01	-
SPT	0.5	0.25	0.29	0.05	113	0.50	0.10	196	0.23	0.03	92
	2.0	1.02	1.50	0.10	147	1.83	0.07	180	1.27	0.22	125
	4.0	2.04	2.60	0.37	127	3.38	0.25	166	2.31	0.88	113
	6.0	3.06	4.00	0.34	131	3.97	0.56	130	3.54	0.27	116
SPTC	0.5	0.32	0.51	0.02	160	0.60	0.15	187	0.61	0.15	194
	2.0	1.26	1.58	0.10	125	2.30	0.50	182	2.08	0.38	165
	4.0	2.53	3.50	0.39	138	4.46	0.40	177	4.27	0.18	169
	6.0	3.79	4.14	0.58	109	4.26	1.10	113	4.26	0.49	112
SPI	0.5	0.41	0.86	0.11	211	1.24	0.08	305	0.75	0.26	185
	2.0	1.63	2.67	0.16	164	3.37	0.23	207	2.07	0.30	127
	4.0	3.25	4.80	0.47	148	5.69	0.66	175	3.69	0.79	113
	6.0	4.88	5.20	0.33	107	6.43	1.21	132	5.20	1.36	107

^a Soy protein texturate (SPT), soy protein texturate concentrate (SPTC) and soy protein isolate (SPI) contained 50.92; 63.15 and 81.30% of protein by Kjeldahl analysis (Nx6.25), respectively.

^b Averages of three different days are recorded relative to SPI (Supro 500E)

SD = Standard deviation

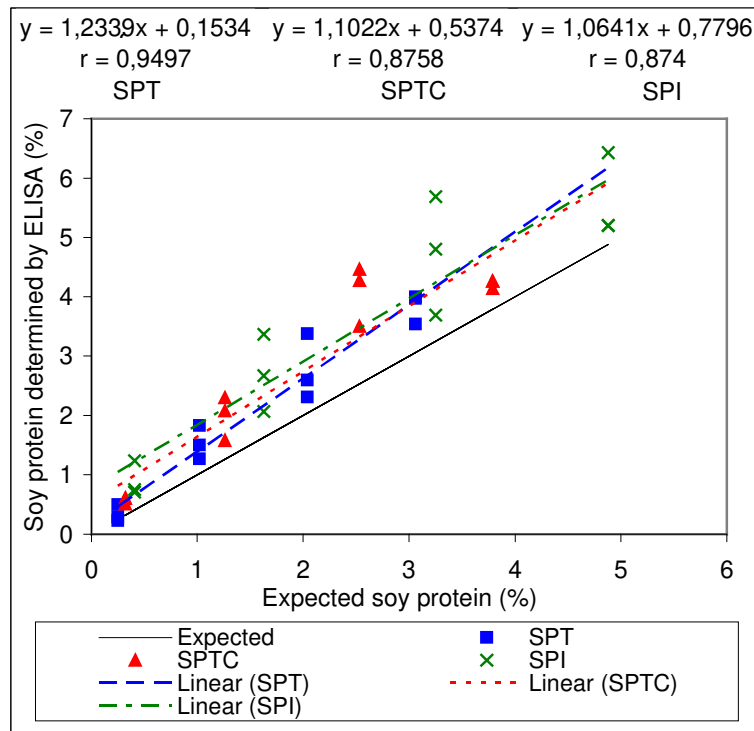


Figure 6. Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of texturate (SPT), texturate concentrate (SPTC) and isolate (SPI) soy protein in emulsion-type meat products using modified official ELISA procedure.

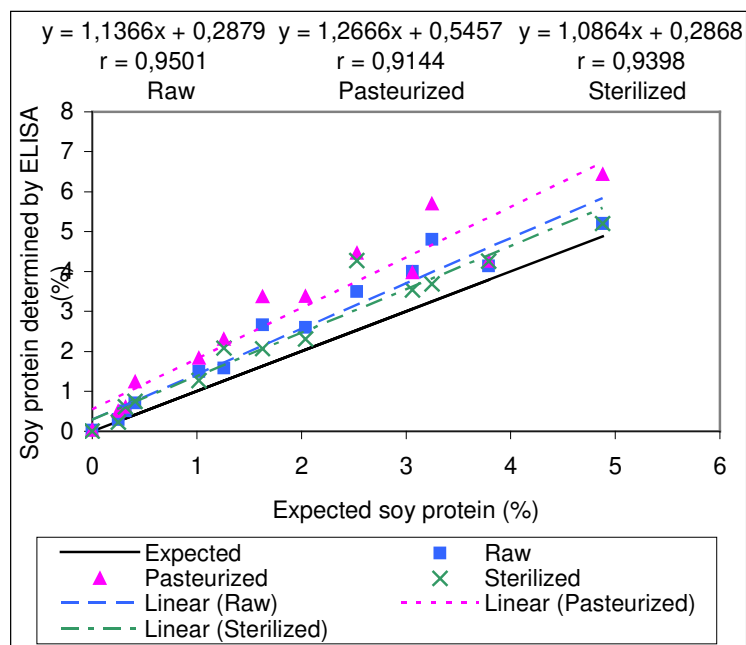


Figure 7. Relationship between ELISA-determinate percent soy protein and expected values of raw, pasteurized and sterilized emulsion-type meat products using modified official ELISA procedure

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DO USO DE PROTEÍNAS DE SOJA EM PRODUTOS EMULSIONADOS

Características físicas e sensoriais de salsichão Lionês com proteínas de soja¹

¹Trabalho apresentado no I Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2001, São Pedro. Anais p.319-320.

INTRODUÇÃO

As proteínas de soja dos tipos isolada (PIS), concentrada (PCS) e texturizada (PTS), nos teores mínimos de protídios 88, 68 e 50% (base seca) respectivamente, são incorporadas aos produtos cárneos com a finalidade de melhorar as características funcionais e reduzir custos do produto final. Dependendo do tipo protéico de soja utilizado, poderá haver influência na textura, cor e sabor. O aspecto comercial estimula o incremento da porcentagem de adição destas proteínas. A porcentagem de adição de proteínas não cárneas, como proteína agregada nos embutidos emulsionados tipo salsicha e mortadela, que anteriormente era de 3,5%¹ passou a ser pela legislação vigente, de 4%².

OBJETIVOS

Avaliação dos efeitos da adição de proteínas de soja dos tipos isolada (PIS), concentrada (PCS) e texturizada (PTS), nos teores 0, 2, 4 e 6%, nas características físicas de firmeza e cor e nos atributos sensoriais de salsichão Lionês.

MATERIAIS E MÉTODOS

Processamento: utilização de proteínas de soja dos tipos isolada (Purina 500E, pó cor natural), concentrada (Proteimax TR-120, grânulos cor natural) e texturizada (Maxten E-100, pó cor vermelha) na formulação de salsichão Lionês, com incremento de 0, 2, 4 e 6%. O salsichão controle, sem adição de proteína de soja, foi formulado com dianteiro bovino (56%), carne de frango mecanicamente separada (12,5%), toucinho (17,25%), gelo (9,38%) e ingredientes de porcentagem fixa como o sal (1,5%), nitrito de sódio (0,015%), tripolifosfato de sódio (0,5%), eritorbato de sódio (0,05%), condimento para salsicha (1%) e fécula de

mandioca (2%). Através de planilha de cálculo fez-se a correção das formulações devido a adição das diferentes concentrações de proteínas de soja, variando os teores de dianteiro bovino, toucinho e gelo, mantendo constante o teor de lipídios a 20% e a relação umidade/proteína a 4,7. Produção utilizando equipamentos de planta piloto. Processamento da massa em homogeneizador de carne tipo cutter (Kraemer & Grebe) no tempo aproximado de 12 minutos. Adição de proteínas de soja na forma de pó ou grânulos no início do processo, antes da adição do toucinho, fécula de mandioca e eritorbato. Uso de embutideira descontínua (Kraemer & Grebe) para enchimento da tripa artificial barreira a vapor de água e gases, calibre 60mm, cor vermelha, K plus (CaseTech). Cozimento do salsichão em estufa (Becker) com vapor seco à 60°C/20minutos e à 70°C/20minutos, e com injeção direta de vapor à 82-85 °C, até atingir temperatura interna de 72°C. **Análise instrumental da força de compressão:** medida realizada nas amostras de salsichão cortadas em cilindros de 20 mm de altura e 60 mm de diâmetro (calibre), através de texturômetro TAXT2i/25 (Stable Micro Systems), utilizando cilindro de alumínio de 35 mm de diâmetro (probe P/35), com os seguintes parâmetros estabelecidos: força de resolução = 5 g, distância de compressão=10 mm (50% de compressão), velocidades pré-teste=5,0 mm/s, teste=2,0 mm/s e pós-teste=10,0 mm/s. Média de quatro unidades de salsichão. **Análise instrumental da cor:** avaliação dos parâmetros de cor L*, a* e b* da CIE em espectrofotômetro MINOLTA (modelo CM-508d), com iluminante D₆₅ e ângulo de observação de 10°. Determinação na superfície do corte transversal de 4 salsichões, em dois pontos, dividindo cada unidade em 3 partes de tamanhos iguais. **Análise sensorial:** equipe formada por 10 julgadores treinados e com discriminação superior ou normal para cores avaliou os atributos sensoriais de cor vermelha, firmeza e sabor característico. Seguiu-se o delineamento experimental de Blocos Completos Casualizados,

com duas repetições, utilizando escala gráfica não estruturada linear simples de 9 cm. O teste para os atributos de firmeza e sabor, com as amostras cortadas em cubos de 13 mm de aresta, foi aplicado em cabines individuais climatizadas iluminadas com lâmpada vermelha. Avaliou-se a cor vermelha nas amostras cortadas em rodela de 20 mm de espessura, aproveitando o calibre de 60 mm dos salsichões, em pires de porcelana branca, codificados e arranjados ao acaso sobre a bancada do laboratório, em ambiente iluminado com lâmpada fluorescente artificial branca luz do dia. **Análise estatística:** os resultados foram submetidos a ANOVA, com duas fontes de variação (tratamentos e provadores) para a análise sensorial. Comparação de médias pelo teste de Tukey. Nível de significância fixado em 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No *Quadro 1* tem-se os valores médios da avaliação sensorial da cor vermelha, firmeza e sabor característico de salsichões Lionês, de acordo com os tratamentos de adição de proteínas de soja isolada (PIS); concentrada (PCS) e texturizada (PTS) nos teores 0, 2, 4 e 6%. Para a cor vermelha, pode-se observar que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ao nível de erro de 5%. O incremento na adição de PTS resultou em maior intensidade de vermelho devido à presença do corante eritrosina na composição da proteína vegetal. A adição de PCS reduziu a cor vermelha dos tratamentos, contudo, não houve diferença entre as amostras com 2 e 4% de adição. Houve redução gradativa do vermelho com o aumento no teor de PIS. Pelo *Quadro 2*, tendo-se os resultados dos parâmetros físicos de cor e textura, pode-se verificar a mesma tendência, ou seja, o valor de a^* (vermelho) aumentou com a elevação do teor de PTS e, para os teores de 4 e 6% de PIS e PCS, houve redução dos valores de a^* . O parâmetro L^* (luminosidade) diminuiu com a adição de 6% de PTS e

aumentou com 6% de PIS. Os resultados de b^* (amarelo) revelaram tendência em se reduzir pelo incremento de PTS, e aumentar com os teores de PIS. A firmeza subjetiva revelou diferença estatística entre os tratamentos adicionados com PIS, onde o aumento do teor resultou em produto menos firme, contudo a adição de 2% de PIS não modificou a firmeza do salsichão, quando comparado ao controle. Estes resultados foram confirmados pela avaliação instrumental da força de compressão dos salsichões acrescidos com PIS. A adição de 2% de PCS resultou em maior força de compressão, contudo, este resultado não foi confirmado sensorialmente. O sabor característico do salsichão revelou decréscimo pela adição de 6% de PIS. O uso de proteína de soja dos tipos PTS e PCS, até o limite de 6%, não revelou alteração do sabor característico dos produtos.

CONCLUSÕES

A adição de 2, 4 e 6% de proteína texturizada de soja cor vermelha (PTS – Maxten E-100) ao salsichão Lionês, resultou na intensificação da cor vermelha percebida sensorialmente, ou avaliada pelos parâmetros objetivos (L^* , a^* e b^*). A diminuição da cor vermelha foi verificada com o uso da proteína de soja concentrada (PCS – Proteimax TR-120) e isolada (PIS – Supro 500E). A firmeza do salsichão ficou reduzida com a adição de 4 e 6% de PIS. A adição de 6% de PIS reduziu o sabor característico do salsichão. Não houve modificação da firmeza e do sabor característico dos salsichões processados com proteínas de soja dos tipos PTS e PCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº14/1978 da CNNPA. Estabelece padrões de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja. **Diário Oficial**, Brasília, 28 junho de 1978, Seção I – Parte I, p.9896-9900.

²BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº4, 31 de mar. 2000 da SDA/MAA. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial**, Brasília, 05 abr. 2000, Seção 1, p.6-10.

Quadro 1. Avaliação sensorial de salsichões com incrementos de proteínas de soja

Atributos sensoriais*	Teores de adição de proteínas de soja											
	PTS (%)				PCS (%)				PIS (%)			
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
Cor vermelha	3,6 ^d	4,6 ^c	5,4 ^b	6,5 ^a	6,3 ^a	5,1 ^b	5,2 ^b	4,0 ^c	6,3 ^a	5,7 ^b	4,8 ^c	4,1 ^d
	(1,10)	(0,9)	(1,1)	(1,1)	(1,0)	(0,7)	(1,1)	(1,0)	(1,3)	(1,2)	(1,1)	(1,0)
Firmeza	4,1 ^a	3,7 ^a	4,1 ^a	3,5 ^a	4,3 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a	5,0 ^a	4,6 ^{a,b}	3,9 ^b	3,1 ^c
	(1,6)	(1,7)	(1,9)	(1,6)	(1,8)	(1,5)	(1,7)	(1,8)	(1,8)	(1,6)	(1,4)	(1,4)
Sabor	5,8 ^a	5,2 ^a	5,5 ^a	4,8 ^a	5,6 ^a	5,6 ^a	5,1 ^a	5,1 ^a	5,6 ^a	5,8 ^a	4,9 ^{a,b}	4,4 ^b
característico	(1,4)	(1,2)	(1,5)	(1,6)	(1,4)	(1,1)	(1,6)	(1,4)	(1,6)	(1,5)	(1,2)	(1,5)

* Escala linear não estruturada de 9cm (0=fraca/pouca/fraco; 9=forte/muita/forte). Média de 10 julgamentos, com repetição.

PTS = proteína texturizada de soja (Maxten E-100); PCS=proteína concentrada de soja (Proteimax TR120);

PIS=proteína isolada de soja (Supro 500E)

^{a, b, c, d} Médias com letras em comum na mesma linha, representam tratamentos que não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$)

() Desvio-padrão

Quadro 2. Parâmetros físicos de cor e força de compressão de salsichões com incrementos de proteínas de soja.

Parâmetros físicos	Teores de adição de proteínas de soja											
	PTS (%)				PCS (%)				PIS (%)			
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
Cor objetiva												
L*	59,49 ^a	59,61 ^a	59,84 ^a	58,00 ^b	59,49 ^a	59,34 ^a	60,26 ^a	59,58 ^a	59,49 ^b	59,83 ^b	60,34 ^{a,b}	61,10 ^a
	(0,64)	(0,21)	(1,01)	(0,66)	(0,64)	(0,32)	(1,08)	(0,35)	(0,64)	(0,67)	(0,42)	(0,09)
a*	12,30 ^d	13,23 ^c	13,92 ^b	14,90 ^a	12,30 ^a	12,11 ^{a,b}	11,70 ^{b,c}	11,52 ^c	12,30 ^a	12,02 ^a	11,55 ^b	10,63 ^c
	(0,25)	(0,15)	(0,15)	(0,27)	(0,25)	(0,15)	(0,34)	(0,07)	(0,25)	(0,21)	(0,20)	(0,07)
b*	9,12 ^a	8,74 ^{a,b}	8,70 ^{a,b}	8,22 ^b	9,12 ^{a,b}	8,02 ^b	9,11 ^{a,b}	9,64 ^a	9,12 ^c	10,08 ^a	10,18 ^a	9,99 ^b
	(0,20)	(0,26)	(0,70)	(0,09)	(0,20)	(0,51)	(1,13)	(0,41)	(0,20)	(0,13)	(0,11)	(0,08)
Força de compressão (g)	11.759 ^{a,b}	13.127 ^a	11.591 ^{a,b}	11.104 ^b	11.759 ^b	13.246 ^a	12.207 ^{a,b}	12.068 ^{a,b}	11.759 ^a	10.945 ^{a,b}	10.234 ^b	8.520 ^c
	(593)	(201)	(918)	(1.146)	(593)	(730)	(380)	(800)	(593)	(580)	(326)	(384)

PTS = proteína texturizada de soja (Maxten E-100); PCS=proteína concentrada de soja (Proteimax TR120);

PIS=proteína isolada de soja (Supro 500E)

^{a, b, c, d} Médias com letras em comum na mesma linha, representam tratamentos que não diferem significativamente entre si (p>0,05).

() Desvio-padrão

Composição e estabilidade da emulsão de salsichão Lionês com proteínas de soja¹

¹Trabalho apresentado no I Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2001, São Pedro. Anais p.321-322.

INTRODUÇÃO

Na atualidade, a soja é a maior fonte de proteína vegetal para a nutrição humana. Segundo a Resolução nº 14/78 da CNNPA (BRASIL, 1978)¹, as proteínas de soja dos tipos isolada (PIS), concentrada (PCS) e texturizada (PTS) com teores protéicos (Nx6,25) mínimos 88,0, 68,0 e 50,0% (base seca), umidade máxima 6,0, 5,0 e 8,0%, gordura máxima 0,5, 1,0 e 2,0%, cinzas máxima 6,0, 5,0 e 6,5% e fibra bruta máxima 1,0, 5,0 e 4,0% respectivamente, são utilizadas como ingredientes de alimentos de fonte protéica e como “extensor” em produtos cárneos. As proteínas de soja são incorporadas com a finalidade de melhoramento das características funcionais de retenção de água, estabilidade da emulsão e redução dos custos de produção. O aspecto comercial estimula o incremento da porcentagem de adição destas proteínas. A porcentagem de adição de proteínas não cárneas como proteína agregada nos embutidos emulsionados tipo salsicha e mortadela, que era 3,5% passou a 4% pela Instrução Normativa nº 4/00 do MAA (BRASIL, 2000)².

OBJETIVOS

Avaliação da composição centesimal, valor de pH e estabilidade da emulsão de salsichão Lionês formulado com teores de 0; 0,5; 2,0; 4,0 e 6,0% de proteínas de soja dos tipos isolada (PIS), concentrada (PCS) e texturizada (PTS).

MATERIAIS E MÉTODOS

Processamento de salsichão Lionês adicionado de farinhas de soja dos tipos PIS (Purina 500E, pó cor natural), PCS (Proteimax TR-120, texturizada cor natural) e PTS (Maxten E-100, pó cor vermelha) nas concentrações 0; 0,5; 2,0; 4,0 e 6,0%. O salsichão controle (0%), sem a

adição de proteína de soja, foi formulado com dianteiro bovino (56%), carne mecanicamente separada de frango (12,5%), toucinho costal-lombar (17,25%), gelo (9,18%) e ingredientes de porcentagem fixa como sal (1,5%), nitrito de sódio (0,015%), tripolifosfato de sódio (0,5%), eritorbato de sódio (0,05%), condimento para salsicha (1%) e fécula de mandioca (2%). Através de planilha de cálculo, procedeu-se as correções das formulações pela adição das diferentes concentrações de proteínas de soja, variando as porcentagens de dianteiro bovino, toucinho e gelo, mantendo constante o teor de gordura a 20% e relação umidade/proteína 4,7. O processamento da massa foi em planta piloto, utilizando homogeneizador de carne tipo cutter (Kraemer & Grebe) num tempo aproximado de 12 minutos. A proteína de soja (na forma seca) foi adicionada com 4 minutos de processo, após a adição das carnes, sal, condimentos, polifosfato e gelo, antes do toucinho, fécula de mandioca e eritorbato. Uso de embutideira descontínua (Kraemer & Grebe) para enchimento da tripa artificial K plus (CaseTech) barreira a vapor de água e gases, calibre 60mm, cor vermelha. Cozimento do salsichão em estufa (Becker) utilizando vapor seco à 60°C/20minutos e 70°C/20minutos, em seguida injeção direta de vapor a 82-85°C até atingir temperatura interna de 72°C. **Análises físico-químicas:** as matérias-primas cárneas, proteínas de soja e salsichões foram triturados em multiprocessador, homogeneizados e analisados em duplicata quanto aos teores de umidade (estufa à 105°C), gorduras (Soxhlet), proteínas (Kjeldahl) e cinzas (mufla à 550°C) segundo as Normas Analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ³. A relação umidade / proteína (U/P) foi obtida por cálculo. Nas matérias-primas cárneas e proteínas de soja fez-se a leitura do pH após diluição 1:10 em água destilada (duplicata de leitura). A determinação de pH foi pela inserção do eletrodo de punção na massa crua (duplicata de leitura), em três salsichões por tratamento (duplicata de leitura por salsichão) e 6 latas por tratamento.

Estabilidade da emulsão: método gravimétrico de conservas esterilizadas⁴. Conhecido o peso da massa emulsionada de uma lata cilíndrica ($\varnothing=50\text{mm}$, $h=70\text{mm}$), peso cheio 120-140g, procedeu-se a recravação manual das latas. A esterilização em autoclave vertical fixa atingiu um F_0 de 6,41 minutos a $121,1^\circ\text{C}$ (vapor saturado). A evolução do processo foi controlada por meio de termopares tipo T (cobre-constantan) revestidos com braquelite, inseridos no centro geométrico. Seis latas por tratamento foram mantidas à $40^\circ\text{C}/2\text{h}$, procedendo-se pesagem e cálculo da porcentagem de gordura e gelatina liquefeitos, separados juntos por inversão da lata. **Análise estatística:** os resultados foram submetidos à ANOVA e teste de médias de Tukey, ao nível de erro de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No *Quadro 3* tem-se os valores de composição centesimal e pH das matérias-primas cárneas e proteínas de soja texturizada (PTS), concentrada (PCS) e isolada (PIS) utilizadas no processamento de salsichão Lionês. Estes valores foram utilizados na planilha de cálculo de formulação dos tratamentos com os diferentes teores de proteínas de soja. Como esperado, é grande a variação dos valores de composição das matérias-primas cárneas. As proteínas de soja estão de acordo com a legislação vigente quanto aos teores máximos de umidade e cinzas. O teor de gordura da PIS (0,74g%) está ligeiramente acima do limite máximo exigido (0,5%) e os teores de proteínas da PIS (86,10 g%) e PCS (66,12 g%) estão ligeiramente abaixo dos valores mínimos estabelecidos (88,0% e 68,0%). No *Quadro 4* tem-se resumido a composição centesimal, relação U/P, valores de pH e porcentagem de separação de gelatina e gordura dos tratamentos com 0; 0,5; 2,0; 4,0 e 6,0% de PTS, PCS e PIS. Pode-se observar que, a adição de

teores de 4 e 6% de PTS, PCS e PIS resultou em redução significativa ($p < 0,05$) dos teores de umidade dos tratamentos comparados ao controle. Uma vez fixado o teor de gordura das formulações em 20%, não houve diferença entre as concentrações de PTS, PCS e PIS, permanecendo os teores de gorduras nas faixas de 19,20 a 19,82 g%, 19,58 a 20,38 g% e 19,58 a 20,73g%, respectivamente. Houve variação significativa ($p < 0,05$) no teor de proteínas dos salsichões adicionados de PTS, revelando redução nos valores a partir de 2% de adição. Os teores de cinzas variaram entre os tratamentos com PTS, onde as adições de 4 e 6% resultaram valores ligeiramente superiores, lembrando que esta proteína tem o dobro do teor de cinzas comparado a PCS e PIS. A relação U/P fixada em 4,7 na planilha de cálculo, apresentou pequena faixa de variação, de 4,64 a 4,88 para os tratamentos. O pH da massa crua diferiu entre os tratamentos com PTS, PCS e PIS. A adição de 6% de PTS e PCS resultou em ligeira elevação do pH da massa crua, o mesmo acontecendo para 4% e 6% de PIS. O tratamento térmico de pasteurização elevou os valores de pH do salsichão em aproximadamente 0,2 unidade, que está de acordo com Della Torre e Felício (1992)⁴. A mesma tendência de elevação do pH foi observado pela adição de 2, 4 e 6% de PTS, 6% de PCS e 4 e 6% de PIS no salsichão pasteurizado. O pH da massa esterilizada em latas apresentou elevações da ordem de 0,02 a 0,09 unidades comparado aos valores de salsichão pasteurizado. Somente a massa esterilizada com 6% de PIS resultou em aumento significativo do valor de pH comparado ao controle. A variação da temperatura final da massa na saída do cutter foi de 9,9 a 14,0°C para os tratamentos, estando dentro dos limites de segurança para evitar a quebra da emulsão. A separação de gelatina e gordura de conservas esterilizadas revelou diferenças significativas pela adição de PTS e PCS. A partir de 2% de PCS e 6% de PTS houve diminuição da separação de gelatina e gordura e portanto aumento na estabilidade da emulsão.

CONCLUSÕES

Adições de 4 e 6% de proteínas de soja texturizada (PTS), concentrada (PCS) e isolada (PIS) reduziram os teores finais de umidade de salsichão Lionês. A partir da concentração de 2% de PTS adicionado, houve redução dos teores de proteína dos salsichões. Aumento na concentração de cinzas pela adição de 4 e 6% de PTS. Tendência de elevação do pH do salsichão pela adição de 2, 4, e 6% de PTS, 6% de PCS e 4 e 6% de PIS. O teor de adição de 6% de proteína de soja texturizada (Maxten E-100) e 2% de concentrada (Proteimax TR-120) revelaram-se favoráveis na estabilização de emulsões. A proteína isolada de soja (Supro 500E) não revelou vantagens na estabilização de emulsões, esta proteína está em desuso no processamento de produtos cárneos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ BRASIL.Leis, decretos, etc. Resolução nº14/1978. **Diário Oficial**, Brasília, 28 junho de 1978, Seção I – Parte I, p.9896-9900.
- ² BRASIL.Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº4, 31 de mar. 2000. **Diário Oficial**, Brasília, 05 abr. 2000, Seção 1, p.6-10.
- ³ INSTITUO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. Vol.1, 3ª ed., São Paulo, 1985.
- ⁴ DELLA TORRE, J. C. de M.; FELÍCIO, P. E. de. Effects of Prerigor Beef and Sodium Tripolyphosphate on the Characteristics of Frankfurter-type Sausage. **Proceedings of 38th Int. Congress of Meat Science and Technology**. Clermond-Ferrand, France, Vol.5:1047-1050, 1992.

Quadro 3. Composição centesimal e valores de pH das carnes e proteínas de soja utilizadas nas formulações.

Análises	Matérias-primas cárneas			Proteínas de soja		
	Dianteiro bovino	CMS de frango	Toucinho	PIS	PCS	PTS
Umidade (g%)	73,07 (0,24)	62,80 (1,56)	17,96 (1,04)	5,55 (0,01)	4,50 (0,12)	3,07 (0,05)
Gorduras (g%)	6,79 (0,07)	25,22 (0,93)	75,16 (0,93)	0,74 (0,04)	0,81 (0,01)	0,94 (0,05)
Proteínas (g%) BS	19,16 (0,24)	11,18 (0,38)	5,64 (0,88)	86,10 (0,14)	66,12 (9,57)	52,53 (1,00)
Cinzas (g%)	0,94 (0,02)	0,71 (0,01)	0,25 (0,01)	3,86 (0,02)	3,84 (0,04)	6,09 (0,07)
pH	5,74 (0,02)	6,33 (0,01)	5,79 (0,03)	6,91 (0,02)	6,74 (0,01)	6,82 (0,02)

() Desvio-padrão

PTS = prot. texturizada de soja (Maxten E-100)

PCS=prot. concentrada (Proteimax TR120)

PIS=prot. isolada (Supro 500E)

BS = Base seca

Quadro 4. Composição centesimal, valores de pH e estabilidade da emulsão de salsichões adicionados de proteínas de soja.

Parâmetros avaliados	Teores de adição de proteínas de soja em salsichão Lionês														
	PTS (%)					PCS (%)					PIS (%)				
	0	0,5	2,0	4,0	6,0	0	0,5	2,0	4,0	6,0	0	0,5	2,0	4,0	6,0
Umidade (g %)	62,02 ^a (0,01)	61,89 ^a (0,14)	61,75 ^a (0,10)	60,75 ^b (0,07)	60,24 ^c (0,16)	62,02 ^a (0,01)	61,69 ^{a,b} (0,05)	61,13 ^{a,b} (0,28)	60,82 ^{b,c} (0,40)	60,42 ^c (0,13)	62,02 ^a (0,01)	61,18 ^{a,b} (0,35)	60,97 ^{a,b} (0,49)	60,57 ^b (0,08)	60,76 ^b (0,16)
Gorduras (g %)	19,58 ^a (0,52)	19,45 ^a (0,51)	19,20 ^a (0,25)	19,82 ^a (0,55)	19,59 ^a (0,18)	19,58 ^a (0,52)	19,98 ^a (0,60)	20,30 ^a (0,02)	20,38 ^a (0,41)	20,05 ^a (0,90)	19,58 ^a (0,52)	20,73 ^a (0,75)	20,26 ^a (0,28)	20,60 ^a (0,54)	20,35 ^a (0,48)
Proteínas (g %)	13,14 ^a (0,15)	12,83 ^{a,b} (0,09)	12,67 ^{b,c} (0,07)	12,72 ^{b,c} (0,11)	12,35 ^c (0,01)	13,14 ^a (0,15)	12,83 ^a (0,05)	12,95 ^a (0,21)	12,74 ^a (0,25)	12,52 ^a (0,06)	13,14 ^a (0,15)	12,91 ^a (0,21)	13,15 ^a (0,45)	13,03 ^a (0,25)	12,82 ^a (0,09)
Cinzas (g %)	3,33 ^b (0,04)	3,34 ^b (0,01)	3,35 ^b (0,09)	3,52 ^a (0,05)	3,53 ^a (0,01)	3,33 ^a (0,04)	3,28 ^a (0,10)	3,40 ^a (0,05)	3,32 ^a (0,02)	3,30 ^a (0,03)	3,33 ^a (0,04)	3,32 ^a (0,03)	3,29 ^a (0,07)	3,36 ^a (0,01)	3,29 ^a (0,03)
Total (g %)	98,07	97,51	96,97	96,81	95,71	98,07	97,78	97,78	97,26	96,29	98,07	98,14	97,67	97,56	97,22
Relação U/P	4,72	4,82	4,87	4,78	4,88	4,72	4,81	4,72	4,77	4,82	4,72	4,74	4,64	4,65	4,74
pH massa crua	5,99 ^{b,c} (0,01)	5,94 ^c (0,01)	5,98 ^{b,c} (0,01)	6,01 ^b (0,01)	6,06 ^a (0,01)	5,99 ^{b,c} (0,01)	5,95 ^d (0,00)	5,97 ^{c,d} (0,00)	6,00 ^b (0,00)	6,06 ^a (0,00)	5,99 ^c (0,01)	5,93 ^d (0,00)	6,00 ^c (0,00)	6,07 ^b (0,00)	6,12 ^a (0,00)
pH massa past..	6,18 ^d (0,01)	6,19 ^{c,d} (0,01)	6,21 ^c (0,01)	6,24 ^b (0,01)	6,26 ^a (0,01)	6,18 ^{b,c} (0,01)	6,17 ^c (0,01)	6,18 ^{b,c} (0,01)	6,20 ^b (0,01)	6,22 ^a (0,00)	6,18 ^c (0,01)	6,16 ^c (0,01)	6,18 ^c (0,01)	6,23 ^b (0,01)	6,28 ^a (0,01)
pH massa esteril.	6,23 ^a (0,06)	6,22 ^a (0,05)	6,23 ^a (0,06)	6,23 ^a (0,06)	6,24 ^a (0,06)	6,23 ^a (0,06)	6,24 ^a (0,07)	6,25 ^a (0,07)	6,25 ^a (0,06)	6,28 ^a (0,08)	6,23 ^b (0,06)	6,20 ^b (0,06)	6,24 ^b (0,07)	6,32 ^{a,b} (0,07)	6,37 ^a (0,10)
Sep. gelatina e gordura (g %)	2,91 ^{b,c} (1,13)	8,11 ^a (0,60)	3,49 ^b (0,43)	1,80 ^{c,d} (0,83)	0,88 ^d (0,53)	2,91 ^a (1,14)	1,85 ^{a,b} (0,84)	0,82 ^b (0,52)	1,22 ^b (0,70)	0,74 ^b (0,41)	2,91 ^a (1,14)	2,58 ^a (1,06)	2,92 ^a (0,74)	1,91 ^a (0,79)	2,39 ^a (1,37)

() Desvio-padrão ^{a,b,c,d} Médias com letras em comum na mesma linha, representam tratamentos que não diferem significativamente entre si (p>0,05).

PTS = proteína texturizada de soja (Maxten E-100); PCS=proteína concentrada de soja (Proteimax TR120); PIS=proteína isolada (Supro 500E)

CAPÍTULO 4

QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA E COLÁGENO EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

**Validação do método espectrofotométrico para
quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas
de carne¹**

¹Artigo técnico-científico aprovado pela Comissão de Publicações Oficiais da Revista do Instituto Adolfo Lutz (ISSN 0073-9855), v.63, n.1, 2004 (no prelo)
--

RESUMO. A validação tem por objetivo assegurar que o método analítico é adequado ao que se propõe quantificar e pode ser realizada por estudos interlaboratoriais ou intralaboratoriais. A exatidão é um dos principais fatores a serem estabelecidos na validação, podendo ser avaliada com o uso de materiais de referência. Os métodos espectrofotométricos são os mais utilizados na quantificação do aminoácido hidroxiprolina na rotina de análise de colágeno devido à precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez. Este trabalho teve por objetivo validar intralaboratorialmente a metodologia espectrofotométrica oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para quantificação do aminoácido hidroxiprolina utilizando amostras de conservas de carne de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK (Food Analysis Performance Assessment Scheme / Ministry of Agriculture, Fisheries and Food / United Kingdom), como material de referência. A curva de padronização apresentou linearidade ($r=0,9991$) na faixa utilizada. O método revelou limite de quantificação de hidroxiprolina na alíquota de análise de $0,030 \mu\text{g/mL}$ com desvio padrão relativo de 6,5% e na amostra $0,0075\text{g}/100\text{g}$. As taxas de recuperação variaram de 90 a 95% determinadas em 3 níveis de concentração da amostra FAPAS fortificada. As taxas de repetitividade obtiveram CV (coeficiente de variação) inferiores a 4%. A participação em nove séries do programa interlaboratorial de proficiência FAPAS/MAFF/UK no período de 1997 a 2003 revelou boa exatidão com resultados satisfatórios em 89% dos casos. A metodologia apresentou-se eficiente quando aplicada a conservas de carne, podendo ser considerada validada intralaboratorialmente.

PALAVRAS-CHAVE. Validação; hidroxiprolina; método espectrofotométrico; determinação quantitativa, colágeno, conserva de carne.

INTRODUÇÃO

Com a implantação dos Programas de Qualidade nos Institutos de Pesquisa, tornou-se necessário a participação em programas interlaboratoriais e a validação de métodos analíticos. Através desses programas é possível auto-avaliar, comparar resultados obtidos usando diferentes técnicas analíticas, testar metodologias, avaliar o desempenho do laboratório e obter materiais de referência certificados. O “Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) - CSL Food Science Laboratory – Ministry of Agriculture, Fishries and Food (MAFF), UK” tem sido o programa interlaboratorial de análise de alimentos mais utilizado no Reino Unido e em vários países do mundo⁵. Segundo o FAPAS⁸, com a finalização dos resultados, tendo-se estabelecido a concentração do analito, as amostras excedentes podem ser utilizadas como material “quase-referência”, da mesma maneira que os materiais de referência certificados (CRMs). Materiais de teste FAPAS não são CRMs porém, como materiais certificados na área de alimentos são escassos, muitas vezes poderão ser a única fonte de referência disponível⁸.

O laboratório, ao empregar métodos de ensaios químicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los¹⁴.

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico, podendo ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, através de testes de recuperação e um ou dois dos enfoques seguintes, o

analista pode validar um método analítico: a) comparação com um método independente; b) emprego de material de referência certificado. Interlaboratorialmente, a validação pode ser obtida através de um estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Nota-se que o método escolhido que já foi objeto de um estudo colaborativo; ainda assim está obrigado a ser validado intralaboratorialmente para provar que pode ser usado no laboratório²⁷.

Validação é um conjunto de operações necessárias para demonstrar que um procedimento é adequado para a aplicação pretendida. A validação de um método analítico tem por objetivo o conhecimento de seu potencial aplicativo e de suas limitações, sendo essencial para a correta interpretação dos resultados obtidos na aplicação do método. O processo de validação tem o objetivo de explicar a repetitividade e a reprodutibilidade de um método, pela interpretação dos parâmetros que definem a exatidão e a precisão do mesmo. A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea em idênticas condições em curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade difere da repetitividade por utilizar laboratórios, operadores e equipamentos diferentes, entre outros¹.

O processo de validação de um teste quantitativo exige além do conhecimento já mencionado da exatidão e da precisão, o conhecimento da especificidade, do limite de quantificação e da linearidade. O limite de detecção deverá ser estabelecido somente nas análises de impurezas e ensaios limite¹.

Os métodos de análise devem apresentar especificidade, pois os alimentos são de constituição química complexa, podendo seus componentes interferir nos resultados. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico¹⁴.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como, por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O termo “*limite de detecção*” não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais. O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito¹⁴.

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade na qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio¹⁴.

Linearidade é a habilidade das respostas analíticas serem diretamente proporcionais às concentrações das substâncias em estudo^{1,19}. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante. O limite inferior deve ser igual ou maior do que o limite de detecção do método. As etapas de diluição e concentração devem ser praticadas sem o risco de introduzir erros sistemáticos (*bias*). A

linearidade da curva de calibração pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado livre de tendências (*unbiased*) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem¹⁴.

Os valores da curva analítica não devem apresentar valores aberrantes e devem apresentar homoscedasticidade. Homoscedasticidade ou heteroscedasticidade é a independência ou dependência da variância das respostas com as concentrações do analito. Se o valor da maior variância dividido pelo somatório das variâncias for menor que o tabelado de Cochran, o método é homoscedástico, e, portanto, a curva analítica pode ser construída pelo método dos mínimos quadrados normais¹.

O limite de quantificação é a mais baixa concentração do analito em exame que pode ser determinada com limite de confiabilidade aceitável utilizando um determinado procedimento experimental¹. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Algumas vezes é também denominado “limite de determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se as exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias¹⁴.

Exatidão do método é definida como sendo a concordância dos valores experimentais com o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro¹. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de

materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação¹⁴. A taxa de recuperação é definida como a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito (*spike*), e o valor teórico desta quantidade fortificada¹. O analito deve ser adicionado à amostra em pelo menos três diferentes concentrações¹⁴. A faixa de variação de recuperação aceitável é de 70 a 110% e deve ser expressa para cada nível de concentração estudado¹.

A presença da hidroxiprolina no colágeno, representando aproximadamente 14% do mesmo, é uma característica particular da proteína porque este aminoácido ocorre somente em poucas proteínas, a saber, elastina (1,6%), e em menor extensão na proteína do complemento do soro (C1q), e em algumas proteínas vegetais²³. Por causa desta composição incomum, é grande o interesse no desenvolvimento de métodos acurados na quantificação deste aminoácido, que permite quantificar indiretamente o teor de colágeno.

Segundo a AOAC², a hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida do material colagenoso em carne e produtos cárneos. O tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina quando o fator de conversão de nitrogênio a proteína 6,25 é utilizado, ou 14% quando o fator é 5,55.

A detecção e a determinação acurada de hidroxiprolina é um requerimento essencial para a ciência e tecnologia de carnes que busca explicar a verdadeira contribuição do colágeno para a estrutura e qualidade da carne. Em geral, a carne com elevada proporção de tecido conjuntivo é considerada de baixa qualidade, devido à redução da sua maciez e valor nutricional²⁵, estando grande parte dos aminoácidos essenciais em proporção acentuadamente reduzida, e o triptofano comumente ausente³. O tecnólogo de alimentos também requer

técnicas analíticas confiáveis para auxiliar no controle de qualidade de um produto uniforme, que também esteja de acordo com a legislação vigente quanto à sua composição. Dependendo da natureza da investigação e da amostra, há vários métodos para a detecção de proteínas colagenosas do tecido conjuntivo e quantificação do aminoácido hidroxiprolina, a saber: **a)** espectrometria de ressonância magnética nuclear¹⁷, **b)** técnica ELISA para a determinação dos vários componentes do tecido conjuntivo⁷; **c)** métodos histoquímicos^{9,10,13,26}, **d)** cromatografia em fase gasosa com detector de massa¹⁵, **e)** cromatografia líquida de alta eficiência²⁴; **f)** espectroscopia de transmissão no infravermelho próximo⁴; **g)** análise de aminoácidos^{12,21,28,29} e **h)** espectrofotometria ou colorimetria^{11,16,18,20,22}. Alguns dos métodos citados podem ser tão bons quanto os colorimétricos, contudo muitos deles necessitam operadores e equipamentos especializados resultando custo elevado, não sendo apropriados para um grande número de amostras⁷.

Na determinação espectrofotométrica da concentração de hidroxiprolina, a amostra é inicialmente hidrolisada com ácido para liberar a hidroxiprolina da ligação peptídica. Isto é geralmente alcançado com H₂SO₄ 3,5M a 105°C por 16h em tubos fechados ou com HCl 6M a 110°C por 8-24h sob refluxo. O aminoácido livre é determinado colorimetricamente após oxidação a pirrol (FIGURA 8) e reação com 4-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Ehrlich) resultando um composto de coloração vermelho-púrpura. A cloramina T é atualmente o agente oxidante preferido na formação do pirrol.

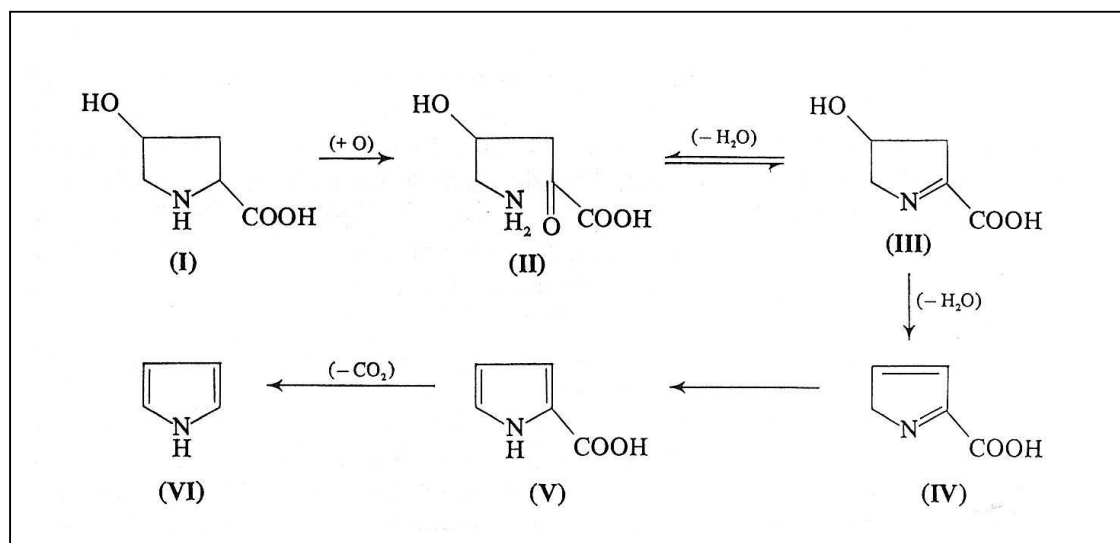


Figura 8. Mecanismo proposto para a oxidação da hidroxiprolina a pirrol. Hidroxiprolina (**I**) é oxidada inicialmente a ácido α -ceto- γ -hidroxi- δ -aminovalérico linear (**II**), o qual está em equilíbrio com a estrutura cíclica de ácido Δ' -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico (**III**). A perda da molécula de água resulta uma estrutura instável (**IV**) a qual, espontaneamente, através de rearranjo, resulta em ácido pirrol-2-carboxílico (**V**). A etapa final de descarboxilação a pirrol (**VI**) ocorre durante o aquecimento após a adição do reagente cromogênico, 4-dimetilaminobenzaldeído⁷.

Na existência de uma legislação que estabeleça teores máximos de proteína do tecido conjuntivo colagenoso em carnes e produtos cárneos, o teor de colágeno deve ser determinado com segurança, havendo a necessidade de métodos de análise de rotina que sejam simples, confiáveis e suficientemente rápidos.

No Brasil, a validação dos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, mas desconhecem-se relatos sobre a validação de métodos para a quantificação do aminoácido hidroxiprolina.

O objetivo do presente trabalho foi validar intralaboratorialmente o procedimento de análise quantitativa na determinação do aminoácido hidroxiprolina segundo método

espectrofotométrico oficial preconizado pela AOAC (1996)², utilizando amostras de conservas de carne de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Amostras

Para a validação do método utilizaram-se amostras de conservas de carne esterilizadas (FIGURA 9) de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK. As amostras denominadas “canned meat test material” foram analisadas quanto aos teores de hidroxiprolina, no período de 1997 a 2003, correspondendo essas análises à participação do Laboratório em 9 séries (“Rounds”) do programa interlaboratorial. De acordo com os procedimentos do FAPAS, o material teste constituiu-se de porcentagens variáveis de carne suína, toucinho, farinha de rosca, água e sal que foram homogeneizados em “cutter”, envasados a vácuo em latas cilíndricas de aproximadamente 150g e autoclavados a um tempo de esterilização (F_0) pré-estabelecido.



Figura 9. Amostra de conserva de carne para estudo de controle interlaboratorial FAPAS na quantificação de hidroxiprolina

1.2. Padrão

Foi preparada uma solução padrão de hidroxiprolina em água (Merck, para fins bioquímicos) na concentração de 839µg/mL, por pesagem direta de 0,1678g em 200mL de água destilada.

1.3. Reagentes

Os solventes orgânicos n-propanol e 2-propanol utilizados foram de grau espectrofotométrico; os demais reagentes utilizados foram de grau pureza analítica.

1.4. Equipamentos

Trabalhou-se com espectrofotômetro ultravioleta e visível (HP-8453 gerenciado pelo software UV-VIS Chemistation), balança analítica (Bosch SAE200), pHmetro digital (Hanna HI 93321), banho-maria termostaticado a 60°C (Fanem - Unitemp).

2. Métodos

2.1. Procedimento de análise quantitativa

A determinação da hidroxiprolina seguiu metodologia preconizada pela AOAC² e estabelecida por DELLA TORRE et al.⁶, onde a amostra (4,00g) foi hidrolisada sob refluxo com 30 mL de ácido clorídrico 6M por 8h a 110°C, filtrada e diluída. A hidroxiprolina foi oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0 (temperatura ambiente, 20 minutos). O pirrol com o reagente de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldeído em ácido

perclórico/2-propanol) a 60°C por 15 minutos forma um complexo vermelho-púrpura, que, segundo a metodologia oficial, deve ser medido a 560nm. Neste estudo, o estabelecimento do comprimento de onda de máxima absorção foi obtido através da varredura espectrofotométrica de uma solução padrão de hidroxiprolina, diluída a 0,030µg/mL, submetida ao procedimento acima. A quantificação das amostras realizou-se pelas interpolações dos resultados de absorbância colocadas na equação de regressão linear da reta padrão.

2.2. Linearidade

A linearidade foi observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r) da curva analítica, das soluções padrão de hidroxiprolina, tratadas pelo procedimento, distribuídas uniformemente no intervalo de trabalho¹⁴.

2.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido como o padrão de calibração da curva analítica de menor concentração (excluindo o branco) medido de forma quantitativa com nível aceitável de precisão e exatidão¹⁴.

2.4. Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente ao teste de linearidade e expressa pelo coeficiente angular da curva de calibração, sendo dependente da natureza do analito e da técnica de detecção¹⁴.

2.5. Recuperação

A amostra de conserva de carne obtida em estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF (“Round 25”) foi previamente avaliada para o teor do aminoácido hidroxiprolina. Os testes de recuperação foram realizados com a adição de 5, 10 e 20 mL de solução padrão de hidroxiprolina na concentração de 839 µg/mL à amostra FAPAS, em triplicata, a fim de se obter os níveis de concentração de hidroxiprolina na alíquota de análise de 0,280 (metade da concentração determinada da amostra de conserva FAPAS); 0,559 (igual) e 1,119 µg/mL (dobro). A recuperação foi calculada pela relação entre a concentração determinada e a teórica (adicionada no início do procedimento) após seguir o procedimento analítico completo¹.

2.6. Precisão

2.6.1. Repetitividade

O estudo da repetitividade abrangeu a determinação de hidroxiprolina de amostras de conserva cárnea (FAPAS, “Round” 25), adicionadas de padrão hidroxiprolina (839 µg/mL) nos três níveis de concentração (dobro, igual e metade da concentração esperada), em triplicata. A repetitividade foi expressa pela dispersão dos resultados entre as replicatas nos níveis de

concentração de adição do padrão, através do coeficiente de variação (%CV). As determinações foram realizadas no mesmo dia e com o mesmo analista¹.

2.7. Exatidão

A exatidão do procedimento analítico de quantificação de hidroxiprolina foi expresso pelo valor-z, representando grau de concordância entre os resultados laboratoriais individuais encontrados e os valores aceitos como referência nos estudos de análise de controle interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK (resultados FAPAS), no período de 1997 a 2003.

2.8. Tratamento estatístico dos dados

2.8.1. Determinação de valores aberrantes

Na verificação se o menor e/ou maior valor era aberrante ou se não fazia parte da população de valores gerados durante as etapas de validação do método, utilizou-se o teste de Grubbs para o nível de significância de 0,05. O valor y_{ij} foi considerado aberrante quando G calculado era maior ao tabelado em função do número de replicatas (n), conforme a equação¹:

$$G = (y_{ij} - \bar{y})/s$$

Onde:

y_{ij} = valor suspeito de ser aberrante

$\bar{y}$ = média dos valores obtidos

s = desvio padrão dos valores obtidos

Valores tabelados: $n=3$, $G_{\text{tab}}=1,15$; $n=4$, $G_{\text{tab}}=1,48$; $n=5$, $G_{\text{tab}}=1,72$

2.8.2. Homoscedasticidade / heteroscedasticidade

A homoscedasticidade foi avaliada através do método de Cochran¹, em quadruplicata para os 5 pontos da curva analítica (0,030 – 2,718µg/mL), calculando-se as variâncias das respostas de absorbância de cada ponto de concentração, dividindo-se a maior variância (S^2) pela somatória das variâncias ($\sum S^2$) e comparação do valor obtido com o valor tabelado, segundo a fórmula: $c_{cal} = S^2_{maior} / \sum S^2$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de hidroxiprolina segundo método AOAC², aplicando-se o procedimento a um padrão diluído, revelou um pico máximo de absorbância no comprimento de onda de 559nm. Na TABELA 6 estão apresentados os resultados de absorbância, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e variância obtidos na análise das soluções padrão de hidroxiprolina para as cinco diferentes concentrações, utilizadas na elaboração da curva analítica.

A determinação da homoscedasticidade / heteroscedasticidade verificada através do método de Cochran ($c_{cal} = S^2_{maior} / \sum S^2$) revelou c_{cal} igual a 0,525 para os resultados de variância estabelecida na TABELA 6. Como c_{cal} é menor que c_{tab} (0,684 para 5 pontos) concluiu-se que o método é homoscedástico. Como o critério de homoscedasticidade foi cumprido, a curva de calibração foi calculada pelo método dos quadrados mínimos, revelando a equação da reta $y=0,3917x+0,0182$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9991 (FIGURA 10). Desta forma fica estabelecido a linearidade da curva analítica pela proximidade de r ao

valor 1 e a sensibilidade de $0,3917 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ expressa pela inclinação da curva de regressão linear (coeficiente angular da reta).

Tabela 6. Resultados da análise das soluções padrão de hidroxiprolina segundo método espectrofotométrico AOAC².

Solução padrão hidroxiprolina* ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância (559nm)	DP	CV (%)	Variância
0,030	0,014	0,001	6,5	0,0000009
0,604	0,268	0,003	1,2	0,0000096
1,359	0,558	0,015	2,7	0,0002260
1,963	0,794	0,010	1,2	0,0000940
2,718	1,071	0,014	1,3	0,0001930

* Análises realizadas em quadruplicata DP = desvio padrão CV=coeficiente de variação

O limite de quantificação de hidroxiprolina na alíquota de análise ficou definido como $0,030 \mu\text{g/mL}$ com desvio padrão relativo de 6,5% (TABELA 6) e de $0,0075\text{g}/100\text{g}$ de hidroxiprolina na amostra. A curva analítica abrangeu de $0,030 \mu\text{g/mL}$ a $2,718 \mu\text{g/mL}$ de hidroxiprolina, limite superior com desvio padrão relativo de 1,3%.

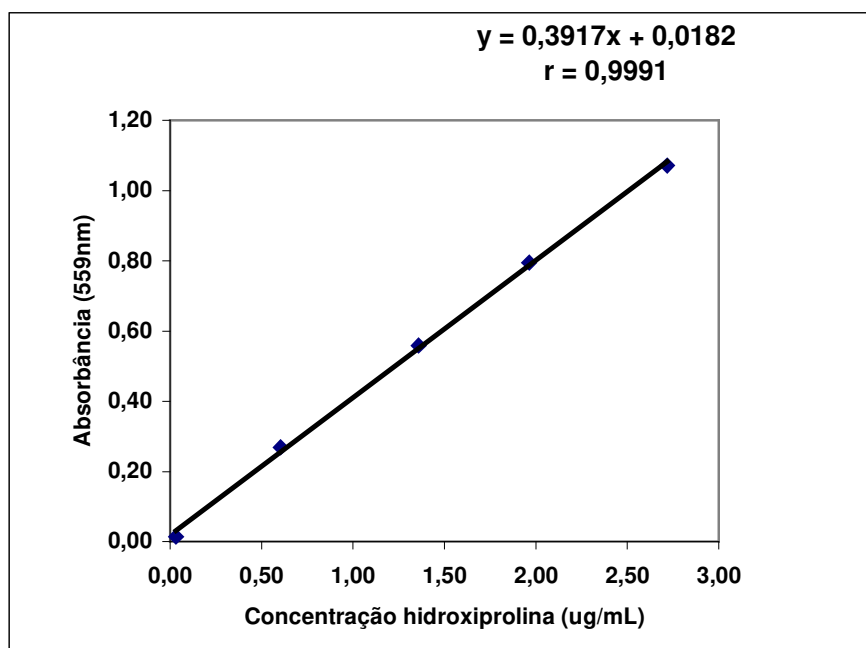


Figura 10. Curva analítica de determinação do aminoácido hidroxiprolina

As taxas de recuperação de hidroxiprolina das amostras de conservas de carne FAPAS adicionadas de padrão em 3 níveis de concentração, foram calculadas pela relação entre a concentração média determinada e a concentração média teórica (adicionada) para cada nível de concentração estudado (TABELA 7). Os resultados revelaram as taxas de recuperação de 92,9, 94,6 e 90,5%, respectivamente, para as concentrações finais teóricas metade, igual e dobro. A recuperação média de 92,7%, embora ligeiramente inferior a 96,1%, obtida no estudo colaborativo de Kolar¹⁸, mostra-se dentro do intervalo aceito 70 – 110%¹. A repetitividade expressa pela dispersão dos resultados entre replicatas através do coeficiente de variação, revelou valores de CV inferiores a 3,9%. Não houve suspeitas de valores aberrantes.

Tabela 7. Taxas de recuperação dos padrões de hidroxiprolina adicionados em amostras de conserva de carne FAPAS.

Níveis	Concentração (alíquota) adicionada* (µg/mL)	Concentração (alíquota) determinada (µg/mL)	Concentração média determinada (µg/mL)	DP	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DP	CV (%)
I	0,28	0,27 0,25 0,26	0,26	0,01	96,4 89,3 92,9	92,9	3,6	3,9
II	0,56	0,53 0,52 0,54	0,53	0,01	94,6 92,8 96,4	94,6	1,8	1,9
III	1,12	1,01 1,02 1,01	1,01	0,01	90,2 91,1 90,2	90,5	0,5	0,6

* Análises realizadas em triplicata

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Na TABELA 8 estão apresentados os resultados dos ensaios de exatidão realizados com nove amostras de conservas de carnes de estudos interlaboratoriais de proficiência FAPAS/MAFF/UK, no período de 1997 a 2003. No relatório final que retornou aos laboratórios participantes, ficou estabelecido o valor-z ("z-score") da análise para cada laboratório, onde $z=(x-X)/\sigma$; x =concentração do analito determinada, X =concentração verdadeira do analito, σ =desvio-padrão para o valor x , podendo-se considerar o resultado satisfatório se $|z|<2$, questionável quando $2<|z|<3$ e insatisfatório se $|z|>3$. Os valores-z variaram de -2,2 a 0,3 no período avaliado. Pode-se considerar que 89% (8 em 9) dos resultados foram satisfatórios, por apresentarem valores de $|z|$ menor que 2. Somente 11% (1 em 9) dos resultados revelaram $|z|$ entre 2 e 3, podendo ser considerados questionáveis. Não

houve resultado insatisfatório ($|z| > 3$). O controle de qualidade do método no laboratório está sendo verificado anualmente pela introdução de amostra de referência FAPAS para análise.

Tabela 8. Resultados das participações no controle interlaboratorial FAPAS

N	Ano	“Round”	Resultado laboratório* (%)	Resultado FAPAS (%)	Valor z
1	1997	18	0,073	0,067	0,3
2	1998	20	0,165	0,168	-0,1
3	1998	22	0,176	0,166	0,2
4	1999	25	0,209	0,198	0,2
5	2000	27	0,216	0,203	0,2
6	2001	30	0,112	0,135	-0,7
7	2002	32	0,177	0,202	-0,5
8	2002	34	0,181	0,187	-0,5
9	2003	35	0,114	0,133	-2,2

*Análises realizadas em triplicata

CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico preconizado pela AOAC para quantificação de aminoácido hidroxiprolina, através da hidrólise ácida das proteínas, oxidação com cloramina T e reação colorimétrica com reagente de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldeído), foi confirmado ser simples na operação, rápido, adequado para um grande número de amostras, revelando elevada exatidão e precisão em matriz complexa como conservas de carne.

ABSTRACT. Validation has the purpose to assure that analytical method is adequate and can be made by inter or intralaboratorial studies. Accuracy is one of the main factors in the validation process and can be evaluated by mean of reference materials. In hydroxyproline determination of collagen routine analysis, the spectrophotometric methods are used due to their precision, accuracy, simplicity, low cost and rapidity. This work aimed at the intralaboratorial validation of the AOAC (Association of Official Analytical Chemists) official spectrophotometric determination of hydroxyproline in canned meat via interlaboratorial work using a FAPAS/MAFF/UK (Food Analysis Performance Assessment Scheme / Ministry of Agriculture, Fisheries and Food / United Kingdom) as reference material. The calibration curve showed linearity ($r=0.9991$) in the concentration interval. The method revealed quantification limit $0.030\mu\text{g/mL}$ with 6.5% relative standard deviation and $0.0075\text{g}/100\text{g}$ for the sample. The recovery rates were 90-95% for three concentrations spiked FAPAS samples. The repeatability rates obtained CV below 4%. The participation in nine series of interlaboratorial FAPAS/MAFF study, in the period between 1997 and 2003, revealed satisfactory results in 89% of the cases. The method was considered efficacious for canned meat analyses and may therefore be considered intralaboratorially validated.

KEY-WORDS: Validation; hydroxyproline; spectrophotometric method; quantitative determination; collagen; canned meat

REFERÊNCIAS

1. Abrantes, S.M.P. **Curso de validação de metodologia na área química**. In: V Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2003.
2. AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1996. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p. 13-5.
3. Bayley, A.J.; Light, N.D. **Connective tissue in meat and meat products**. England: Elsevier Science Publishers; 1989. 355p.
4. Berg, H.; Kolar, K. Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the infratec food and feed analyzer. **Fleischw.**, 71:787-9, 1991.
5. Della Torre, J.C.M.; Rodrigues, R.S.M.; Marsiglia, D.A.P.; Lichtig, J. Avaliação das metodologias de análise de produto cárneo através de programa interlaboratorial. In: 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 2001. *Anais...*São Pedro: CTC-ITAL, 2001. p.466-7.
6. Della Torre, J.C.M.; Rodrigues, R.S.M.; Takemoto, E.; Barbosa, S.F.C.; Lichtig, J. Capítulo XIII - Carnes e produtos cárneos – 0283/IV Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina. In: **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - Instituto Adolfo Lutz**. 4.ed., 2004 (no prelo).
7. Etherington, D.J.; Sims, T.J. Detection and estimation of collagen. **J. Sci. Food Agric.**, 32:539-46, 1981.

8. Fapas Secretariat. Protocol for the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS). Organisation and Analysis of data. **Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Food Science Laboratory, United Kingdom.** 3^a ed, may 1993.

9. Flint, F.O.; Firth, B.M. Histochemical demonstration of collagen in comminuted meat products. **Analyst**, 108:757-9, 1983.

10. Flint, F.O.; Pickering, K. Demonstration of collagen in meat products by an improved micro-sirius red polarization method. **Analyst**, 109:1505-6, 1984.

11. França, J.M.; Waszczynskyj, N. Teor de hidroxiprolina em peles de frango submetidas à tratamento térmico. **B. CEPPA**, 20:19-28, 2002.

12. Gruber, H.A.; Kronick, P.L.; Buechler, P.R.; Hannigan, M.V. Determination of connective-tissue components in beef using simultaneous equations based on amino-acid analyses. **J. Food Science**, 55:1506-9, 1990.

13. Hildebrandt, G.; Hirst, L. Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analysis. **J. Food Science**, 50:568-72, 1985.

14. INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01 - março 2003. 35p.

15. Johson, S.K. The determination of hydroxyproline in meat using gas chromatography-mass spectrometry. **Meat Science**, 22:221-7, 1988.

16. Jonas, D.A.; Wood, R. Determination of hydroxyproline in meat products: collaborative study. **J. Assoc. Publ. Analysts**, 21:113-21, 1983.

17. Josefowicz, M.L.; O'Neill, I.K.; Prosser, H.J. Determination of L-hydroxyproline in meat protein by quantitative Carbon-13 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Anal. Chem.**, 49:1140-3, 1977.
18. Kolar, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73:54-7, 1990.
19. Leite, F. **Validação em análise química**. 1. ed. Campinas: Editora Átomo, 1996. 120p.
20. Murray, A.C.; Jeremiah, L.E. Toluene as an alternative to benzene in the Woessner determination of hydroxyproline. **J. Agric. Food Chem.**, 31:1368-9, 1983.
21. Nguyen, Q.; Zarkadas, C.G. Comparison of the amino acid composition and connective tissue protein contents of selected bovine skeletal muscles. **J. Agric. Food Chem.**, 37:1279-86, 1989.
22. Reis, R.A.A.; Santos, W.L.M.; Oliveira, A.L.; Souza, R.M.; Veloso, C.R.V. Quantificação da hidroxiprolina como índice de qualidade de salsicha comercializada em Belo Horizonte – MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 51:589-94, 1999.
23. Sims, T.J.; Bailey, A.J. Connective tissue. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science – 2**. London: Applied Science Publishers Ltd, 1981. p.29-59.
24. Smith, S.H.; Judge, M.D. An HPLC method using FMOC-ADAM for determination of hydroxyproline in muscle. **Meat Science**, 30:351-7, 1991.
25. Steinhart, H.; Bosselmann, A.; Möller, C. Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. **J. Agric. Food Chem.** 42:1943-7, 1994.

26. Swasdee, R.L.; Terrell, R.N.; Dutson, T.R.; Lewis, R.E. Ultrastructural changes during chopping and cooking of a frankfurter batter. **J. Food Science**, 47:1011-3, 1982.
27. Valente Soares, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60:79-84, 2001.
28. Zarkadas, C.G.; Marliss, E.B.; Zarkadas, G.C.; YU, Z.; Minero-Amador, A. Amino acid composition and protein contents of selected very low energy reducing diets. **J. Agric. Food Chem.**, 40:2198-207, 1992.
29. Zarkadas, C.G.; Ziran, Y.; Zarkadas, G.C.; Minero-Amador, A. Assessment of the protein quality of beefstock bone isolates for use as an ingredient in meat and poultry products. **Agric. Food Chem.**, 43:77-83, 1995.

Composição centesimal e teor de colágeno de carne bovina moída¹

¹Artigo científico submetido à Comissão de Publicações Oficiais da Revista do Instituto Adolfo Lutz (ISSN 0073-9855).

RESUMO. Os tecidos musculares animais, genericamente chamados de carne são uma importante fonte de proteínas na dieta provendo um ótimo balanço de aminoácidos essenciais para o homem. Um dos principais componentes desse tecido são as fibras colágenas do conjuntivo, que apresentam em sua composição uma reduzida quantidade de aminoácidos essenciais, baixando o valor nutricional dos produtos em que estão presentes em quantidades acima da normal. Matérias-primas cárneas de baixo valor comercial, normalmente ricas em fibras do tecido conjuntivo, têm sido utilizadas fraudulentamente na produção de carne moída bovina, com a finalidade de redução de custos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar sensorialmente a aparência, odor e estabelecer valores físico-químicos de composição centesimal, pH, colágeno (COL) e relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) de 20 amostras de carne moída bovina crua, que deram entrada no laboratório para análise (rotina laboratorial), comparado aos resultados físico-químicos de carne moída obtida de nove diferentes cortes cárneos de traseiro de bovino, adquiridos no varejo. As amostras de carne moída pertencentes à rotina de análise laboratorial revelaram extensas variações nos teores de umidade (61,0%–81,8%), gordura (1,2%–21,9%), proteína (8,1%–21,1%), cinzas (0,5%–1,1%), COL (1,0%–4,9%), COL rel. (5%–31%) e pH (5,34–6,55), enquanto a carne moída preparada com os cortes adquiridos no varejo revelou intervalos menores para os teores de umidade (64,1%–74,5%), gordura (2,8%–16,3%), proteína (19,3%–21,8%), cinzas (0,8%–1,1%), COL (1,0%–3,7%), COL rel. (5%–17%) e pH (5,52–5,80). As amostras de carne moída analisadas na rotina revelaram em geral odor e cor aceitáveis, contudo 14 unidades (70%) foram consideradas alteradas na aparência pela elevada proporção de fibras de tecido conjuntivo ou aponevrose. Estes resultados foram confirmados pelos valores correspondentes às medianas de COL e COL rel., que se apresentaram superiores aos teores da carne bovina moída preparada com cortes adquiridos em açougue, em 123% e 200% respectivamente. Os valores de gordura correspondentes às medianas apresentaram-se ligeiramente superiores (37%) e, conseqüentemente, os níveis de proteínas ficaram reduzidos (18%), como resultado da alteração da composição original característica da carne bovina muscular. Os resultados de composição centesimal e colágeno obtidos nesse estudo podem auxiliar o estabelecimento de padrões de identidade e qualidade, referentes aos teores mínimo de proteína total e máximos

de umidade e colágeno, contribuindo para o efetivo controle da análise laboratorial de rotina na verificação de fraudes.

PALAVRAS-CHAVE. Carne bovina moída; colágeno; composição centesimal; pH, legislação.

INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo e está presente principalmente nos ossos, pele e tendões. No músculo, presente na forma de rede de fibras do tecido conjuntivo, perfaz de 1 a 9% da matéria seca desengordurada. Três estruturas colagenosas podem ser morfológicamente distinguidas – endomísio, envolvendo cada fibra, perimísio, recobrando feixes destas fibras, e epimísio, circundando o músculo inteiro. A força de contração é transmitida aos tendões através dos feixes de tecido conjuntivo intramusculares que envolvem as fibras musculares individualmente¹⁰.

As fibras colágenas quando fervidas em água por longo tempo formam gelatina e, no estado fresco são brancas, conferindo essa cor aos tecidos nos quais predominam. Os tendões, estruturas cilíndricas alongadas que ligam os músculos esqueléticos aos ossos, devido à sua riqueza em fibras colágenas, são brancos e inextensíveis¹³.

Os aminoácidos glicina (percentual molar 33,0%), prolina (12,2%), hidroxiprolina (9,4%) e alanina (10,7%), perfazem 65% dos aminoácidos do colágeno. O colágeno é uma proteína totalmente carente de cisteína e triptofano. Sua unidade molecular é o tropocolágeno, o fio protéico mais longo que se conhece (PM 300.000) com 15 Å de diâmetro e 2.800 Å de comprimento, onde três hélices esquerdas se entrelaçam formando uma super-hélice direita¹².

A cor amarelada é característica da fibra elástica, variedade de tecido conjuntivo que devido à sua cor, são chamadas fibras amarelas do conjuntivo, em comparação com as colágenas, que são as fibras brancas. As fibras elásticas cedem facilmente mesmo às trações mínimas, porém retomam sua forma inicial tão logo cessem as forças deformantes. O componente principal das fibras elásticas é a proteína elastina. O tecido elástico é pouco freqüente, sendo encontrado, por exemplo, nos ligamentos amarelos da coluna vertebral e na parede de alguns vasos sangüíneos de grosso calibre (aorta, por exemplo), sob a forma de extensas lâminas ou folhas perfuradas, conhecidas como membranas fenestradas¹³. A elastina é uma proteína muito próxima do colágeno, em constituição e atuação, apresentando ainda muito maior elasticidade e resistência à deformação devido a interligações de lisinonorleucina e desmosina¹².

A proporção de aminoácidos essenciais em diferentes cortes de vitela, bovino e suíno decresceu linearmente quando o logaritmo do teor de hidroxiprolina aumentou⁹. Verificaram-se correlações negativas de 0,99 e 0,98 entre os valores de colágeno na carne e o conteúdo de aminoácidos essenciais de uma proteína, e também entre o conteúdo de colágeno e os valores de PER (Protein Efficiency Ratio). Estes resultados indicam que a determinação química do teor de colágeno pode ser utilizada para prover uma estimativa rápida e de baixo custo da qualidade protéica¹⁴. Um aumento na taxa específica de colágeno em carnes e produtos cárneos reduziu o número absoluto de aminoácidos essenciais e desequilibrou seu balanço, diminuindo a qualidade do sistema protéico^{15, 16, 22}.

Pode-se esperar uma redução na qualidade sensorial com o aumento do teor de colágeno³. Músculos inteiros contendo elevados teores de colágeno podem ser

inaceitavelmente duros¹⁷, sendo que, a carne com elevada proporção de tecido conjuntivo é considerada de baixa qualidade devido à redução da sua maciez e valor nutricional²¹.

Nos Estados Unidos, Cross et al.⁷ observaram que, a presença de tecido conjuntivo foi o maior problema associado com a aceitação da carne moída bovina. A carne da categoria “U.S. Utility” ou de menor qualidade, ou de cortes inferiores, produziu um produto moído que era inaceitavelmente elevado em tecido conjuntivo.

No Brasil⁸ resultados sobre os efeitos da mistura de 0-50% de tecido aponevrótico bovino [63% umidade; 15% gordura; 22% proteína; 0,8% cinzas; 1% hidroxiprolina, 8% colágeno e 37% relação colágeno pela proteína total] obtido da limpeza mecânica (Skyner – Townsend 7600) superficial de cortes cárneos de traseiros de bovinos, nas propriedades sensoriais e físico-químicas de carne moída e hambúrguer, apontaram na carne moída aumento ($p < 0,05$) dos teores de gordura (2%-8%), hidroxiprolina (0,1%-0,5%), colágeno (0,6%-4,2%) e relação colágeno pela proteína total (3%-20%), redução da umidade (76%-70,0%), cinzas (1,0%-0,9%) e pH (5,8-5,6), sem alteração significativa da proteína total (20-21%). A adição de 20% desse material em hambúrguer reduziu a intensidade da cor vermelha, aumentou a quantidade de aponevrose aparente, elevando a firmeza na mastigação. O teor de adição de 30% aumentou a mastigabilidade (número de mordidas), a quantidade de tecido conjuntivo residual na boca e reduziu o sabor característico. No teste de consumidor, com 57 participantes, a adição de 10% de tecido aponevrótico revelou uma carne moída aceitável na aparência, enquanto que, 20% resultou uma menor aceitação.

A presença da hidroxiprolina no colágeno é um aspecto único porque este aminoácido ocorre somente em poucas proteínas, a saber, elastina (1,6%), e em menor extensão na proteína do complemento do soro (C1q), e em algumas proteínas vegetais²⁰. A hidroxiprolina

é usada para indicar o teor de colágeno porque a mesma, comumente, não está presente em proteínas não colágenas. O método espectrofotométrico é o mais utilizado na quantificação do aminoácido hidroxiprolina pelos laboratórios de análise de rotina devido a sua precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez¹⁰.

A legislação da Comunidade Européia⁶, Directiva 2000/13/EC estabeleceu o conteúdo máximo de gordura para os ingredientes designados pelo termo “carne ... (nome da espécie animal)” não devendo exceder 15% para a carne de aves e coelhos, 30% para carne de suínos e 25% para carne de outros mamíferos. O conteúdo de tecido conjuntivo, que é calculado com base na relação percentual de colágeno pela proteína total, não deve exceder 10% para as carnes de aves e coelhos e 25% para a carne suína e outros mamíferos.

Pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (Food Safety and Inspection Service) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos¹¹ (USDA) a grande diferença entre carne moída e hambúrguer é que a gordura somente pode ser adicionada ao segundo, sendo aceito um teor máximo de 30% de gordura para ambos. Os produtos podem conter condimentos, mas não devem ser acrescidos de água, fosfatos, aglutinantes, substâncias ligadoras ou extensoras. O teor de carne de bochecha na carne moída deve ser limitado a 25% do total, quando em excesso, a presença deve ser declarada no rótulo, na lista de ingredientes.

Segundo a legislação de carne e produtos cárneos da Austrália Nova Zelândia² a carne moída pode conter quantidades significativas de gordura. Não é necessária a declaração do teor de gordura da carne moída embalada ou não embalada, se não for feita alguma alegação ao teor de gordura. No entanto, o uso da terminologia “magra” ou “limpa” traduz a necessidade da declaração do teor de gordura.

No Brasil, as Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (São Paulo, 1978)¹⁸ estabeleceram para a carne moída bovina, segundo a NTA 3, ausência de cartilagens, de ossos e os teores máximos de 3% de aponevrose e 10% de gordura.

Segundo a Instrução Normativa nº83 de 21/11/03⁵, que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída de Bovino, entende-se por carne moída o produto obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos (aplica-se também ao produto obtido da carne de búfalos), seguido de imediato resfriamento ou congelamento, com teor máximo de 15% de gordura. A matéria-prima a ser utilizada deve estar isenta de tecidos inferiores como ossos, cartilagens, gordura parcial, aponevroses, tendões, coágulos, nodos linfáticos etc. A água no teor máximo de 3% consta como ingrediente opcional. Permite-se a utilização de carne industrial de matança, desde que as mesmas sejam previamente lavadas, escorridas, e submetidas a processo de resfriamento ou congelamento.

A indústria da carne para satisfazer o mercado e atingir públicos de diversas camadas sociais, tem produzido alimentos com características variadas. Com a elevação dos custos dos cortes e carnes, tradicionalmente utilizados na produção de carne moída, algumas indústrias têm passado a incorporar fraudulentamente matérias-primas de baixo valor comercial ou retalhos obtidos na desossa de cortes, normalmente ricos em fibras de tecido conjuntivo.

A influência do tecido conjuntivo na qualidade sensorial (aparência, odor, textura e sabor), nutricional e preço, parece ter sido a base para a introdução de regulamentos técnicos em alguns países, estabelecendo limites mínimos para proteína cárnea não colágena e limites máximos para proteínas colágenas do tecido conjuntivo em produtos cárneos⁴.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar sensorialmente a aparência, e estabelecer valores de composição centesimal, pH e colágeno de amostras comerciais de carne moída

bovina crua que deram entrada no laboratório do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) para análise, em comparação aos resultados de análise de cortes de carne moída bovina adquirida no varejo. Como resultado espera-se a inclusão desses parâmetros físico-químicos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída Bovina⁵.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Cortes cárneos comerciais de bovino (peça inteira) das categorias patinho (*quadriceps femoris*), coxão mole (*semimembranosus*), coxão duro (*biceps femoris*), contrafilé de lombo (*longissimus dorsi*), músculo traseiro (*gastrocnemius*), lagarto (*semitendinosus*), picanha (*biceps femoris*), coração da alcatra (*gluteus medius*) e maminha da alcatra (*tensor fasciae latae*) foram adquiridos no varejo, na cidade de São Paulo. No período de 2000 a 2003 foram avaliadas 20 amostras comerciais de carne moída bovina crua que deram entrada para análise junto ao laboratório central do Instituto Adolfo Lutz (IAL), não traduzindo uma coleta aleatória.

2. Métodos

As análises físico-químicas foram iniciadas logo após a entrada das amostras de carne moída no laboratório, evitando-se o congelamento das mesmas, ou no mesmo dia da aquisição dos cortes cárneos no mercado varejista. Os cortes cárneos foram cortados com a aponevrose (tecido conjuntivo) e a gordura de cobertura (não houve limpeza interna ou externa), preconizando condições industriais de processo, e moídos duas vezes em moedor (CAF 8)

utilizando disco de 5mm. Após a incorporação de possíveis exsudatos, as amostras foram homogeneizadas em multiprocessador doméstico (marca Arno). As análises foram realizadas em duplicata, seguindo os métodos preconizados pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985)¹⁹. A análise das substâncias voláteis (umidade) foi realizada em estufa a 102-105°C, até peso constante; proteínas segundo o método de Kjeldahl utilizando sistema automatizado (Gehardt), gorduras pela extração com éter etílico em extrator tipo Soxhlet, cinzas após incineração em mufla a 550°C e pH pela inserção na massa cárnea de um eletrodo de punção acoplado a um potenciômetro (Hanna Instruments – microprocessador digital HI9321). A determinação do conteúdo de colágeno (hidroxiprolina x 8) foi realizada através da quantificação do aminoácido hidroxiprolina, conforme método preconizado pela AOAC¹. As amostras foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6M a 110°C por 8h, sob refluxo. A hidroxiprolina oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0, converteu-se em um complexo avermelhado (absorção a 559 nm) pela reação com o reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico/2-propanol). O teor de colágeno relativo foi obtido da relação percentual do tecido conjuntivo pela proteína total.

As amostras de carne moída bovina crua da rotina de análise, foram caracterizadas por consenso no Laboratório de Análise Sensorial quanto aos atributos de aparência e odor, por uma equipe de 3 a 7 julgadores com discriminação para odores básicos, acuidade normal ou superior para cores e experientes na avaliação de carnes. Na descrição visual da aparência, avaliou-se a cor e teores relativos de aponevrose (fibras de tecido conjuntivo) sendo classificadas quanto a proporção em pequena (P), moderada (M) e elevada (E). O odor foi avaliado como característico de carne crua e sem detecção de odores estranhos (C) ou alterado (A), procurando-se descrever as sensações percebidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 9 apresenta os resultados das avaliações físico-químicas relativas a composição centesimal, teor de colágeno (COL), relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) e valores de pH, de carnes de cortes do traseiro bovino, moídas com a gordura e tecido conjuntivo intramuscular e de cobertura. Os resultados revelaram diferenças ($p < 0,05$) entre os cortes cárneos para todos os parâmetros físico-químicos avaliados. A carne moída de patinho não diferiu da carne moída de lagarto e apresentou o maior teor de umidade (74,5%), enquanto a carne moída de contrafilé apresentou o menor valor (64,1%). O teor de gordura foi menor para o patinho (2,8%) que não diferiu do coxão duro, e o maior valor ficou para o contrafilé (16,3%), que apresentava moderada proporção de gordura de cobertura. Na quantificação do teor de proteína, o maior valor foi para a carne moída de coxão duro (21,8%) que não diferiu do músculo, lagarto, e alcatra, ficando o menor teor para o contrafilé (19,3%). A porcentagem de cinzas foi maior para o patinho (1,1%) que diferiu somente da carne de contrafilé (0,8%) e este último não diferindo da alcatra, picanha e músculo. As variações nos teores de COL e COL rel. foram amplas, sendo os menores valores para a carne moída de patinho (1,0% e 5%) que não diferiu do coxão mole, lagarto, picanha e maminha, ficando o músculo com os maiores teores (3,7% e 17%). A alcatra revelou o maior valor de pH (5,84) diferindo das demais categorias de cortes cárneos e o coxão duro apresentou o menor valor (5,52), não diferindo do lagarto.

A Tabela 10 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos e sensoriais de 20 amostras de carne moída recebidas para análise no laboratório (N1-N20), de 13 marcas

diferentes, designadas pelas letras do alfabeto (A-M). Os intervalos de variação na composição centesimal foram muito amplos, revelando as seguintes faixas de valores: umidade 61,0%-81,8%; gordura 1,2%-21,9%; proteína 8,1%-21,1%; cinzas 0,5%-1,1%; COL 1,0%-4,9% e COL rel. 5%-31%. Os valores de pH se apresentaram no intervalo de 5,34-6,55. Os extremos superiores apresentaram-se elevados para os teores de umidade (81,8%), gordura (21,9%), COL (4,9%) e COL rel. (31%), e os limites inferiores de proteína (8,1%) e cinzas (0,5%) revelaram-se muito reduzidos, em comparação aos valores correspondentes às medianas de carne moída adquirida no varejo (Tabela 9), respectivamente, umidade (72,1%), gordura (5,4%), proteína (21,1%), cinzas (1,0%), COL (1,3%) e COL rel. (6%). Verificou-se que o produto N3 (marca A), mesmo apresentando elevados teores de umidade (81,8%), COL rel. (26%), pH (6,1) e baixo teor de proteína (8,1%), foi classificado pelo fabricante como carne moída de patinho, ou seja de 1ª categoria. Neste mesmo produto, pela análise microscópica constatou-se a fraude pela presença de cascas de banana.

O teor de gordura acima do limite estabelecido de 10% segundo NTA 3 (São Paulo, 1978)¹⁸ foi observado em 6 amostras. Somente uma amostra apresentou teor de gordura acima de 15%, limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa nº83/03⁵, em vigor desde 21/11/2003. Verificou-se a frequência de 8 amostras de carne moída bovina, no total de 20, com valores de pH acima de 5,9 (valor limite segundo Circular nº 192/98/DCI/DIPOA).

Segundo a Tabela 10, a caracterização sensorial da aparência da carne moída revelou elevada (E) proporção de aponevrose para 14 amostras, moderada (M) para 4 e pequena (P) a 2 unidades. A cor variou de rósea (principalmente nas amostras com elevada proporção de aponevrose) a marrom-avermelhada. O odor se apresentou nas amostras característicos a carne crua, não sendo detectados odores estranhos, exceto para N7 que apresentou odor alterado,

embora ainda revelasse cor vermelha pela adição fraudulenta de dióxido de enxofre (404 ppm). A Figura 11 apresenta ilustração de carne moída bovina (N14, marca I) que na caracterização sensorial revelou odor característico, mas apresentou elevada proporção de aponevrose ou tecido conjuntivo.

Na comparação dos valores correspondentes às medianas das amostras de carne moída bovina obtida de cortes cárneos do traseiro adquiridos no varejo (Tabela 9) e amostras que deram entrada para análise no laboratório (Tabela 10), nos parâmetros físico-químicos de umidade (72,1% e 72,5%), gordura (5,4% e 7,4%), proteína (21,1% e 17,4%), cinzas (1,0% e 0,9%), COL (1,3% e 2,9%), COL rel. (6% e 18%) e pH (5,66 e 5,83), ficam estabelecidas as diferenças percentuais, onde foram superiores os teores principalmente de gordura (37%), COL (123%) e COL relativo (200%), revelando-se inferiores os teores de proteína (18%) e cinzas (10%), sem alteração nos valores de umidade.

Na Figura 12 tem-se, respectivamente, a distribuição de frequência dos teores de COL e COL rel., podendo-se observar elevação dos valores percentuais de colágeno nas amostras que deram entrada no laboratório para análise (N1 a N20) em comparação com a carne moída de cortes cárneos de traseiro bovino adquiridos no varejo, podendo-se estabelecer neste trabalho, a existência de uma relação direta entre os valores analíticos de colágeno e a presença de aponevrose como percebida pela equipe de julgadores na caracterização sensorial.

No Brasil, desconhecem-se relatos completos referentes à análise quantitativa de composição centesimal e teor de colágeno de carne moída dos diferentes cortes comerciais de traseiro bovino. Os resultados deste trabalho revelaram teores de 9; 5 e 6 % de COL rel., respectivamente para as carnes moídas de contrafilé, coxão mole e lagarto, enquanto que os resultados de Nguyen e Zarkadas¹⁵ mostraram valores moderadamente inferiores de 3,4% para

o contrafilé de touro, 3,04% e 3,31% para o coxão mole e lagarto de vaca de 8 anos, através da análise do aminoácido Lys (5-OH). O resultado de colágeno absoluto na base seca para a carne moída de lagarto (4,8%) está de acordo com o resultado (4,75%) encontrado por Bailey e Light³, contudo o teor de colágeno para a carne de contrafilé (2,76%) mostrou-se inferior ao obtido nesta pesquisa (5,1% base seca).

Na rotina de análise, a proporção máxima de aponevrose de 3% estabelecida pela Norma Técnica de Alimentos e Bebidas NTA 3, somente poderá ser avaliada, se houver um valor analítico legalmente estabelecido para o teor correspondente de proteínas do colágeno. Della Torre et al.⁸ substituíram na carne moída categoria patinho 0 - 50% de tecido aponevrótico obtido da limpeza superficial mecânica de cortes cárneos de traseiro de bovinos, e obtiveram para o teor de substituição de 3%; 5%; 10%; 15% e 20% resultados analíticos de 0,8%; 1,1%; 1,4%, 1,7% e 2,6% de colágeno e 4%; 5%; 7%; 9% e 13% de colágeno relativo a proteína total.

Os valores máximos estabelecidos pela Comunidade Européia para carne bovina, de 25% de gordura e 25% de COL rel, e nos Estados Unidos de 25% de gordura para a carne moída, não traduzem os resultados normalmente obtidos na rotina de análise para a carne bovina das raças comerciais brasileiras. Uma vez que a presença de elevados teores de fibras de tecido conjuntivo, cor vermelha clara e aparência exsudativa são os principais fatores associados à menor aceitação da carne moída bovina, este trabalho sugere a inclusão de teor mínimo de proteína total e teores máximos de umidade, colágeno, colágeno relativo à proteína total, junto ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída Bovina.



Figura 11. Carne moída bovina (N14, marca I).

Tabela 9: Composição aproximada, colágeno e pH de cortes cárneos comerciais de bovino*

Cortes cárneos	Umid. (%)	Gord. (%)	Prot. (%)	Cinzas (%)	COL (%)	COL rel. (%)	pH
Patinho	74,5^a (0,2)	2,8^e (0,1)	21,1^b (0,0)	1,1^a (0,02)	1,0^d (0,01)	5	5,56^e (0,01)
Coxão mole	72,1^c (0,3)	5,5^c (0,1)	21,0^b (0,2)	1,0^a (0,01)	1,0^d (0,1)	5	5,56^e (0,02)
Coxão duro	73,3^b (0,1)	3,3^{d,e} (0,3)	21,8^a (0,3)	1,0^a (0,01)	1,8^c (0,03)	8	5,52^f (0,01)
Contrafilé	64,1^d (0,06)	16,3^a (0,04)	19,3^d (0,1)	0,8^b (0,1)	1,8^c (0,03)	9	5,66^d (0,01)
Músculo	72,9^b (0,1)	5,2^c (0,1)	21,3^{a,b} (0,2)	0,9^{a,b} (0,1)	3,7^a (0,2)	17	5,78^b (0,01)
Lagarto	74,1^a (0,1)	3,8^d (0,4)	21,3^{a,b} (0,1)	1,0^a (0,03)	1,2^d (0,1)	6	5,54^{e,f} (0,01)
Picanha	71,9^c (0,4)	6,3^b (0,01)	20,5^c (0,1)	1,0^{a,b} (0,02)	1,3^{c,d} (0,3)	6	5,80^b (0,01)
Alcatra	72,1^c (0,02)	5,4^c (0,02)	21,4^{a,b} (0,1)	1,0^{a,b} (0,03)	2,7^b (0,1)	13	5,84^a (0,01)
Maminha	72,0^c (0,1)	5,6^c (0,04)	21,1^b (0,03)	1,0^a (0,01)	1,3^d (0,1)	6	5,74^c (0,01)
Valor min.	64,1	2,8	19,3	0,8	1,0	5	5,52
Valor max.	74,5	16,3	21,8	1,1	3,7	17	5,80
Mediana	72,1	5,4	21,1	1,0	1,3	6	5,66
Média	71,9	6,0	21,0	1,0	1,8	8	5,67
DP	3,1	4,0	0,7	0,1	0,9	4	0,13
CV	4,3	66,9	3,4	8,1	51,2	49	2,22

*Cortes cárneos de bovino adquiridos no varejo na cidade de São Paulo

COL = colágeno COL rel. = (COL/proteína total) x 100

Medidas de variabilidade: () DP = Desvio Padrão CV = Coeficiente de variação

Tabela 10: Parâmetros físico-químicos e sensoriais de carne moída bovina comercial*

Nº	Marca	Parâmetros físico-químicos							Parâmetros sensoriais			
		Umid. (%)	Gord. (%)	Prot. (%)	Cinz. (%)	COL (%)	COL rel (%)	pH	Num. julg. ¹	Apon. visual ²	Cor ³	Odor ⁴
N1	A	72,8 (0,1)	6,7 (0,2)	19,4 (0,3)	1,1 (0,1)	2,2 (0,1)	11	5,86 (0,01)	3	M	V	C
N2	A	69,5 (0,1)	13,6 (0,2)	14,6 (0,1)	0,7 (0,01)	4,5 (0,1)	31	5,34 (0,02s)	3	E	V	C
N3**	A ⁵	81,8 (0,03)	7,1 (0,01)	8,1 (0,2)	0,5 (0,01)	2,1 (0,3)	26	6,10 (0,02)	3	E	VE	C
N4	A	73,7 (0,1)	8,1 (0,5)	17,3 (0,5)	0,7 (0,00)	2,5 (0,2)	14	5,53 (0,02)	4	E	R	C
N5	A	75,2 (0,2)	6,4 (0,3)	17,5 (0,4)	0,7 (0,05)	3,3 (0,2)	19	5,84 (0,00)	4	E	RA	C
N6	B	74,0 (0,1)	7, (0,2)	17,1 (0,2)	0,8 (0,04)	3,0 (0,1)	18	5,92 (0,01)	3	E	VP e V	C
N7***	C	76,8 (0,1)	7,0 (0,1)	14,6 (1,0)	0,8 (0,01)	2,7 (0,5)	19	6,55 (0,03)	3	E	V	A
N8	D	70,6 (0,6)	7,8 (0,2)	20,6 (0,6)	0,9 (0,1)	4,9 (0,01)	24	5,98 (0,01)	3	E	VP e V	C
N9	E	61,0 (0,2)	21,9 (0,7)	16,6 (0,6)	0,7 (0,03)	4,9 (0,05)	30	6,10 (0,02)	3	E	RA	C
N10	F ⁶	71,6 (0,6)	7,5 (0,8)	19,5 (0,7)	1,0 (0,01)	3,0 (0,03)	15	5,79 (0,00)	5	E	V	C
N11	F ⁷	71,6 (0,2)	6,3 (0,8)	21,1 (1,1)	1,1 (0,02)	2,6 (0,1)	12	5,64 (0,01)	4	M	V	C
N12	G ⁵	76,2 (0,1)	1,2 (0,1)	20,9 (0,03)	1,1 (0,04)	1,6 (0,03)	8	5,50 (0,02)	3	P	V	C
N13	H	73,1 (0,2)	6,8 (0,1)	19,2 (0,2)	0,9 (0,02)	2,5 (0,1)	13	5,74 (0,02)	4	M	V	C
N14	I	72,2 (1,6)	13,8 (0,8)	13,0 (0,4)	1,1 (0,01)	3,3 (0,01)	25	5,82 (0,02)	3	E	V	C
N15	J	70,3 (0,5)	13,6 (1,2)	15,9 (0,3)	0,7 (0,01)	4,3 (0,7)	27	5,80 (0,01)	3	E	V	C
N16	K ⁵	74,5 (0,2)	2,8 (0,1)	21,1 (0,0)	1,0 (0,01)	1,0 (0,01)	5	5,59 (0,00)	5	P	V	C
N17	L	74,7 (0,1)	6,2 (0,6)	17,9 (0,6)	0,9 (0,05)	3,4 (0,3)	19	5,96 (0,03)	3	E	V	C
N18	L ⁸	72,2 (0,2)	8,2 (0,1)	18,2 (0,03)	1,1 (0,1)	1,6 (0,2)	9	5,80 (0,01)	3	M	V e MA	C
N19	L	71,7 (0,5)	11,0 (0,4)	16,8 (0,3)	0,7 (0,05)	2,8 (0,2)	17	6,03 (0,01)	7	E	VP e MA	C
N20	M	70,5 (0,6)	12,0 (0,1)	14,8 (0,4)	0,8 (0,1)	3,2 (0,1)	22	6,15 (0,01)	4	E	RA	C
Valor min.		61,0	1,2	8,1	0,5	1,0	5	5,34				
Valor max.		81,8	21,9	21,1	1,1	4,9	31	6,55				
Mediana		72,5	7,4	17,4	0,9	2,9	18	5,83				
Média		72,7	8,8	17,2	0,9	3,0	18	5,85				
D.P		3,9	4,5	3,2	0,2	1,1	7	0,27				
C.V.		5,4	51,6	18,5	20,7	36,1	41	4,62				

*Enviadas ao laboratório para análise **Pelo exame microscópico revelou cascas de banana ***Revelou 404 ppm de SO₂COL = tecido conj. colagenoso COL rel. = (COL/proteína total) x 100 ¹Número de julgadores²Proporção visual de aponevrose: P = pequena; M = moderada; E = elevada ³Cor: V = vermelha; VE=vermelha com pontos escuros R= rósea RA = róseo-avermelhada VP= vermelho-pardacenta; MA = marrom-avermelhada⁴Odor: C = característico de carne crua, não sendo detectado odores estranhos; A*** = alterado⁵Patinho ⁶Músculo ⁷Recorte de alcatra (aranha) ⁸Coxão mole

Medidas de variabilidade: () ou DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de variação

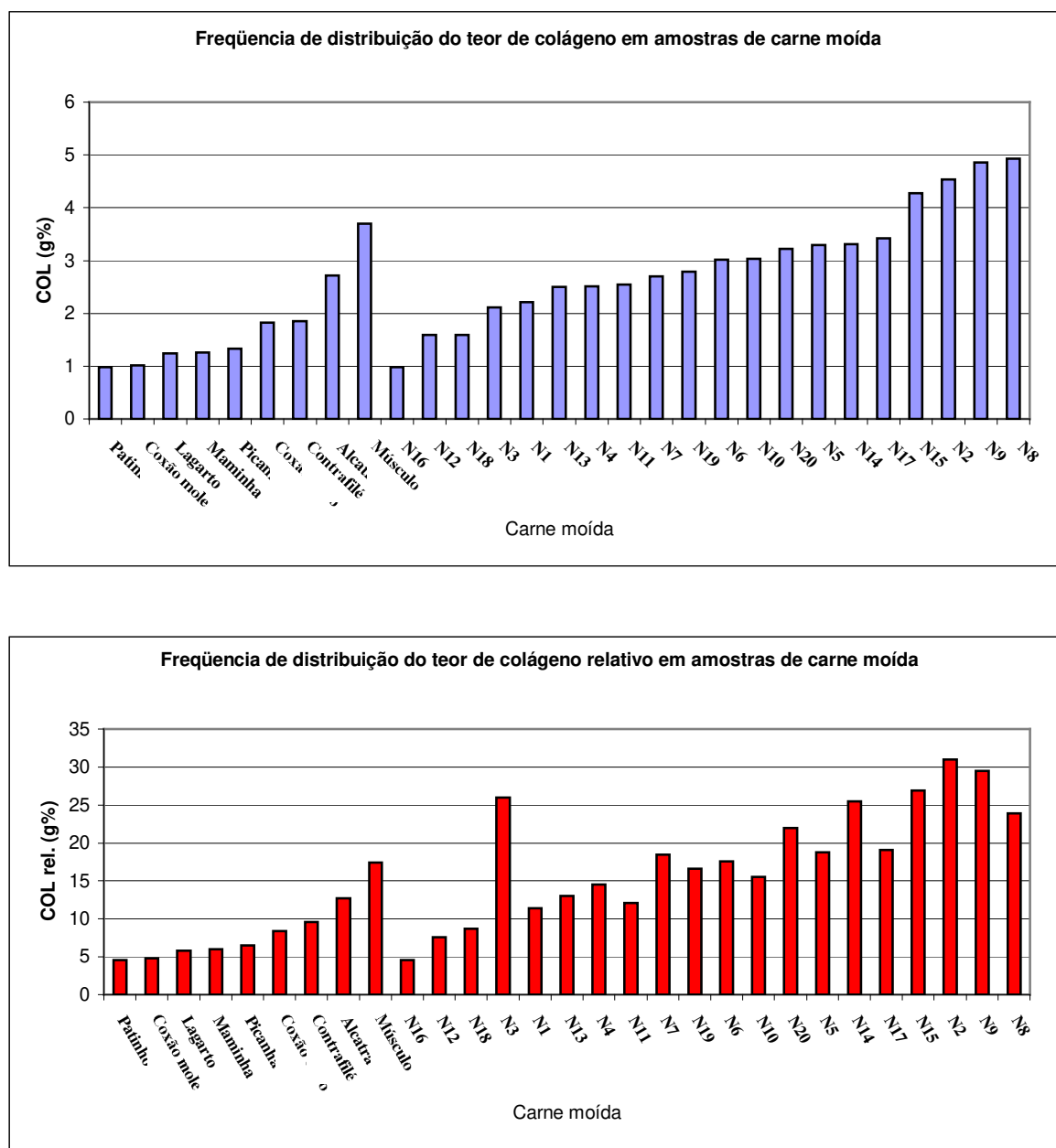


Figura 12. Distribuições de frequências dos teores de colágeno (COL) e relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) de amostras de carne moída bovina adquirida no varejo (patinho, coxão mole, lagarto, maminha, picanha, coxão duro, contrafilé, alcatra e músculo) e da rotina de análise laboratorial (N1 a N20).

CONCLUSÃO

Quarenta por cento das amostras de carne moída comercial encaminhadas ao laboratório apresentavam pH maior que 5,9, enquanto todas as amostras de carne moída preparadas a partir de cortes obtidos em açougue apresentaram pH abaixo desse valor. Isso indica que o valor de 5,9 estabelecido pela legislação é adequado.

A avaliação sensorial indicando que 70% das amostras de carne moída comercial apresentavam alteração da aparência pelo excesso de aponevrose e fibras do tecido conjuntivo colagenoso foi confirmada pelo maior teor de colágeno dessas carnes que variaram entre 5 e 31% da proteína total, enquanto os valores das carnes preparadas de cortes adquiridos em açougue ficou entre 5 e 17%. O valor de colágeno relativo de 25% preconizado pela Comunidade européia seria demasiado alto em função dos resultados desse estudo.

Proximate composition and collagen content of beef minced meat

ABSTRACT. Animal muscle tissues, generically named meat, are an important protein source in diet, providing an outstanding balance in essential amino acids, which are necessary to man. Among these tissue's main components are connective collagen fibers, that present a decreased rate of essential amino-acids, lowering products' nutritional value, when the former present rates above normal. Low cost meat raw materials, which are normally rich in collagen fibers of connective tissue, have been deceitfully used in the production of beef minced meat, with the intention of reducing costs. The present work aimed to characterize sensory

appearance, odor and to establish the proximate physico-chemical composition values, pH, collagen rate (COL), percent rate of collagen per total protein (rel COL) of 20 commercial beef minced meat samples which underwent routine laboratorial procedures compared with physico-chemical results of nine different beef minced meat prepared from meat cuts bought in meat stores. Commercial beef minced meat samples analysed under routine laboratorial procedures revealed a wide range for moisture rate (61.0%–81.8%), fat (1.2%–21.9%), protein (8.1%–21.1%), ash (0.5%–1.1%), COL (1.0%–4.9%), rel. COL (5%–31%) and pH (5.34–6.55), while minced meat bought in meat store revealed a shorter amplitude for moisture rate (64.1%–74.5%), fat (2.8%–16.3%), protein (19.3%–21.8%), ash (0.8%–1.1%), COL (1.0%–3.7%), rel. COL (5%–17%) and pH (5.52–5.80). Minced meat samples under routine laboratorial analysis mostly revealed acceptable odor and color, although 14 units (70%) were considered altered in sensory appearance due to the excessive rate of connective tissue or aponevrosis. These results were confirmed through median values of COL and rel. COL, which were respectively 123% and 200% higher than the rates for meat stores products. The median values for fat stood slightly above (37%) those of meat store products, and, consequently, the median protein rate decreased (18%), as a result of the original typical muscle beef meat composition alteration. Proximate composition and collagen results are presented with the purpose of helping establishing both identity and quality limits regarding minimum content of total protein, as well as maximum contents of moisture and collagen, thus contributing to effective control of deceitful procedures.

KEY-WORDS: beef minced meat; collagen; proximate composition; pH; legislation

REFERÊNCIAS

1. AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, 16^a edição, Arlington: AOAC International, 1996. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p. 13-9.
2. Austrália Nova Zelândia. **Food Standards Code**. User guide to Standard 2.2.1 – Meat and Meat Products. July 2001. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/mediareleasespublications/factsheets/industryfactsheetsfsc/meateggsandfish> Acesso em: 23 jun. 2003.
3. Bayley, A.J.; Light, N.D. **Connective tissue in meat and meat products**. England : Elsevier Science Publishers, 1989. 355p.
4. Board, P.W.; Montgomery, W.; Rutledge, P.J. Collagen content of some Australian Canned Meats. **J. Sci. Fd Agric.** 29:569-73, 1978.
5. Brasil. Instrução Normativa nº 83, 21 de nov. 2003. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (Corned Beef) e Carne Moída de Bovino. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 03 dez 2003. Seção I, p.13. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/> Acesso em: 9 dez. 2003.
6. Comunidade Européia. Directiva 2000/13/CE, de 20 de Março de 2000. Relativa à aproximação das legislações do Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos gêneros alimentícios. **Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial nº L 109 de 06/05/2000 p. 0029 - 0042. Disponível em: <http://europa.eu.int/eur-lex/>. Acesso em: 06 ago. 2003.
7. Cross, H.R.; Green, E.C.; Stanfield, M.S.; Franks JR, W.J. Effect of quality grade and cut formulation on the palatability of groun beef patties. **Journal of Food Science**, 41:9-11, 1976.

8. Della Torre, J.C.M.; Rodas, M.A.B.; Rodriguez, R.S.M.; Silva, C.R.; Beraquet, N.J. Effects of connective proteins on chemical composition and sensory properties of ground beef. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY . 2nd BRAZILIAN CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003, Campinas. **Proceedings...** Campinas:CTC/ITAL, 2003. p.255-6.

9. Dvorák, Z.; Vognarová, I. Nutritive value of the proteins of veal, beef and pork determined on the basis of available essential amino acids or hydroxyproline analysis. **J. Sci. Fd Agric.**, 20:146-50, 1969.

10. Etherington, D.J.; Sims, T.J. Detection and estimation of collagen. **J. Sci. Food Agric.**, 32:539-46, 1981.

11. Estados Unidos. United State Department of Agriculture - USDA. Food Safety and Inspection Service. **Code of Federal Regulations**. Definitions and Standards of Identity or Composition. Revised as of January 1, 2001. From the U.S. Government Printing Office via GPO Acess. CITE: 9CFR319Page 294-312. Disponível em: <http://www.acess.gpo.gov/nara/cfr/index.html>. Acesso em: 21 jun. 2002.

12. Farfán, J.A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. 2^a ed. (Série Manuais) Campinas: Ed. da UNICAMP, 1994. 134p.

13. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990. p.65-100.

14. Lee, Y.B.; Elliott, J.G.; Rickansrud, D.A.; Hagberg, E.C. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. **Journal of Food Science**, 43:1359-62, 1978.

15. Nguyen, Q.; Zarkadas, C.G. Comparison of the amino acid composition and connective tissue protein contents of selected bovine skeletal muscles. . **J. Agric. Food Chem.**, 37:1279-86, 1989.
16. Rogov, I.A.; Tokaev, E.S.; Kovalev, Y.I. Collagen and its rational content in meat products 2: Experiments with growing rats. **Meat Science**, 31:147-53, 1992.
17. Sadler, D.H.N.; Young, O.A. The effect of preheated tendon as a lean meat replacement on the properties of fine emulsion sausages. **Meat Science**, 35: 259-68, 1993.
18. São Paulo (Estado). Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (NTA). **Diário Oficial [do Estado de São Paulo]**, São Paulo, n.200, 21 out 1978. Seção I, NTA 3, p.3-4.
19. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.
20. Sims, T. J.; Bailey, A.J. Connective tissue. In: LAWRIE, R., editor **Developments in Meat Science – 2**. London:Applied Science Publishers Ltd, 1981. p.29-59.
21. Steinhart, H.; Bosselmann, A.; Möller, C. Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. **J. Agric. Food Chem.**, 42:1943-7, 1994.
22. Zarkadas, C.G. Assessment of the protein quality of selected meat products based on their amino acid profiles and their myofibrillar and connective tissue protein contents. **J. Agric. Food Chem.**, 40:790-800, 1992.

Composição centesimal e teor de colágeno de cortes cárneos de bovinos e suínos¹

¹Artigo técnico-científico enviado à revista Ciência e Tecnologia de Alimentos (ISSN 0101-2061) – publicação da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)

RESUMO

Os parâmetros físico-químicos de composição e pH de cortes cárneos de bovinos e suínos são importantes para o processador de carnes, por estarem relacionados às propriedades funcionais de retenção de água e emulsificação de gorduras. Objetivou-se neste trabalho a determinação dos teores de umidade, gordura, proteína total, colágeno (COL), relação percentual de colágeno pela proteína total (COL relativo) e pH de cortes cárneos, de suínos híbridos e bovinos raça Nelore. Os resultados dessas análises cumprem dois propósitos: auxiliar as indústrias a formularem produtos cárneos, e ajudar o serviço de inspeção no cumprimento da legislação relativo à composição dos produtos cárneos. Tendo-se analisado os cortes cárneos de três dianteiros de bovinos das categorias acém, paleta, peito, pescoço, diafragma, pilar do diafragma, sangria, músculo dianteiro e carne de costela, obtiveram-se as seguintes variações de teores de umidade 66,5-75,4%, gordura 4,0-15,9%, proteína 16,4-19,9%, cinzas 0,8-1,0%, hidroxiprolina 0,19-0,61%, COL 1,5-4,9%, COL relativo 8-25% e pH de 5,7-6,0. As maiores variabilidades dos resultados entre animais foram verificadas para a carne de peito, e as menores para a carne do diafragma. Na avaliação dos cortes cárneos de três meias carcaças de suínos das categorias pernil, paleta, copa, lombo, filezinho, barriga, carne de costela, toucinho e couro, foram observadas extensas variações de umidade 20,6-73,1%, gordura 5,2-75,6%, proteína 5,4-20,8%, cinzas 0,3-1,2%, hidroxiprolina 0,08-1,28%, COL 0,6-10,2%, COL rel. 3-66% e pH 5,8-6,2. As maiores variabilidades nas determinações entre animais foram observadas para o toucinho e as menores para o lombo. Os cortes cárneos de suínos (exceto o couro) revelaram maiores teores de gordura e menores de umidade, hidroxiprolina e COL, comparado aos cortes cárneos de bovinos.

Palavras-chave: composição centesimal; hidroxiprolina; colágeno; pH; carne bovina, carne suína

SUMMARY

PROXIMATE COMPOSITION AND COLLAGEN CONTENT OF BEEF AND PORK MEAT CUTS. Both physical and chemical composition parameters and pH of beef- and pork-cuts are important for the meat producer, since such parameters are connected with the functional properties of water retention and fat emulsification. The objective of this paper was to determine moisture, fat, total protein, collagen (COL) content, collagen per total protein (relative COL), as well as pH of meat cuts of hybrid pork and bovine (Nelore) meat. The results of these analyses fulfill two purposes: to help the industries formulate meat products and to help inspection services to enforce legislation concerning meat products composition. Three forequarter beef meat cuts of the categories chuck, shoulder, brisket, neck, inside skirt (diaphragm), thick skirt, neck trimmings, foreshank, and plate have been analysed. The following variation was observed: moisture, 66.5-75.4%; fat, 4.0-15.9%; protein, 16.4-19.9%; ashes, 0.8-1.0%; hydroxyproline, 0.19-0.61%; COL, 1.5-4.9%; relative COL, 8-25%; and pH, 5.7-6.0. The largest results' variances between animals were found in brisket meat, while the smallest were those for diaphragm meat. In the evaluations of pork cuts from fresh ham, picnic shoulder, shoulder butt, loin, tender loin, belly, spareribs, backfat and skin, large variation was found for moisture (20.6-73.1%), fat (5.2-75.6%), protein (5.4-20.8%), ashes (0.3-1.2%), hydroxyproline (0.08-1.28%), COL (0.6-10.2%) relative COL (3-66%), and pH (5.8-6.2). The largest variances between the animals in the determinations were those for backfat, while the smallest were those for loin. The pork-cuts (except the skin) presented the greatest rates of fat

and the tiniest rates of moisture, hydroxyproline and COL, if compared with those of beef-cuts meat.

Key words: proximate composition; hydroxyproline; collagen; bovine meat; pork meat.

1 – INTRODUÇÃO

As características quantitativas de composição das matérias-primas cárneas são de fundamental importância para a elaboração de produtos cárneos emulsionados como salsichas e mortadelas, tornando imprescindível o estudo dos parâmetros físico-químicos de umidade, gordura, proteínas, colágeno (COL) e valor de pH dos cortes cárneos de suínos e bovinos, principais ingredientes do processo de fabricação. A grande preocupação no processamento de emulsionados finamente cominuídos tipo salsicha, é com os níveis mínimos de proteínas cárneas livre de COL e máximos de COL e gordura, ingredientes que afetam diretamente a estabilidade da emulsão e a retenção de água e gordura dos produtos, durante o seu processamento.

As proteínas do músculo podem ser divididas em três classes: sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromais. São classificadas como sarcoplasmáticas as proteínas solúveis em solução de força iônica igual ou menor que 0,1, em pH neutro. Esta fração constitui 30-35% da proteína total da musculatura esquelética. Contém de 100-200 proteínas diferentes. A fração miofibrilar é constituída de proteínas que normalmente só são extraídas em solução de força iônica entre 0,5 e 1,0. As proteínas miofibrilares representam 52-56% de toda a proteína muscular. São classificadas como estromais as proteínas insolúveis em solventes aquosos. Essa fração representa 10-15% de toda a proteína dos músculos esqueléticos, incluindo

lipoproteínas e mucoproteínas das membranas celulares e superfícies assim como proteínas do tecido conjuntivo. O colágeno representa normalmente de 40-60% das proteínas estromais e a elastina de 10-20% do total desta fração. As proteínas do estroma são normalmente determinadas como proteínas insolúveis remanescentes após extração exaustiva de todas as outras proteínas do músculo. A fração estromática normalmente contém proteínas do sarcolema, do retículo sarcoplasmático e das membranas mitocondriais, além das proteínas que constituem o tecido conjuntivo que envolve a célula muscular. Duas proteínas do tecido conjuntivo, colágeno e elastina, representam a maior parte da fração protéica estromática, embora as proporções exatas de colágeno e elastina variem bastante nos diferentes músculos, da mesma espécie animal [15].

O colágeno é o principal constituinte das cartilagens e outros tecidos conjuntivos, sendo caracterizado pelo elevado conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina, e completa ausência de aminoácidos sulfurados e de triptofano. Aquecimento prolongado em água fervente converte o colágeno em proteína solúvel, denominada gelatina. A unidade estrutural fundamental de colágeno é o tropocolágeno [3,15].

As proteínas do tecido conjuntivo transmitem o movimento produzido pela contração das proteínas miofibrilares ao esqueleto do corpo. Esta função requer que a proteína do tecido conjuntivo seja resistente e firme. O colágeno é a principal proteína do tecido conjuntivo da carne, sendo similar ao tecido conjuntivo encontrado na pele, ligamentos e tendões. Os músculos utilizados para locomoção, como os músculos da perna, possuem maiores teores de colágeno que os músculos utilizados para suporte como o contra-filé. Onde os músculos se prendem aos ossos, o teor de colágeno aumenta em concentração. Animais mais velhos não possuem necessariamente maiores teores de colágeno, mas eles possuem colágenos mais

resistentes. Por estas razões, as carnes dos músculos das pernas e músculos de animais mais velhos são firmes demais para serem ingeridos após assados ou grelhados com calor seco. As carnes com elevados teores ou com colágeno mais resistentes são desviadas para o processamento de embutidos, onde o colágeno é reduzido no tamanho pelas facas dos moedores, *cutters* ou moinhos [3, 11].

Os fabricantes de embutidos usam carne contendo elevada proporção de tecido conjuntivo, no entanto, eles sabem que é necessário limitar a quantidade de colágeno para impedir os principais defeitos no produto final como as bolsas e capas de gelatina e gordura, difícil descasque etc [13].

Os produtos cárneos também podem ser acrescidos de colágeno pela adição de couro cozido como ingrediente da formulação. Os estudos de OLIVO & SHIMOKOMAKI [11] com isolado de colágeno, em forma de fibras, obtido de tendões bovinos através de sucessivas moagens e liofilização, revelaram que teores acima 15-18% de seu peso em relação à fração protéica ou aproximadamente 2% em relação ao peso total da massa prejudicam a estabilidade da massa, quando em sistemas com alto teor de gordura. Há evidência de que a ação instabilizadora do colágeno seja devido a sua compressão física aos glóbulos de gordura durante a expansão térmica dos mesmos, levando-os a coalescência.

A padronização dos cortes de carne bovina ficou estabelecida segundo a Portaria nº 05 [5]. Entende-se por carcaça o bovino abatido, sangrado, esfolado, eviscerado, desprovido de cabeça, patas, rabada, glândula mamária (na fêmea), verga, exceto sua raízes e testículo (no macho). Após a sua divisão em meias carcaças retiram-se ainda os rins, gorduras perirrenal e inguinal, “ferida-de-sangria”, medula espinhal, diafragma e seus pilares. As patas dianteiras são seccionadas e a cabeça é separada da carcaça. A meia carcaça resulta do corte longitudinal

da carcaça, abrangendo a sínfise isquiopubiana, a coluna vertebral e o esterno. O quarto resulta da subdivisão da meia carcaça em traseiro e dianteiro, por separação entre a quinta e a sexta costela. O quarto dianteiro é subdividido em grandes peças como paleta e dianteiro sem paleta. A paleta subdivide-se nos cortes pá (raquete, peixinho e coração da paleta) e músculo dianteiro, enquanto o dianteiro-sem-paleta em acém, pescoço, costela do dianteiro, peito e cupim.

O pilar do diafragma, a sangria e o diafragma, do ponto de vista dos frigoríficos são enquadrados como carne industrial. O diafragma é cortado rente ao gradil torácico, corresponde à porção lateral do músculo da respiração (devendo ser removido o tecido conjuntivo fibroso que o envolve) e nos açougues é conhecido como “fraldinha”. A sangria compreende parte dos músculos do pescoço feridos durante a sangria e a divisão sagital mediana do pescoço [12].

No *Quadro 5* estão descritos os nomes dos principais componentes musculares e nomenclatura anatômica dos cortes comerciais do quarto dianteiro e carnes industriais de bovinos. A nomenclatura anatômica dos principais cortes comerciais de suínos estão apresentados no *Quadro 6*.

A determinação de colágeno é um requerimento essencial para a ciência e tecnologia de carnes que buscam explicar a verdadeira contribuição do colágeno para a estrutura e qualidade da carne. O tecnólogo de alimentos também requer resultados analíticos confiáveis de tecido conjuntivo para auxiliar nas planilhas de formulação e manutenção de um produto uniforme, que também esteja de acordo com a legislação vigente quanto a sua composição.

O objetivo do trabalho foi avaliar a composição centesimal, teor de colágeno e valor de pH de cortes cárneos de bovinos raça Nelore e suínos híbridos, para uso como matérias primas na indústria da carne.

Quadro 5. Nômina anatômica de cortes comerciais de dianteiro e carne industrial de bovinos

Cortes comerciais de bovino	Principais componentes musculares	Nômina anatômica
Paleta	supra e infra espinhoso, tríceps braquial	<i>supraspinatus, infraspinus, triceps brachii</i>
Músculo-do-dianteiro	flexores e extensores digital comum, lateral e carpo-radial	<i>extensor carpi obliquus, radialis, ulnaris e digiti primi longus, flexor carpi radialis, ulnaris, bíceps brachii</i>
Acém	trapézio, romboide, serratil	<i>trapezius, rhomboideus, serratus ventralis</i>
Peito	peitorais, intercostais	<i>pectoralis, intercostales externi</i>
Pescoço	trapézio, braquicefálico, romboide	<i>trapezius, omo-transverarius, brachiocephalicus, rhomboideus, serratus ventralis</i>
Costela do dianteiro	escaleno, serratil, intercostais	<i>scalenus dorsalis, serratus dorsalis - anterior, posterior e ventralis, intercostales externi e interni</i>
Pilar do diafragma	diafragmaticos	<i>diaphragm</i>
Diafragma	diafragmaticos	<i>diaphragm</i>
Sangria	bráquiocefálico	<i>drachiocephalicus</i>

Fonte: OLIVEIRA [10]

Quadro 6. Nômina anatômica de cortes comerciais de suínos

Cortes cárneos de suínos	Nômina anatômica
Pernil	<i>biceps femoris, semitendinosus, obturator internus, semimembranosus, gracilis, vastus medialis, vastus intermedius, vastus lateralis, rectus femoris</i>
Paleta	<i>subscapularis, supraspinatus, infraspinus, deltoideus, triceps brachii</i>
Copa	<i>longissimus, multifidus dorsi, spinalis, rhomboideus, trapezius, serratus</i>
Lombo	<i>longissimus, serratus dorsalis, posterior, iliocostalis, costae</i>
Filezinho / Filé mignon	<i>psoas major, psoas minor</i>
Barriga	<i>cutaneous trunci, rectus abdominis, obliquus abdominis externus, obliquus abdominis internus, transversus abdominis</i>
Carne de costela	<i>intercostales externi, intercostales interni, serratus ventralis, pectoralis profundus, cutaneous trunci, rectus abdominis</i>

Fonte: OLIVEIRA [10]

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Cortes cárneos de bovinos

Três bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*), machos castrados, com idades entre 30 e 36 meses, sob regime de engorda a pasto, com peso vivo médio de 437,5 kg ($\pm 16,2$), foram adquiridos junto à Fazenda Bem-te-vi de Inúbia Paulista-SP. Estes animais foram abatidos um a um com intervalo de 15 dias na planta piloto do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL. Após o abate as carcaças foram resfriadas em câmara fria sob temperatura de $0 \pm 4^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As meias-carcaças esquerdas foram divididas em quarto dianteiro e traseiro com corte entre a 5ª e 6ª costela. Os cortes utilizados para as análises físico-químicas foram: acém, paleta, peito, pescoço, diafragma, pilar do diafragma, sangria, músculo e carne de costela.

2.2 - Cortes cárneos de suínos

Três suínos híbridos terminais de 158 dias machos, originados de machos Large White x Pietrain com híbridas Large White x Landrace, peso vivo aproximado 125-130Kg, foram adquiridos junto a Granja Suinocultura das Palmeiras. Os três animais foram abatidos no mesmo dia na planta piloto do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL. Após resfriamento em câmara fria sob temperatura de $0^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, procedeu-se à separação dos cortes cárneos das meias carcaças do lado esquerdo, sendo utilizados para análises físico-químicas os seguintes cortes: pernil, paleta, copa, lombo, filezinho, barriga, carne de costela, toucinho e couro.

2.3 - Análises físico-químicas

As peças inteiras dos músculos de carne bovina foram picadas e moídas por três passagens em moedor (Hermann) com disco de 5 mm. Os cortes cárneos suínos foram moídos duas vezes através de disco 3 mm (moedor Hermann). Não houve limpeza superficial ou interna dos cortes cárneos, considerando-se o uso dos mesmos pela indústria processadora de produtos cárneos cominuídos. As análises físico-químicas de composição e hidroxiprolina foram realizadas em duplicata e o valor de pH em triplicata para cada corte cárneo por animal, obtendo-se uma média final de 3 animais.

As determinações físico-químicas foram iniciadas no mesmo dia da moagem e seguiram os procedimentos estabelecidos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz [14] para a composição centesimal. A análise das substâncias voláteis (umidade) foi feita em estufa a 102-105°C, até peso constante; a determinação do teor de proteínas foi realizado pelo método Kjeldahl (Nx6,25) utilizando sistema automatizado (Gehardt); o teor de gorduras foi obtido pela extração com éter etílico em extrator tipo Soxhlet; o teor de cinzas foi determinado após incineração em mufla a 550°C e o valor de pH foi determinado pela inserção na massa cárnea do eletrodo de punção acoplado a pHmetro digital (Hanna Instruments – HI9321 microprocessador).

A determinação do conteúdo de colágeno foi realizada por meio da quantificação do aminoácido hidroxiprolina (hidroxiprolina x 8), conforme o método AOAC [2]. As amostras foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6N por 8h a 110° C. Após hidrólise, a hidroxiprolina foi oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0, e o pirrol se converteu a um complexo avermelhado (absorção a 558 nm) pela reação com reagente de Ehrlich (p-

dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico / 2-propanol). O teor de colágeno relativo foi obtido da relação percentual entre o colágeno e a proteína total.

2.4 - Análise estatística

Os resultados médios das análises de umidade, gorduras, proteínas, cinzas, hidroxiprolina, colágeno e pH dos cortes cárneos dos 3 animais foram tratados estatisticamente pela análise de variância e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey, utilizando o programa estatístico GraphPad InStat Software v.2.02 (1990-1993). O nível de significância foi fixado em 5%.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Cortes cárneos do dianteiro de bovinos

Os pesos quentes das meias carcaças dos três bovinos (LE) da raça Nelore, machos castrados, 30-36 meses, engorda a pasto, foram 124,6; 130,6 e 135,4 Kg e os respectivos quartos dianteiros resfriados foram 41,1; 46,5 e 51,6 Kg. A *Tabela 11* apresenta os resultados médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) das avaliações físico-químicas relativas à composição centesimal, teor de hidroxiprolina, colágeno (COL), colágeno relativo (COL rel.) e pH obtidos para os cortes cárneos dos 3 dianteiros de bovinos, avaliados separadamente. Os valores médios de umidade para os cortes cárneos variaram na faixa de 66,5% (carne de costela) a 75,4% (pescoço), não diferindo entre si ($p < 0,05$) com os menores valores a carne do peito, diafragma, sangria e carne de costela. Os teores de gordura variaram de 4,0% (pescoço) a 15,9% (carne de costela), não diferindo entre si com maiores valores a

carne de costela e a sangria. Os conteúdos de proteínas variaram significativamente entre os cortes cárneos na faixa de 16,4% (carne de costela) a 19,9% (músculo), não diferindo da carne de costela o diafragma, peito, acém, sangria e pilar do diafragma, ficando os três maiores valores de proteínas para a paleta, pescoço e músculo. Não houve diferenças ($p>0,05$) entre os cortes cárneos em relação aos teores de cinzas com variação de 0,8% (carne de costela) a 1,0% (diafragma e peito). Os teores de hidroxiprolina dos cortes cárneos variaram significativamente de 0,19% (diafragma) a 0,61% (músculo), resultando que os valores proporcionais de colágeno foram 1,5% a 4,9%. A relação colágeno pela proteína total apresentou o menor valor (8%) para o diafragma e o maior (25%) para o músculo. Os valores de pH dos cortes cárneos variaram significativamente de 5,7 (peito) a 6,0 (carne de costela e pilar do diafragma).

Pode-se observar pequena variabilidade dos resultados médios das análises físico-químicas dos cortes cárneos dos quartos dianteiros dos três bovinos, pela faixa dos coeficientes de variação (CV) para as determinações de pH (0,3-2,7%), umidade (0,3-5,6%), proteínas (0,9-7,2%); cinzas (2,0-16,8%), hidroxiprolina e colágeno (6,1-25,6%) ficando as maiores variabilidades entre animais para os resultados de gorduras (4,0-55,7%). Em geral, nas análises de composição química as maiores variabilidades foram observadas para carne de peito e os menores valores de CV ficaram para a carne de diafragma. As variabilidades não refletem variações analíticas e sim diferenças naturais entre cortes cárneos de animais.

Caso todos os músculos do dianteiro juntamente com a carne industrial dos três animais fossem avaliados misturados em proporções iguais, poderia se esperar a composição média aproximada de 73,0% de umidade, 7,4% de gorduras, 18,4% de proteínas, 0,9% de

cinzas, 0,35% de hidroxiprolina, 2,8% de colágeno (COL), 15% de COL relativo à proteína total e um valor de pH de 5,9.

3.2 - Cortes cárneos de suínos

As meias carcaças LE dos três suínos apresentaram 43,4; 46,2 e 49,0 Kg de peso quente. Os resultados médios, DP e CV das avaliações físico-químicas relativas a composição centesimal, teor de hidroxiprolina, colágeno (COL), colágeno relativo (COL rel.) e pH obtidos para os cortes cárneos dos 3 suínos avaliados (separadamente), encontram-se na *Tabela 12*.

Pode-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os cortes cárneos de suínos para todos os parâmetros avaliados. O teor de umidade apresentou extensa faixa de variação de 20,6% para o toucinho a 73,1% para o filezinho, este último não diferindo significativamente do pernil e da paleta. Os teores de gorduras variaram de 5,3% (filezinho) a 75,6% (toucinho), não havendo diferença significativa entre filezinho e pernil com os menores valores. A análise de proteínas revelou variação de 5,4% para o toucinho a 20,8% para o filezinho, este último não diferindo do pernil e lombo. A concentração final de cinzas revelou o menor valor 0,3% para o toucinho e o maior 1,2% para o filezinho, não havendo diferença entre o pernil (1,1%), paleta (1,0%) e lombo (1,0%). O conteúdo do aminoácido hidroxiprolina variou de 0,08% para a carne do filezinho, que não diferiu do pernil, a 1,28% para o couro, que diferiu de todos os demais. O mesmo sendo verificado para o teor de colágeno (COL) cuja variação ficou entre 0,6% (filezinho) e 10,2% (couro). O conteúdo de COL relativo apresentou a faixa de 3% (filezinho) a 66% (couro). Os valores de pH permaneceram na faixa de 5,8 (lombo, filezinho e barriga) a 6,2 (copa) onde a copa diferiu do lombo, filezinho e barriga, que não diferiram entre si, com os menores valores.

A variabilidade dos resultados médios das análises físico-químicas dos cortes cárneos para os 3 suínos foi relativamente pequena segundo as faixas dos coeficientes de variação (CV) verificadas de pH (0,3-6,3%), umidade (0,4-8,3%), gorduras (2,0-17,5%), proteínas (0,3-15,5%); cinzas (2,0-12,9%), hidroxiprolina e colágeno (3,2-23,7%). Em geral, nas análises de composição, as maiores variabilidades foram observadas para o toucinho e os menores valores de CV ficaram para o lombo. Cabe lembrar que os desvios encontrados refletem as variações naturais das amostras dos diferentes animais e não variações analíticas.

No Brasil, desconhecem-se relatos completos referentes à análise quantitativa da composição centesimal e colágeno de cortes cárneos de bovinos e suínos. Os resultados para gorduras totais do pernil (7,4%), paleta (10,6%) e lombo (12,3%) foram ligeiramente superiores e os de toucinho (75,6%) inferiores aos de BRAGAGNOLO [4] que apresentou teores de 5%, 5%, 13% e 83% para os cortes cárneos comerciais de pernil e paleta sem gordura de cobertura, lombo com gordura e toucinho, respectivamente. Os teores de proteínas e umidade para o lombo (19,8% e 68,0%) e carne de costela (17,1% e 62,5%) foram menores que os de CARVALHO [6] que obteve teores aproximados de 24% e 72% para o lombo e 20% e 70% para a carne de costela, respectivamente, para suínos provenientes das linhagens Optimus e Maximus. Os resultados de umidade (73,0%), gordura (7,2%) e proteína (18,2%) obtidos para o diafragma bovino estão de acordo com aqueles apontados por DELLA TORRE [7], que apresentou teores respectivos de 72,5%, 8,1% e 16,5%.

Tabela 11: Parâmetros físico-químicos de cortes cárneos de bovinos*

Cortes cárneos		Análises físico-químicas							pH
		Umid. (%)	Gord. (%)	Prot. (%)	Cinzas (%)	Hidrox (%)	COL (%)	COL rel. (%)	
Acém	Média	74,7 ^a	5,8 ^b	18,4 ^{ab}	0,9 ^a	0,30 ^{bcde}	2,4 ^{bcde}	13	5,9 ^{ab}
	DP	1,9 ^a	1,7	0,3	0,1	0,04	0,3		0,02
	CV(%)	2,5	29,7	1,4	6,5	14,10	13,9		0,3
Paleta	Média	74,6 ^a	4,8 ^b	19,6 ^a	0,9 ^a	0,39 ^{bc}	3,1 ^{bc}	16	5,8 ^{ab}
	DP	1,4	1,7	0,7	0,1	0,08	0,6		0,1
	CV(%)	1,9	34,6	3,7	10,6	20,41	20,4		1,7
Peito	Média	72,6 ^{ab}	7,8 ^b	18,2 ^{ab}	1,0 ^a	0,25 ^{cde}	2,0 ^{cde}	11	5,7 ^c
	DP	3,8	4,4	1,3	0,2	0,06	0,5		0,1
	CV(%)	5,2	55,7	7,2	16,8	25,59	25,6		1,1
Pescoço	Média	75,4 ^a	4,0 ^b	19,3 ^a	0,9 ^a	0,36 ^{bcd}	2,9 ^{bcd}	15	5,9 ^{ab}
	DP	1,5	1,9	0,2	0,04	0,06	0,5		0,1
	CV(%)	2,0	32,3	1,2	4,3	18,01	18,0		1,0
Diafragma	Média	73,0 ^{ab}	7,2 ^b	18,2 ^{ab}	1,0 ^a	0,19 ^e	1,5 ^e	8	5,9 ^{ab}
	DP	0,2	0,3	0,2	0,02	0,02	0,1		0,04
	CV(%)	0,3	4,0	0,9	2,0	9,42	9,2		0,7
Pilar do diafragma	Média	74,9 ^a	6,4 ^b	17,1 ^b	0,9 ^a	0,23 ^{de}	1,9 ^{de}	10	6,0 ^{ab}
	DP	0,4	1,5	0,4	0,1	0,04	0,3		0,1
	CV(%)	0,6	23,8	2,3	9,2	15,81	16,0		0,8
Sangria	Média	70,9 ^{ab}	9,9 ^{ab}	18,2 ^{ab}	0,9 ^a	0,41 ^b	3,3 ^b	18	5,8 ^{bc}
	DP	3,2	4,0	0,9	0,1	0,03	0,2		0,03
	CV(%)	4,5	40,9	4,8	8,7	6,05	6,1		0,5
Músculo dianteiro	Média	74,5 ^a	5,1 ^b	19,9 ^a	0,9 ^a	0,61 ^a	4,9 ^a	25	5,9 ^{ab}
	DP	0,9	1,3	0,8	0,1	0,06	0,5		0,2
	CV(%)	1,2	25,3	3,9	6,8	9,61	9,6		2,7
Carne de costela	Média	66,5 ^b	15,9 ^a	16,4 ^b	0,8 ^a	0,41 ^b	3,3 ^b	20	6,0 ^a
	DP	3,7	5,4	0,8	0,1	0,03	0,2		0,1
	CV(%)	5,6	34,2	4,8	7,2	6,88	7,1		1,0
Valor min. (%)		66,5	4,0	16,4	0,8	0,19	1,5	8	5,7
Valor max. (%)		75,4	15,9	19,9	1,0	0,61	4,9	25	6,0
Mediana (%)		74,5	6,4	18,2	0,9	0,36	2,9	15	5,9
Média (%)		73,0	7,4	18,4	0,9	0,35	2,8	15	5,9
D.P		2,8	3,8	1,0	0,1	0,13	1,0	5	0,1
C.V. (%)		3,9	48,9	5,7	5,6	36,00	36,1	34	1,5

*Médias de três dianteiros bovinos raça nelore, 30-36 meses, macho castrado.

COL = colágeno COL rel. = (COL/proteína total) x 100 DP = Desvio padrão CV = Coeficiente de variação

Tabela 12: Parâmetros físico-químicos de cortes cárneos de suínos*

Cortes cárneos		Análises físico-químicas							
		Umid. (%)	Gord. (%)	Prot. (%)	Cinzas (%)	Hidrox (%)	COL (%)	COL (rel.)	pH
Pernil	Média	71,8 ^a	7,4 ^{ef}	20,1 ^{ab}	1,1 ^b	0,15 ^{cd}	1,2 ^{cd}	6	5,9 ^{ab}
	DP	0,8	1,3	0,2	0,03	0,01	0,1		0,2
	CV(%)	1,1	17,5	1,1	2,8	9,46	9,3		3,2
Paleta	Média	70,1 ^{ab}	10,6 ^e	18,6 ^{bc}	1,0 ^{bc}	0,22 ^b	1,8 ^b	10	6,1 ^{ab}
	DP	0,3	0,2	0,1	0,02	0,04	0,3		0,3
	CV(%)	0,4	2,0	0,7	2,0	18,67	18,9		4,1
Copa	Média	64,0 ^c	18,8 ^d	16,9 ^{cd}	1,0 ^{cd}	0,18 ^{bc}	1,4 ^{bc}	8	6,2 ^a
	DP	1,2	1,8	0,6	0,1	0,01	0,1		0,4
	CV(%)	1,8	9,4	3,6	5,3	6,22	5,6		6,3
Lombo	Média	68,0 ^b	12,3 ^e	19,8 ^{ab}	1,0 ^{bc}	0,16 ^{bc}	1,2 ^{bc}	6	5,8 ^b
	DP	0,8	0,3	0,1	0,02	0,01	0,04		0,2
	CV(%)	1,2	2,6	0,5	2,0	3,23	3,2		2,6
Filezinho	Média	73,1 ^a	5,3 ^f	20,8 ^a	1,2 ^a	0,08 ^d	0,6 ^d	3	5,8 ^b
	DP	0,5	0,8	0,1	0,1	0,02	0,1		0,1
	CV(%)	0,7	16,0	0,3	4,3	19,48	19,4		1,7
Barriga	Média	55,2 ^d	30,0 ^c	14,9 ^e	0,8 ^e	0,20 ^{bc}	1,6 ^{bc}	11	5,8 ^b
	DP	0,9	2,3	0,3	0,03	0,01	0,1		0,1
	CV(%)	1,5	7,8	1,8	3,8	3,96	4,3		0,9
Carne de costela	Média	62,5 ^c	19,7 ^d	17,1 ^{cd}	0,9 ^d	0,18 ^{bc}	1,4 ^{bc}	8	5,9 ^{ab}
	DP	1,9	2,0	0,7	0,04	0,02	0,2		0,1
	CV(%)	3,0	10,1	4,1	4,4	10,73	11,4		2,4
Toucinho	Média	20,6 ^f	75,6 ^a	5,4 ^f	0,3 ^g	0,22 ^{bc}	1,7 ^{bc}	32	6,1 ^{ab}
	DP	1,7	2,3	0,8	0,04	0,05	0,4		0,02
	CV(%)	8,3	3,1	15,5	12,9	23,15	23,7		0,3
Couro	Média	38,0 ^e	46,0 ^b	15,5 ^{de}	0,4 ^f	1,28 ^a	10,2 ^a	66	6,1 ^{ab}
	DP	0,5	3,0	1,72	0,03	0,24	1,9		0,1
	CV(%)	1,3	6,5	11,12	6,8	18,62	18,6		1,0
Valor min.		20,6	5,2	5,4	0,3	0,08	0,6	3	5,8
Valor max.		73,1	75,6	20,8	1,2	1,28	10,2	66	6,2
Mediana		64,0	18,8	17,1	1,0	0,18	1,4	8	5,9
Média		58,1	25,1	16,6	0,9	0,30	2,3	17	6,0
D.P		17,8	22,8	4,7	0,3	0,37	3,0	20	0,2
C.V.		30,6	90,9	28,2	34,2	125,85	125,8	122	2,8

*Média de três LE de suínos híbridos terminais originados de machos Large White x Pietrain com híbridas Large White x Landrasse, 158 dias
 COL = colágeno COL rel. = (COL/proteína total) x 100
 DP = Desvio padrão CV = Coeficiente de variação

4 – CONCLUSÕES

Os resultados de umidade, gordura, proteína, colágeno e pH de cortes cárneos de suínos híbridos e cortes cárneos de dianteiro e carne industrial de bovinos raça Nelore apresentados nesse trabalho revelaram extensas faixas de variação e podem ser utilizados na indústria da carne, como valores médios nas planilhas de formulações, visando o cumprimento dos padrões de identidade e qualidade físico-químicos dos produtos, de acordo com a legislação vigente. Em geral, os cortes cárneos de suínos revelaram menores teores de umidade, hidroxiprolina e colágeno e maiores teores de gordura quando comparados com a carne industrial e cortes cárneos do dianteiro de bovinos. A variabilidade entre animais suínos foi ligeiramente menor quando comparada a dos bovinos nos parâmetros físico-químicos dos cortes cárneos avaliados.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMBROSIADIS, I; WIRTH, F. Comminution of connective tissue and temperature pattern in the manufacture of frankfurter-type sausages. **Fleischwirtschaft**, v. 64, n. 8, p. 945-950, 1984.
- [2] A.O.A.C. INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, 16^a edição. Arlington: AOAC International, 1996. Cap. 39, p. 13-15.
- [3] BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. England : Elsevier Science Publishers, 1989. 355p.
- [4] BRAGAGNOLO, N. **Fatores que influenciam o nível de colesterol, lipídios totais e composição de ácido graxos em camarão e carne**. Campinas, 1997, 123p. Dissertação

(Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

- [5] BRASIL. Portaria n° 05, de 8 de novembro de 1988. Aprova a padronização dos cortes de carne bovina. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 18 nov.1988. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/portaria05.htm>>. Acesso em: 11 nov.2003.
- [6] CARVALHO, E. M. **Influência do sexo e peso de abate na qualidade de carne e na composição lipídica em linhagens comerciais de suínos**. Campinas, 2003. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [7] DELLA TORRE, J. C. M. **Efeitos do uso de carne bovina pré “rigor mortis” e fosfato nas características físicas, químicas e sensoriais de embutidos tipo emulsão**. Campinas, 1991. 111p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [8] GILLET, T. A.; TANTIKARNJATHEP, K.; ANDREW, S. J. Mechanically desinewed meat: its yield, composition and effect on palatability of cooked salami. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 4, p.766-769, 1976.
- [9] KENNEY, P. B.; KASTNER, C. L.; KROPF, D. H. Raw and preheated epimysium and gelatin affect properties of low-salt, low-fat, restructured beef. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 551-554, 1992.
- [10] OLIVEIRA, A. L. Tecnologia de carnes e produtos derivados. **Apontamentos e notas de aulas -TEI-604**. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 8p. 2002.
- [11] OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: no caminho da pesquisa**. 2.ed. Cocal do Sul: IMPRINT, 2002. 155p.

- [12] PICCHI, V.; FELÍCIO, P. E.; CIA, G. Sistematização da avaliação final de bovinos e bubalinos – I. Composição corporal. **Boletim Técnico – Centro de Tecnologia de Carnes (CTC/ITAL)**, Campinas, n. 3, p.1-32, março de 1979.
- [13] RAO, B. R.; HENRICKSON, R. L. Food grade hide collagen in bologna effect on functional properties, texture and color. **J. Food Qual.**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 1983.
- [14] SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.
- [15] SGARBIERI, V. C. **Proteínas em produtos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1ª edição. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

6– AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, pelo auxílio concedido na aquisição dos bovinos (Projeto nº 2000/06438-8) e à Firma ELANCO – Eli Lilly do Brasil Ltda (Divisão Saúde Animal) pela doação dos suínos usados nesse estudo.

**Chemical composition and collagenous connective tissue
evaluation of commercial frankfurter-type sausages¹**

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)- 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.237-238.
--

Background

In finely comminuted sausages like frankfurters (hot dogs, wieners) meat protein and water are combined to form a matrix that encapsulates fat, thus forming an emulsion. Basically, a meat emulsion is a semi-fluid mass with fat particles held or suspended by meat protein and water. Curing ingredients contribute to flavor, color and preservation. The finished products may not contain more than 65% moisture, 30% fat (frankfurters, wieners, hot dogs) or 35% fat (frankfurter-type or wiener-type), but at least 12% protein (BRASIL, 2000). The same emulsion-type sausage regulation allows 4% non-meat protein, of either vegetable or animal source, as added protein, which are nevertheless not allowed in frankfurter and wiener (except for milk proteins). It is also permitted the addition (isolated or in combination) of up to 10% of skin, rind, tendon, bone marrow and offal such as brain, liver, heart, tripe, tongue, kidney, most of them, collagen-rich by products (except for frankfurter and wiener). Connective tissues are largely added to reduce meat product's costs. According to Sims and Bailey (1981), collagen exhibits a characteristic amino acid analysis result, the most noticeable feature being a high glycine and pyrrolidine content, which together comprehend approximately half of the total amino acids. The presence of the amino acid hydroxyproline in collagen (about 14%) is also a unique feature because this amino acid occurs in only a few other proteins – namely elastin (1.6%), to a lesser extent in the serum complement protein, and in certain plant proteins. Elastin is a highly insoluble fibrous protein and, as such, very difficult to isolate and purify. Elastin contributes with only about 0.5% to the overall connective tissue content of muscle, and most of it distributed within the blood vessels (tissue requiring a high degree of elasticity and recovery from deformation). A few muscles contain a high proportion of elastin, for example *M. semitendinosus* where elastin constitutes about 37% of the whole connective

tissue. According to Sadler and Young (1993), increasing replacement of lean tissue by fibrous form of connective tissue, tendon, resulted in an increasing loss of favorable texture, flavour and overall acceptability. The biological value of collagenous connective tissue is limited because of its low amino acid balance, being low in methionine and devoided of tryptophan. Adults and children consume significant amounts of processed meat products (including sausages), often using them as substitutes for meat flesh. Therefore, it is important to maintain the nutritional profile of these products.

Objectives

Evaluate chemical composition and content of collagenous connective tissue from 4-hydroxyproline amount in commercial frankfurter-type sausages. Offer helpful informations contributing to legislation standards.

Methods

Forty-eight cooked emulsion-type sausages (31 not characterized sausage, 9 hot dogs, 3 junior sausages, 4 chicken sausages and 1 wiener type sausage) from 26 different producers were chemically analysed in Adolfo Lutz Institute during the period of 2000 – 2002. The samples were finely chopped, mixed thoroughly and analysed in duplicate to determine their chemical composition. Moisture (oven at 102-105°C), protein (Kjeldahl method, factor 6.25) and fat (diethyl ether extractable) contents were determined according to Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985) procedures. Hydroxyproline assay was carried out according to the method described by AOAC (1996). Hydroxyproline was quantitatively determined, in order to measure collagenous material. Samples were hydrolyzed with 6N HCl for 8h at 110°C. After

hydrolysis, 4-hydroxyproline was converted to pyrrole with chloramine T in acetate-citrate buffer pH 6.0, and pyrrole was converted to a red-coloured complex (absorption at 558nm) by reaction with Ehrlich reagent [p-(dimethylamino)benzaldehyde in perchloric acid/2-propanol]. Total connective tissue proteins were determined by multiplying hydroxyproline contents by 8.

Results and Discussion

In Table 13, results showed that values for moisture ranged from 51.7 to 66.2% (only 1 product contained over 65% - legal limit). Fat content ranged from 9.3 to 27.9% (none over 30% and 35%), protein means, 5.4 to 15.7% (17 results below the minimum of 12%). Moisture-protein ratio (MPR) ranged from 3.8 to 11.5. Collagenous connective tissue (CCT) ranged from 0.7 to 3.1% and calculated collagenous connective tissue per total protein (CCT/P), 5.3 to 27.1%. Median and average results for emulsion type sausages stood very close to each other and revealed moisture values of 59.8% and 59.4%, fat, 18.3% both, total protein, 12.7% and 12.4%, MPR, 4.6 and 5.0, CCT, 1.7% and 1.8%, CCT/P, 13.5% and 14.7%. Coefficients of variation (C.V.) ranged from 5% for moisture to 34% for CCT. Great results variability was observed for fat, moisture protein ratio and collagenous connective tissue contents (CCP and CCP/P – Figure 12). Most samples of hot-dog type sausage, usually consumed in school lunches and in children hospitals are sent to Adolfo Lutz Institute for analysis; with a record of unsatisfactory sensory characteristics, specially concerning flavor acceptance by the consumers. Once a good meat product flavor stays intrinsically connected to non-collagenous myofibrillar proteins, it is convenient to limit maximum connective tissue proteins content in meat products allowed.

Conclusions

Commercial emulsion type sausages showed a great chemical composition variability, mainly for fat and collagenous connective tissue proteins contents. Results showed that minimum protein limit for these products were not obeyed for 35% of products analyzed. To assist in sensory problems with frankfurter-type sausages, regulation standards for maximum collagenous connective tissue content should be established.

References

AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1996. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p. 13-15.

BRASIL. Instrução Normativa nº4, 31 mar 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 abr. 2000a. Seção 1, p.6-10.

SADLER, D.H.N.; YOUNG, O.A. The Effect of preheated tendon as a lean meat replacement on the properties of fine emulsion sausages. **Meat Science**, v. 35, n. 2, p. :259-268, 1993.

SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.

SIMS, T.J.; BAILEY, A.J. Connective Tissue. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science—2**. London: Applied Science Publishers, 1981. Cap.2, p.29-59.

Table 13. Chemical parameters means for commercial emulsion type sausages

Emulsion type sausages	N	Producers	Moisture (%)	Fat (%)	Total protein (%)	Moisture protein ratio (MPR)	Collagenous Connective tissue (%)	Coll. con. tissue per total protein (%)
Not characterized sausage	1	A	62.9 (0.1)	16.3 (1.0)	13.3 (0.4)	4.7	3.1 (0.1)	23.3
	2	A	61.1 (0.1)	18.1 (0.1)	12.1 (0.1)	5.0	2.5 (0.0)	20.7
	3	B	60.0 (0.0)	16.3 (0.1)	9.2 (0.0)	6.5	1.5 (0.1)	16.3
	4	C	55.4 (0.3)	23.3 (0.4)	13.3 (0.0)	4.2	1.4 (0.1)	10.5
	5	D	58.0 (0.3)	24.2 (0.1)	11.5 (0.1)	5.0	1.3 (0.0)	11.3
	6	D	51.7 (0.2)	27.9 (0.3)	12.3 (0.0)	4.2	1.3 (0.1)	10.6
	7	E	57.5 (0.1)	20.8 (0.0)	13.7 (0.0)	4.2	1.8 (0.0)	13.1
	8	F	58.1 (0.3)	19.1 (0.5)	11.2 (0.1)	5.2	1.6 (0.0)	14.3
	9	G	60.1 (0.2)	17.9 (0.2)	14.6 (0.1)	4.1	2.9 (0.0)	19.9
	10	H	58.2 (0.0)	18.9 (0.1)	14.0 (0.1)	4.2	2.7 (0.0)	19.3
	11	H	60.1 (0.0)	20.9 (0.2)	11.5 (0.4)	5.2	2.6 (0.0)	22.5
	12	K	64.9 (0.0)	13.7 (0.0)	15.1 (1.8)	4.3	1.8 (0.0)	11.9
	13	L	60.4 (0.0)	17.1 (0.1)	13.4 (0.1)	4.5	2.5 (0.0)	18.7
	14	L	59.9 (0.1)	15.1 (0.1)	13.3 (0.0)	4.5	2.5 (0.2)	18.9
	15	M	56.3 (0.2)	22.9 (0.6)	14.3 (0.1)	3.9	1.8 (0.0)	12.3
	16	M	58.2 (0.0)	18.4 (0.1)	15.0 (0.1)	3.9	1.9 (0.1)	12.5
	17	M	57.5 (0.0)	21.2 (0.1)	13.0 (0.4)	4.4	1.5 (0.1)	11.5
	18	N	62.3 (0.1)	14.8 (0.0)	5.4 (0.2)	11.5	1.4 (0.0)	27.1
	19	P	58.3 (0.0)	17.8 (0.1)	12.2 (0.2)	4.8	1.6 (0.1)	13.1
	20	Q	58.6 (0.3)	16.9 (0.1)	9.7 (0.0)	6.0	1.6 (0.1)	16.5
	21	Q	56.0 (0.1)	17.0 (0.1)	10.3 (0.1)	5.4	1.9 (0.0)	18.2
	22	R	56.2 (0.0)	18.3 (0.0)	10.8 (0.0)	5.2	1.5 (0.0)	13.9
	23	S	58.6 (0.0)	17.8 (0.1)	11.0 (0.1)	5.3	1.0 (0.0)	9.1
	24	T	60.5 (0.2)	18.6 (0.2)	13.3 (0.0)	4.5	1.7 (0.0)	12.8
	25	U	57.3 (0.0)	21.6 (0.3)	12.9 (0.1)	4.4	2.9 (0.0)	22.5
	26	V	53.7 (0.0)	22.5 (0.2)	14.2 (0.1)	3.8	2.6 (0.0)	18.6
	27	W	64.1 (0.0)	9.3 (1.5)	9.3 (0.1)	6.9	1.4 (0.1)	15.4
	28	X	62.9 (0.1)	13.7 (0.2)	15.7 (0.4)	4.0	1.3 (0.0)	8.6
	29	X	60.7 (0.1)	15.0 (0.2)	14.9 (0.1)	4.1	1.3 (0.0)	8.7
	30	Y	60.1 (0.1)	18.2 (0.2)	13.4 (0.8)	4.5	1.9 (0.0)	14.2
	31	Z	58.0 (0.1)	14.8 (0.1)	10.4 (0.0)	5.6	0.9 (0.0)	8.7
Hot Dog	32	D	55.0 (0.3)	23.1 (0.2)	13.1 (0.2)	4.2	2.2 (0.0)	16.8
	33	D	57.2 (0.1)	21.8 (0.2)	12.3 (0.1)	4.7	1.3 (0.0)	10.6
	34	H	62.6 (0.0)	18.6 (0.1)	11.9 (0.1)	5.3	2.1 (0.2)	17.7
	35	H	60.8 (0.3)	21.1 (0.0)	10.9 (0.1)	5.6	2.4 (0.0)	22.0
	36	I	64.3 (0.1)	15.3 (0.1)	13.3 (0.3)	4.8	1.4 (0.0)	10.3
	37	I	66.2 (0.0)	13.4 (0.0)	12.2 (0.6)	5.4	1.2 (0.0)	9.7
	38	I	59.6 (0.2)	18.6 (0.1)	13.8 (0.1)	4.3	2.5 (0.1)	18.1
	39	O	57.9 (0.2)	13.6 (0.2)	8.0 (0.1)	7.2	1.0 (0.1)	12.5
	40	S	58.3 (0.1)	18.8 (0.2)	11.4 (0.0)	5.1	1.0 (0.0)	8.8
Junior sausage	41	D	61.2 (0.1)	19.0 (0.1)	13.3 (0.1)	4.6	0.7 (0.0)	5.3
	42	E	61.0 (0.1)	17.4 (0.0)	13.2 (0.0)	4.6	2.6 (0.0)	19.7
	43	I	58.7 (0.1)	18.3 (0.1)	14.9 (0.0)	3.9	1.4 (0.0)	9.4
Chicken sausage	44	A	61.1 (0.1)	13.1 (0.2)	12.4 (0.2)	4.9	2.2 (0.1)	17.7
	45	C	54.8 (0.4)	26.6 (0.2)	12.5 (0.0)	4.4	2.3 (0.0)	18.4
	46	J	61.0 (0.5)	16.2 (0.4)	11.4 (0.0)	5.4	1.1 (0.1)	9.6
	47	J	61.3 (0.3)	20.0 (0.0)	10.9 (0.1)	5.6	1.3 (0.2)	11.7
Wiener sausage	48	I	61.0 (0.0)	17.3 (0.0)	14.6 (0.0)	4.2	1.7 (0.0)	11.6
Minimum value			51.7	9.3	5.4	3.8	0.7	5.3
Maximum value			66.2	27.9	15.7	11.5	3.1	27.1
Median			59.8	18.3	12.7	4.6	1.7	13.5
Average			59.4	18.3	12.4	5.0	1.8	14.7
S.D.			2.9	3.6	2.0	1.2	0.6	4.8
C.V. (%)			5	20	16	25	34	33

S.D. = Standard deviation C.V.= Coefficient of variation

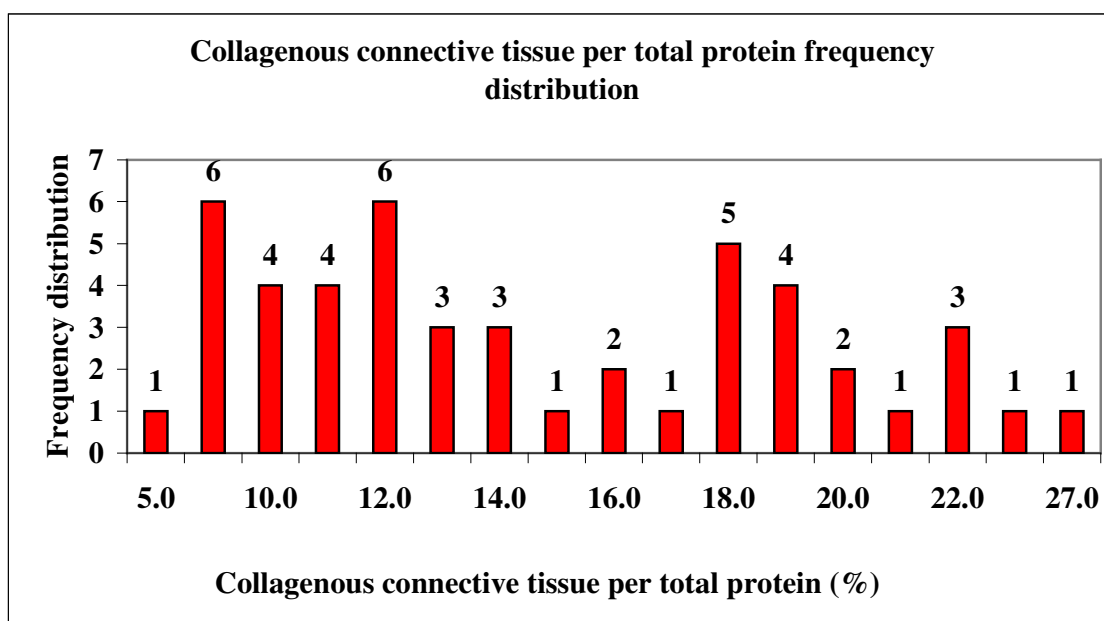
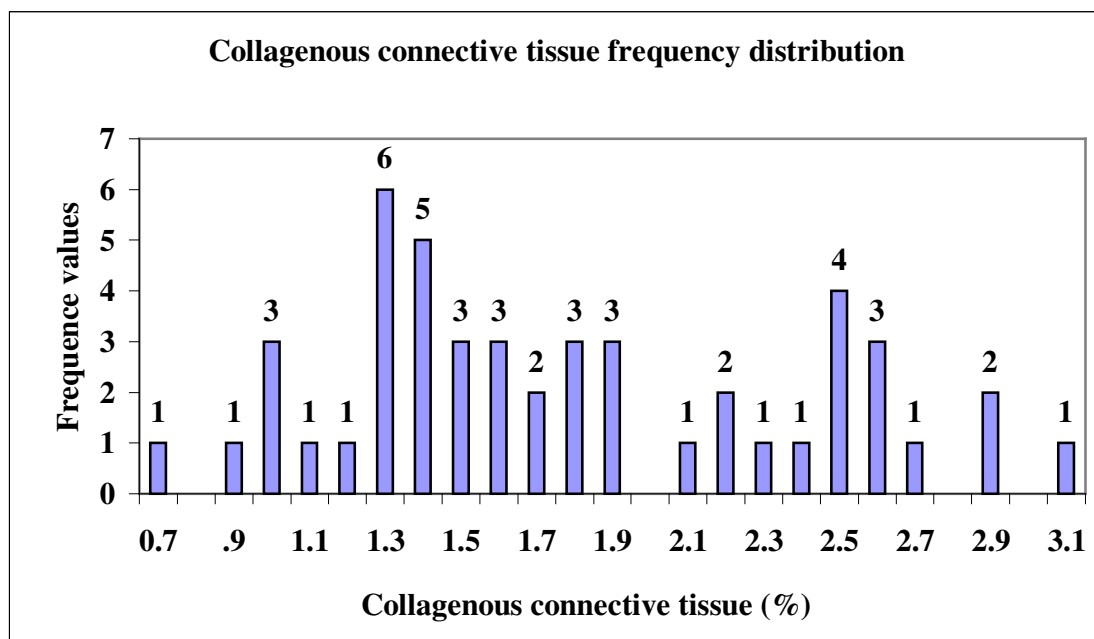


Figure 13. Collagenous connective tissue frequency distribution for commercial emulsion type sausages

**Chemical composition and collagenous connective tissue
evaluation of commercial fresh ground sausages¹**

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) - 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.239-240.
--

Background

Fresh ground sausages are a coarse comminuted meat product prepared from chopped pork fat and one or more kinds of meat. They are usually seasoned, frequently cured and stuffed into casings. They must be kept refrigerated and thoroughly cooked before eating. Many sausages took on the names of areas where they were thought to have originated, resulting in typical flavors, textures and shapes. Many present-day sausages still carry those names; examples are Tuscan and Calabrian type fresh sausages. In the coarsely ground fresh sausages, where fat is often visible to the consumer, fat levels are limited to 30%, moisture, to 70% and finished product must contain at least 12% protein (BRASIL, 2000). Non-meat protein of either animal, or vegetal source, at level of 2.5%, may be added to fresh sausages (except in the case of sausages characterized as calabrian and tuscan) and may not contain mechanically deboned meat or starch (BRASIL, 2000). Sausage manufactures presently use meat containing large quantities of connective tissue (collagen) to reduce processing costs. The essential amino acid content of collagen represents 6-22% of its total amino acids compared to reference pattern, which represents 36% of “ideal” protein. There is clearly a large reduction in the levels of almost all of those components (BAILEY; LIGHT, 1989). Collagen contains no tryptophan and only very few aromatic or sulphur-containing amino acids. Zarkadas et al. (1993) suggested that connective tissue contents of meats can be a useful parameter to evaluate their protein quality. The advantages of using collagen determinations to predict PER of meat samples are: no sophisticated instrument, such as an amino acid analyzer, is needed; it is simpler and less expensive; and small processors can easily perform this analysis in their quality-control laboratory. Later testes with sensory panels showed that there is a good negative correlation between taste parameters and the amount of collagenous connective tissue

in meat products. In other words, the greater the amount of collagen that is present, the lower the eating quality may be expected to be. The influence of connective tissue on the nutritional and sensory quality has been the basis for the introduction by many countries of regulations requiring maximum contents of collagenous connective tissue protein in meat products. So characteristic is the presence of hydroxyproline in collagen, that it has been used for many years as a mean of determining the amount of collagen present in a tissue (SIMS; BAILEY, 1981).

Objectives

Determine chemical composition, moisture protein ratio, and content of collagenous connective tissue from 4-hydroxyproline amount in commercial fresh ground sausages. Evaluate sensory appearance and offer helpful informations contributing to legislation standards.

Methods

Fifty five fresh ground sausage samples (20 not characterized, 16 tuscan-type, 5 calabrian-type, 3 beef and pork meat mixed, 9 pork meat, 2 poultry meat sausages) from 29 different producers were chemical and visually analysed in Adolfo Lutz Institute during the period of 2000 – 2002. The samples were finely chopped and mixed thoroughly. Chemical analysis of moisture (oven at 102-105°C), protein (Kjeldahl method, factor 6.25) and fat (diethyl ether extractable) contents were determined in duplicate according to Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985) procedures. Hydroxyproline analysis was according to the method described by AOAC (1996). Collagenous connective tissue proteins were determined by multiplying

hydroxyproline contents by 8. The analyst, before chopping the fresh sausage samples, evaluated the visual appearance for connective tissue and fat amounts as S=slight, R=regular or M=much; and an overall acceptability value from 1 to 5 (1=worst, 2=bad, 3=regular, 4=good, 5=very good) was attributed to the product, taking in consideration both parameters' results.

Results and Discussion

In Table 14, results showed that values for moisture ranged from 43.4 to 74.3% (6 products were over the 70% limit established by legislation). Fat content ranged from 2.7 to 46.1% (10 over 30%), protein means, from 8.4 to 18.5% (22 below 12%). Moisture-protein ratio (MPR) ranged from 2.9 to 5.9. Collagenous connective tissue (CCT) ranged from 0.7 to 5.4% and calculated collagenous connective tissue per total protein (CCT/P), from 4.3 to 39.8%. Median and average results for fresh sausages revealed values of moisture of 59.7% and 60.0%, fat, 23.4% and 22.6%, total protein, 12.4% and 13.0%, MPR, 4.8 and 4.7, CCT, 1.8% and 2.0%, CCT/P, 15.2% and 16.6%. Coefficients of variation (C.V.) ranged from 12% for moisture to 51% for CCT/P. Great results variability was observed for fat and collagenous connective tissue contents (CCP and CCP/T – Figure 13). There was a good relation between appearance acceptability values, fat and connective tissue amounts attributed by analyst and analytical collagenous connective tissue or fat contents. Usually, samples that reached low appearance acceptability grades already had a background of consumers' sensorial complaints.

Conclusions

Commercial coarse fresh sausages revealed a great variability on fat and collagenous connective tissue contents. Results showed that minimum protein, maximum moisture and maximum fat limits were not obeyed respectively for 43%, 11% and 18% of the analysed products. This study demonstrated that regulation standards should include maximum collagenous connective tissue amounts for sensory reasons and to minimize deceptive practices regarding fresh ground sausage meat products.

References

AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1996. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p. 13-15.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. Connective tissue in meat and meat products. London: Elsevier Applied Science, 1989. 355p.

BRASIL. Instrução Normativa nº4, 31 mar 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 abr. 2000a. Seção 1, p.6-10.

SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.

SIMS, T.J.; BAILEY, A.J. Connective Tissue. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science–2**. London: Applied Science Publishers, 1981. Cap.2, p.29-59.

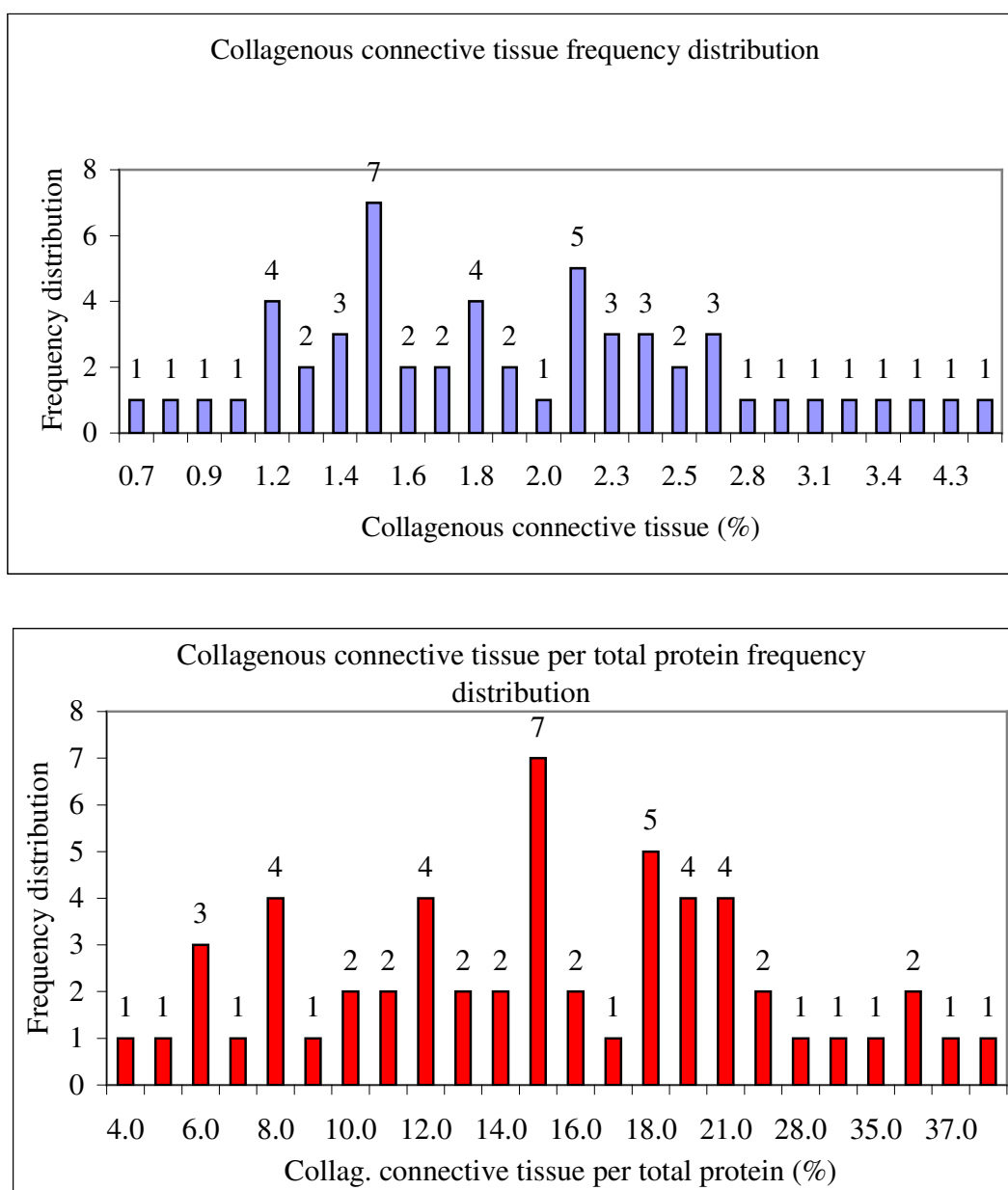


Figure 14. Collagenous connective tissue frequency distribution for commercial fresh ground sausage.

Table 14. Chemical means and appearance parameters for fresh ground sausage

Types of coarse fresh sausage	N	Producers	Moisture (%)	Fat (%)	Total protein (%)	Moisture protein ratio (MPR)	CCT (%)	CCT rel (%)	Appearance evaluation		
									Connect. tissue amount*	Fat amount*	Value ** (1-5)
Not characterized sausage	1	A	55.0 (0.6)	31.4 (1.9)	12.3 (0.7)	4.5	2.6 (0.5)	21.1	-	-	-
	2	A	52.0 (0.1)	33.4 (1.1)	12.1 (0.2)	4.3	2.3 (0.2)	19.0	R	R	2
	3	A	70.4 (0.5)	11.6 (0.2)	13.8 (0.1)	5.1	2.0 (0.3)	14.5	S	S	4
	4	A	71.1 (0.5)	9.3 (0.5)	14.7 (1.6)	4.8	1.5 (0.1)	10.2	S	S	4
	5	A	44.7 (0.2)	42.4 (0.3)	9.0 (0.1)	5.0	3.3 (0.3)	36.7	M	M	1
	6	B	65.0 (0.9)	17.2 (0.7)	15.4 (0.8)	4.2	5.4 (1.0)	35.1	M	R	1
	7	C	49.2 (0.3)	39.5 (1.4)	9.9 (0.8)	5.0	3.0 (0.5)	30.3	M	M	1
	8	D	65.9 (0.4)	13.2 (0.2)	16.8 (0.1)	3.9	1.2 (0.1)	7.1	S	S	4
	9	E	57.5 (0.4)	24.6 (0.0)	12.0 (0.3)	4.8	1.5 (0.0)	12.5	S	M	3
	10	F	66.2 (0.5)	16.8 (0.7)	13.9 (1.8)	4.8	2.5 (0.1)	18.0	R	R	3
	11	F	60.6 (1.0)	18.8 (0.5)	15.0 (0.1)	4.0	1.2 (0.1)	8.0	S	R	4
	12	G	57.2 (0.1)	24.4 (0.9)	12.3 (0.6)	4.7	3.4 (0.3)	27.6	R	R	3
	13	H	57.8 (0.1)	25.7 (0.5)	12.1 (0.0)	4.8	1.5 (0.2)	12.4	R	R	3
	14	H	61.5 (0.2)	22.8 (0.4)	12.8 (0.4)	4.8	1.5 (0.2)	11.7	R	R	3
	15	I	63.5 (0.3)	19.1 (0.6)	12.4 (0.3)	5.1	1.3 (0.1)	10.5	S	R	3
	16	J	52.4 (0.5)	27.8 (1.3)	17.8 (1.3)	2.9	2.2 (0.1)	12.4	R	R	3
	17	K	56.3 (0.1)	26.1 (0.0)	10.8 (0.0)	5.2	4.3 (0.2)	39.8	M	M	1
	18	L	56.8 (0.0)	28.1 (0.4)	11.2 (0.1)	5.1	1.8 (0.1)	16.1	R	R	2
	19	L	49.1 (0.5)	32.8 (0.4)	11.7 (0.1)	4.2	1.7 (0.1)	14.5	R	M	2
	20	M	55.5 (1.4)	26.4 (1.4)	11.5 (1.3)	4.8	2.8 (0.0)	24.3	M	R	2
Tuscan type sausage	21	D	65.0 (0.1)	14.4 (0.1)	17.3 (0.0)	3.8	1.5 (0.0)	8.7	S	S	4
	22	D	64.7 (0.3)	15.6 (0.9)	16.0 (0.1)	4.0	1.2 (0.0)	7.5	S	S	4
	23	D	67.4 (0.4)	11.0 (0.9)	16.2 (0.3)	4.2	0.7 (0.0)	4.3	S	S	4
	24	G	63.4 (0.1)	19.1 (2.2)	12.6 (0.5)	5.0	2.4 (0.1)	19.0	R	R	3
	25	G	57.4 (0.3)	26.8 (1.3)	11.6 (0.2)	4.9	1.8 (0.0)	15.5	R	R	3
	26	N	63.1 (0.0)	19.3 (1.0)	13.0 (0.1)	4.9	2.4 (0.2)	18.5	R	R	3
	27	N	58.8 (0.5)	27.6 (0.5)	13.4 (0.4)	4.4	2.6 (0.2)	19.4	R	R	3
	28	N	55.9 (0.2)	29.2 (0.9)	10.8 (0.1)	5.2	2.6 (0.1)	24.1	S	R	3
	29	O	49.7 (0.5)	34.8 (0.3)	11.4 (1.4)	4.4	1.7 (0.2)	14.9	S	M	2
	30	P	58.0 (0.3)	23.8 (1.3)	12.5 (0.6)	4.6	2.2 (0.1)	17.6	R	R	3
	31	P	58.7 (0.2)	20.0 (1.5)	11.8 (0.3)	5.0	2.2 (0.2)	18.6	M	S	2
	32	Q	65.4 (1.7)	15.7 (0.1)	16.0 (0.1)	4.1	1.8 (0.0)	11.3	S	S	5
	33	R	45.8 (0.2)	34.2 (2.2)	11.0 (0.9)	4.2	3.9 (0.3)	35.5	M	M	1
	34	S	58.0 (0.6)	26.7 (0.0)	9.8 (1.0)	5.9	1.5 (0.1)	15.3	S	R	3
	35	T	53.5 (0.5)	29.9 (0.5)	10.9 (0.4)	4.9	1.4 (0.3)	12.8	-	-	-
	36	U	58.7 (0.3)	25.1 (0.3)	10.8 (0.8)	5.4	1.9 (0.2)	17.6	R	R	3
Calabrian type sausage	37	O	68.3 (0.1)	8.9 (0.1)	17.7 (0.1)	3.9	1.1 (0.0)	6.2	S	S	5
	38	P	62.2 (0.1)	23.3 (0.2)	11.0 (0.1)	5.7	1.9 (0.1)	17.3	S	R	4
	39	P	60.9 (0.0)	22.0 (0.4)	12.5 (0.2)	4.9	0.8 (0.1)	6.4	R	R	2
	40	V	62.1 (0.6)	16.8 (1.3)	14.6 (0.4)	4.3	1.4 (0.2)	9.6	R	S	4
	41	W	57.1 (0.3)	25.3 (0.1)	10.8 (0.5)	5.3	2.3 (0.1)	21.3	R	R	2

/ continuação

Types of coarse fresh sausage	N	Producers	Moisture (%)	Fat (%)	Total protein (%)	Moisture protein ratio (MPR)	CCT (%)	CCT rel (%)	Appearance evaluation		
									Connect. tissue amount*	Fat amount*	Value ** (1-5)
Beef and pork mixed sausage	42	X	61.2 (0.3)	24.1 (0.2)	11.4 (0.1)	5.4	2.4 (0.1)	21.1	R	R	3
	43	Y	59.8 (0.5)	23.5 (0.9)	12.2 (0.4)	4.9	2.2 (0.6)	18.0	S	R	4
	44	AD	43.4 (1.3)	46.1 (1.5)	8.4 (0.1)	5.2	3.1 (0.4)	36.9	M	M	1
Pork sausage	45	A	70.5 (0.3)	11.9 (0.3)	13.7 (0.4)	5.1	2.2 (0.3)	16.1	S	R	3
	46	L	55.6 (0.2)	29.1 (0.5)	10.6 (0.1)	5.2	1.6 (0.1)	15.1	S	M	3
	47	X	72.6 (0.2)	6.4 (0.0)	18.5 (0.2)	3.9	1.2 (0.0)	6.5	S	S	5
	48	Y	67.8 (0.2)	17.0 (0.0)	11.5 (0.3)	5.9	1.5 (0.2)	13.0	S	R	3
	49	Z	59.6 (0.1)	21.1 (0.4)	16.4 (0.1)	3.6	1.3 (0.4)	7.9	S	R	4
	50	AB	54.0 (0.5)	31.1 (0.4)	10.6 (0.3)	5.1	1.6 (0.3)	15.1	R	M	2
	51	AC	50.0 (0.2)	33.4 (1.1)	10.7 (0.2)	4.7	2.3 (0.2)	21.5	R	M	3
	52	P	71.3 (0.1)	11.7 (0.0)	13.0 (0.0)	5.5	1.4 (0.0)	10.8	S	S	5
	53	N	65.6 (0.3)	15.6 (0.2)	16.2 (0.5)	4.0	2.5 (0.4)	15.4	S	R	4
Poultry sausage	54	S	74.3 (0.2)	2.7 (0.1)	17.2 (2.1)	4.3	0.9 (0.1)	5.2	S	S	5
	55	Y	66.7 (0.1)	16.5 (0.1)	13.0 (0.4)	5.1	1.8 (0.1)	13.8	S	R	4
Min. value			43.4	2.7	8.4	2.9	0.7	4.3			
Max. value			74.3	46.1	18.5	5.9	5.4	39.8			
Median			59.7	23.4	12.4	4.8	1.8	15.2			
Average			60.0	22.6	13.0	4.7	2.0	16.6			
S.D.			7.2	9.0	2.4	0.6	0.9	8.5			
C.V. (%)			12	40	19	13	43	51			

*Connective tissue and fat amounts: S= slight R=regular M=much

**Overall acceptability value: 1=worst; 2=bad; 3=regular; 4=good; 5=very good

SD= standard deviation

C.V.= coefficient of variation

CCT = collagenous connective tissue

CCT rel = collagenous connective tissue per total protein

**Effects of connective tissue proteins on chemical
composition and sensory properties of ground beef¹**

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) - 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.255-256.
--

Background

Meat is an important source of protein in the diet and the major meat proteins provide a good balance of the essential amino acids needed by man. However, the connective tissue components of meat, collagen and elastin, have uncharacteristic amino acid compositions, which either lack or present low amounts of several of the essential amino acids. This makes the connective tissue nutritionally poor and could influence the overall quality of meat if they were present in high amounts (BAILEY; LIGHT, 1989). Sensory analysis is an additional method of determining overall quality of meat products by using human tasters in organized and formalized experiments. To characterize sensory and nutritional value of ground meat, it is necessary to know the tissue composition. Besides fat and water content, the major emphasis in quality grading is placed on the muscle protein and connective tissue. The determination of connective tissue is an essential part of every quality control procedure. The term connective tissue covers a wide variety of structures within the body. There are those, such as tendons and ligaments, which clearly connect and hold tissues together, while others, associate more intimately with specific organs. In muscle, for example, connective tissue is present as epi, peri- and endomysial components, which surround and invest the muscle fibers and thus provide the functional integrity, essential for precise muscle action (SIMS; BAILEY, 1981). Connective tissue is a major problem associated with the acceptance of ground beef. The raw ground beef meat regulations allow up to 10% fat and 3% sinew without bone, tendon and cartilages (BRASIL, 1978). With regulation purpose in views, it is necessary to establish the analytical value of collagenous connective tissue proteins that can be present in beef ground meat, in order to ensure their nutritive and sensory value.

Objectives

Evaluate the effects of raw beef connective tissue at 0 to 50% replacement levels on the chemical composition, collagenous connective tissue amount, pH, color values and sensory acceptance of raw ground beef meat. Determine their effects on sensory properties of hamburgers. Offer helpful informations contributing to legislation standards.

Methods

Products manufacture: the fresh beef connective tissue (BCT) consists largely of epimysium and perimysium removed from bovine muscles obtained from a commercial packing plant that utilizes Skyner machine (Model 7600 - Townsend). The BCT was packaged in vacuum plastic bags and frozen at -18°C . BCT packages were 24h thawed in refrigerator and passed three times through a grinder (CAF 8) plate having 5mm diameter holes. Commercially available quadriceps femoris muscles were manually trimmed to remove intermuscular fat, epimysial connective tissue, heavy bands of connective tissue within the muscle and grounded through a 5mm plate. BCT was added to ground meat at 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50% levels. The control (0%) contained only grounded lean meat. Every treatment was mixed for 3 min in 2Kg lots using an orbital mixer. The ground meat mixtures were promptly utilized for chemical analysis, pH, objective color measurements and consumer acceptance test. The 10, 20 and 30% BCT formulations were mixed for 1min with 1.0% salt, 0.5% onion soup powder, formed up into 80g hamburgers (10 cm in diameter) and placed in a -18°C freezer until the time of sensory analysis. **Physico-chemical analysis:** moisture, protein (Kjeldahl, $\text{Nx}6,25$), fat (diethyl ether extractable) and ash contents were determined in

duplicate following Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985) procedures. pH values were measured with a spear-tip electrode attached to digital pH-meter (HANNA Instruments – HI9321 microprocessor). **Hydroxyproline assay:** was carried out according to the method described by AOAC (1996). Hydroxyproline is quantitatively determined for collagenous material amount measurement. Samples are hydrolyzed with 6N HCl for 8h at 110 degrees C. After hydrolysis, 4-hydroxyproline is converted to pyrrole with chloramine T in acetate-citrate buffer pH 6.0, and pyrrole is converted to a red-coloured complex (absorption at 558nm) by reaction with Ehrlich reagent [p-(dimethylamino)benzaldehyde in perchloric acid/2-propanol]. **Total connective tissue proteins:** were determined multiplying the hydroxyproline contents by 8. **Color:** five objective color readings were taken from ground meat mixture surfaces using a spectrophotometer Minolta CM-508d, with Illuminant D₆₅ and 2° standard observer. The results were expressed as CIE-Lab L* (lightness), a* (redness), b* (yellowness). **Sensory evaluation:** a trained 11-member panel rated raw ground meat mixtures formulated with 10, 20 and 30% BCT for red color and sinew amount, using a unstructured 10 cm line. The attributes firmness, amount of residual connective tissue remaining at the end of the chewing process, characteristic flavor and masticability (chews number) were evaluated in hamburgers roasted in a 260-280°C electric oven for 20 min, quartered, and served as hot as possible to the panelists in booths under red lights with controlled temperature. Replicate judgments were made among all assistants. **Consumer acceptance test:** a consumer panel test was carried out for 57 panelists. Five numbered ground meat mixture 0, 10, 20, 30 and 40% BCT replacement were presented in booths with controlled temperature. The appearance acceptability was evaluated on a 9 points verbal hedonic scale, sinew amount in a 9 points just right scale and purchase intent in a 5 points scale. **Statistical analysis:** the sensory design was randomized

complete block. Results were statistically analyzed by ANOVA and Tukey test of 5% level of significance using GraphPad InStat Software v2.01 (1990-1993).

Results and Discussion

Based on Table 15 results, for raw beef connective tissue (BCT) at 0 to 50% replacement levels to ground beef meat, ranges of percent moisture were 76.46-70.04%, fat 2.24-8.40%, total protein 19.84-20.58%, ash 1.03-0.91%, hydroxyproline 0.08-0.52%, collagenous connective tissue 0.62-4.15%, collagenous connective tissue per total protein 3.12-20.16%, pH 5.81-5.65, L* value 36.02-45.14, a* value 19.42-14.71 and b* value 4.68-9.85. The addition of 20% BCT decreased moisture, increased fat and L* (lightness) when compared to the control 0% ($p < 0.05$). BCT added at 15% level increased ($p < 0.05$) 4-Hydroxyproline and collagenous connective tissue compared to the control. Addition of BCT had a slight increase effect on total protein of ground meat ($p > 0.05$). Ash was affected with 30% BCT replacement. BCT had a significant effect on pH, but the actual range in pH value (0.16 units) was of little practical importance. Color a* (redness) and b*(yellowness) values were significantly different from control at 35% BCT level. As assessed by sensory panel (Table 16), 20% BCT added to ground meat significantly ($p < 0.05$) reduced red color intensity, increased sinew amount (appearance) and hamburger firmness. Hamburgers added with 30% BCT showed increased masticability, connective tissue residue remaining at the end of mastication and decreased characteristic flavor. Laboratory consumer test (Table 17) revealed that 20% BCT in ground meat resulted in a slightly disliked appearance; moderately too much sinew amount and this product maybe/maybe not would buy. Figure 15 shows closer linear relationship between

collagenous connective tissue ($r=0,985$) or collagenous connective tissue per total protein ($r=0,973$) and predicted beef connective tissue.

Conclusions

In general, fresh beef connective tissue (BCT) added to beef ground meat decreases values and contents of moisture, ash, pH, a^* (redness), increases fat, hydroxyproline, collagenous connective tissue, collagenous connective tissue per total protein, L^* (lightness) and b^* (yellowness). There was a definite linear relationship between the amount of connective tissue added and determined. These findings suggest that analytical collagenous connective tissue content can be a useful parameter for regulatory evaluation of connective tissue replacement in beef ground meat. Connective tissue contributed to increase hamburger firmness, masticability, as well as to decrease red color and characteristic flavor. Addition of 10% BCT ground meat resulted in acceptable product appearance; more connective tissue replacement produced less acceptable ground meat.

References

AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1996. Cap. 39 (Meat and Meat Products), p. 13-15.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. London Elsevier Applied Science, 1989. 355p.

SÃO PAULO (Estado). Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. **DO [do] Estado de São Paulo**, São Paulo, n.200, 21 out 1978. Seção I, p.3-4.

SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.

SIMS, T.J.; BAILEY, A.J. Connective Tissue. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science–2**. London: Applied Science Publishers, 1981. Cap.2, p.29-59.

Table 15. Chemical composition and physical parameters means for ground meat containing beef connective tissue

Parameters	Beef connective tissue replacement in ground meat (%)												
	0	3	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	100
Moisture (%)	76.46 ^a (0.12)	75.82 ^a (0.82)	75.31 ^{ab} (0.33)	75.39 ^{ab} (0.17)	74.92 ^{ab} (0.42)	73.54 ^{bc} (0.87)	73.67 ^{bc} (0.75)	72.28 ^{cd} (0.02)	71.65 ^{cde} (0.23)	71.00 ^{de} (0.36)	70.70 ^{de} (0.77)	70.04 ^e (0.06)	62.92 ^f (0.71)
Fat (%)	2.24 ^g (0.11)	2.58 ^{fg} (0.12)	2.92 ^{fg} (0.39)	4.30 ^{efg} (0.31)	3.96 ^{efg} (0.06)	4.70 ^{def} (0.02)	5.63 ^{cde} (1.11)	6.67 ^{bcd} (0.23)	6.70 ^{bcd} (0.45)	7.72 ^{bc} (0.43)	8.33 ^b (0.88)	8.40 ^b (1.19)	15.45 ^a (0.49)
Total protein (%)	19.84 ^b (0.42)	19.88 ^b (0.31)	20.01 ^b (0.42)	19.96 ^b (0.34)	20.04 ^b (0.65)	20.02 ^b (0.16)	19.48 ^b (0.06)	19.96 ^b (0.31)	19.85 ^b (0.47)	20.02 ^b (0.54)	20.26 ^{ab} (0.61)	20.58 ^{ab} (0.08)	21.76 ^a (0.32)
Ash (%)	1.03 ^a (0.01)	1.00 ^{ab} (0.04)	1.00 ^{abc} (0.02)	1.02 ^a (0.00)	1.02 ^a (0.01)	1.00 ^{a,b} (0.01)	0.99 ^{abc} (0.03)	0.94 ^{bcd} (0.01)	0.94 ^{bcd} (0.00)	0.94 ^{bcd} (0.01)	0.93 ^{cd} (0.01)	0.91 ^d (0.02)	0.77 ^e (0.02)
Hydroxyprol. (%)	0.08 ^f (0.03)	0.10 ^{ef} (0.00)	0.13 ^{ef} (0.02)	0.17 ^{ef} (0.00)	0.22 ^{de} (0.02)	0.32 ^{cd} (0.09)	0.36 ^c (0.04)	0.43 ^{bc} (0.01)	0.44 ^{bc} (0.03)	0.51 ^b (0.03)	0.50 ^b (0.01)	0.52 ^b (0.01)	1.01 ^a (0.03)
Collagenous con. tissue (%)	0.62 ^f (0.26)	0.79 ^{ef} (0.03)	1.06 ^{ef} (0.18)	1.36 ^{ef} (0.01)	1.74 ^{de} (0.128)	2.55 ^{cd} (0.71)	2.87 ^c (0.29)	3.42 ^{bc} (0.06)	3.50 ^{bc} (0.26)	4.09 ^b (0.25)	4.02 ^b (0.10)	4.15 ^b (0.13)	8.09 ^a (0.21)
Coll. con.tissue per total protein (%)	3.12	3.97	5.30	6.81	8.68	12.74	14.73	17.13	17.63	20.43	19.84	20.16	37.18
pH value	5.81 ^a (0.01)	5.80 ^{ab} (0.01)	5.76 ^{bc} (0.01)	5.76 ^{bc} (0.01)	5.76 ^{bc} (0.01)	5.74 ^{cd} (0.01)	5.75 ^{bc} (0.01)	5.68 ^{def} (0.00)	5.67 ^{ef} (0.01)	5.65 ^f (0.03)	5.67 ^{e,f} (0.01)	5.65 ^f (0.01)	5.71 ^{c,d,e} (0.01)
L* value	36.02 ^f (1.02)	36.50 ^{ef} (1.77)	37.45 ^{def} (2.84)	38.06 ^{def} (2.11)	39.54 ^{cdef} (2.70)	42.17 ^{bcd} (2.76)	42.16 ^{bcd} (1.83)	43.01 ^{bcd} (4.56)	44.90 ^{bc} (3.50)	47.01 ^b (1.96)	45.82 ^b (3.71)	45.14 ^{b,c} (3.13)	54.71 ^a (1.23)
a* value	19.09 ^{ab} (0.28)	17.09 ^{abc} (1.22)	19.42 ^a (1.10)	18.52 ^{abc} (2.20)	17.89 ^{abc} (1.47)	17.55 ^{abc} (1.00)	16.50 ^{abc} (1.80)	16.29 ^{abc} (2.19)	15.35 ^{bcd} (3.11)	14.71 ^{cd} (1.86)	15.71 ^{abc} (1.59)	15.69 ^{abc} (2.67)	11.45 ^d (1.23)
b* value	5.67 ^d (0.81)	4.68 ^d (0.84)	6.48 ^{cd} (2.62)	5.72 ^{cd} (0.61)	6.75 ^{bcd} (0.98)	7.58 ^{bcd} (1.19)	7.75 ^{bcd} (1.86)	7.71 ^{bcd} (2.47)	8.89 ^{abc} (1.31)	9.21 ^{ab} (0.66)	9.85 ^{ab} (1.75)	9.51 ^{ab} (1.14)	10.99 ^a (0.60)

() Standard deviation

^{abcdef} Means on the same horizontal row with different superscripts are significantly different (p<0,05)

Table 16. Mean sensory scores for beef hamburgers

Sensory attributes*	Beef connective tissue (BCT) replacement in hamburgers (%)		
	10	20	30
Red color ¹	6.38 ^a (0.28)	4.31 ^b (0.36)	3.01 ^c (0.40)
Sinew amount ²	4.15 ^c (0.40)	6.35 ^b (0.23)	7.90 ^a (0.26)
Firmness ³	5.31 ^b (0.35)	6.42 ^a (0.32)	7.04 ^a (0.27)
Connective tissue amount ⁴	4.76 ^b (0.48)	5.58 ^b (0.47)	6.66 ^a (0.32)
Characteristic flavour ⁵	6.88 ^a (0.47)	5.93 ^{a,b} (0.49)	5.52 ^b (0.46)
Mastigability ⁶	36 ^b (3)	37 ^b (4)	44 ^a (5)

* Means of 11 judgments using 10cm linear scale

¹0=slight; 10=intense;

²0=none; 10=very abundant;

³0=not firm; 10=very firm; ⁴0=none; 10=abundant; ⁵0=slight; 10=intense; ⁶Number of chews

^{a,b,c}Means on the same horizontal row with different superscripts are significantly different (p<0.05)

() Standard error of the mean

Table 17. Laboratory consumer test for ground beef meat added with beef connective tissue

Sensory attributes	Beef connective tissue (BCT) replacement in ground meat (%)				
	0	10	20	30	40
Hedonic scale ¹	7.85 ^a	6.24 ^b	4.29 ^c	2.56 ^d	1.47 ^e
Appearance acceptability	(0.16)	(0.21)	(0.20)	(0.14)	(0.08)
Just right scale ²	-0.21 ^e	1.02 ^d	2.21 ^c	2.87 ^b	3.74 ^a
Sinew amount	(0.09)	(0.13)	(0.12)	(0.13)	(0.08)
Purchase intent scale ³	4.63 ^a	3.93 ^b	2.56 ^c	1.75 ^d	1.10 ^e
	(0.12)	(0.10)	(0.12)	(0.11)	(0.04)

¹9=like extremely; 5=neither like not dislike; 1= dislike extremely

²+4=extremely too much; 3=much too much; 2= moderately too much; 1= somewhat too much;

0= just right; -1= somewhat too little; -4=extremely too little

³5=definitely would buy; 4=probably would buy; 3=maybe/maybe not. 2=probably would not buy;

1=definitely would not buy

^{a,b,c}Means on the same horizontal row with different superscripts are significantly different (p<0.05)

- 57 judgments

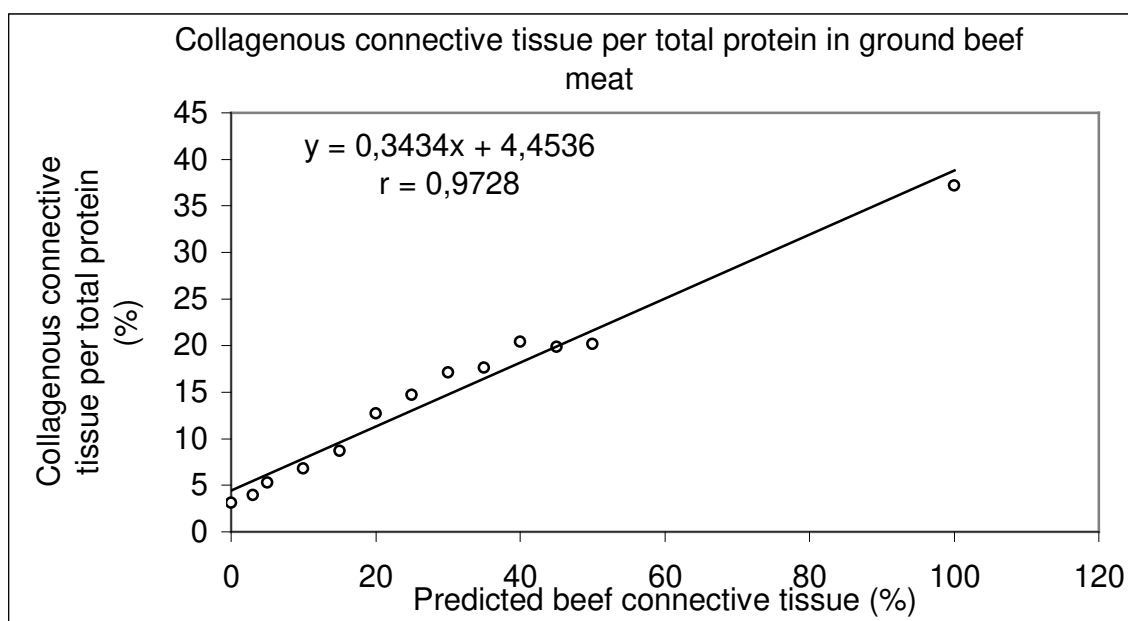
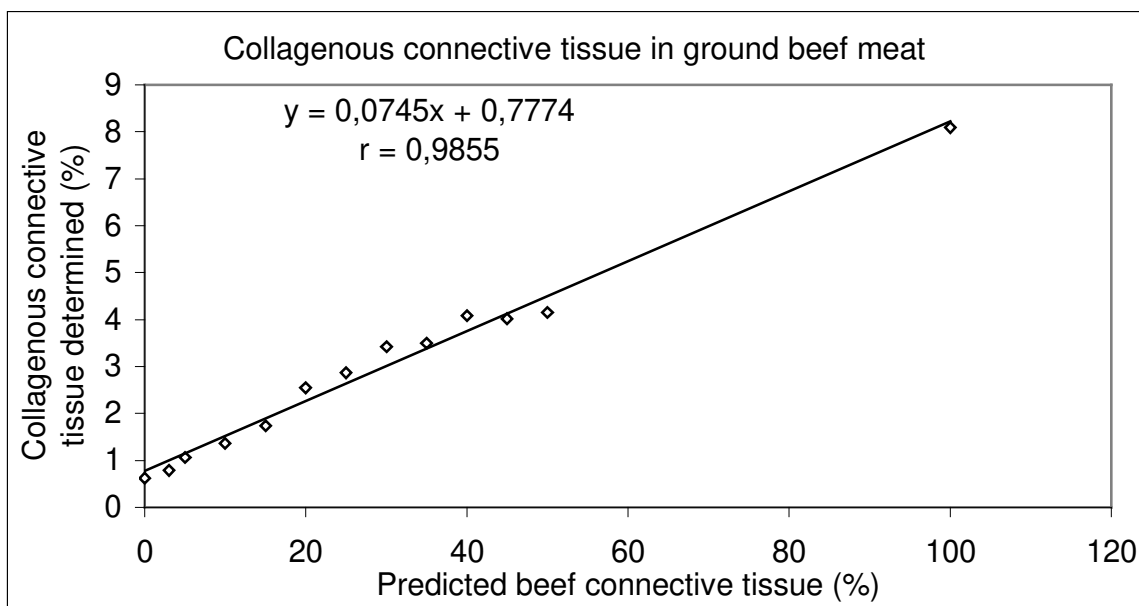


Figure 15. Linear regression curve for predicting measured collagenous connective tissue for amount of beef connective tissue added.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DO USO DE COLÁGENO EM PRODUTOS CÁRNEOS EMULSIONADOS

**Effects of connective tissue proteins on chemical
composition and emulsion stability of Lyoner type sausage¹**

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) - 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.439-440.
--

Background

Processed meat products are important sources of proteins in human nutrition. Such composite meat products are often prepared from cuts high in connective tissue. The levels and type of specific non muscle animal protein ingredients used to formulate such products, however, vary greatly, resulting in wide variations in their protein quality and nutritive value. Therefore, an accurate assessment of the amounts of these proteins is essential for consumer information, regulatory purposes and international trade (ZARKADAS et al., 1993). It has generally been recognized that inexpensive cuts of meat and meat by-products high in connective tissue have relatively poor biological value. Chemical determination of collagen in composite meats can be employed to provide a rapid estimation of protein quality (ZARKADAS et al., 1993; EL, 1995). Collagen content was highly negatively correlated to essential amino acid content and rat PER with correlation coefficients of -0.99 and -0.98, respectively (LEE et al., 1978). Collagen is an incomplete protein. The value of collagen as human food is limited because of its low amino acid balance, being low in methionine and devoid of tryptophan (RAO; HENRICKSON, 1983). Regulations restricting collagenous connective tissue amounts in meat products have already been in force for some years in some countries. Some of them limit the connective tissue protein fraction of total (crude) protein content, while others restrict the proportion of connective tissue protein of total (crude) meat protein content; limits depend on the particular type of product. The determination of the connective tissue nitrogen content is based on chemical analysis of 4-hydroxyproline, the characteristic amino acid contained in the most important connective tissue proteins, collagen and elastin. Sausage manufacturers presently use meat containing large quantities of connective tissue (collagen) to reduce

processing costs. However, functional properties such as thermal shrinkage and gelatinization make the collagen additive levels in a food critical. The sausage products regulations allow the addition of up to 10% of skin, rind, tendon, and offal such as brain, liver, heart, stomach, tongue, kidney, bone marrow in sausages as hot dogs; therefore, it cannot be added to frankfurters and wieners (BRASIL, 2000). Collagen content ranges from 90% in tendon, to about 2% in most lean meat and to less than 1% in liver (BAILEY; LIGHT, 1989).

Objectives

Determine the effect of levels 5, 10 and 15% commercial beef (epimysium/perimysium) and pork (rind) connective tissues replacement on chemical composition, pH, collagenous connective tissue protein and emulsion stability of Lyoner type sausages.

Methods

Lyoner sausage manufacture: fresh beef connective tissue (BCT) containing both epimysium and perimysium was removed from commercial bovine hind muscles from a packing plant that utilized Skyner machine 7600 (Towsend). The BCT was packaged in vacuum plastic bags, frozen at -18°C and grinded (8mm plate) in a frozen state. The commercial pork rind was cooked in water (CPR) and chopped in cutter. The formulation of the control Lyoner type sausage (8Kg each batch) consisted of 41.1% beef, 12.5% mechanically deboned poultry meat, 19.1% pork backfat, 18.4% crushed ice, 4% textured soy protein concentrate (Proteimax TR-120), 1.5% salt, 0.015% sodium nitrite, 0.3% sodium tripolyphosphate, 0.05% sodium erythorbate, 1% spices and 2% manioc starch. The seven formulations containing 0% (control); 5%; 10% and 15% BCT or CPR were adjusted to 20%

fat in the final product, altering beef, ice and backfat. CPR or BCT were added with lean beef at the beginning of the cutter's process. The products were prepared in the Meat Technology Centre of the Institute of Food Technology according to industrial standards. The batter was stuffed into 60 mm casings (CaseTech - K plus) and thermally processed to 72°C internal temperature. **Physico-chemical analysis:** moisture, protein (Kjeldahl method, factor 6.25), fat (diethyl ether extractable) and ash contents were determined in duplicate following the INSTITUTO ADOLFO LUTZ (SÃO PAULO, 1985) procedures. Duplicate pH readings of raw batter, cooked Lyoner and sterilized products were taken with a spear-tip electrode attached to HANNA HI9321 microprocessor pH-meter. Hydroxyproline analysis was carried out according to the method described by AOAC (1995). Hydroxyproline is quantitatively determined as measure of collagenous material. Collagenous connective tissue contains 12,5% hydroxyproline when nitrogen-to-protein factor of 6.25 is used. **Emulsion stability:** reported as percent fat and gelatin released from sterilized cans at 121°C (~150g cylindrical cans, nominal process value $F_0 = 6.41$). **Statistical analysis:** all data underwent analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Test to determine differences ($p < 0.05$) between pairs of means, using GraphPad InStat tm, Copyright 1990-1993, V2.01.

Results and Discussion

The pork rind absorbed 7.1% water in cooking process and resulted in a final chemical composition of 52.7% moisture, 22.0% protein, 24.9% fat, 0.2% ash, 2.37% 4-hydroxyproline, 18.9% collagenous connective tissue (CCT) and 85.9% collagenous connective tissue per total (crude) protein (CCT/P). Beef connective tissue after grind resulted in a comminuted product with 67.5% moisture, 19.1% protein, 12.2% fat, 0.7% ash, 0.79% 4-hydroxyproline, 6.3%

CCT and 33.0% CCT/P. The final raw batter comminuting temperatures (cutter) ranged from 11.7 to 13.4°C. Chemical and collagenous composition, pH value and emulsion stability of Lyoner type sausage manufactured with 5, 10 and 15% beef connective tissue (BCT) or cooked pork rind (CPR) are presented in Table 18. For BCT treatments, it was observed a significant ($p<0.05$) increase on protein levels, ranging from 12.54 to 13.81%; no treatment differences were noted for moisture, fat and ash. Moisture levels varied from 59.65 to 58.34% for CPR treatments. As the quantities of added CPR increased, moisture content decreased and fat and protein contents increased ($p<0.05$). Fat and protein levels ranged from 20.26 to 21.67% and 12.54 to 14.56% respectively. Because of the higher protein rate of collagen (22.0%) than that of muscle (19.0%), the addition of collagen tends to increase the apparent lean meat (total protein) content of meat products. The mean collagenous connective tissue (CCT) values calculated from the amounts of 4-hydropyridine found for BCT and CPR treatments, ranged from 1.68 to 2.40% and 1.68 to 4.10% of the total composite, respectively. The effect of added connective tissues was most significant for CPR replacements; all treatments were significantly different from each other. This reflected on collagenous connective tissue per total protein (CCT/P) content that ranged from 13.40 to 28.16%. The sausage added with BCT levels showed an increase on CCT/P, ranging from 13.40 to 17.65%. As shown in Figures 15 and 16, as the amount of bovine or pork connective tissue in the Lyoner increased, there was a significant linear increase ($r = 0.9693$ and 0.9934 , BCT and CPR respectively) in the amount of collagenous connective tissue determined and a linear increase in collagenous connective tissue per total (crude) protein ($r=0.8342$ and 0.9998 , BCT and CPR). The raw batter, Lyoner and conserve pH values showed a slight but significant increase with increasing BCT (6.01 to 6.10) or CPR (6.00 to 6.19) levels (Table 18). The small

pH differences although statistically significant may not be of much relevance. All treatments added with connective tissue resulted in a significant increase on fat and gelatine release ($p < 0.05$), the range was 0.51 to 2.83% and 0.51 to 2.10% for BCT and CPR treatments respectively, indicating a decrease on emulsion stability with increasing connective tissue levels, affecting functional properties, which are attributed to the lean meat proteins in a fine emulsion sausage like Lyoner.

Conclusions

Lyoner type sausages replaced with beef connective tissue (epimysium and perimysium) and cooked pork rind increased total protein, collagenous connective tissue, pH and fat/gelatin release, affecting emulsion functionality. The pH difference from control (without connective tissue added) was too slight to be of much practical importance. The results were more pronounced for cooked pork rind replacements compared to beef connective tissue for all parameters evaluated except for emulsion stability that was slightly inferior. Since there is a straight correlation between connective tissue added and collagenous connective tissue content, new regulations on the composition of emulsion type meat products should establish analytical collagenous connective tissue protein values, and collagenous connective tissue protein fraction of the total protein content, by hydroxyproline determination.

References

AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1995. Cap. 39 (Meat and Meat Products), p. 13-15.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. London: Elsevier Applied Science, 1989. 355p.

BRASIL. Instrução Normativa nº4, 31 mar 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 abr. 2000a. Seção 1, p.6-10.

EL, S. N. Evaluating protein quality of meats using collagen content. **Food Chemistry**, 53:209-210, 1995.

LEE, Y. B.; ELLIOTT, J. G.; RICKANSRUD, D. A.; HAGBERG, E. C. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 5, p. 1359-1362, 1978.

RAO, B. R.; HENRICKSON, R. L. Food grade hide collagen in bologna effect on functional properties, texture and color. **J. Food Qual.**, Westport, v. 6, n. 1, p. 1-10, 1983.

SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.

ZARKADAS, C. G.; KARATZAS, C. N.; KHANIZADEH, S. Evaluation protein quality of model meat/soybean blends using amino acid compositional data. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 4, p. 624-632, 1993.

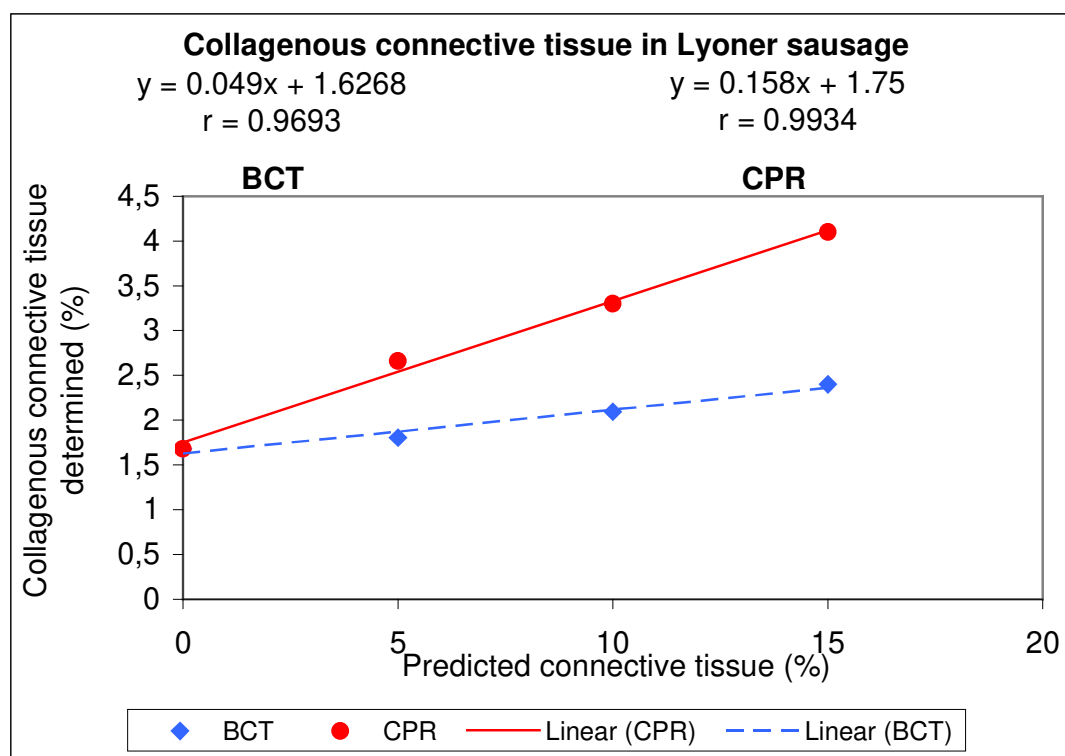


Figure 15. Relationship between predicted connective tissue and collagenous connective tissue determined in Lyoner type sausage containing amounts of bovine connective tissue (BCT) and cooked pork rind (CPR)

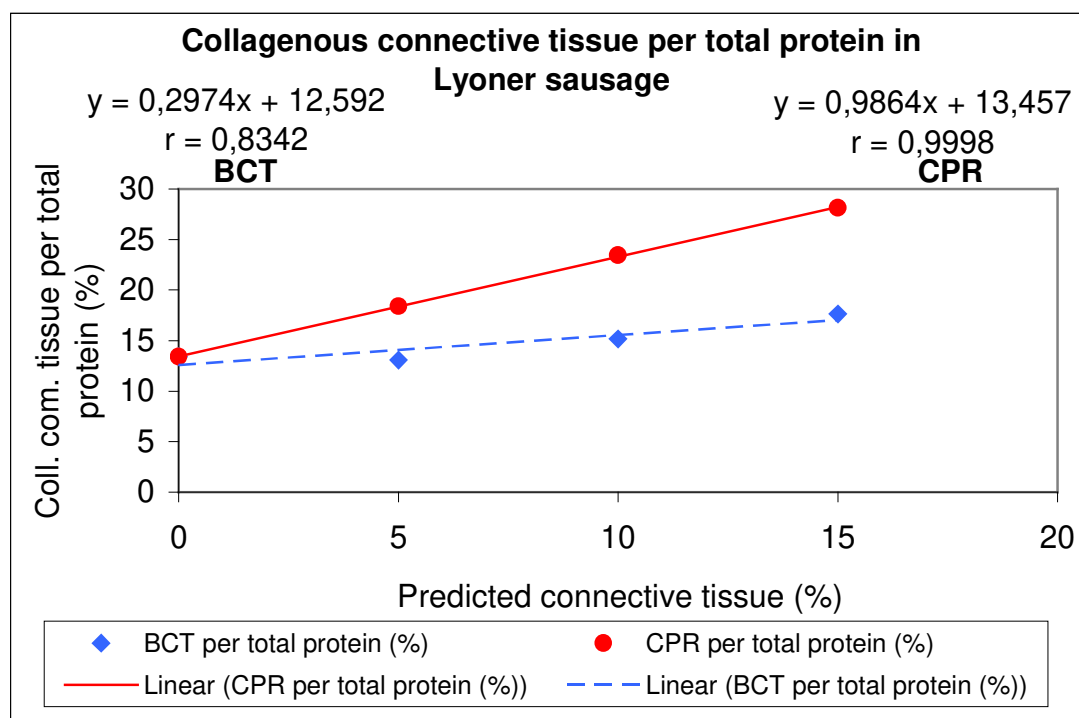


Figure 16. Relationship between predicted connective tissue added and collag. connective tissue per crude protein determined in Lyoner type sausage containing amounts of bovine connective tissue (BCT) and cooked pork rind (CPR)

Table 18. Chemical and physical parameters means for Lyoner type sausage containing connective tissue proteins

Parameters	Beef connective tissue (BCT)*				Cooked pork rind (CPR)			
	Control	5%	10%	15%	Control	5%	10%	15%
Chemical composition¹								
Moisture (%)	59.65 ^a (0.13)	58.70 ^a (0.13)	59.28 ^a (0.01)	59.23 ^a (0.47)	59.65 ^a (0.13)	58.87 ^{a,b} (0.30)	58.60 ^b (0.23)	58.34 ^b (0.06)
Fat (%)	21.26 ^a (0.06)	21.51 ^a (0.43)	20.14 ^a (0.36)	20.12 ^a (0.39)	21.26 ^b (0.06)	20.26 ^c (0.03)	21.26 ^b (0.13)	21.67 ^a (0.07)
Total protein (%)	12.54 ^b (0.18)	13.81 ^a (0.20)	13.78 ^a (0.18)	13.60 ^a (0.05)	12.54 ^b (0.18)	14.45 ^a (0.61)	14.07 ^{a,b} (0.01)	14.56 ^a (0.42)
Ash (%)	3.37 ^a (0.07)	3.35 ^a (0.00)	3.28 ^a (0.05)	3.30 ^a (0.04)	3.37 ^a (0.07)	3.42 ^a (0.05)	3.37 ^a (0.00)	3.30 ^a (0.07)
Collagenous composition¹								
4-Hydroxyproline (%)	0.210 ^b (0.013)	0.226 ^{a,b} (0.019)	0.261 ^{a,b} (0.009)	0.300 ^a (0.035)	0.210 ^d (0.013)	0.332 ^c (0.009)	0.412 ^b (0.015)	0.512 ^a (0.032)
Collagenous connective tissue (%)	1.68 ^b (0.10)	1.80 ^{a,b} (0.15)	2.09 ^{a,b} (0.07)	2.40 ^a (0.28)	1.68 ^d (0.10)	2.66 ^c (0.07)	3.30 ^b (0.12)	4.10 ^a (0.25)
Collagenous connective tissue per total protein (%)	13.40	13.06	15.18	17.65	13.40	18.41	23.45	28.16
pH value								
Raw batter ¹	6.05 ^b (0.01)	6.05 ^b (0.01)	6.06 ^{a,b} (0.01)	6.08 ^a (0.01)	6.05 ^c (0.01)	6.05 ^c (0.01)	6.10 ^b (0.01)	6.18 ^a (0.02)
Pasteurized (Lyoner) ²	6.10 ^a (0.01)	6.10 ^a (0.01)	6.09 ^a (0.01)	6.10 ^a (0.00)	6.10 ^c (0.01)	6.11 ^c (0.01)	6.16 ^b (0.01)	6.19 ^a (0.01)
Sterilized (Conserve) ²	6.01 ^c (0.01)	6.02 ^c (0.01)	6.04 ^b (0.00)	6.06 ^a (0.00)	6.00 ^d (0.01)	6.05 ^c (0.01)	6.09 ^b (0.01)	6.12 ^a (0.01)
Emulsion stability³								
Fat and gelatin release (%)	0.51 ^d (0.12)	1.25 ^c (0.39)	1.81 ^b (0.44)	2.83 ^a (0.26)	0.51 ^d (0.12)	1.03 ^c (0.19)	1.57 ^b (0.26)	2.10 ^a (0.62)

^{a, b, c} Mean values in a row within treatment followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) from each other

* Epimysium / perimysium fraction

() Standard deviation

Number of replicates: ¹N=2; ²N=4; ³N=8

**Effects of connective tissue on texture, color and sensory
properties of Lyoner type sausage¹**

¹Trabalho apresentado no 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) - 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology, 2003, Campinas. Proceedings p.257-258.
--

Background

Sensory analysis involves tasting meat samples by consumer panels or by trained taste panels using accurate profiling or scoring methods. These techniques yield data on the general quality aspects of meat products. These quality attributes can then be correlated with data obtained from other methods of physical testing or with known biochemical composition. Sensory methods can provide an overview of the relative eating quality of meat samples (BAILEY; LIGHT, 1989). Collagen is the most abundant protein in the body and is present mainly in bone, skin and tendon. It is found in muscle as 1-9% of the dry, fat free mass, where it exists as networks of fibers. The force of contraction is transmitted to the tendons through sheets of intramuscular connective tissue, which enclose the individual muscle fibres. Three collagenous structures can be distinguished morphologically – endomysium, enclosing each fibre, perimysium, surrounding bundles of these fibres, and epimysium, surrounding the whole muscle (ETHERINGTON; SIMS, 1981). Connective tissue proteins in meat emulsion can affect colour, texture, flavour and shelflife (BAILEY; LIGHT, 1989)

Objectives

Evaluate the effect of levels 5, 10 and 15% commercial beef (epimysium/perimysium) and pork (rind) connective tissues replacement on texture, color, sensory parameters and consumer acceptability of Lyoner type sausages.

Methods

Lyoner sausage manufacture: fresh beef connective tissue (BCT) from hind muscles (epimysium and perimysium that recover cuts) was obtained from a commercial packing plant that utilized Skyner machine 7600 (Towsend). The BCT was packaged in vacuum plastic bags, frozen at -18°C and grinded (5mm plate) in a frozen state. The commercial pork rind was cooked in water (CPR) and chopped in cutter. The formulation of the control Lyoner type sausage (8Kg batches) consisted of 41.1% beef, 12.5% mechanically deboned poultry meat, 19.1% pork backfat, 18.4% crushed ice, 4.0% soy protein texturate concentrate (Proteimax TR-120), 1.5% salt, 0.015% sodium nitrite, 0.3% sodium tripolyphosphate, 0.05% sodium erythorbate, 1.0% spices and 2.0% manioc starch. The formulations with levels of 5; 10 and 15% BCT or CPR were adjusted altering beef, ice and backfat resulting 20% fat. The products were prepared in the Meat Technology Centre of the Institute of Food Technology according to industrial standards, stuffed into 60mm casings and thermally processed to 72°C internal temperature. The CPR or BCT were added with lean beef at the beginning of the cutter's process. Ten cylindrical samples (caliber 60mm, 20mm height) were obtained of three Lyoner sausages/treatment to performed texture and color from internal cut surfaces. **Texture:** was measured using a TA-XT2 (Texture Analyser - Stable Micro Systems), compressed to 50% of their original height with 35mm aluminum probe (P/35). A crosshead speed of 2 mm/s was applied. The compression hardness was computed. **Color:** was measured using a spectrophotometer Minolta CM-508d and expressed as CIE-Lab: L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness). Illuminant D_{65} was used with a 10° standard observer. **Sensory evaluation:** trained panelists (n=10 females, age 20–50 years), who consisted of Adolfo Lutz Institute staff

members, rated samples 5, 10 and 15% BCT and CPR for red color (cylindrical samples, 60/20mm), firmness, residual connective tissue and characteristic flavor (cubes 12cm³) using an unstructured 9 cm line, in a sensory room with controlled temperature. Replicate judgments were made between all assessors. **Consumer acceptance test:** at 8-week storage, a consumer acceptance panel was carried out. The consumers (n=35, 63% females and 37% male, age 17–51 years) consisted of Institute of Food Technology's staff members. The test was carried out in the CTC's Sensory Analysis Laboratory. The attributes of appearance, flavor and overall acceptability were evaluated on a 9 points verbal hedonic scale, 7 points firmness just right scale (bipolar category scale) and 5 points purchase intent scale. Samples were coded with a randomized three-digit number: Lyoner with 15% BCT, 15% CPR and control. Samples were cut in cubes of 12cm³ for presentation to the consumers, at room temperature. **Statistical analysis:** the experiment was performed as randomized complete block designs. All data underwent analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Test to determine differences ($p \leq 0.05$) between pairs of means, using STATISTICA StatSoft, Inc. (v. 5).

Results and Discussion

Sensory evaluation scores from Table 19 indicated that, as the beef connective tissue (BCT) level increased in the formulations, the red color scores increased too ($p \leq 0.05$). This was confirmed by color values (Table 20); Lyoner sausage with BCT was darker (L^*) and redder (a^*) than control. In yellowness (b^*), the results didn't show a tendency. The sausages added with 5% and 15% BCT were firmer than control ($p \leq 0.05$) (Table 19). Objective texture measurements (compression hardness) didn't confirm all of these results; 5% BCT were

harder than the other samples ($p \leq 0.05$). The amount of connective tissue residue remaining at the end of mastication was abundant in sausages formulated with 15% BCT; but there was no difference ($p > 0.05$) in characteristic flavor scores (Table 19). The mean panel scores for red color (Table 19) indicated that the formulation containing 5% CPR was redder ($p \leq 0.05$) than sausages with 10% and 15% CPR; color values (L^* , a^* , b^*) confirmed this tendency ($p \leq 0.05$); 15% CPR sausage was brighter and had lower redness value than control, and yellowness (b^*) mean was greater for 15% CPR sausage than 5% CPR replaced. This was expected since pork rind is white in color and in addition reduces the myoglobin content of the product, which is responsible for the cured red color of sausage. Sausages replaced with 5%, 10% and 15% CPR were firmer than control. Compression hardness values were slightly higher with 5% CPR ($p > 0.05$); 10% and 15% CPR added to sausage increased progressively hardness ($p < 0.05$). The residual connective tissue amount perceived by trained panel was smaller in control sausage ($p \leq 0.05$) than formulations replaced with CPR. Characteristic flavor mean decreased with 5% CPR added to sausage formulation. In conclusion, the tests showed that 5% fresh beef connective tissue (BCT) added to Lyoner type sausage resulted in firmness increasing and improvement in red shade color. The amount of connective tissue residue remaining at the end of mastication was greater when 15% BCT was replaced and no significant influence on sausage characteristic flavor was observed. Sausage replaced with 15% CPR showed decrease on objective red color; 5% replacement made de sausage firmer, with greater connective tissue amount and fader flavor. Consumer test resulted in decrease in appearance and overall acceptability for Lyoner sausage replaced with 15% CPR (Table 21). Replacement of 15% fresh BCT did not affect sausage appearance, flavor and overall acceptability. The sausages

with 15% BCT were somewhat firm to consumers. Purchase intent scale revealed that 38% and 21% of consumers probably would not by Lyoner sausage replaced with 15% CPR or BCT respectively (Table 21, Figure 18).

Conclusions

Connective tissue proteins replacements in Lyoner type sausages were a contributing factor to toughness, as well as an increasing factor to residual connective tissue amount remaining at the end of mastication. Fresh beef connective tissue replacement showed red color improvement, and had no influence on characteristic flavor. The cooked pork rind resulted in decrease on red color and characteristic sausage flavor; these attributes had a great importance on the decreasing of consumer's acceptability.

References

- BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. London: Elsevier Applied Science, 1989. 355p.
- ETHERINGTON, D.J.; SIMS, T.J. Detection and estimation of collagen. **J. Sci. Food Agric.** v. 32, n. 6, p.539-546, 1981.

Table 19. Mean sensory scores for Lyoner type sausage control and containing connective tissue

Sensory attributes	Connective tissue replacement levels in Lyoner							
	Control*	Beef connective tissue (BCT)**			Control*	Cooked pork rind (CPR)		
		5%	10%	15%		5%	10%	15%
Red colour ¹	1.46 ^c (0.19)	2.25 ^b (0.22)	2.85 ^a (0.18)	3.14 ^a (0.21)	2.73 ^{a,b} (0.27)	3.01 ^a (0.32)	1.87 ^b (0.21)	1.83 ^b (0.24)
Firmness ¹	2.64 ^b (0.34)	3.78 ^a (0.42)	3.53 ^{a,b} (0.29)	3.91 ^a (0.20)	2.54 ^b (0.30)	4.41 ^a (0.32)	4.23 ^a (0.28)	4.59 ^a (0.31)
Connective tissue amount ¹	3.29 ^b (0.36)	3.80 ^b (0.27)	3.90 ^b (0.48)	5.00 ^a (0.40)	3.04 ^b (0.39)	4.28 ^a (0.31)	4.48 ^a (0.26)	4.64 ^a (0.25)
Characteristic flavor ¹	4.91 ^a (0.45)	4.83 ^a (0.46)	4.69 ^a (0.37)	4.94 ^a (0.43)	5.59 ^a (0.20)	4.23 ^b (0.22)	4.71 ^{a,b} (0.28)	3.91 ^b (0.42)

^{a, b, c} Mean values in a row within treatment followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) from each other

() Standard error of the mean

*Control Lyoner - no added connective tissue

** Raw epimysium / perimysium fraction

¹Sensory scores are expressed in 10cm line scale: (0 = slight / not firm / none / slight; 9 = intense /very firm / abundant / intense). Scores are means of 10 judgments with analysis repetition.

Table 20. Mean values for color and texture measurements of Lyoner type sausage control and formulated with connective tissue

Physical measurements		Connective tissue replacement levels in Lyoner							
		Control	Beef connective tissue (BCT)			Control	Cooked pork rind (CPR)		
			5%	10%	15%		5%	10%	15%
Colour	L*	62.22 ^a (0.64)	61.93 ^a (0.81)	61.51 ^{a,b} (1.05)	60.58 ^b (0.84)	62.22 ^b (0.64)	62.57 ^b (0.31)	62.50 ^b (0.67)	63.72 ^a (0.63)
	a*	10.67 ^b (0.24)	11.45 ^a (0.28)	11.58 ^a (0.32)	11.57 ^a (0.42)	10.67 ^a (0.24)	10.79 ^a (0.31)	10.69 ^a (0.32)	9.70 ^b (0.36)
	b*	13.26 ^a (0.55)	12.32 ^b (0.44)	12.73 ^{a,b} (0.51)	13.06 ^a (0.68)	13.26 ^{a,b} (0.55)	12.73 ^b (0.49)	13.03 ^{a,b} (0.29)	13.78 ^a (0.98)
Texture	Compression	14.68 ^b	24.35 ^a	17.40 ^b	17.30 ^b	14.68 ^c	17.10 ^{b,c}	18.76 ^b	23.00 ^a
	hardness (g)	(1.80)	(4.81)	(2.54)	(1.40)	(1.80)	(3.28)	(2.01)	(3.29)

Table 21. Laboratory consumer test for Lyoner type sausage control and containing connective tissue proteins

Sensory attributes	Connective tissue replacement levels in Lyoner		
	Control	15% Beef connective tissue (BCT)	15% cooked pork rind (CPR)
Verbal hedonic scales⁽¹⁾			
Appearance acceptability	6.4 ^a	6.4 ^a	5.8 ^b
Flavor acceptability	6.6 ^a	6.3 ^a	5.9 ^a
Overall acceptability	6.6 ^a	6.5 ^{a,b}	5.9 ^b
Just right scale⁽²⁾			
Firmness	0	0.6	0.4
Purchase intent scale⁽³⁾			
Definitely / probably would buy (%)	45	38	38
Definitely / probably would not buy (%)	20	21	38

^{a,b} Mean values in a row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) from each other. Mean of 35 judgements.

⁽¹⁾ Acceptance scores: 9=like extremely; 5=neither like not dislike; 1= dislike extremely

⁽²⁾ Firmness just right scale: 3=much too much; 2= moderately too much; 1= somewhat too much; 0= just right; -1= somewhat too little; -2= moderately too little; -3= much too little.

⁽³⁾ Purchase intent scores: 5=definitely would buy; 4=probably would buy; 3=maybe/maybe not, 2=probably would not buy; 1=definitely would not buy

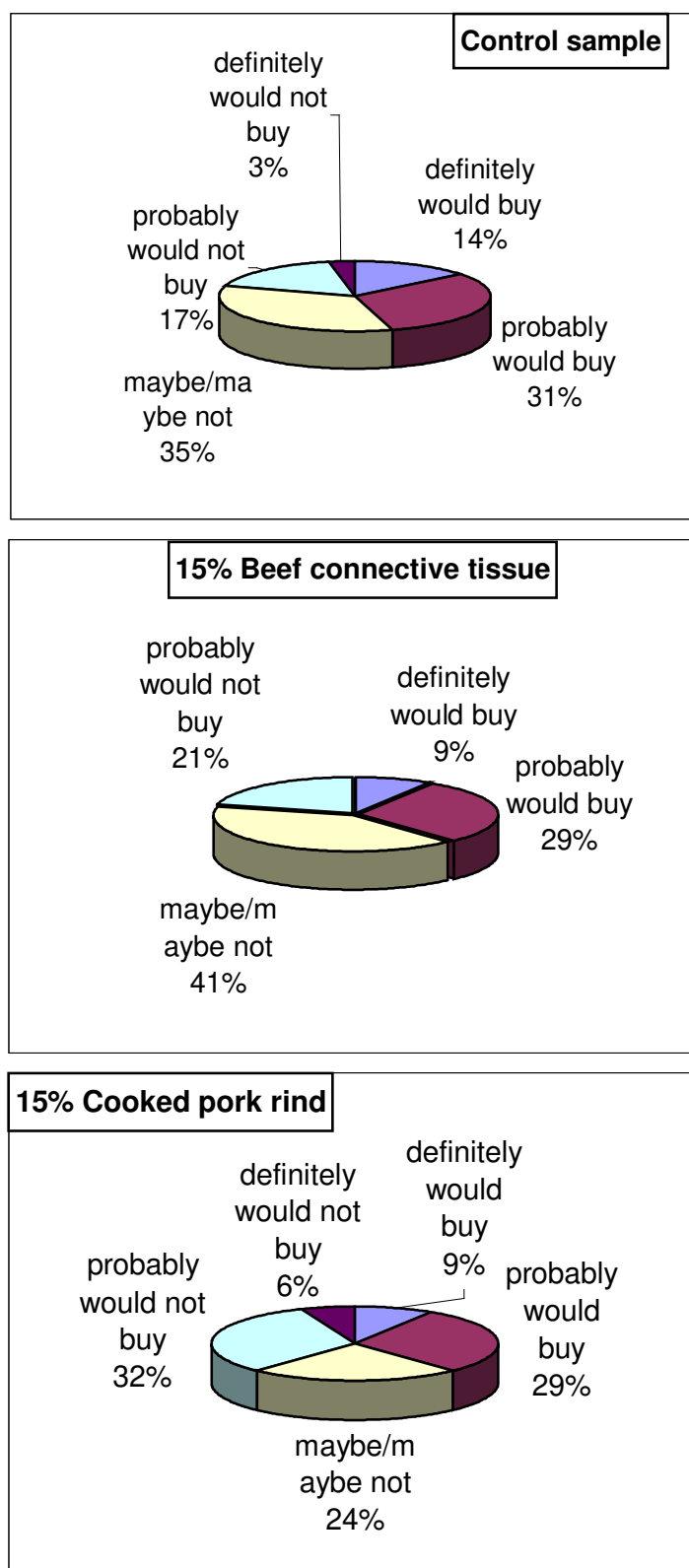


Figure 18. Consumer purchase intent scale for Lyoner added with 15% cooked pork rind (CPR) or 15% beef connective tissue (BCT)

CONCLUSÕES

Nesta pesquisa chegou-se às conclusões que se seguem, as quais são válidas nas condições descritas nesse trabalho.

1) O método oficial AOAC na quantificação de hidroxiprolina revelou, segundo a validação intralaboratorial, sensibilidade, exatidão, precisão, simplicidade na operação, rapidez no procedimento e adequação para um grande número de amostras, podendo fornecer uma quantificação acurada e real do teor de colágeno de uma matriz complexa como as de conservas de carne.

2) Os ensaios imunoenzimáticos ELISA, utilizando as metodologias preconizadas segundo o *kit* ELISA-TEK, o método oficial AOAC e o método oficial modificado na etapa de extração, foram específicos na detecção de proteínas de soja texturizada (PTS, Maxten E-100), concentrada texturizada (PCS, Proteimax TR-120) e isolada (PIS, Supro 500E), em produtos cárneos tipo emulsão cru, pasteurizado e esterilizado, não havendo reações cruzadas com outros ingredientes da formulação. Os ensaios revelaram respostas lineares para os diferentes produtos de soja e tratamentos térmicos. O *kit* ensaio ELISA-TEK ofereceu uma extração simples e rápida das proteínas de soja. Em geral, houve boa concordância entre os teores esperados e determinados nas concentrações de adição 2%, 4% e 6%, com intervalos de recuperação, respectivamente, de 77%–142%, 87%–164% e 89%–137%. O ensaio com o uso do *kit* foi de fácil manuseio, contudo, seu uso na análise laboratorial de rotina torna-se limitado pelo elevado custo. O ELISA, de acordo com o método oficial AOAC, revelou boa precisão (baixos valores de CV intra-ensaio) e elevada sensibilidade com limite de determinação de proteína de soja de 0,41 µg/mL na alíquota de análise e de 0,14g/100g na

amostra. Os resultados de recuperação foram elevados, com baixas concordâncias, principalmente, para os tratamentos com 0,5% e 2% de proteínas de soja, com intervalos de recuperação de 174%-425% e 163%-224%, respectivamente. A elevação do teor adicionado em 4% e 6% revelou tendência de redução das faixas de valores, respectivamente, 134%–200% e 115%–180%, apresentando, contudo, valores dos limites superiores acima da aceitabilidade. O procedimento ELISA oficial AOAC modificou uma extração aquosa simples e rápida. As faixas de recuperação 92%-305%, 125%–207%, 133%–177% e 107%–132% para os níveis de adição 0,5%; 2%; 4% e 6%, respectivamente, revelaram melhor aproximação comparada ao método oficial. A modificação foi fundamental para a redução dos valores para todos os níveis de concentração avaliados, revelando resultados de recuperação satisfatórios a 6%. O método ELISA oficial poderá ser utilizado na detecção de fraudes, necessitando, contudo, aprimoramentos que levem a uma maior exatidão, para que possa ser utilizado no efetivo controle dos teores adicionados.

3) A utilização de 0%, 2%, 4% ou 6% de PTS (pó cor rósea), PCS (grânulos cor natural) ou PIS (pó cor natural) em salsichão Lionês revelou incremento da cor vermelha com 2% de PTS, sem alterações da firmeza e sabor até 6%. A redução da intensidade da cor vermelha foi verificada com o uso de 2% de PCS e PIS. A firmeza e o sabor característico ficaram reduzidos pela adição de 4% e 6% de PIS, respectivamente. A utilização de 4% de PTS na composição reduziu os teores de umidade e proteína, aumentou ligeiramente as cinzas e o pH, estabilizando a emulsão em 6%. A utilização de 4% de PCS reduziu a umidade, de 6% elevou ligeiramente o pH e de 2% estabilizou a emulsão. O teor de PIS em 4% conferiu menor

valor de umidade e maior pH no salsichão, não ocasionando melhora na estabilidade da emulsão mesmo em 6%.

4) A inclusão de 0%, 5%, 10% e 15% de tecido conjuntivo bovino cru ou couro suíno cozido em salsichão Lionês resultou no aumento dos teores de proteína, colágeno, separação de gordura/gelatina e pH (ligeiramente), reduzindo a estabilidade da emulsão. Todos os resultados físico-químicos foram mais afetados pelo uso do couro suíno, contudo a estabilidade da emulsão não se mostrou prejudicada em comparação ao tecido conjuntivo bovino. A presença de tecido conjuntivo bovino ou suíno contribuiu no aumento da firmeza e quantidade de tecido residual na mastigação. O tecido bovino revelou intensificação da cor vermelha e não interferiu no sabor característico. O couro suíno resultou em decréscimo na intensidade da cor e sabor característicos, contribuindo para uma menor aceitabilidade pelos consumidores.

5) Os resultados físico-químicos de composição centesimal, teor de hidroxiprolina e tecido conjuntivo colagenoso (colágeno) de 48 amostras comerciais de salsicha e 55 amostras de lingüiça frescal revelaram uma grande variabilidade na composição, principalmente, para os teores de gordura e colágeno. O teor máximo de 70% de umidade estabelecido pela legislação vigente para lingüiças frescas foi ultrapassado por 11% das amostras e o limite de 30% de gordura, por 18%. O limite mínimo de 12% de proteína não foi obedecido para 35% das salsichas e 43% das lingüiças analisadas, chegando-se aos valores mínimos de proteínas de 5,4% com as amostras de salsichas e 8,4% com amostras de lingüiças. Deste total protéico, tem-se o colágeno, que apresentou valores percentuais relativos (colágeno relativo) nas faixas de 5,3% - 27,1% (salsichas) e 4,3% - 39,8% (lingüiças). Os intervalos de variação de colágeno

absoluto para as salsichas e linguiças foram 0,7% - 3,1% e 0,7% - 5,4%, respectivamente, com valores correspondentes às medianas de 1,7% e 1,8%.

6) As amostras de carne moída analisadas na rotina laboratorial revelaram em geral odor e cor aceitáveis, contudo, 14 unidades (70%) foram consideradas alteradas na aparência pela elevada proporção de fibras de tecido conjuntivo ou aponevrose. Estes resultados foram confirmados pelos valores medianos de colágeno (2,9%) e colágeno relativo (18%), que se apresentaram superiores em 123% e 157%, respectivamente, aos teores de colágeno (1,3%) e colágeno relativo (7%), encontrados para a carne moída de cortes de traseiro de bovinos adquiridos no varejo.

7) A inclusão de 0% a 50% de tecido conjuntivo colagenoso de bovino (TCB) em carne bovina moída fresca revelou decréscimo dos valores de umidade, cinzas, pH e cor vermelha, aumento da gordura, luminosidade e cor amarela, com incrementos lineares de colágeno ($r=0,985$) e colágeno relativo ($r=0,973$). O uso de 10% de TCB na carne moída crua resultou em produto aceitável na aparência, contudo, um teor maior de reposição resultou um produto de menor aceitabilidade pelos consumidores. No hambúrguer acrescido com 10%, 20% ou 30% de TCB, o teor de 20% contribuiu para o decréscimo da cor vermelha, aumento do tecido conjuntivo aparente e aumento da firmeza, enquanto o teor de 30% resultou em aumento na quantidade de tecido conjuntivo residual na boca, mastigabilidade (número de mastigadas para engolir) e redução do sabor característico.

ANEXOS

METODOLOGIAS PARA

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE

SOJA E COLÁGENO EM CARNES E

PRODUTOS CÁRNEOS

ANEXO 1

Determinação de proteína de soja pelo método ELISA¹

¹Metodologia publicada no livro: Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos – Instituto Adolfo Lutz – 4^a ed, 2004. Capítulo 13 – Carnes e Produtos Cárneos (no prelo).
--

As proteínas de soja são ingredientes utilizados na elaboração de alimentos como fonte protéica e como extensor em produtos cárneos. As amostras de produtos cárneos crus ou processados termicamente são maceradas e extraídas com solventes orgânicos. O resíduo desta extração, denominado pó de acetona, é solubilizado a quente em solução aquosa de uréia. Após diluição, as proteínas de soja renaturadas são analisadas pelo método ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando anticorpos comercialmente disponíveis. Na quantificação de proteínas de soja, o método ELISA é um imuno-ensaio competitivo indireto em que o analito proteína de soja (antígeno) reage com volume fixo de anticorpo anti-proteína de soja (antissoro produzido em coelho) em excesso. O anticorpo não reagente é determinado pela ligação em placa de imuno-ensaio previamente sensibilizada com o antígeno. O anticorpo capturado é determinado pela adição de um segundo anticorpo (produzido em cabra para globulinas de soro de coelho) ligado covalentemente a uma enzima (conjugado). A reação é evidenciada pelo desenvolvimento de cor com a adição de substrato. Etapas de lavagem são incorporadas após cada estágio de interação, para remover material não reagente (Figura 19). A amostra é geralmente analisada em diluições seriadas na razão 3. A resposta é comparada a uma curva-padrão de proteína de soja. O ELISA é semi-quantitativo na determinação de proteínas de soja em produtos cárneos crus e processados termicamente, podendo ser quantitativo quando o teor de protídios da proteína de soja adicionado é conhecido e, especialmente, se a proteína de soja (texturizada, concentrada ou isolada) está disponível para calibração.

Material

Lavadora e leitora de placas de ELISA; pipeta digital de 8 ou 12 canais, pipetas monocanais de 5-50 μ L, 50 -200 μ L e 100 -1.000 μ L com ponteiros, reservatórios de reagentes para cada solução; triturador de amostras, homogeneizador Ultra-Turrax ou Diax 900 (Heidolph) ou equivalente; papel de filtro Whatman nº 541; tubos de vidro pirex graduados de 10 mL com tampas de plástico; banho-maria; placas de imunoensaio de poliestireno fundo chato de 96 cavidades (equivalente Nunc Maxisorp 442404); microtubos plásticos de 1 mL com tiras de tampas e suporte (8 x 12 fileiras) para diluição serial e pré-incubação; caixas plásticas com tampa para colocar placas de ELISA; balões volumétricos de 10, 25, 50 mL; funil de vidro de 7 cm; almofariz; balança analítica; pHmetro; estufa; cronômetro; papel gráfico semi-log (linear/4 ciclos log).

Reagentes

Acetona

Uréia

2-mercaptoetanol

Azida sódica (NaN_3)

Nota: azida sódica - material tóxico, prevenir contato com a pele e os olhos, e impedir aspiração do pó.

Clorofórmio-metanol – 2:1 (v/v).

Álcool-água (acidificado) – 80+20 (v/v), acidificado com 2 gotas de HCl/L.

Tampão Tris-HCl a 0,25 M – Pese 30,3 g de tris (hidroximetil) amino metano em um litro de água e ajuste ao pH 8,60 com HCl.

Solução de sensibilização – Utilize como padrão, o concentrado de proteína de soja (Loders CroKlaan B.V., Holanda) ou pó de acetona de soja (equivalente Sigma-Aldrich S7756) ou isolado protéico de soja Supro 500E (Protein Technologies International, USA).

Solução de sensibilização 50 vezes concentrada – Misture, em balão volumétrico de 50 mL, 4,5 mL de Na_2CO_3 (0,2 M); 8 mL de NaHCO_3 (0,2 M); 625 μL da solução-padrão de antígeno de proteína de soja preparada no item procedimento (b) e água até completar o volume. Mantenha esta solução-padrão a 2-8°C por 16h.

Nota: o valor 625 μL da solução-padrão foi calculado para corresponder a 2,5 mg de proteína de soja no pó de acetona, uma vez que a solução-padrão descrita no item (b) do procedimento contém 100 mg / 25 mL.

Solução de sensibilização de trabalho – Misture, em um balão volumétrico de 50 mL, 4,5 mL Na_2CO_3 (0,2 M); 8 mL NaHCO_3 (0,2 M) e água para completar o volume. Homogeneíze e retire 1 mL desta solução, repondo o volume da solução com 1 mL da solução de sensibilização 50 vezes concentrada.

Solução-tampão fosfato salino TFS pH 7,1 – Misture, em um balão volumétrico de 1.000 mL, 85 g NaCl, 10,7 g Na₂HPO₄, 3,9 g NaH₂PO₄.2H₂O, 5 g NaN₃ e água até completar o volume para 1.000 mL.

Solução-tampão de trabalho TFST com Tween – Misture 100 mL da solução-tampão TFS, 1,5 mL de Tween 20 e 900 mL de água.

Soluções imunorreagentes

Solução anticorpo-positivo – Dilua, em um balão volumétrico de 50 mL, B µL de antissoro de coelho para proteína de soja (equivalente Sigma-Aldrich S-2519), conservado a -20°C, e complete o volume com solução-tampão TFST.

Solução anticorpo-negativo – Em um balão volumétrico de 50 mL, pipete B µL de soro normal de coelho e complete o volume com solução-tampão TFST.

Solução conjugado – Em um balão volumétrico de 25 mL, pipete C µL de IgG anti-coelho produzido em cabra conjugado à fosfatase alcalina (equivalente Sigma-Aldrich A-7539), conservado a (2-8)°C e complete o volume com solução-tampão TFST.

Nota: as quantidades de anticorpo e conjugado que devem ser adicionadas dependem das propriedades dos imunorreagentes recebidos. Calcule B e C como descrito no item padronização.

Solução substrato fosfatase em tampão – Misture, em um balão volumétrico de 25 mL, 2,25 mL de Na_2CO_3 (0,2 M); 4,00 mL de NaHCO_3 (0,2 M); 25 μL $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M); 25 mg p-nitrofenil fosfato (5 tabletes de 5 mg cada, equivalente Sigma 104-105, guarde no escuro a temperatura menor que 0°C) e complete o volume com água.

Padronização

(A) Anticorpo-positivo e anticorpo-negativo – Teste novos lotes nas placas ELISA sensibilizadas e lavadas (itens (c) e (d) do procedimento). Prepare séries de diluições (no intervalo 100–100.000) de anticorpo positivo (fileiras A-D) e anticorpo negativo (fileiras E-H) em TFST, pré-incube sem proteína de soja, e então proceda como descrito nos itens (h)-(k) do procedimento. Use a curva de diluição do antissoro para obter o título do anticorpo positivo. Calcule o valor B, isto é, se o título for 1 em 3.000, então $B = 2 \cdot (1/3.000) \cdot 50.000 \mu\text{L}$ = cerca de 30 μL . Teste também o anticorpo em produto cárneo padrão contendo concentração conhecida de proteína de soja e também contra materiais com potencial para reações cruzadas.

(B) Conjugado – Teste novos lotes de conjugado sobre uma placa ELISA (sensibilizada e lavada, itens (c) e (d) do procedimento). Prepare anticorpo positivo como para BP (item (f) do procedimento) e pré-incube essa solução com TFST separadamente (item (g) do procedimento). Incube na placa (item (h) do procedimento) nas fileiras A-D (anticorpo positivo) e fileiras E-H (TFST). Use conjugado a várias diluições (ou seja, no intervalo 500-5.000) no item (i) do procedimento e então siga (j) e (k). Calcule o valor de C (ou seja, $C=15$) de tal forma que o conjugado positivo seja $> 1,000$ e conjugado negativo $< 0,050$.

(C) Placa ELISA – Teste lotes de placas para avaliar a variabilidade entre placas. A placa padrão em protocolo utiliza, nas determinações, somente as cavidades (B-G) (2-11) em razão de uma possível variação das cavidades externas.

Procedimento

(a) Preparação do pó de acetona – Pese 20 g da amostra previamente triturada e macere (no Ultra-Turrax ou Diox 900) com solventes orgânicos, filtrando o resíduo a cada estágio para re-extração, na seguinte seqüência: 200 mL clorofórmio-metanol (3 vezes), 200 mL álcool acidificado (3 vezes) e 200 mL acetona (3 vezes). Seque o resíduo ao ar, de um dia para o outro, e homogeneíze em almofariz; o produto final denomina-se pó de acetona. Proceda a análise da proteína total pelo método Kjeldahl ($N \times 6,25$), utilizando o resultado para calcular a massa da amostra de pó de acetona do item (b) do procedimento.

(b) Solubilização de amostras e padrão – Pese, separadamente, em tubos pirex graduados de 10 mL o pó de acetona da proteína de soja padrão (97-103 mg de proteína) e o pó de acetona de cada amostra de produto cárneo (95-105 mg de proteína). Adicione a cada um dos tubos na ordem: 2 mL de tampão Tris-HCl, 6 g de uréia, 2 mL de água, 200 μ L de 2-mercaptoetanol e água para 10 mL. Tampe, misture e aqueça imergindo até o nível de 10 mL em banho de água fervente por (60 ± 1) min. Resfrie por 3-5 min e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL com água, assegurando a ressolubilização da uréia cristalizada. Mantenha as soluções de amostras e padrão por 16 h a 2-8°C. A solução-padrão de proteína de

soja está pronta para ser utilizada no item reagentes (solução de sensibilização) e no item procedimento (e). As soluções de amostras serão utilizadas no item (e) do procedimento.

(c) Sensibilização das placas ELISA – Utilizando pipeta multicanal, transfira 200 µL de solução de sensibilização de trabalho (item reagente) a cada cavidade na placa de ELISA. Coloque a placa tampada em caixa plástica, feche e incube a 37°C por (16 ± 1) h.

(d) Lavagem e estocagem das placas ELISA – Lave as placas de ELISA utilizando um procedimento padronizado. Com um sistema automático de lavagem estabeleça um ciclo de 5 vezes, em que cada fileira de cavidades é sucessivamente esvaziada e enchida com TFST por 5 vezes e finalmente as cavidades são esvaziadas. Segundo o procedimento de lavagem manual, a primeira fileira é esvaziada e enchida com TFST por 5 vezes antes de finalmente ser esvaziada; a sequência é repetida para as fileiras sucessivas. Um ciclo de lavagem de 10 vezes inclui primeiramente uma lavagem de 5 vezes, seguida por um segundo ciclo de mais 5 lavagens. Se a placa ELISA sensibilizada não for utilizada imediatamente, remova a placa da estufa no final das 16 h e lave 5 vezes. Uma lavagem eficiente é parte essencial do método. A placa lavada pode ser enxugada e estocada. Use tecido absorvente para secar os lados da placa, inverta a placa para remover algum líquido remanescente nas cavidades, e então seque a parte de cima da placa. Idealmente, a superfície interna das cavidades incluindo a base deve permanecer intocada durante o processo de lavagem e secagem. Coloque a placa tampada com a parte de cima voltada para baixo em caixa plástica, feche e estoque em freezer (-20°C).

(e) Diluição serial das soluções de amostras e padrão – Assegure a ambientação da temperatura das soluções de amostras e padrão retirando da refrigeração com 45-60 minutos de antecedência. Transfira alíquotas de 750 μL de cada uma dessas soluções a balões volumétricos de 10 mL, dilua ao volume com TFST e misture por repetidas inversões. Encha com microtubos o suporte (8x12) e pipete 600 μL das soluções de amostras e padrões diluídos, cada um dentro do seu tubo correspondente, como definido na Tabela 22 (padrão S1 em triplicata e amostras T1-Z1 em duplicata). A Tabela 22 ilustra o modelo padrão de tubos que corresponde às cavidades na placa de ELISA. Todos os outros tubos devem receber 400 μL de TFST; faça essa transferência utilizando pipeta multicanal (duas porções de 200 μL). Conduza a diluição serial de cada amostra, em duplicata, pelo uso de pipeta multicanal para misturar alíquotas de 600 μL (recolha 200 μL e reponha 3 vezes), e então transfira 200 μL ao tubo adjacente que já contém 400 μL de TFST. Misture como descrito e repita a diluição, descartando a alíquota de 200 μL do último tubo. Desta mistura resulta uma diluição serial 1:3; normalmente use soluções de amostra não diluída, 3 vezes diluídas e 9 vezes diluídas para o ensaio quando o teor de proteína de soja na amostra é desconhecido ou baixo (0-11g de proteína/100g de proteína total). Escolha maiores diluições se os teores são altos (3, 9, 27 vezes se 11-33g/100g; 9, 27, 81 vezes para 33-100g/100g), ou quando o ELISA já tenha demonstrado que as soluções de amostras são muitas concentradas. Dilua as soluções-padrão similarmente, preparando para o ensaio 7 diluições seriais (de solução não diluída a diluição de 729 vezes, cada uma em triplicata).

(f) Brancos – Quatro tipos de brancos são usados, cada um em triplicata: substrato (BS), conjugado (BC), anticorpo positivo (BP) e anticorpo negativo (BN). Adicione 400 µL de TFST a todos eles. Aos tubos BS e BC, acrescente 2 porções de 200 µL de TFST; aos tubos BP, solução de anticorpo positivo (2 x 200 µL); e, aos tubos BN, a solução de anticorpo negativo (2 x 200 µL). Idealmente, as leituras finais de absorbância (k) correspondentes a esses brancos devem apresentar os seguintes valores: BS<0,010; BC<0,050; BP>1,000; BN>0,200.

Tabela 22 – Modelo padrão recomendado para os microtubos (pré-incubação) e cavidades correspondentes na placa de ELISA, no ensaio com 7 amostras*.

Linhas	Colunas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BS	S1	S1	S1	00	00	00	00	00	00	00	00
B	BS	S2	S2	S2	T1	U1	V1	W1	X1	Y1	Z1	00
C	BS	S3	S3	S3	T2	U2	V2	W2	X2	Y2	Z2	00
D	BC	S4	S4	S4	T3	U3	V3	W3	X3	Y3	Z3	00
E	BC	S5	S5	S5	T1	U1	V1	W1	X1	Y1	Z1	00
F	BC	S6	S6	S6	T2	U2	V2	W2	X2	Y2	Z2	00
G	BP	S7	S7	S7	T3	U3	V3	W3	X3	Y3	Z3	00
H	BP	BP	BN	BN	BN	00	00	00	00	00	00	00

* As 96 posições estão arranjadas em 12 colunas (1-12) e 8 linhas (A-H). Cada amostra é analisada a 3 diluições (em duplicata); padrão a 7 diluições (em triplicata), e 4 brancos em triplicata. BS, branco substrato; BC, branco conjugado; BP, branco anticorpo-positivo; BN, branco anticorpo negativo; 00, não usado; S1-S7, padrão (1-7 indica 7 diluições seriais); T-Z, 7 amostras (1-3 indica 3 diluições seriais).

(g) Pré-incubação com soro anti-proteína de soja – Utilizando pipeta multicanal, adicione solução de anticorpo positivo (2 x 200 µL) aos tubos de amostras e padrões. Coloque TFST (2 x 200 µL) nos tubos externos restantes (00 na Tabela 22). Feche cuidadosamente com as tiras plásticas que vedam os microtubos. Inverta o suporte de microtubos três ou mais vezes para misturar e coloque na estufa a 37°C por (30 ± 1) min.

(h) Etapa anticorpo – Nos últimos 10 min da etapa de pré-incubação (g), lave a placa de ELISA já à temperatura ambiente (cerca de 45-60 min) utilizando um ciclo de 5 vezes. Remova o suporte de microtubos da estufa no tempo estipulado e inverta 3 vezes para misturar. Retire cuidadosamente as tiras plásticas vedadoras. Utilizando pipeta multicanal, transfira alíquotas de 200 µL de cada solução para as cavidades na placa de ELISA na posição correspondente (Tabela 22). Coloque a placa tampada na caixa plástica, feche e incube a (120 ± 2) min a 37°C.

(i) Etapa conjugado – Remova a placa ELISA da estufa, lave 10 vezes e enxugue como em (d). Adicione 200 µL de TFST na cavidade do branco substrato (BS). Com auxílio da multicanal adicione solução de conjugado a todas as outras cavidades (exceto BS) na mesma ordem de adição utilizada na etapa do anticorpo (h). Coloque a placa tampada na caixa plástica, feche e incube a (120 ± 2) min a 37°C.

(j) Etapa substrato – Remova a placa da estufa, lave 10 vezes e enxugue. Utilizando multicanal, adicione 200 µL da solução de substrato a cada cavidade da placa na mesma ordem da etapa (h). Então, coloque a placa tampada na caixa plástica, feche e incube por $(30 \pm 0,25)$ min a 37°C.

(k) Reação enzimática e medição da cor – Remova a placa ELISA da estufa e com ajuda da multicanal adicione alíquotas de 50 µL de solução de 0,2 M de NaOH a todas as cavidades da

placa, na mesma ordem da etapa do anticorpo. Proceda à leitura da absorbância a 405-410nm da solução de cada cavidade, usando leitora de ELISA ou equivalente; essa leitura deve ser realizada entre 5 e 60 min após a adição da solução de NaOH.

Cálculos

Para cada placa, construa uma curva-padrão (curva analítica ou de calibração - Figura 20) do log da concentração de proteína de soja padrão como pó de acetona ($N \times 6,25$) nas 7 diluições seriais *versus* a correspondente absorbância (média de 3 leituras). Calcule a concentração de proteína total ($N \times 6,25$) em cada diluição de cada solução de amostra. De cada média de absorbância, leia na curva a concentração de proteína de soja correspondente em cada diluição da amostra. Calcule a massa de proteína de soja por 100 g de proteína total para as 3 diluições correspondentes a cada amostra de pó de acetona. Se todos os 3 valores corresponderem à porção central da curva de calibração (isto é, S2 a S6), utilize a média como resultado final. As absorbâncias muito baixas implicam que as soluções utilizadas estavam muitas concentradas, e um maior número de diluições seriais deve ser utilizado para um segundo procedimento de ELISA. Os resultados também podem ser calculados em termos de massa de proteína de soja por 100 g de amostra como recebida ou em termos de peso do ingrediente de soja (proteínas isoladas contêm 88% de proteína, concentradas 68% e texturizadas 50%, base seca, teores mínimos estabelecidos pela legislação vigente) por 100 g de amostra como recebida. Note que as três maneiras de definir os teores de soja na amostra são diferentes e devem ser consideradas com cuidado.

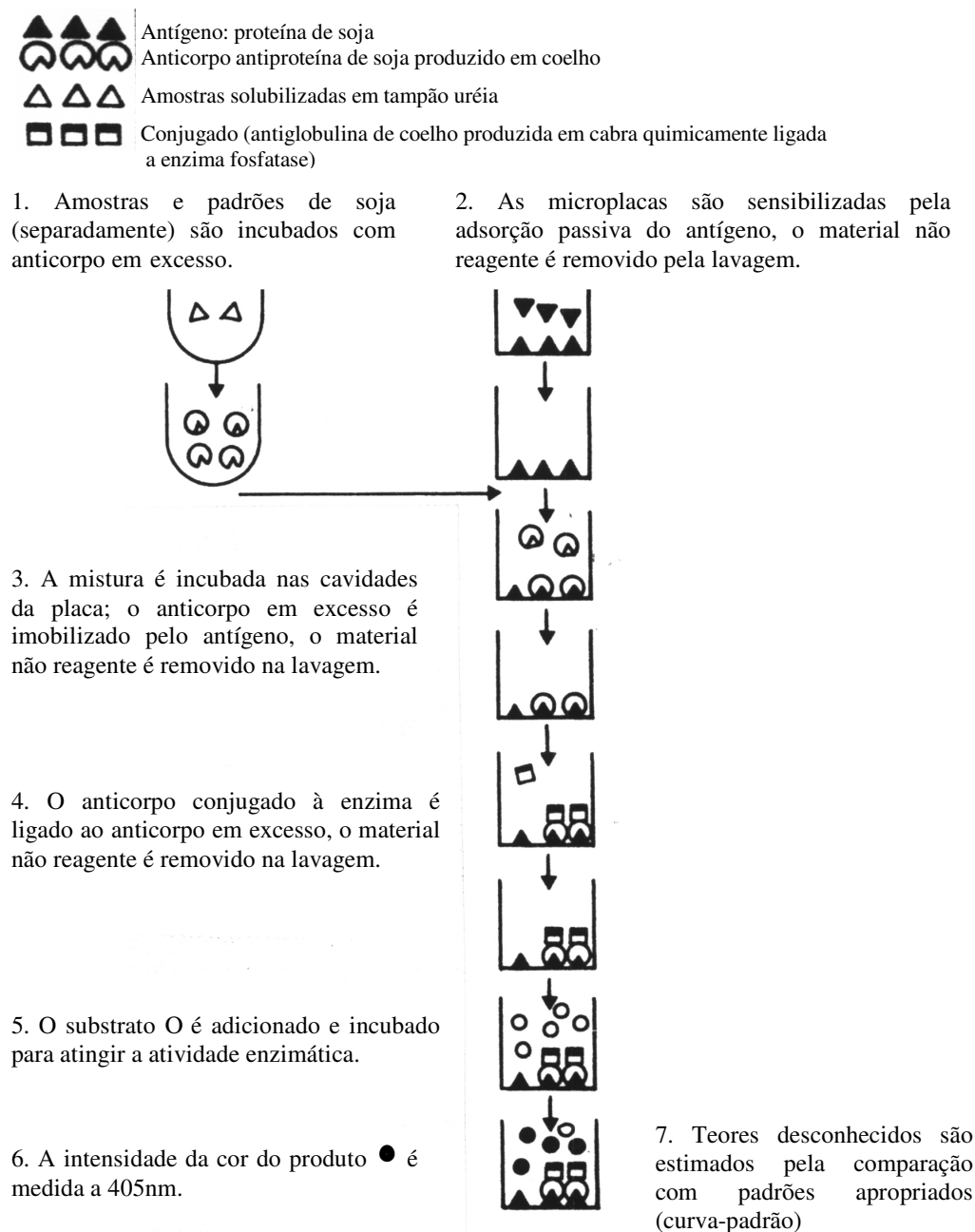


Figura 19 – Procedimento esquemático ilustrando as etapas individuais do método ELISA para determinação de proteína de soja.

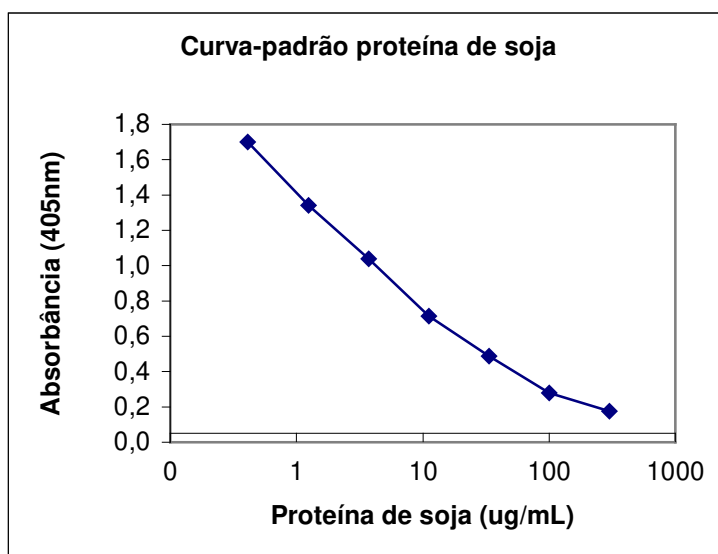


Figura 20 – Curva-padrão evidenciando a relação entre absorbância e concentração de proteína de soja da solução padrão pelo método ELISA.

O limite de quantificação do método é de 0,41 $\mu\text{g/mL}$ de proteína de soja na alíquota de análise (com desvio-padrão relativo de 2,4%) e de 0,14 g/100 g de proteína de soja na amostra. A curva-padrão abrange de 0,41 $\mu\text{g/mL}$ a 300 $\mu\text{g/mL}$ de proteína de soja, limite superior com desvio padrão relativo de 5,8% (DELLA TORRE et al., 2003).

Referências bibliográficas

AOAC International. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1995. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p.16-9.

DELLA TORRE, J. C. M.; BARBOSA, S. F. C.; FERRACIOLI, V. R.; ZENEBON, O.; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Quantitative determination of comercial soy proteins in emulsion-type meat products by official ELISA procedure. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 2003. *Proceedings...* Campinas: CTC-ITAL, 2003. p.405-406.

ANEXO 2

Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina¹

¹Metodologia publicada no livro: Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos – Instituto Adolfo Lutz – 4^a ed, 2004. Capítulo 13 – Carnes e Produtos Cárneos (no prelo).
--

Método de referência para determinação do aminoácido hidroxiprolina em carnes e produtos cárneos, expresso em % m/m. A hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida das proteínas colágenas de carnes e produtos cárneos. O tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina quando o fator 6,25 (conversão nitrogênio para proteína) é utilizado, ou 14% quando o fator é 5,55. A amostra é hidrolisada com solução de ácido clorídrico em constante ebulição sob refluxo, a solução é filtrada e diluída. A hidroxiprolina é oxidada com cloramina T. A cor vermelha púrpura que se desenvolve após a adição de 4-dimetilaminobenzaldeído é medida espectrofotometricamente a 558 nm.

Material

Processador de alimentos, chapa elétrica equipada com condensador resfriado com água para refluxo, balança analítica, banho-maria com temperatura termostaticamente controlada a $60 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, espectrofotômetro UV/VIS, cubeta de vidro de caminho óptico de 10 mm, papel de filtro qualitativo de diâmetro 12,5 cm, pHmetro, frascos Erlenmeyer com boca esmerilhada de 100, 250 e 500 mL, tubos de ensaio com tampa de 10 mL, balões volumétricos de 50, 100, 500 e 1.000 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 e 20 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico 6M – Misture volumes iguais de HCl concentrado e água.

Solução-padrão estoque de hidroxiprolina a 600 µg/mL – Dissolva 60 mg de hidroxiprolina em água. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. A

solução é estável cerca de 2 meses a 4°C. *Opção:* dissolva 120 mg (0,1200 g) em balão de 200 mL, complete o volume com água.

Solução-padrão intermediária de hidroxiprolina a 6 µg/mL – Pipete 5 mL da solução-estoque em balão volumétrico de 500 mL. Complete o volume. Prepare a solução no dia de seu uso.

Solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina – Pipete 5, 10, 20 e 30 mL da solução intermediária em balão volumétrico de 50 mL. Complete o volume. Essas soluções-padrão de trabalho revelam concentrações de hidroxiprolina de 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 µg/mL, respectivamente. Prepare as soluções no dia de seu uso.

Solução-tampão (pH 6,0) – Dissolva 30 g de ácido cítrico mono-hidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 15 g de hidróxido de sódio (NaOH) e 90 g de acetato de sódio tri-hidratado ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) em cerca de 500 mL de água. Transfira a solução para balão volumétrico de 1.000 mL. Adicione 290 mL de 1-propanol. Determine o pH e ajuste, se necessário, com ácido ou base. Complete o volume. A solução é estável por cerca de 2 meses a 4°C em frasco escuro.

Solução oxidante – Dissolva 1,41 g do reagente cloramina T em 100 mL da solução tampão pH 6,0. A solução é estável 1 semana a 4°C, em frasco escuro.

Reagente de cor – Dissolva 10 g de 4-dimetilaminobenzaldeído em 35 mL de ácido perclórico a 60% m/m. Adicione vagorosamente, com agitação, 65 mL de 2-propanol. Prepare a solução no dia de seu uso.

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 4 g da amostra em duplicata em frascos Erlenmeyer de 250 ou 500 mL. A amostra não deve aderir às paredes laterais. Adicione 30 mL de HCl 6 M e algumas pérolas de vidro (ou cacos de porcelana) a cada frasco. Aqueça à fervura branda por 8 horas sob refluxo. Transfira quantitativamente o hidrolisado para balão volumétrico de 500 mL com água. Complete o volume e agite. Filtre a solução através de papel de filtro, em frasco Erlenmeyer de 500 mL. O filtrado é estável ao menos por 2 semanas a 4°C. Dilua o filtrado com água em balão volumétrico, de modo que a concentração de hidroxiprolina da diluição final esteja na faixa de 0,6 a 3,6 µg/mL. A diluição de 5 mL do filtrado para 50 mL é usualmente satisfatória. Pipete 2 mL da diluição final de cada amostra em tubos de ensaio. A cada tubo, adicione 1 mL da solução oxidante. Agite os tubos e deixe por (20 ± 2) minutos à temperatura ambiente. Adicione 1 mL do reagente de cor e misture vigorosamente. Feche cada tubo com tampa ou papel alumínio. Imediatamente, coloque os tubos em banho de água a $(60 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ por exatamente 15 minutos. Resfrie os tubos em água corrente por 3 minutos. Meça a absorbância das soluções contra o branco de reagentes a (558 ± 2) nm.

Curva-padrão – Prepare a curva-padrão para cada série de medições. Transfira 2 mL de água (branco) e 2 mL de cada solução-padrão de trabalho aos tubos de ensaio e proceda à adição da solução oxidante e do reagente de cor conforme procedimento da amostra. Construa a curva com absorbância no eixo y e concentrações de hidroxiprolina 0,3; 0,6; 1,2 e 1,8 µg/mL no eixo x. Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculos

$$\frac{(A - b)}{a \times p} = \text{hidroxiprolina (H) em g/100g}$$

A = absorbância do filtrado da amostra diluída 10 vezes (5 mL em 50 mL)

b = coeficiente linear da reta obtida na curva-padrão

a = absortividade, coeficiente angular da reta obtida na curva-padrão

p = peso da amostra (g)

$$H \times 8 = \text{tecido conjuntivo colagenoso (B) em g/100 g}$$

Nota: tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina se o fator de conversão de nitrogênio para proteína for de 6,25.

$$\frac{B \times 100}{\% \text{ proteína total}} = \text{tecido conjuntivo colagenoso relativo (BR) em g/100g}$$

$$\% \text{ proteína total} = \text{teor de nitrogênio da amostra (g/100 g)} \times 6,25$$

Notas

O cálculo é diferente em alguns países, com base nos diferentes fatores de conversão de nitrogênio e hidroxiprolina.

O limite de quantificação do método é de 0,030 µg/mL de hidroxiprolina na alíquota de análise (com desvio-padrão relativo de 6,5%) e de 0,0075g/100g de hidroxiprolina na amostra (DELLA TORRE et al., 2004). A curva-padrão abrange de 0,030 µg/mL a 2,718 µg/mL de hidroxiprolina (limite superior com desvio-padrão relativo de 1,3%).

A confiabilidade do método é dada pelas equações que relacionam o teor de hidroxiprolina (H) com a repetitividade (r) e a reprodutibilidade (R), e é calculada da seguinte maneira (AOAC, 1995):

$$r = 0,0131 + 0,0322 \cdot H$$

$$R = 0,0195 + 0,0529 \cdot H$$

A diferença entre dois valores calculados, obtidos simultaneamente no teste em duplicata pelo mesmo analista, não devem exceder a diferença calculada de acordo com o valor de r calculado.

Exemplo: Se o valor médio aritmético de 0,50 g/100 g de hidroxiprolina é obtido na determinação da amostra em duplicata, a repetitividade é calculada como segue: $r = 0,0131 + 0,0322 \cdot 0,50 = 0,029$. Portanto, para esta amostra, os resultados de duas determinações não devem diferir por mais que $\pm 0,029\%$ do valor médio de 0,50.

Referências bibliográficas

AOAC International. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1995. Cap. 39 (Meat and Meat Products), p. 13-15.

DELLA TORRE, J. C. M.; LICHTIG, J.; BERAQUET, N.J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz*, v.63, n.1, 2004 (no prelo).