

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Efeitos da alta pressão hidrostática sobre o colágeno da
carne bovina**

Laís Martins Fontoura

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**Efeitos da alta pressão hidrostática sobre o colágeno da
carne bovina**

LAÍS MARTINS FONTOURA

*Sob a Orientação do Professor Doutor
Amauri Rosenthal*

*e Co-orientação da Professora Doutora
Simone Pereira Mathias*

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

**Seropédica, RJ
Agosto de 2013**

664.92

F684e

T

Fontoura, Laís Martins, 1982-

Efeitos da alta pressão hidrostática sobre o colágeno da carne bovina / Laís Martins Fontoura. - 2013.

61 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2013.

Bibliografia: f. 51-61.

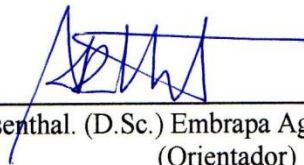
1. Carne bovina - Teses. 2. Carne bovina - Análise - Teses. 3. Colágeno - Análise - Teses. 4. Alta pressão (Tecnologia) - Teses. 5. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Rosenthal, Amauri, 1960-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

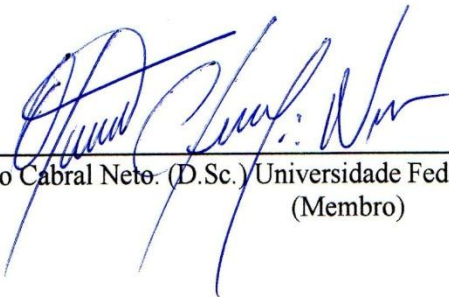
LAÍS MARTINS FONTOURA

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

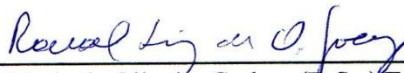
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/08/2013



Amauri Rosenthal. (D.Sc.) Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Orientador)



Otávio Cabral Neto. (D.Sc.) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
(Membro)



Ronoel Luiz de Oliveira Godoy. (D.Sc.) Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais
Eni Martins da Silva (*in memoriam*)
e Jader Fontoura da Silva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir amar ainda mais a minha vida!

Agradeço aos meus pais Eni e Jader e aos meus irmãos Leandro Martins Fontoura e Ender Martins Fontoura pelo amor incondicional e apoio ao longo da minha vida.

Agradeço à toda minha família, em especial meu tio Edir Martins Ferreira, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Agradeço à todos os meus amigos do mestrado que, de todas as formas ajudaram no meu crescimento profissional, em especial meu namorado Arturo, que foi um presente divino em minha vida.

Agradeço ao meu amigo José Luis Ascheri, por todos os ensinamentos e generosa paciência.

Agradeço aos meus amigos, por compreenderem minha ausência e me apoiarem em todos os momentos.

Agradeço aos meus orientadores Amauri Rosenthal e Simone Mathias, pelos ensinamentos e incentivos ao longo deste trabalho.

Agradeço à todos os meus colegas, funcionários e estagiários da Embrapa das Plantas 1 e 2, Laboratório de Reologia, Laboratório de Bioquímica e Laboratório de Cromatografia Líquida, sou muito grata pela ajuda e ensinamentos.

Agradeço à minha professora Cristiane Hess, por acreditar na minha capacidade, me apoiar em um momento muito difícil da minha vida e me apresentar, na graduação, o “mundo da pesquisa”.

Agradeço ao professor Armando Sabaa, pela oportunidade de trabalho e grande incentivador para continuar no “mundo da pesquisa”.

Agradeço aos pesquisadores Marília Stephan, Ronoel Godoy e Carlos Piler por toda ajuda e conhecimento adquirido.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa e à Embrapa Agroindústria de Alimentos pela realização deste trabalho.

RESUMO

MARTINS FONTOURA, Laís. **Efeito da alta pressão hidrostática sobre o colágeno da carne bovina.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

A maciez, atributo de textura, é um dos aspectos mais importantes para a qualidade da carne. Existem muitos fatores que determinam a maciez da carne, como os físico-químicos, enzimáticos, espécie do animal, raça, tipo de músculo e idade. Ainda é possível tornar a carne mais macia com diversos métodos como o uso de enzimas específicas, descarga elétrica, ultrassom e alta pressão hidrostática. As alterações de textura durante o processamento são resultantes de modificações estruturais. A aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática em carnes para o amaciamento ou maturação é dependente de fatores intrínsecos (determinados pela composição e fase do *rigor-mortis*) e das variáveis do processo: pressão, tempo e temperatura. Efeitos distintos decorrem de modificações da estrutura das proteínas, aumentando ou reduzindo a maciez de vários cortes cárneos, devido a possível fragmentação de proteínas miofibrilares e/ou enfraquecimento do tecido conjuntivo. As modificações no colágeno decorrentes dos processos podem ser determinadas pela quantificação da hidroxiprolina, um aminoácido em alta concentração e quase exclusivo do colágeno, incomum em outras proteínas. Objetivou-se com esse trabalho estudar as modificações no colágeno decorrentes da aplicação da alta pressão hidrostática na carne bovina. O músculo bovino foi pressurizado em 200, 400 e 600 MPa por 10 e 20 min. Extraíram-se os colágenos do perimísio e endomísio, que foram liofilizados. Foram realizadas análises do perfil das proteínas, solubilidade do colágeno, análise térmica por calorímetro diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura. As modificações ocorridas no perimísio detectadas pela análise eletroforética foram mais evidentes em torno das bandas próximas de 103 kDa, representando as proteínas α da cadeia de colágeno, e nas bandas em torno de 180 kDa e 200kDa, que representam, respectivamente, a cadeia pesada da miosina e as proteínas β da cadeia de colágeno. Novas faixas de peptídeos foram observadas nos tratamentos em relação à amostra controle. Esse perfil pode ser consequência da mudança ocorrida no perimísio pela APH, bem como das alterações de proteínas miofibrilares e/ou sarcoplasmáticas. Pode-se concluir que a pressurização é capaz de aumentar as características do colágeno, tornando-o mais solúvel, com possível aumento na maciez da carne. Não foi possível concluir que houve alterações no perimísio pela análise de microscopia eletrônica de varredura. De acordo com o presente trabalho, pode-se concluir que a APH foi capaz de modificar a estrutura do colágeno do perimísio e endomísio.

Palavras-chave: pressurização, hidroxiprolina, tecido conjuntivo, análise eletroforética, cromatografia líquida

ABSTRACT

Softness is a texture attribute being regarded as one of the main factors related to meat quality. Several factors determine meat softness such as physic-chemicals, enzymatic, animal species, muscle type and animal age. In addition, it is possible to turn the meat softer by applying different methods as the use of specific enzymes, electro shocks, ultrasound and high hydrostatic press as shockwaves. Texture changes along the processes are due to structural changes. Application of high hydrostatic pressure for meat softening depends on intrinsic factors (associated to composition and rigor mortis stage) and processing variables: pressure, time and temperature. Distinct effects result from protein structure modifications by enhancing or decreasing different meat cut softening, due to possible myofibril protein fragmentation or by weakening conjunctive tissue. Changes in collagen from the proceedings may be determined by quantification of hydroxyproline, an amino acid in high concentration and almost exclusively in collagen, uncommon in other proteins. This research aimed at studying collagen modification resulting from the application of high pressure on bovine meat. The muscle was pressurised at 200, 400 and 600 MPa for 10 and 20 min. Endomysium and perimysium collagens were extracted and freeze-dried. The following analyses were carried out: protein profile, collagen solubility, thermal analyses by differential scanning calorimetry and electronic scanning microscopy. Modifications on perimysium detected by electrophoretic analysis were more evident around 103 kDa band, representing the α proteins of collagen chain, and on the bands around 180 kDa to 200 kDa, associated to the heavy myosin and β proteins of collagen chain. . New peptides bands were observed on the treatments samples in comparison to the control. Such a profile may result from the changes that happen on perimysium due to high hydrostatic pressure, as well as modifications on myofibril and sarcoplasmic proteins. It is possible to conclude that high-pressure application was able to affect collagen characteristics turning it more soluble, with a possible effect on meat softness. It was not possible to detect any perimysium change from the scanning electronic microscopy. In overall it was possible to conclude that hydrostatic high pressure was capable of changing both perimysium and endomysium portion of collagen.

Keywords: pressurization, hydroxyproline, conjunctive tissue, liquid chromatography, electrophoretic analyse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização do músculo esquelético, mostrando o epimísio, perimísio e endomísio.....	4
Figura 2. Desenho esquemático da seção longitudinal de um sarcômero em estado contraído, relaxado e estendido.	5
Figura 3. Molécula de colágeno.	7
Figura 4. Formação da fibrila de colágeno.....	9
Figura 5. Modificações no tecido intramuscular conectivo durante a maturação.....	13
Figura 6. Porcentagens de ligações cruzadas conforme a maturidade fisiológica.	14
Figura 7. Comercialização de alimentos pressurizados de acordo com os setores da indústria alimentícia.....	17
Figura 8. Equipamento de alta pressão hidrostática.	20
Figura 9. Gráfico das variáveis: tempo, temperatura e pressão no processamento de APH.	21
Figura 10. Efeito da APH no valor do Indicador Bioquímico da Maturação Miofibrilar (BIMA).	25
Figura 11. Efeito da APH na fragmentação das miofibrilas.	26
Figura 15. Perfil eletroforético das proteínas extraídas do perimísio.	35
Figura 17. Gráfico dos tratamentos de APH sobre a quantidade de hidroxiprolina do endomísio.....	37
Figura 18. Gráfico dos tratamentos de APH sobre a quantidade de hidroxiprolina do perimísio.	37
Figura 18. Superfície de Resposta para o Endomísio.	41
Figura 19. Superfície de Resposta para o Perimísio.	42
Figura 20. Efeito de diferentes pressões hidrostáticas nos valores de entalpia de diferentes amostras de perimísio.	45
Figura 21. Gráfico das análises de DSC em todos os tratamentos de pressurização e controle (TC) no perimísio.	46
Figura 22. Imagens dos liofilizados.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição de aminoácidos (g/100g de proteína) da fibra de colágeno.	12
Tabela 2.	Mudança de temperatura pela compressão adiabática em alguns alimentos.	22
Tabela 3.	Descrição dos tratamentos utilizados.....	28
Tabela 4.	Conteúdo de colágeno da porção endomisial e perimisial da carne pressurizada e não pressurizada.....	36
Tabela 5.	Valores e Resultados experimentais da hidroxiprolina no endomísio e perimísio.	38
Tabela 6.	Análise de Variância para o Endomísio.....	38
Tabela 7.	Análise de Variância para o Endomísio.....	38
Tabela 8.	Efeitos do Planejamento Experimental para o Endomísio.	39
Tabela 9.	Efeitos do Planejamento Experimental para o Perimísio.	39
Tabela 10.	Coeficiente de Regressão do Planejamento Experimental para o Endomísio.	39
Tabela 11.	Coeficiente de Regressão do Planejamento Experimental para o Perimísio.	40
Tabela 12.	Variação da Entalpia.....	44
Tabela 13.	Temperatura inicial, de pico e final do perimísio dos tratamentos.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo Geral	2
1.2. Objetivos Específicos	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Tecido Muscular	3
2.2 Colágeno.....	5
2.2.1 Síntese e formação das fibrilas de colágeno	8
2.2.2 Tipos de colágeno	10
2.2.3 Aminoácidos do colágeno	10
2.2.4. Maciez	12
2.3 Alta Pressão Hidrostática (APH).....	15
2.3.1 Histórico	16
2.3.2 Princípios do processamento	17
2.3.3 Vantagens da tecnologia	18
2.3.4 Equipamentos	19
2.3.5 Descrição do processamento	20
2.3.6 Efeito nas proteínas	23
2.3.7 Efeito no tecido conjuntivo.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Material.....	28
3.2 Métodos	28
3.2.1 Planejamento Experimental	28
3.2.2 Tratamento sob Alta Pressão Hidrostática.....	28
3.2.3 Extração do Colágeno.....	29
3.2.4 Análise de proteínas por Eletroforese.....	29
3.2.5 Análise Cromatográfica.....	30
3.2.6 Análise Térmica por Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC).....	31
3.2.7 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	32
3.2.8 Análise Estatística.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Efeito da APH sobre o perfil das proteínas	33
4.2 Efeito da APH sobre a solubilidade do perimísio e endomísio	35
4.3 Efeitos da APH nas propriedades térmicas do perimísio	44
4.4 Visualização do perimísio	48

5 CONCLUSÃO.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de carne bovina e é considerado o segundo maior exportador. Em 2012, exportou-se 1,13 milhão de toneladas. Houve crescimento de 13,4% sobre o ano de 2011 na exportação da carne. Em relação ao volume financeiro, o Brasil obteve recorde com a receita de 5,77 bilhões de dólares (ABIEC, 2013).

O mercado de carnes e produtos cárneos é determinado pelas características de qualidade, destacando-se as propriedades de textura. Entre os aspectos determinantes das qualidades da carne, podem-se citar as propriedades físicas, composição química e atributos sensoriais.

Existem muitos fatores que determinam a maciez da carne, como os físico-químicos, enzimáticos, espécie do animal, tipo de músculo e idade. Ainda é possível tornar a carne mais macia com diversos métodos como a maturação, o uso de enzimas específicas, descarga elétrica, ultrassom e alta pressão hidrostática. A textura, destacando-se o atributo maciez, é um dos aspectos mais importantes para a qualidade da carne. As alterações de textura durante o processamento são resultantes de modificações estruturais.

O colágeno é uma proteína fibrosa, que agrega e dá suporte às células e está relacionado com proteínas rígidas e insolúveis, por isso é capaz de influenciar a maciez da carne dependendo do tipo de músculo. Os músculos com maior quantidade de colágeno são encontrados naqueles que são exigidos maior esforço muscular. Logo, essa carne é considerada menos macia e tem seu valor de mercado reduzido. O cozimento aumenta a solubilidade do colágeno e, assim, pode aumentar a maciez da carne. Contudo, uma carne rica em colágeno, quando cozida, tem encolhimento térmico e isso faz com que a carne tenha perda de líquidos e se torne menos macia.

A alta pressão hidrostática é um processo em que há pouco gasto energético e não produz resíduo, logo, é classificado como uma tecnologia limpa. É considerada emergente, não convencional, com processamento não-térmico, e fundamenta-se em submeter o produto a pressões acima de 100MPa. Diversos países já aplicam a tecnologia industrialmente e seu uso está crescendo, justamente porque é possível trabalhar com os mais variados tipos de alimentos, tornando o produto mais atrativo, mantendo as características mais próximas à original, com melhoria no sabor e textura, aumentando a vida útil, agregando valor ao produto, e ainda, com amplo aceite pelos consumidores.

O uso da tecnologia de alta pressão hidrostática pode ser realizado em carnes para o amaciamento ou maturação, e é dependente de fatores intrínsecos (composição e fase do rigor mortis) e das variáveis do processo: pressão, tempo e temperatura. Efeitos distintos são encontrados pela modificação da estrutura das proteínas, aumentando ou reduzindo a maciez de vários cortes cárneos, pois há fragmentação das proteínas miofibrilares e enfraquecimento do tecido conjuntivo.

1.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do processamento de alta pressão hidrostática sobre as características do colágeno de carne bovina.

1.2. Objetivos Específicos

- Extração do colágeno pressurizado
- Análise qualitativa do colágeno por eletroforese
- Análise quantitativa do colágeno por HPLC
- Análise das propriedades térmicas
- Análise das mudanças morfológicas

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O processamento de carne e derivados, principalmente os processos emergentes, exigem previamente conhecimentos específicos da estrutura e composição da matéria-prima que serão transformadas com vistas ao melhoramento para consumo. A seguir são apresentadas e discutidas tais características relativas à carne bovina e as transformações das proteínas contidas na mesma, em particular, o colágeno.

2.1 Tecido Muscular

O tecido muscular é formado por 16 a 22% de proteínas, 1 a 13% de gorduras, 75 a 85% de água, 1,5% de substâncias nitrogenadas não proteicas, 1% de carboidratos e 1% de minerais (PARDI et al., 2007).

As proteínas podem ser classificadas em miofibrilares, sarcoplasmáticas e estromáticas e representam de 52 a 56% das proteínas musculares, formando os miofilamentos grossos e finos que constituem as miofibrilas, responsáveis pela contração muscular. São formados pela miosina, actina, proteína C, proteína M, tropomiosina, α -actina e β -actina (SGARBIERI, 1996).

Ainda segundo o mesmo autor, grande parte da fração proteica estromática é formada por duas proteínas do tecido conectivo, o colágeno e a elastina. Contudo, há muitas variações no teor de colágeno e elastina em diferentes músculos da mesma espécie. As proteínas estromáticas são menos solúveis que as sarcoplasmáticas e possuem proteínas do sarcolema, do retículo sarcoplasmático, das membranas mitocondriais e, ainda, das proteínas do tecido conectivo que envolve a célula muscular. Para a separação das proteínas estromáticas de todas as proteínas dos músculos, são necessárias diversas extrações baseadas na solubilidade.

O tecido conjuntivo possui relevante papel no organismo, uma vez que desempenha a função estrutural, agregando e dando suporte às células. Isso se deve às propriedades do colágeno, uma proteína fibrosa que possui grande força de tensão (REIS et al., 1999).

As funções do tecido conjuntivo são sustentar os músculos e separá-los em diferentes tipos, diferenciando-os pela força contrátil exigida (BAILEY e LIGHT, 1989). O tecido conjuntivo intramuscular apresenta grande quantidade de matriz extracelular, que é formada por fibras, cujo principal componente é o colágeno com cerca de 95%. Também possui elastina e a substância amorfa com glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas, aderentes à sua estrutura (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O papel da matriz é englobar todas as moléculas imobilizadas externamente às células. Sua importância é devido a algumas propriedades em que exerce influência, como a capacidade de retenção de água extracelular, elasticidade e regulação de fatores de crescimento. Na musculatura esquelética, o tecido conjuntivo apresenta três camadas principais, endomísio, perimísio e epimísio, que se distinguem pela composição, estrutura e posição anatômica (PURSLOW e DUANCE, 1990).

Segundo Taylor (1998), o colágeno é a principal proteína do endomísio e perimísio, possuindo uma grande variação entre os músculos. Em geral, músculos que possuem maior funcionalidade têm maior conteúdo de colágeno em comparação com os músculos que não são tão exigidos em ações de esforço.

O endomísio possui uma camada fina de tecido conjuntivo que engloba cada fibra muscular separadamente. É composto por uma rede de fibras onduladas de colágeno que se

realignam conforme o movimento da musculatura. Possui características adesivas e é estável ao calor de 100°C e, conseqüentemente, não colabora para as modificações da textura (PURSLOW e TROTTER, 1994). O perimísio é a camada do tecido conjuntivo em que há alteração quantitativa. A fina camada de perimísio engloba os feixes de fibras musculares. Suas fibras de colágeno se arranjam em duas camadas que se cruzam e se realinham, conforme o movimento dos músculos de contração e relaxamento. Entende-se por epimísio a bainha de tecido conjuntivo que se encontra ao redor dos músculos, separando-os individualmente (ROWE, 1981; PURSLOW, 1989).

O músculo esquelético é considerado um músculo estriado de contração voluntária. A unidade estrutural desse músculo é a fibra muscular, que é formada por uma membrana externa (sarcolema) e citoplasma diferenciado (sarcoplasma), repleto de miofibrilas. O sarcômero é a menor unidade contrátil estrutural repetitiva da miofibrilas, desempenhando um papel importante na contração e relaxamento muscular (ALVES e MANCIO, 2007). A Figura 1 mostra a organização do músculo esquelético, apresentando os principais componentes de toda a estrutura.

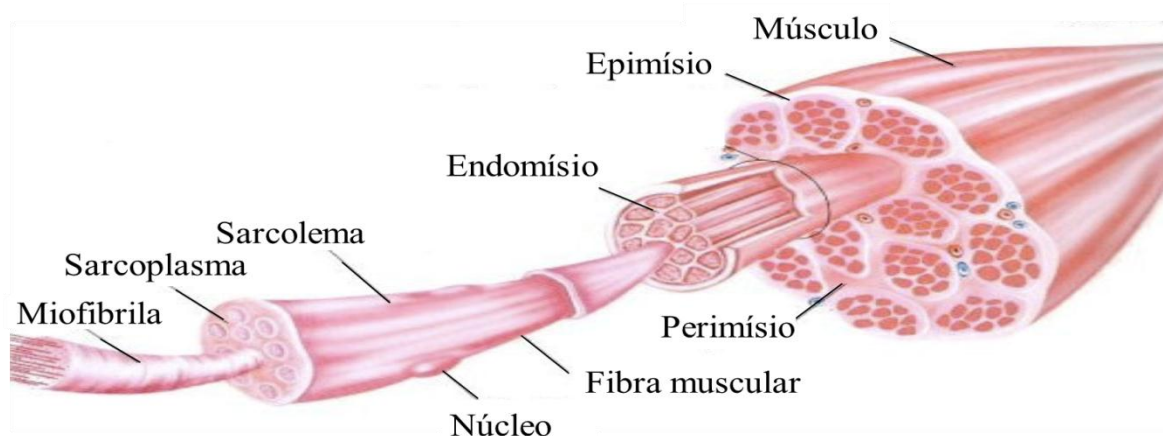


Figura 1. Organização do músculo esquelético, mostrando o epimísio, perimísio e endomísio.

Fonte: Adaptado da internet (http://panamericanscience10.blogspot.com.br/2012_10_01_archive.html)

A seguir, a Figura 2 exibe o esquema de contração e relaxamento muscular, com os principais componentes do músculo, responsáveis pelo movimento muscular.

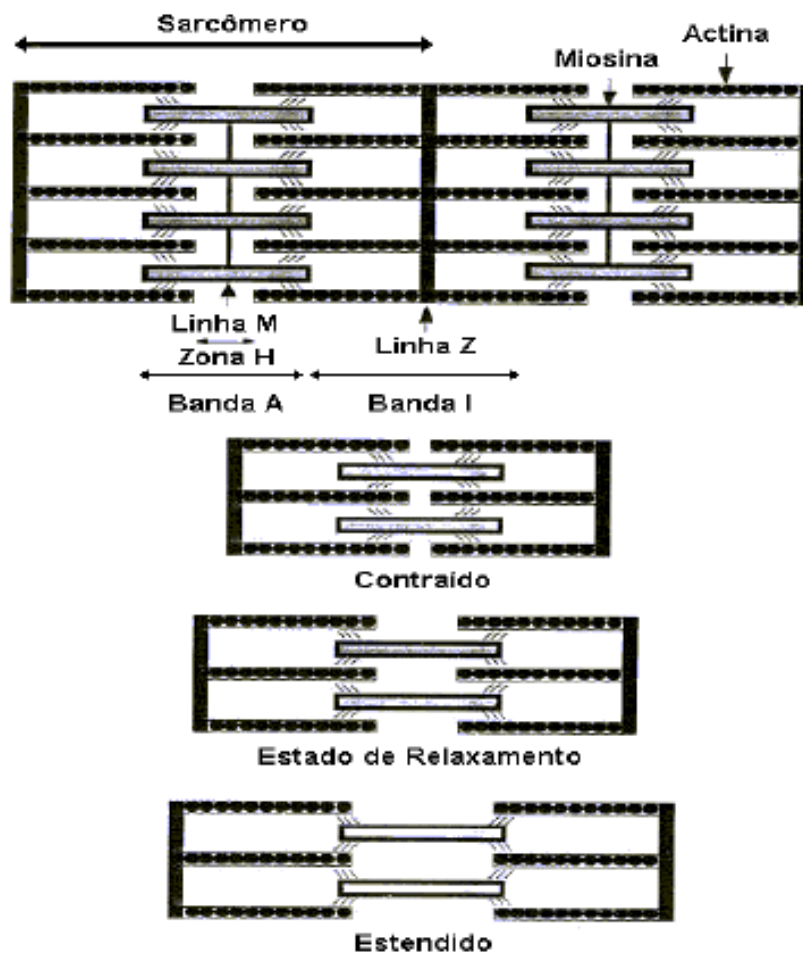


Figura 2. Desenho esquemático da seção longitudinal de um sarcômero em estado contraído, relaxado e estendido.

Fonte: Luchiari Filho (2000).

Os três sistemas enzimáticos são os responsáveis pela proteólise das miofibrilas: catepsinas, calpaínas e o complexo multicatalítico de proteases (ALVES e MANCIO, 2007). As catepsinas são proteases ácidas localizadas nos lisossomos e atua sobre a actina, miosina e linha Z. Agem até em pH baixo ($\text{pH} < 6,0$) não somente nas proteínas miofibrilares como também nas proteínas do tecido conjuntivo, o colágeno (KOOHMARAIE, 1994). Enquanto que o complexo multicatalítico de proteases age preferencialmente, em peptídeos, em pH neutro ou alcalino e em temperaturas próximas de 45°C , reduzindo sua importância. Já o sistema das calpaínas é o mais importante em relação à proteólise, levando ao amaciamento da carne (ALVES e MANCIO, 2007).

2.2 Colágeno

O vocábulo colágeno é derivado das palavras gregas *Kolla* (cola) e *Genno* (produção) e é de fato utilizado na produção de cola animal (OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2001).

O colágeno é uma proteína animal e pode ser considerado como o principal constituinte das cartilagens e outros tecidos conectivos, representando 40-60% do estroma. O

tropocolágeno é a unidade estrutura fundamental do colágeno e mede 15 Å de diâmetro e 2800 Å de comprimento, com aproximadamente 300.000 de peso molecular (SGARBIERI, 1996).

O colágeno é a proteína mais numerosa presente nos mamíferos e está relacionado com proteínas rígidas e insolúveis. É o elemento mais abundante da pele, ossos, tendões, cartilagens e dentes. O colágeno é uma molécula que possui mais de mil resíduos composta por três cadeias polipeptídicas, contendo uma sequência de aminoácidos particular. Contudo, diferentemente das proteínas globulares, as colagenosas são mais compactas. Há uma elevada proporção de hidroxiprolina, somente encontrada no colágeno, perfazendo 13 e 14% da estrutura (CHAMPE e HARVEY, 1996; NELSON e COX, 2006; BERG et al., 2008; VOET et al., 2008).

O colágeno possui diversas funções no organismo, como a sustentação de órgãos e tecidos, contribuindo para a integridade da estrutura da matriz extracelular, e ajudando a fixação de células na mesma (SISKEN, 1993; NEKLYUDOV, 2003). É bastante utilizado em biomateriais, como em fios cirúrgicos, em revestimentos de próteses vasculares de grande calibre, bem como na recuperação de funções motoras pela orientação de células nervosas (SISKEN, 1993). A crescente demanda pelo colágeno deve-se a fatores como a grande disponibilidade que é encontrada no reino animal, ao reduzido número de reações imunológicas e ao poder de formação de fibras semelhantes aos tecidos.

Possui altos teores de glicina, prolina e hidroxiprolina, e ausência de aminoácidos sulfurados e de triptofano. O colágeno é uma glucoproteína e possui pequenas partes de galactose e glicose (SGARBIERI, 1996).

Devido à presença quase exclusiva da hidroxiprolina em alta concentração a quantificação desse aminoácido é comumente empregada para determinar a concentração de colágeno e de suas frações (WOESSNER JUNIOR, 1961; SIMS e BAILEY, 1981; KOLAR, 1990; DUGAN et al., 2000).

Com a ausência dos aminoácidos essenciais, considera-se o colágeno como sendo pobre para a dieta humana (OCKERMAN e HANSEN, 1994; PARDI et al., 2007). Contudo, a gelatina e o colágeno hidrolisado têm valor nutricional adequado quando estão combinados com outras proteínas, a fim de que sejam suplementos proteicos (ZIEGLER, 2006).

A solubilização do colágeno ocorre em soluções de ácidos entre pH 3,0-4,0 e a precipitação em pH neutro, cujo ponto isoelétrico está localizado entre 6,6-6,8 (SGARBIERI, 1996). É possível visualizar a molécula de colágeno através da Figura 3, que mostra a conformação das ligações moleculares.

Os músculos possuem uma pequena porção de colágeno, entre 2 e 10% do peso seco. Porém, este componente fibroso e inflexível do tecido conjuntivo intramuscular é capaz de influenciar a dureza da carne, em relação ao seu encolhimento, determinando perdas de líquidos durante o cozimento (LIGHT e CHAMPION, 1984). Desse modo, mudanças implementadas no colágeno podem possivelmente trazer resultados benéficos e significativos relacionados à textura da carne.

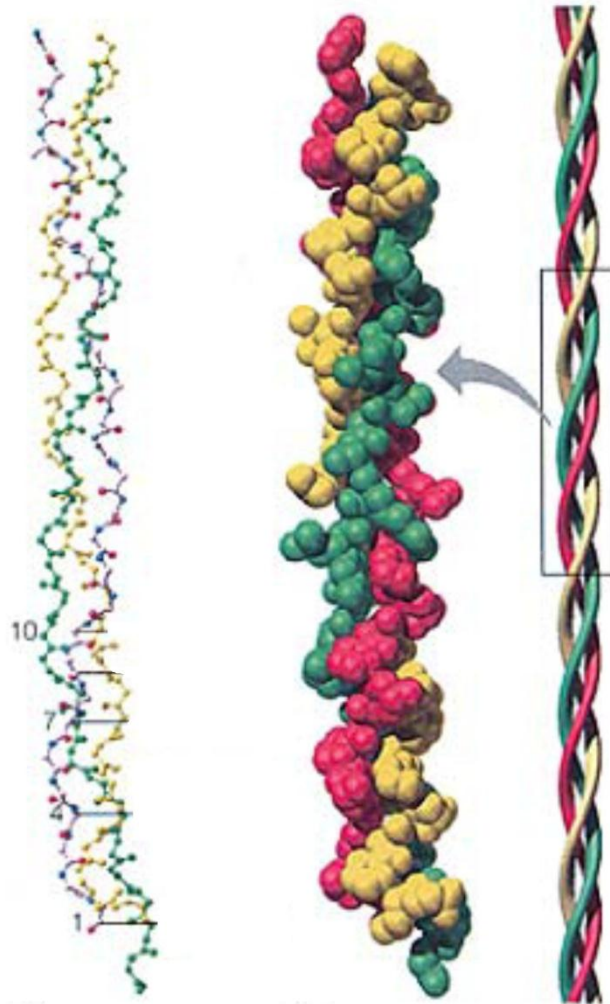


Figura 3. Molécula de colágeno.

Fonte: Internet (<http://wwwfac.mcdaniel.edu/Chemistry/CH3321JPGs/Proteins/Collagen.jpg>)

Na maioria das vezes, o colágeno é secretado por fibroblastos, contudo pode originar-se de outros tipos de células (BERG *et al.*, 2008).

As proteínas do colágeno geralmente formam agregados supramoleculares, como as fibrilas, filamentos ou redes, sejam isoladas ou em conjunto com outras matrizes extracelulares (NEKLYUDOV, 2003).

A fibra é linear e cada uma é composta por três cadeias polipeptídicas, como mostrado na Figura 3. Cada cadeia polipeptídica se organiza como uma hélice distendida com giro para a esquerda, enquanto que as três cadeias se agrupam fortemente, gerando uma super hélice com giro para a direita, unidas por pontes de hidrogênio (SGARBIERI, 1996). Essa estrutura alongada em tripla hélice permite que as cadeias laterais dos próprios aminoácidos se localizem na parte externa da molécula permitindo, assim, a interação de monômeros de colágeno em longas fibras (CHAMPE e HARVEY, 1996).

As três cadeias polipeptídicas, chamadas cadeias alfa, podem conter variações na sequência de aminoácidos e, com isso, formar elementos estruturais com características distintas, sem acarretar alterações de tamanho. A variedade de tipos de colágeno existentes nos tecidos se dá pela combinação dessas cadeias alfa (CHAMPE e HARVEY, 1996).

Pelo fato de existir ligações intermoleculares, as fibras de colágeno possuem pouca solubilidade e extensibilidade (ALVES e MANCIO, 2007). As ligações de hidrogênio entre as

cadeias polipeptídicas deixam a tríplice hélice do colágeno muito resistente e rígida. Porém, quando as ligações de hidrogênio são quebradas, a cadeia polipeptídica sofre degradação (SGARBIERI, 1996).

As propriedades do colágeno podem variar de acordo com o tipo de músculo, podendo ser determinantes conteúdos elevados de colágeno total e insolúvel. Assim sendo, diversas pesquisas constataram que o aumento da maciez da carne pode ser associado a variações da solubilidade do colágeno (SHIMOKOMAKI, ELSDEN e BAILEY, 1972; DRANSFIELD, 1977; BAILEY e LIGHT, 1989; McCORMICK, 1999; TORRESCANO et al., 2003; VAZ e RESTLE, 2007; DUARTE et al., 2011).

O colágeno sofre modificações quando submetido a altas temperaturas. Suas ligações intermoleculares são rompidas e a proteína, que originalmente possuía uma forma cristalina, muito organizada, torna-se solúvel e altera-se para uma forma amorfa, chamado de gelatina (SGARBIERI, 1996; ARNOCZKY e AKSAN, 2000). De acordo com Bernal e Stanley (1987), essa modificação estrutural acontece em duas etapas. Na primeira há a quebra da ligação de hidrogênio entre as três cadeias polipeptídicas da molécula tropocolágeno e, na segunda etapa, há a quebra intramolecular da ligação hidrogênio na cadeia α .

Conforme o animal envelhece, as interações intermoleculares do colágeno vão aumentando, assim como o diâmetro das fibras (REISER et al., 1992). Logo, essas ligações são consideradas como uma das causas da carne de animais mais velhos serem menos macia que de animais jovens (VOET et al., 2008).

Essas interações intermoleculares, denominadas ligações cruzadas, também são susceptíveis a uma ação enzimática, catalisada pela enzima extracelular lisil-oxidase e processo oxidativo, envolvendo glicosilação de resíduos (BAILEY, 2001).

Na molécula de colágeno, há terminais N- e C- que têm extensões peptídicas não helicoidais e, nesse espaço, se dá a origem às ligações cruzadas, oriundas das cadeias laterais de lisina e histidina. A enzima lisil-oxidase é a única enzima responsável pela origem das ligações cruzadas. Ela é capaz de transformar resíduos de lisina em alisina, um aldeído (VOET et al., 2008).

No máximo, quatro cadeias podem ter ligação covalente entre si. São conhecidos dois tipos de ligações: as ligações intramoleculares, que reagem com a própria molécula, e as ligações intermoleculares, que são fundamentais para a estabilidade da fibra de colágeno (CHAMPE e HARVEY, 1996).

Durante o estudo das propriedades físicas da molécula de colágeno envolvendo a formação das interações intermoleculares, existe a hipótese de uma modificação não-enzimática, através da reação de Maillard, produzindo compostos irreversíveis que impedem a auto-renovação do tecido colagenoso (AVERY e BAILEY, 2006).

A insolubilidade do colágeno ocorre pelas pontes cruzadas intermoleculares, gerando grande força de tensão, comprometendo a maciez da carne (CANHOS e DIAS, 1985).

No período *post-mortem*, há a ação de proteases lisossomais que modificam o tecido conectivo. Estas proteases são enzimas, as catepsinas, que degradam o colágeno na maturação (LAWRIE, 1977).

2.2.1 Síntese e formação das fibrilas de colágeno

O processo para a síntese do colágeno é complexo e acontece no retículo endoplasmático, no aparelho de Golgi e por fim, no espaço extracelular. A cadeia polipeptídica inicial é denominada pré-colágeno, que sofre mudanças pós-transducional, gerando o pró-colágeno. Essas mudanças são parecidas aos de outras proteínas. O ácido desboxiribonucleico (DNA) do núcleo dos fibroblastos que codifica o colágeno traduz para o

formulário de pré-RNA, que recebe processamento em excesso antes do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) maduro estar apto para sintetizar as proteínas (CHAMPE e HARVEY, 1996).

O mRNA sintetizado tem o código capaz de utilizar em toda a cadeia de um polipeptídeo pró-colágeno. Em seguida, o mRNA é levado para o citoplasma e, assim, pró-cadeias de colágeno são sintetizadas em ribossomos ligados à membrana. As cadeias formadas são introduzidas no retículo endoplasmático rugoso, lugar que as moléculas de pró-colágeno são organizadas. Algumas mudanças pós-transducional ainda são realizadas, como a hidroxilação, a oxidação, a condensação aldólica, redução e glicosilação. Um importante cofator é a vitamina C. Ela atua nas hidroxilases da prolina e lisina, sendo que a redução dessa vitamina no organismo é capaz de produzir deficiências na síntese do colágeno. Assim que o pró-colágeno é sintetizado, o colágeno é transportado para o meio extracelular, onde acontece a modificação para tropocolágeno. Essa molécula possui aproximadamente 1000 aminoácidos e tem a forma de tripla hélice. Ela contém 3 cadeias polipeptídicas, que se entrelaçam formando uma α -hélice, com giro para a direita e unidas por ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas (ABERLE et al., 2001; VELLEMAN, 1999). Cada volta completa da hélice possui 8,6 nm de comprimento (ABERLE et al., 2001).

A seguir, a Figura 4 traz uma ilustração diagramática da estrutura molecular do colágeno, tropocolágeno e a sequência de aminoácidos.

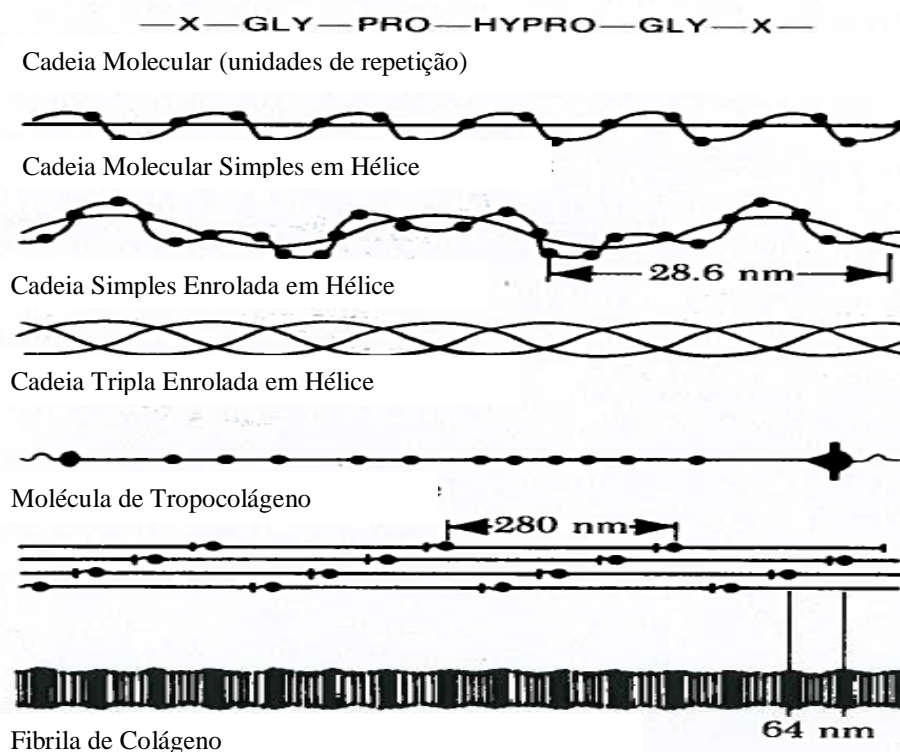


Figura 4. Formação da fibrila de colágeno.
Fonte: Judge et al. (1989).

O tropocolágeno é transportado pelos fibroblastos para o meio extracelular e tem 280 nm de comprimento e 1,5 nm de espessura. É possível a incorporação de unidades

microfibrilares e também fibrilares de maior diâmetro, caracterizando a formação da estrutura quaternária das fibras de colágeno do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Para a formação das fibrilas de colágeno, as moléculas de tropocolágeno têm sua configuração superposta uma em relação à outra, havendo o deslocamento de 25% de seu comprimento. Com isso, as moléculas de tropocolágeno deixam as fibrilas com aparência estriada, bandas de colágeno, visualizadas pelo microscópio eletrônico em intervalo de 700 Å. Com a microscopia eletrônica, é possível observar as fibrilas, cujo diâmetro está entre 0,5 e 5,0 µm de diâmetro, se estender de 6 a 7 vezes o diâmetro em ácido fraco. A massa molecular do colágeno varia de 5×10^4 a 1×10^5 Da (ROSE, 1987; SGARBIERI, 1996).

2.2.2 Tipos de colágeno

O colágeno pode ser dividido em classes de acordo com a função e tamanho da molécula, sendo fibrilar, fibrilar-associado, formador de rede, filamentosos, de cadeia curta ou longa (VAN der REST e GARRONE, 1991).

Existem 19 tipos diferentes de fibras de colágeno, classificadas conforme sua estrutura: fibrosa, não-fibrosa ou filamentosas. Os tipos I, III, IV, V, VI, XII, e XIV foram identificados no tecido conjuntivo (LISTRAT et al., 2000).

Geralmente, os tipos I e III são predominantes no endomísio, perimísio e epimísio. O tipo I se localiza principalmente nas membranas do epimísio e perimísio, enquanto o tipo III se encontra em maior quantidade no perimísio e em menor no endomísio (BAYLEY e SIMS, 1977; LISTRAT et al., 2000). O colágeno do tipo IV é o principal composto encontrado na membrana basal que une a camada reticular do endomísio ao sarcolema, que é a membrana das células musculares (LISTRAT et al., 2000).

O colágeno do tipo I é formado por três cadeias, sendo duas levógiras (α_1) que se envolvem em uma dextrogira (α_2), gerando a estrutura de α -hélice, que se mantém, principalmente, por ligações de hidrogênio. As ligações intermoleculares de sulfeto são situadas nas extremidades globulares das cadeias polipeptídicas e estabilizam a estrutura das fibrilas colagenosas. Há também ligações covalentes entre grupos aldeídos e aminoácidos livres entre as cadeias α (NEKLYUDOV, 2003).

Os tecidos conjuntivos que influenciam na maciez da carne são dos tipos I e III, que podem ser modificados pelo calor, sendo que o do tipo III é menos solúvel que o do tipo I (BURSON e HUNT, 1986; LUCHIARI FILHO, 2001). Existe correlação entre a quantidade de colágeno e a idade. O colágeno do tipo III, em relação ao tipo I, reduz com o aumento da idade. Além disso, em virtude de deficiência nutricional, é possível ter a expressão gênica reduzida (BYRNE et al., 2005).

2.2.3 Aminoácidos do colágeno

O colágeno possui uma composição bastante característica, pois quase 33% dos resíduos são formados por glicina e entre 15 a 30% são prolina e 4-hidroxiprolina. Fazem parte do colágeno resíduos de 3-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina (VOET et al., 2008).

A molécula de colágeno possui maior conteúdo ácido, básico e com aminoácido hidroxilado que em resíduos lipofílicos. Ainda, a estrutura secundária do colágeno não beneficia a organização de cadeias α -hélice causados por muitos resíduos prolil e hidroxiprolil. Logo, o colágeno pode ser determinado como uma proteína hidrofílica (CHAMPE e HARVEY, 1996).

O teor de aminoácidos que não são característicos do colágeno deve-se às restrições estruturais da hélice do colágeno (NELSON e COX, 2006). A glicina é um aminoácido que existe numa sequência de três posições na cadeia polipeptídica. A glicina possui a capacidade de se adaptar ao pequeno espaço, justamente onde as três hélices estão mais próximas. Faz parte da sequência os resíduos de glicina –Gly-X-Y-, onde, geralmente, X é prolina e Y é hidroxiprolina ou hidroxilisina. Desse modo, grande parte da cadeia alfa é composta na forma de politripeptídeo (CAMPBELL e FARRELL, 2006).

O aminoácido prolina, que possui uma estrutura cíclica, favorece a organização da estrutura helicoidal em cada uma das cadeias alfa pelas torções na cadeia polipeptídica (NELSON e COX, 2006).

As hidroxilases, prolil-hidroxilase e lisil hidroxilase são responsáveis pela síntese dos aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente (NELSON e COX, 2006). Para que essas sínteses ocorram é necessário oxigênio molecular e um agente redutor como o ácido ascórbico, conhecido como Vitamina C. A hidroxila dos resíduos de hidroxilisina existentes no colágeno pode ser glicosada. Em geral, a glicose e a galactose reagem, formando parte da cadeia polipeptídica antes da formação da tripla hélice (CHAMPE e HARVEY, 1996).

A hidroxiprolina possui uma hidroxila onde originalmente havia um hidrogênio no anel de pirrolidina (BERG et al., 2008). Sua importância se dá pela estabilização da estrutura em tripla hélice do colágeno. Quanto aos outros aminoácidos essenciais, metionina, tirosina e histidina participam em menor proporção. Enquanto que a cistina e triptofano geralmente, não estão presentes (CHAMPE e HARVEY, 1996).

A hidroxiprolina é um aminoácido considerado incomum em outras proteínas, de conforme anteriormente discutido, contudo é constante no colágeno (ABERLE et al., 2001; WARRIS, 2000). Por isso, a determinação de colágeno presente no músculo se dá pela quantificação da hidroxiprolina, que ainda é o melhor método (BERGMAN e LOXLEY, 1963; EGELANDSDAL et al., 2005; PARDI et al., 2007).

Neuman e Logan (1950) pesquisaram um método de quantificação de hidroxiprolina. Se baseia na oxidação de pyrrolo-2-carboxílico, formação de coloração e em seguida, adição do reagente vermelho Erlinch. Outros métodos têm sido estudados a fim de se obter menor influência dos outros aminoácidos e manter a repetibilidade dos resultados. O método de Woessner Junior (1961) conseguiu recuperar uma parte de hidroxiprolina e 4000 partes de outros aminoácidos. Bergman e Loxley (1963) adaptaram e aperfeiçoaram o método anterior, apresentando maior estabilidade e sensibilidade.

Gaspar (2003) utilizou o método recomendado pela AOAC, com a digestão, leitura e quantificação da hidroxiprolina por espectrofotômetro. Abreu et al. (2008) realizaram a quantificação de hidroxiprolina por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

Os aminoácidos essenciais, como metionina, tirosina, histidina e cistina, estão em quantidades menores no colágeno, e há ausência do aminoácido triptofano (WOESSNER JUNIOR, 1961; SGARBIERI, 1996).

A composição de aminoácidos da molécula de colágeno, representada na Tabela 1, é constituída por cerca de 60% de resíduos hidrofóbicos e 40% de resíduos hidrofílicos, indicando caráter anfótero e uma capacidade emulsificante à proteína (BAILEY e LIGHT, 1989). Os aminoácidos considerados não-essenciais (glicina, prolina, hidroxiprolina, arginina e alanina) representam 2/3 dos resíduos e os aminoácidos essenciais, quando presentes, estão em pequena quantidade (ASGHAR e HENRICKSON, 1982).

Tabela 1. Composição de aminoácidos (g/100g de proteína) da fibra de colágeno.

Aminoácidos	% (g/g)
Cisteína	0,2 ± 0,0
Ácido Aspártico	5,6 ± 0,5
Ácido Glutâmico	11,9 ± 0,1
Arginina	8,7 ± 0,5
Lisina	3,6 ± 0,2
Histidina	0,7 ± 0,1
Treonina	1,9 ± 0,1
Serina	3,0 ± 0,1
Prolina e Hidroxiprolina	13,0 ± 0,3
Alanina	9,3 ± 0,1
Glicina	29,7 ± 0,5
Leucina	3,1 ± 0,0
Valina	2,5 ± 0,0
Metionina	0,6 ± 0,0
Isoleucina	1,6 ± 0,0
Fenilalanina	2,3 ± 0,0
Tirosina	0,5 ± 0,0

Fonte: (Wolf et al., 2009)

Embora o colágeno apresente valor nutricional reduzido pelo baixo teor de aminoácidos essenciais, tais aminoácidos podem ser incluídos para suplementar a dieta humana ou animal. Por outro lado, a fibra de colágeno tem a propriedade de facilitar a digestão, regular a absorção de nutrientes no intestino humano e eliminar substâncias tóxicas (NEKLYUDOV, 2003).

A substituição da carne gorda ou magra em embutidos suínos ou bovinos até o nível de 20% de colágeno não prejudica as propriedades funcionais do produto final e os requerimentos nutricionais da dieta (RAO e HENRICKSON, 1983).

2.2.4. Maciez

Existe uma forte associação entre o tecido conjuntivo e a maciez da carne, e também a relação da quantidade de colágeno e tal atributo. O primeiro relato nesse sentido foi realizado por Lehman (1907), e entre 1940 a 1970 surgiram muitas pesquisas a fim de compreender melhor as estruturas da carne e do colágeno, de modo a se obter uma carne com maior maciez (BAILEY e LIGHT, 1989).

Muitos estudos foram realizados para elucidar o mecanismo de amaciamento da carne elucidando uma combinação de fatores determinantes dessa característica de qualidade. Dentre os fatores estão: a produção (idade, sexo, raça, alimentação, etc.), características sensoriais (cor, textura, sabor) e propriedades biológicas (colágeno, fibras, lipídeos, enzimas, etc) pertencentes ao tecido muscular (RENAND et al., 2001).

A Figura 5 expõe a representação esquemática das mudanças no tecido conectivo intramuscular durante o envelhecimento “*post mortem*”. No músculo imediatamente após o abate, proteoglicanos (PG’s) unem as fibrilas de colágeno e estabilizam o tecido intramuscular conectivo. Durante o envelhecimento “*post mortem*”, PG’s são degradados e a ligação entre as

fibrilas de colágeno são enfraquecidas. Esta mudança estrutural no tecido intramuscular conectivo contribui para o amaciamento da carne maturada.

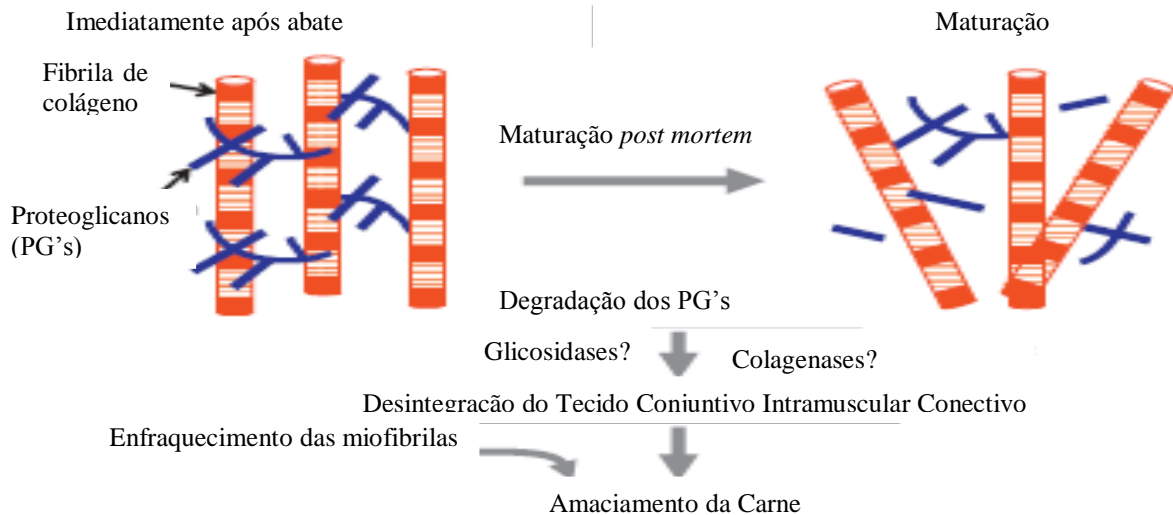


Figura 5. Modificações no tecido intramuscular conectivo durante a maturação.
 Fonte: Nishimura (2010).

Apesar de existir relação entre a quantidade de colágeno total e a maciez da carne (DRANSFIELD, 1977; TORRESCANO et al., 2003), há uma variação pequena na quantidade de colágeno total durante o crescimento do animal (BAILEY e LIGHT, 1989). A textura da carne não pode ser atribuída unicamente à quantidade de colágeno presente. O fator que influencia a textura é sobretudo a forma de colágeno existente no músculo (VAN der REST e GARRONE, 1991), sendo a maciez da carne principalmente determinada pelo teor de colágeno insolúvel (RILEY et al., 2007).

As diferenças nas características do colágeno foram causadas pelo conteúdo de colágeno total e pela maturidade fisiológica de novilhos das raças bovinas Hereford, Friesian, Aberdeen Angus e Charolês. Nesse estudo, os valores de colágeno total dos músculos do dianteiro foram maiores que os do traseiro, apesar de não existir diferenças genéticas. Contudo, a pesquisa descreve que possa haver diferenças entre as raças com relação às propriedades do tecido conjuntivo, como o tamanho da fibra de colágeno, as ligações cruzadas, o tipo de distribuição do colágeno e distinções nos componentes não colagenosos (BAILEY e LIGHT, 1989).

Boutten et al. (2000) relataram que as variações na maciez é dependente da idade dos animais. Desse modo, animais mais novos têm a carne mais macia, ainda que o teor de colágeno no músculo pouco se modifique com a idade.

Diversas pesquisas afirmaram que o fato de carnes serem menos macias em animais mais velhos é causado pela mudança na estrutura química do colágeno intramuscular em decorrência da idade, principalmente em suas ligações cruzadas covalentes que estabilizam as fibras de colágeno, e não pelo aumento da quantidade de tecido conjuntivo (BAILEY, 1972; BAILEY e SIMS, 1977; BAILEY et al., 1979; BAILEY, 1985; BAILEY e LIGHT, 1989; TARRANT, 2001).

Com relação à solubilidade do colágeno, há um decréscimo com o aumento de peso e o avançar da idade do animal. Entretanto, valores distintos de solubilidade do colágeno podem

ser oriundos do modo como se deu o crescimento do animal. Assim, os animais alimentados por dietas ricas em energia no pré-abate têm uma alta síntese proteica, ou seja, produzem grande volume de colágeno, que é mais termolábil por ser recentemente sintetizado (ABERLE et al., 1981).

Em outro estudo, vacas adultas que foram alimentadas por dieta rica em energia, obtiveram carne com maior proporção de colágeno solúvel (MILLER et al., 1987 apud SUZUKI et al., 2006). Já Boleman et al. (1996) também pesquisaram a alimentação de vacas adultas, porém alimentadas em diferentes períodos com dieta rica em energia e proteína, constatando que a solubilidade do colágeno aumentou e houve redução na força de cisalhamento com o tempo de alimentação. Contudo, em acompanhamento sensorial realizado, não foi encontrada diferença significativa na maciez da carne (BOLEMAN et al., 1996).

Conforme relatado pela Figura 6, há mudanças nas ligações de *cross-linking* ou ligações cruzadas durante o tempo. Há formação de ligações cruzadas durante o envelhecimento do animal, ou seja, o animal possui uma quantidade maior de ligações cruzadas em sua maturidade fisiológica, sendo este um fator importante para a qualidade da carne.

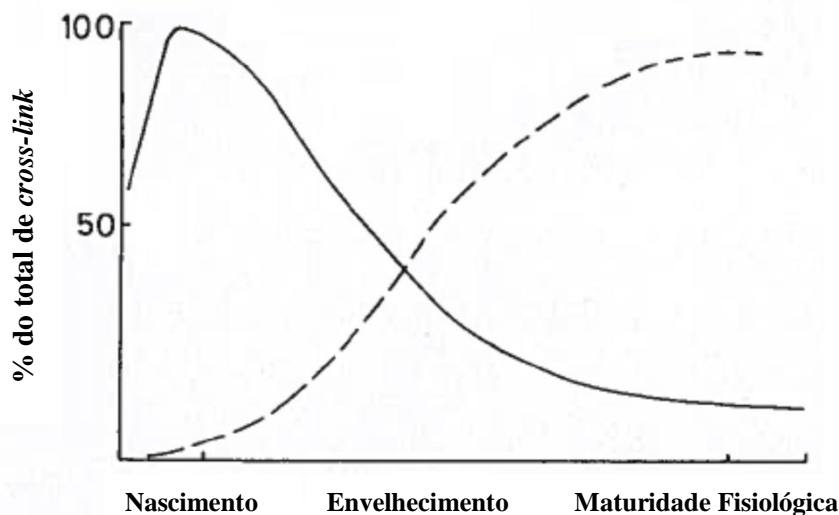


Figura 6. Porcentagens de ligações cruzadas conforme a maturidade fisiológica.

—: redução de *cross-links*; - - -: formação de *cross-links* maduros

Fonte: Adaptado de Bailey e Light (1989).

A maciez da carne depende da quantidade e solubilidade do colágeno no músculo, sofrendo influência do aquecimento (LISTRAT e HOCQUETTE, 2004). A estabilidade térmica do colágeno é associada às ligações cruzadas estáveis de suas fibras notadas principalmente em animais mais velhos (HILL, 1966). O colágeno se desprende da carne quando submetido ao aquecimento. Não somente o teor de colágeno solúvel é reduzido, mas também sua solubilidade, conforme o envelhecimento do animal (GOLL et al., 1964).

Quando o colágeno é aquecido, há o rompimento das ligações de hidrogênio, provocando o encolhimento das fibras de colágeno que é seguido por solubilização e gelatinização (AKTAS, 2003).

Em pesquisa realizada com bovinos em diferentes idades foram encontrados baixos valores de correlação e não significantes entre maturidade e solubilidade de colágeno. Assim, a porcentagem de colágeno solúvel não determina, com efetividade, a maciez dentro de uma classificação de maturidade (HERRING et al., 1967).

Todavia, um estudo recente avaliou a influência da maturidade sobre as características da carcaça e qualidade da carne de touros Nelore, tendo sido verificada uma correlação negativa entre a força de cisalhamento e a solubilidade de colágeno (DUARTE et al.).

Em animais jovens, entre 8 e 9 semanas, a solubilidade observada na carne foi de 22% de colágeno intramuscular. Aos 10 meses, houve decréscimo para 12% de solubilidade de colágeno e, em vacas adultas, existe somente 4% de colágeno solúvel (WOESSNER JUNIOR, 1961). Já em animais mais velhos, a carne é menos macia, pois há modificação na estrutura química do colágeno intramuscular, estabilizando as ligações cruzadas covalentes (TARRANT, 2001).

As carnes macias estão relacionadas à menor espessura do perimísio em músculo com grande quantidade de tecido conjuntivo intramuscular (FAUSTO, 2011).

A maturação mantém a carne em temperaturas acima do seu ponto de congelamento, aproximadamente 2°C, por um período de estocagem, com o intuito de melhorar a maciez (FELÍCIO, ALLEN e CORTE, 1982). Esse período se relaciona com a quantidade de calpaínas que existem em 24 horas post mortem, cujas alterações se dão conforme a concentração inicial e inativação durante o rigor mortis (DRANSFIELD, 1977).

A maturação da carne ocorre por meio de enzimas proteolíticas. Não foram encontrados estudos que degradaram o colágeno de bovinos durante a maturação (TORNBERG, 1996). Entretanto, em estudo com músculo bovino, houve a degradação de proteoglicanas da matriz extracelular, que deixariam o tecido conjuntivo intramuscular mais fraco (NISHIMURA et al., 1996). Por outro lado, há teorias contrárias ao estudo de Tornberg (1996), em que haveria modificações no tecido conjuntivo devido à ação de catepsinas, proteases lisossomais, que agem degradando o colágeno durante a maturação (DUTSON, 1983; LAWRIE, 1977). Ainda, em outro estudo, as catepsinas B, L, N e S seriam aptas a quebrar o colágeno nativo insolúvel em frações solúveis (BAILEY e ETHERINGTON, 1980). Entretanto, a inativação das catepsinas por inibidores específicos não interfere na maturação da carne (UYTTERHAEGEN et al., 1994). Já o estudo de Li et al. (2008) concluiu que modificações miofibrilares e o aumento na solubilidade do colágeno intramuscular ocorreram durante a maturação.

2.3 Alta Pressão Hidrostática (APH)

O consumidor vem cada vez mais exigindo produtos de qualidade em relação aos alimentos frescos e, por isso, têm-se desenvolvido tecnologias menos drásticas aos métodos tradicionais de conservação. A alta pressão hidrostática é uma tecnologia que alia as expectativas dos consumidores às exigências do mercado e da legislação. O processo ocorre submetendo-se os alimentos à pressões que variam de 100-1000 MPa (DONSÌ et al., 2007; SIKES et al., 2010).

O processamento à alta pressão hidrostática possui diversas vantagens. Pode promover o aumento da vida útil dos produtos, que é um fator importante para a indústria de alimentos. É considerada uma tecnologia limpa, já que não produz resíduos prejudiciais ao meio ambiente e possui baixa demanda energética, aumentando a segurança dos alimentos pela inativação de microrganismos (TÉLLEZ-LUIS et al., 2001; TORRES e VELÁSQUEZ, 2005; AERTSEN et al., 2009; YORDANOV e ANGELOVA, 2010; RENDUELES et al., 2011). Além disso, a tecnologia de alta pressão hidrostática é capaz de inativar enzimas, preservando

vitaminas, aminoácidos e outras moléculas de baixo peso molecular desejáveis que não são afetadas. Assim, as características nutricionais e sensoriais são preservadas, mantendo-se intactos a cor, sabor e funcionalidade do alimento (PATTERSON, 2005; RENDUELES et al., 2011).

Em pesquisa realizada avaliando-se a importância de diversos produtos e fatores de marketing sobre o interesse dos consumidores de alimentos processados por novas tecnologias, mostrou-se por diversas análises que a tecnologia de alta pressão hidrostática apresenta maior destaque que outras tecnologias não-térmicas (GARRIGA e AYMERICH, 2009).

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores mundiais de alimentos, sendo assim é de grande importância garantir a segurança alimentar, produzindo alimentos seguros, mantendo a qualidade e sustentabilidade ambiental (GUIMARÃES, 2011). Desse modo, são necessários estudos sobre a viabilidade da utilização dessa tecnologia no Brasil, diversificando o mercado com produtos inovadores.

2.3.1 Histórico

O processo à alta pressão para a conservação de alimentos, também conhecido como Pascalização, teve início em 1884, porém o aprofundamento em pesquisa sobre a tecnologia foi iniciado em 1899 por Bert Hite. Como finalidade era aumentar o período de conservação do leite, foi realizado um processamento de 670 MPa durante uma hora em temperatura ambiente. O experimento obteve sucesso com a redução da carga microbiana e, conseqüentemente, aumento da vida útil (HOOVER et al., 1989; TÉLLEZ-LUÍZ et al., 2001; JAY et al., 2005; PATTERSON, 2005).

As indústrias demonstraram interesse novamente pela tecnologia de alta pressão em 1914, quando Hite provou que o processamento em frutas era eficiente, uma vez que reduzia o número de microrganismos responsáveis pela deterioração, aumentando assim a conservação dos produtos. Na época, os vegetais não tiveram o mesmo sucesso, pois havia a dificuldade de eliminar os microrganismos esporulados, que são mais resistentes ao processamento por alta pressão (JAY et al., 2005; PATTERSON, 2005). As bactérias esporuladas podem ser inativadas a pressões a partir de 600 MPa, conforme a resistência específica ao processo, entretanto o processamento não foi muito difundido pelo alto custo com equipamentos (EARNSHAW et al., 1995). Assim sendo, as indústrias se interessaram por outra tecnologia de preservação, a pasteurização, que apresentava um custo menor (GARRIGA et al., 2004).

Em 1992, a comercialização, em escala industrial, dos primeiros alimentos pressurizados ocorreu no Japão. Inicialmente, foram os sucos de frutas e geleias que obtiveram sucesso. Atualmente, as empresas que utilizam a tecnologia operam em vários países e os produtos estão cada vez mais diversificados, como produtos à base de frutas, lácteos, carnes e produtos cárneos, peixes e frutos do mar (MURCHIE et al., 2005).

Em todo o mundo, a comercialização de produtos submetidos às altas pressões está crescendo exponencialmente. Desde o ano 2000, considera-se que mais de 80% dos equipamentos de pressurização foram instalados nas indústrias alimentícias. Com aproximadamente 100 empresas processadoras de alimentos pressurizados, em 2008, a produção mundial era superior a 200 mil toneladas de alimentos por ano (BALASUBRAMANIAM et al., 2008; JOFRÉ et al., 2010). Em 2009, a produção mundial foi de 250 mil toneladas de alimentos por ano, sendo que a produção de produtos cárneos foi de 90315 toneladas por ano (JUNG et al., 2011).

As indústrias de alimentos que utilizam a tecnologia de alta pressão concentram-se nos Estados Unidos da América, Canadá e México, com aproximadamente 55%, já que há uma

grande aceitação de produtos não-térmicos pelos consumidores. Cerca de 25% das indústrias estão na Europa, com destaque para a Espanha, 15% distribuídos entre Japão, Coreia do Sul e China e 5% na Austrália e Nova Zelândia (JUNG et al., 2011).

A maioria dos produtos pressurizados encontra-se destinados aos setores da hortifruticultura (49%) e em derivados cárneos (31%), conforme mostra a Figura 7:

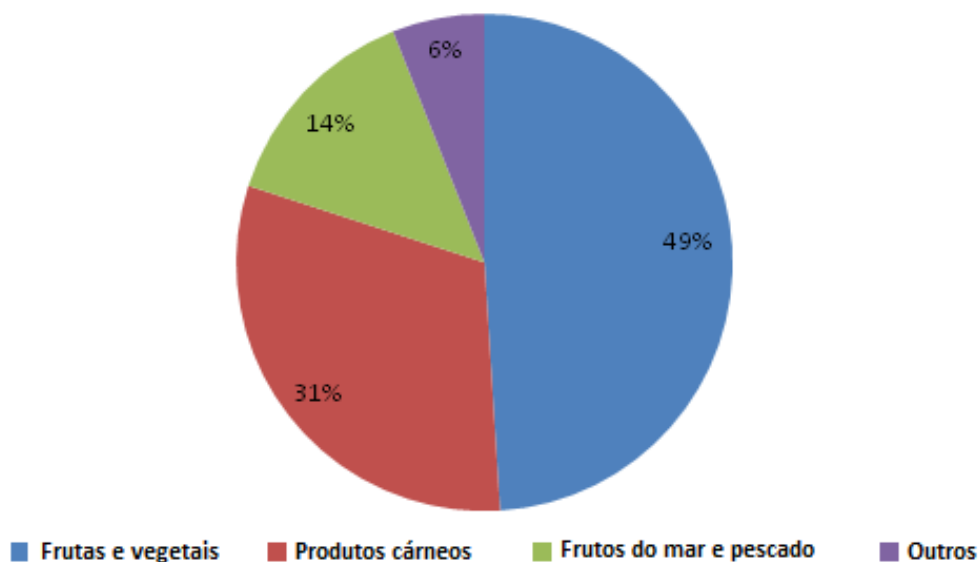


Figura 7. Comercialização de alimentos pressurizados de acordo com os setores da indústria alimentícia.

Fonte: Jung et al. (2011).

Na atualidade, nenhuma empresa do Brasil ainda possui o equipamento para a comercialização de produtos pressurizados. Apesar de apresentar elevado custo inicial de equipamento, essa tecnologia é muito vantajosa porque é econômica e tecnicamente viável. Há um gasto mínimo com energia e os custos operacionais vão reduzindo com a automação do processo, além de ser uma tecnologia limpa, já que não gera subprodutos (PATTERSON et al., 2006; AYMERICH et al., 2008; NORTON e SUN, 2008; GARRIGA e AYMERICH, 2009; ZHOU et al., 2010; FARKAS, 2011).

2.3.2 Princípios do processamento

A tecnologia da APH fundamenta-se em dois princípios: o de Le Chatelier e o Princípio Isostático. Conforme o Princípio de Le Chatelier, os processos em que há redução de volume, como mudanças na conformação da molécula, reações e reatividade química são favorecidos pelo aumento da pressão. Contudo, os processos que incluem aumento de volume são dificultados pela pressurização. Assim, quando ocorre a pressurização, em um sistema em equilíbrio, o deslocamento da reação acontece no sentido da redução de volume, minimizando o efeito da pressão. Desse modo, a pressurização beneficia qualquer processo que seja seguido de redução de volume e vice-versa (EARNSHAW et al., 1995; CHEFTEL e CULIOLI., 1997; SMELT, 1998; PATTERSON, 2005; HERRERO et al., 2006; PATTERSON et al., 2006; AYMERICH et al., 2008). Nesse sentido, a temperatura é considerada como acarretando

efeito inversamente proporcional à pressão, visto que com o aumento da temperatura, há o aumento do volume (SMELT, 1998).

O Princípio Isostático é baseado na Lei de Pascal, também conhecido como Lei de Arrhenius, e ocorre quando a pressão é transmitida homoganeamente e quase instantaneamente por todo o alimento. Assim, a pressão no alimento não depende do tamanho, da forma ou da composição do alimento, diferentemente do tratamento térmico. A pressurização pode ser aplicada diretamente a alimentos líquidos ou qualquer alimento embalado e submerso em um fluido de pressurização, de baixa compressibilidade (CHEFTEL, 1995; CAMPOS, 2004).

2.3.3 Vantagens da tecnologia

O tratamento de alta pressão evita a deformação dos alimentos, fundamentado por um dos princípios da tecnologia, o isostático, em que a pressão é transmitida de maneira uniforme e praticamente instantaneamente ao produto (CHEFTEL, 1995). Assim, a pressão exercida sobre o alimento não depende da forma ou tamanho, reduzindo gastos com outras operações (RASTOGI et al., 2007).

Os alimentos mantêm suas características nutricionais e sensoriais, principalmente relacionadas a compostos termolábeis, já que o processamento não utiliza altas temperaturas como método de conservação. Assim, as vitaminas e compostos de baixo peso molecular que são responsáveis pelo aroma e sabor são conservados (CHEFTEL, 1995). Desse modo, é possível a conservação dos alimentos pressurizados à temperatura ambiente (RASTOGI et al., 2007).

Não há alteração do sabor natural nem a coloração de alguns alimentos, pois o processamento não favorece o escurecimento enzimático e a reação de Maillard (HAYASHI, 1989 apud TÉLLEZ-LUIS, 2001).

Não é preciso incorporar aditivos ao alimento, porque a APH é capaz de eliminar/inativar microrganismos, aumentando a validade comercial do produto. Além disso, melhora ou induz à aparição de propriedades funcionais nos alimentos. A alta pressão é uma tecnologia adequada às políticas de meio ambiente, já que é considerada uma tecnologia limpa, pois não produz resíduos. Ainda, o gasto energético é baixo, considerando que, para esquentar 1 litro de água a 30°C é necessário a mesma energia para pressurizar a 400 MPa o mesmo volume de água (TÉLLEZ-LUIS, 2001).

A alta pressão hidrostática é um método emergente para controlar a formação de aminas biogênicas. Estas são compostos nitrogenados de baixo peso molecular, com anel imidazólico e um grupo amino ligados por dois grupos metileno. Formam-se por processos bioquímicos, participam de importantes funções metabólicas e fisiológicas e encontram-se em alimentos de origem animal, vegetal e fermentados (HALÁSZ et al., 1994). O período de maturação é um fator importante, pois determina o grau de acumulação das aminas biogênicas. Comparando o tempo de maturação, a maturação rápida favorece um aumento das aminas biogênicas, pois os fenômenos proteolíticos da maturação aumentam a concentração dos aminoácidos precursores relacionados com a formação das aminas biogênicas (VIDAL-CAROU et al., 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada na separação e quantificação das aminas (ÖNAL, 2007).

2.3.4 Equipamentos

O sistema de pressurização abrange um vaso de pressão, um fluido transmissor da pressão e uma ou mais bombas para fornecer a pressão desejada (PATTERSON et al., 2006).

O equipamento de pressurização possui um recipiente em que é necessário fechar, chamado câmara de pressão, um sistema para gerar a pressão e um controle de operação, onde é possível determinar a temperatura, tempo e pressão. A câmara de pressão pode variar de acordo com a finalidade do processo. Em unidades laboratoriais, o volume varia de 100 mL a 2 L, enquanto as plantas pilotos têm variação de 10 L a 25 L. Já as indústrias, têm capacidade de até 687 L para produtos marinhos (HOOVER, 1993).

O fluido pressurizador tem a função de transferir a pressão ao alimento. É utilizado quando a amostra é embalada e deve possuir como características a baixa compressibilidade e o menor risco de contaminação ao alimento e, sendo assim, a água é o fluido mais utilizado. Outros compostos também podem ser utilizados conforme recomendação do fabricante: glicerol, álcool 70%, óleos comestíveis, agentes antimicrobianos e agentes anticorrosivos e emulsões de óleos comestíveis (CHEFTEL, 1995; FARKAS, 2011; MEYER et al., 2000 apud CABRAL NETO, 2011). A baixa compressibilidade dos fluidos pressurizadores, principalmente a água, torna o processamento por APH pouco perigoso (SANGRONIS et al., 1997 apud SLONGO 2008; HERRERO et al., 2006).

Na indústria de alimentos pressurizados, é possível que o produto receba tratamento à temperatura ambiente. Utilizam-se pressões que variam conforme o produto, atingindo até 600 MPa e por, no máximo, 20 minutos, de modo a viabilizar o processamento e conservar as propriedades nutritivas e sensoriais do produto original (GARRIGA et al., 2002).

O processamento da alta pressão hidrostática pode ser de forma contínua, descontínua ou em batelada. Fundamenta-se em aplicar pressões que podem variar de 100 a 800 MPa, em pulso único ou em vários pulsos, utilizando desde temperaturas negativas a superiores a 100°C (FDA, 2011). O equipamento para o tipo de processo, contínuo, semicontínuo ou descontínuo, possui algumas distinções. No sistema semicontínuo, é possível que existam várias câmaras trabalhando em sequência com a mesma bomba de pressão (HERRERO et al., 2006).

Os líquidos são processados em sistemas semicontínuos ou contínuos, em que não há necessidade da embalagem, e no qual o próprio alimento é o fluido pressurizador e a pressão é realizada diretamente no produto por meio de um pistão móvel, usado para aumentar a compressão. O alimento é embalado assepticamente somente após o processamento (HERRERO et al., 2006; CHAWLA et al., 2011).

A Figura 8 apresenta o equipamento de alta pressão hidrostática com todos os componentes e controles para a pressurização descontínua de amostras embaladas.

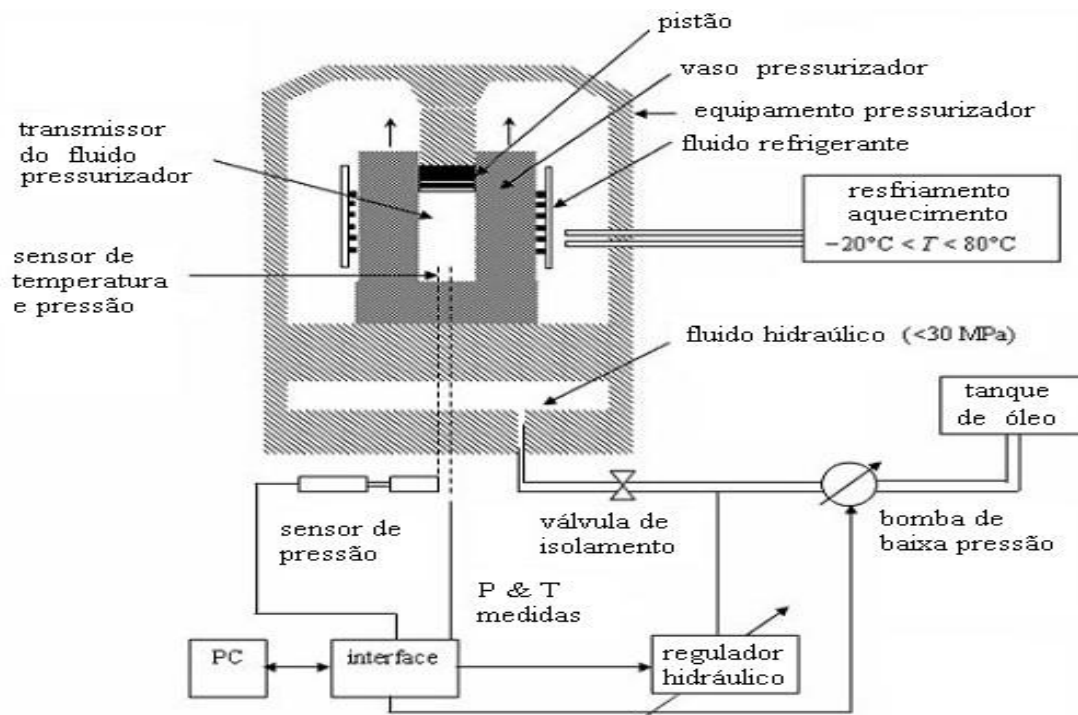


Figura 8. Equipamento de alta pressão hidrostática.
Fonte: Buzrul et al. (2007).

Estudos comprovam que diferentes equipamentos e meios de pressurização são capazes de alterar a microbiota dos alimentos e, posteriormente, o desenvolvimento de microrganismos durante o armazenamento. Portanto, é de fundamental importância estabelecer protocolos de validação da eficácia do tratamento, antes do processamento dos alimentos, a fim de garantir alimentos seguros (HUGAS et al., 2002).

2.3.5 Descrição do processamento

A pressurização faz com que o alimento tenha seu volume reduzido em 15% e de modo homogêneo quando ocorre a despressurização. Assim, é necessário que as embalagens resistam à grande diferença de pressão, sem perder a integridade do material. Os materiais mais usados são stomacher bags, tubos estéreis e de polietileno e embalagens de polietileno (FARKAS, 2011). Desse modo, a tecnologia de alta pressão não seria viável se não existisse embalagens que aumentam a durabilidade dos alimentos, resistindo às compressões e descompressões a altas pressões e mantendo a selagem (MIN e ZHANG, 2007; NORTON e SUN, 2008).

A câmara de pressurização é inicialmente carregada com os produtos que serão pressurizados e é, em seguida, fechada. Posteriormente, o sistema de bomba substitui o ar da câmara pelo fluido de pressurização enchendo-a completamente, aplicando-se a pressão até o nível desejado. Assim sendo, o fluido sofre essa pressão e faz com que o alimento seja comprimido, reduzindo seu volume (SANGRONIS et al., 1997).

Assim que a pressão desejada é atingida, uma válvula fecha o circuito que permite a manutenção da pressão sobre o alimento, sem a necessidade de maior gasto energético. As propriedades físico-químicas da água, que é o fluido pressurizador mais utilizado, são diferentes à temperatura ambiente. O volume de água diminui 4%, 12% e 15% conforme a

pressurização a 100 MPa, 400 MPa e 600 MPa, respectivamente (CHEFTEL e CULIOLI, 1997).

Após o tempo determinado, o processo de pressurização termina e a câmara é descomprimida pela abertura da válvula, permitindo que o fluido pressurizador se expanda e a pressão permaneça igual à atmosférica. A partir de então, o alimento pode seguir para outras etapas de fabricação e o equipamento pode ser novamente carregado com novo lote para iniciar outro ciclo de pressurização (SANGRONIS et al., 1997 apud SLONGO, 2009; CHAWLA et al., 2011).

As variáveis típicas para a pressurização são: pressão, temperatura e tempo. O tempo de processamento é dividido em 3 partes: o tempo para compressão, o tempo de processamento e o tempo de descompressão. O tempo para a compressão é necessário para a amostra atingir a pressão estabelecida. É determinado pela taxa de compressão, pela pressão transmitida pelo fluido, pela potência da bomba e pela pressão almejada. O tempo de processamento é aquele em que a pressão permanece constante no nível determinado desde a compressão até a descompressão. E o tempo de descompressão é aquele que deixa a amostra com pressão mais próxima da pressão atmosférica (BALASUBRAMANIAM et al., 2004)

Os efeitos causados pela pressurização podem ser benéficos dependendo dos parâmetros escolhidos e da formulação do produto (RASTOGI et al., 2007).

A Figura 9 mostra o gráfico das variáveis no processamento por APH e os tempos de compressão para alcançar a pressão almejada, tempo de retenção e tempo de descompressão.

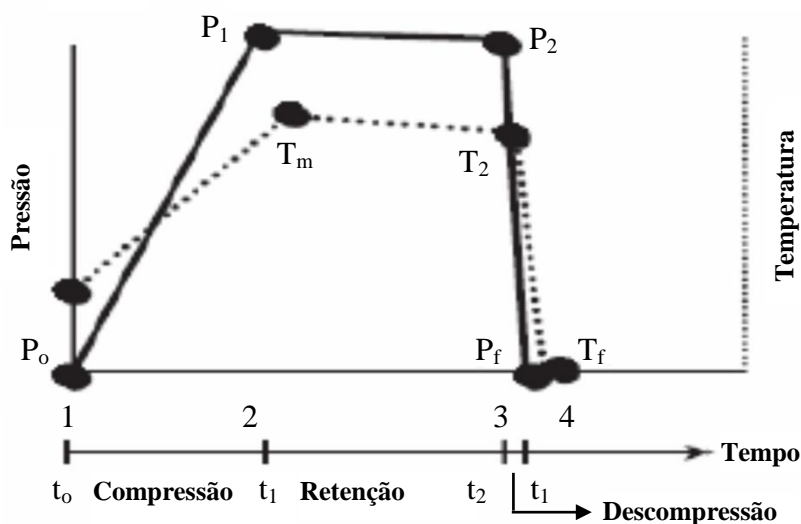


Figura 9. Gráfico das variáveis: tempo, temperatura e pressão no processamento de APH. Ps= pressão ambiente; Pf = pressão final; Tm= temperatura máxima do processo; Ts= temperatura antes da pressurização; Tf= temperatura final da pressurização. Fonte: Adaptado de Balasubramaniam et al. (2004).

Para o processamento de alimentos em alta pressão existem dois tipos de processos que têm sido pesquisados: o hidrostático, que pode ser descontínuo, em batelada, ou semicontínuo; e o processo de Homogeneização à Alta Pressão (HAP). A homogeneização com baixos níveis de pressão, cerca de 20MPa, é utilizada pela indústria de laticínios. Entretanto, a aplicação de pressões de até 350MPa foi possível devido ao desenvolvimento

tecnológico, proporcionando o desenvolvimento de novos produtos (SANDRA e DALGLEISH, 2005).

No processo descontínuo ou em batelada, o alimento é embalado e pressurizado na câmara de pressão, que possui um líquido para transferir a pressão ao alimento (CAMPOS, 2004), conforme anteriormente descrito, sendo a base do processo mais usualmente empregado. No processo semicontínuo, é realizado um arranjo de três ou mais recipientes resistente a altas pressões em série (FDA, 2011).

A utilização de pulsos na pressurização hidrostática é menor em comparação com o uso de pulso único. Geralmente, o alimento pressurizado recebe o tratamento de pulso único e prolongado. Os múltiplos pulsos em um processamento atuam como uma série de ciclos de pressurização, fazendo com que o alimento receba o tratamento de pressão, despressurização e pressurização diversas vezes (FARKAS, 2011).

Apesar do processamento por múltiplos pulsos ser mais eficiente na inativação de microrganismos, devido às modificações na membrana celular pela grande e rápida diferença de pressão, não é utilizado pelo aumento no custo e pelo maior desgaste do equipamento, uma vez que são necessários repetidos ciclos de pressão (CHEFTEL, 1995; DONSI et al., 2007).

Durante o processamento, a energia gerada dentro da câmara de pressão resulta em moderada e temporária geração de calor, que é o aquecimento adiabático. Ao final do processamento de pressurização, a câmara é despressurizada, caindo a pressão rapidamente e dissipando o aquecimento adiabático (ANSTINI, 2003).

O efeito termodinâmico do processamento não pode ser evitado. Assim, todas as substâncias compressíveis terão sua temperatura modificada de acordo com a pressão. A temperatura não se altera muito, mesmo em pressões elevadas. A água, que possui baixa compressibilidade, aumenta 3°C a cada 100 MPa. Como alguns alimentos possuem grande quantidade de água em sua composição, pode-se dizer que a compressão do alimento tem comportamento adiabático similar ao da água (TING et al., 2002).

O aquecimento adiabático ocorre devido à pressurização e a magnitude da temperatura no produto, sendo definido pelo aumento da temperatura inicial e pelo material do produto. O aumento da temperatura não é conhecido, pois o aquecimento adiabático é função da pressão e da temperatura. A Tabela 2 mostra a mudança da temperatura para alguns alimentos.

Tabela 2. Mudança de temperatura pela compressão adiabática em alguns alimentos.

Alimento a 25°C	Mudança de temperatura por 100 MPa (°C)
Água	~3,0
Purê de batata	~3,0
Suco de laranja	~3,0
Salsa	~3,0
Leite (2% de gordura)	~3,0
Salmão	~3,2
Frango	~4,5
Carne	~6,3
Óleo de oliva	De 8,7 a <6,3 ^a
Óleo de soja	De 9,1 a <6,2 ^a

^a Alimentos que apresentaram diminuição da temperatura com o aumento de pressão.

Fonte: TING et al., 2002.

O processamento à alta pressão é capaz de fornecer alimentos seguros, nutritivos, com o frescor dos alimentos naturais e alimentos inovadores. Os progressos no projeto do equipamento melhoraram o acesso aos dispositivos de alta pressão. Os equipamentos são feitos em aço inoxidável e de fácil limpeza, são seguros e automatizados (TONELLO, 2011).

Por isso, o uso da tecnologia de alta pressão em alimentos teve um grande aumento ao longo de 10 anos. Dentre os mais diversificados tipos de produtos pressurizados, a carne e os produtos cárneos tiveram um grande aumento em todo o mundo (GARRIGA e AYMERICH, 2009).

Geralmente, os produtos processados por alta pressão são utilizados para garantir a segurança dos alimentos, inativando microrganismos, principalmente a *Listeria sp*, sem modificar as características sensoriais. Os produtos pressurizados são facilmente encontrados nos Estados Unidos e Japão. A Espanha é pioneira em pressurização de produtos cárneos e em 1998, comercializou o primeiro presunto fatiado pressurizado. O presunto foi embalado à vácuo e pressurizado a 400 MPa e 17°C por 20 minutos, com vida útil de 8 semanas a 4°C (GREBOL, 2002). Encontram-se no comércio presuntos curados, refeições semiprontas de suínos, aves e diversos tipos de salsichas (GARRIGA e AYMERICH, 2009).

2.3.6 Efeito nas proteínas

O efeito da alta pressão sobre proteínas tem sido investigado por diversos autores, com a demonstração de que a pressão fortalece as pontes de hidrogênio e enfraquece interações hidrofóbicas e ligações iônicas nas macromoléculas. Desta forma, o tratamento a alta pressão pode induzir alterações reversíveis e irreversíveis na conformação dessas macromoléculas, sua dissociação em subunidades ou associação e consequente formação de agregados (HINRICHS et al., 1996). A APH atua forçando a entrada de água no núcleo proteico, implicando na ruptura das ligações fracas e, assim, no desnovelamento proteico (CREIGHTON, 1993, apud PALMIERI, 2005).

A tecnologia de APH é capaz de desnaturar as proteínas, que é uma transformação complexa e está relacionado com a estrutura da proteína, o intervalo de pressão, a temperatura, o pH e a composição do solvente (LAMBALLERIE-ANTON et al., 2002; MARQUES et al., 2007; EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2009).

As proteínas, quando submetidas a altas temperaturas, pH extremos e a APH, podem perder sua estrutura e ação parcialmente ao se desenovelarem. Isso ocorre devido à quebra das interações fracas, pela entrada de água no cerne proteico pela APH (CREIGHTON, 1990 apud NETO, 2011).

Com a pressurização, há redução do volume e as ligações de hidrogênio, responsáveis pela manutenção da estrutura helicoidal das proteínas são fragilizadas (HOOVER et al., 1989; CHEFTEL e CULIOLI, 1997; PATTERSON et al., 2006; RENDUELES et al., 2011). É possível que aconteça a desnaturação das proteínas, pois as moléculas de elevado peso molecular são sensíveis à pressão, como as proteínas e carboidratos, ocasionando alterações nas suas funções (HOOVER et al., 1989; BUTZ e TAUSCHER, 2002; LOEY et al., 2003; NORTON e SUN, 2008).

A desnaturação pode ser entendida pela modificação da hélice tripla para uma estrutura desordenada, ocasionada pelo aquecimento, adição de ácidos, álcoois, entre outros (BADEA et al., 2008).

As estruturas oligoméricas são dissociadas a pressões relativamente baixas, 200 MPa, sendo as proteínas facilmente desnaturadas entre pressões de 400 MPa a 600 MPa (PALOU et al., 1999; JAY et al., 2005; HAN, 2007).

As ligações de hidrogênio são responsáveis pela disposição da cadeia peptídica. O efeito causado pela quebra dessas ligações acarreta modificações na estrutura secundária das proteínas a pressões de 300 a 700 MPa e, na estrutura terciária acima de 200 MPa. Já a estrutura quaternária é conservada pelas interações hidrofóbicas entre os componentes, sendo muito sensível e normalmente dissociada a pressões inferiores a 150 MPa (HOOVER et al., 1989; HENDRICKX et al., 1998; MURCHIE et al., 2005; MARQUES et al., 2007; YORDANOV e ANGELOVA, 2010; RIBEIRO et al., 2010; RENDUELES et al., 2011).

A APH desnatura proteínas pela desestabilização das ligações não covalentes na estrutura terciária, expõe as ligações hidrofóbicas, agregando as proteínas (DONG SUN; HOLLEY, 2010).

De acordo com Molina-Gutierrez (2002) apud Slongo (2008), entre 20 e 40 MPa verifica-se efeitos sobre as proteínas citoplasmáticas com modificações em suas conformações, podendo alterar a funcionalidade e interação entre as proteínas. Isso acontece na pressurização e despressurização, devido à reorganização da camada de hidratação das proteínas.

Segundo Keim e Hinrichs (2004), a formação de gel nas proteínas se dá por dois processos: a deconformação parcial das cadeias laterais reativas dos grupos de proteínas e a agregação dessas proteínas em uma dimensão de redes de proteínas com estruturas menores.

Diversos estudos bioquímicos indicam que geralmente pressões acima de 200 MPa, a temperatura ambiente, acarretam dissociação de estruturas oligoméricas em subunidades, abertura parcial e deconformação das estruturas monoméricas, na maioria irreversíveis, bem como gelatinização, desde que a pressão e concentração de proteínas sejam suficientes (CHEFTEL e CURIOLI, 1997; HEREMANS et al., 1997).

No caso da carne, foram realizados estudos para examinar as mudanças na actina, miosina e actomiosina, depois do tratamento com alta pressão. A despolimerização, acompanhada de uma redução do volume do alimento cárneo exposto que se comprovou pela liberação de água, foi o principal efeito observado (GHOSH et al., 2001, apud SLONGO, 2008).

As enzimas são classificadas como proteínas que possuem atividade biológica por um sítio ativo, possuindo sua molécula uma estrutura tridimensional. A APH é capaz de modificar ligeiramente o sítio ativo através da desnaturação e, conseqüentemente, alterar a função da enzima, aumentando ou reduzindo sua atividade biológica e, ainda, mudando a especificidade do substrato (HENDRICKX et al., 1998). A enzima calpastatina tem sua inibição a 200 MPa e as calpaínas em valores acima de 400MPa. Em pressões próximas a 200 MPa, os lisossomos são quebrados e há aumento da atividade autolítica, aumentando a maciez da carne (LAMBALLERIE-ANTON et al., 2002).

Em estudo de Jung et al. (2000), o efeito do tratamento de alta pressão hidrostática nas atividades enzimáticas em carne (*Biceps femoris* and *Longissimus dorsi*) foram investigadas no *post-rigor* (dia 2) e durante a maturação. Atividades da catepsina D e fosfatase ácida foram maiores nas carnes pressurizadas que nas amostras controle (dia 2) e durante o armazenamento. Esse aumento nas atividades enzimáticas foi relatado como a quebra das membranas lisossomais e/ou a ativação enzimática.

A APH induz ao amaciamento através de mecanismos como a alteração da interação actina-miosina, fragmentação miofibrilar, transformação da α -conectina em β -conectina e do efeito no tecido conjuntivo (SUZUKI et al., 2006).

Sabe-se que a interação actina-miosina e a estrutura miofibrilar são modificados durante a maturação, evidenciados pelas mudanças na atividade ATPase das miofibrilas. Ouali (1984) apud Suzuki et al. (2006) reportou que a atividade da enzima ATPase aumenta a uma força iônica baixa (menor que 0,2M KCl), ao passo que é diminuído à altas concentrações (0,3 M ou mais) com o aumento do tempo de armazenamento. Os autores

concluíram que a força iônica é um indicador preciso da redução da estrutura miofibrilar na maturação, e tem sido denominado de Indicador Bioquímico da Maturação Miofibrilar (BIMA).

O valor do BIMA nas miofibrilas pressurizadas foi diretamente proporcional à pressão exercida até 200 MPa e atingiu o mesmo nível das miofibrilas estocadas por 7 dias. Entretanto, houve um decréscimo notável no valor do BIMA quando utilizado a pressão de 300 MPa. A pressão induzida cria mudanças estruturais no filamento fino e pode ser o principal fator que afeta o valor BIMA observado nas miofibrilas preparadas de músculos expostos à APH por um breve período (5 minutos). As modificações drásticas observadas no músculo pressurizado não foram observadas nas miofibrilas preparadas de músculo. O resultado sugere que a aplicação de APH no músculo *post-rigor* causa mudanças na atividade ATPase e nos valores BIMA das miofibrilas de uma maneira diferente naquelas que foram condicionados, ou seja, maturados (SUZUKI et al., 2006).

A Figura 10 mostra as mudanças nos valores de BIMA das miofibrilas preparadas do músculo condicionado e do músculo pressurizado.

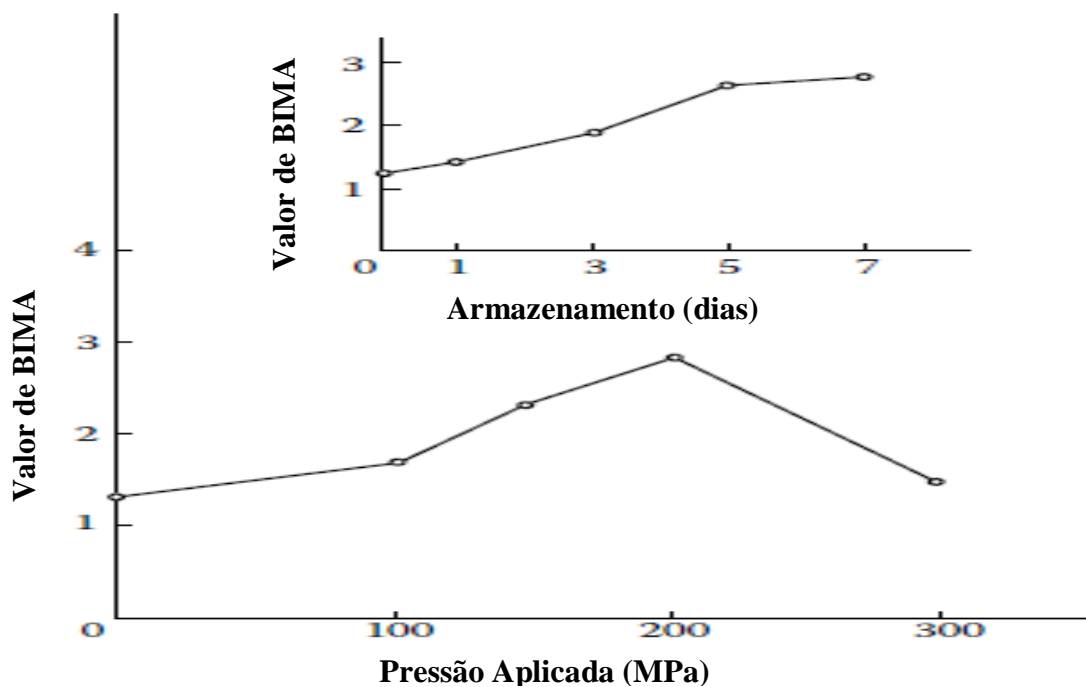


Figura 10. Efeito da APH no valor do Indicador Bioquímico da Maturação Miofibrilar (BIMA).

Fonte: Adaptado de Suzuki et al. (2006).

Suzuki et al. (1990) relatam que uma curta exposição da carne *post-rigor* ao tratamento de APH produz efeito na fragmentação das miofibrilas muito acima do esperado pela maturação. As miofibrilas do músculo condicionado eram menores e compostas por poucos sarcômeros do que aqueles músculos não condicionados e as quebras nas miofibrilas na linha-Z foram relacionadas ao aumento na maciez da carne. Portanto, a fragmentação miofibrilar é considerada como útil para prever a maciez da carne (CALKINS E DAVIS, 1980 apud SUZUKI et al., 2006).

A Figura 11 mostra o decréscimo na fragmentação das miofibrilas, o qual é expresso pela porcentagem do número de fragmentos de miofibrilas, compostos por um a quatro sarcômeros do total de números de miofibrilas observadas (aproximadamente 100).

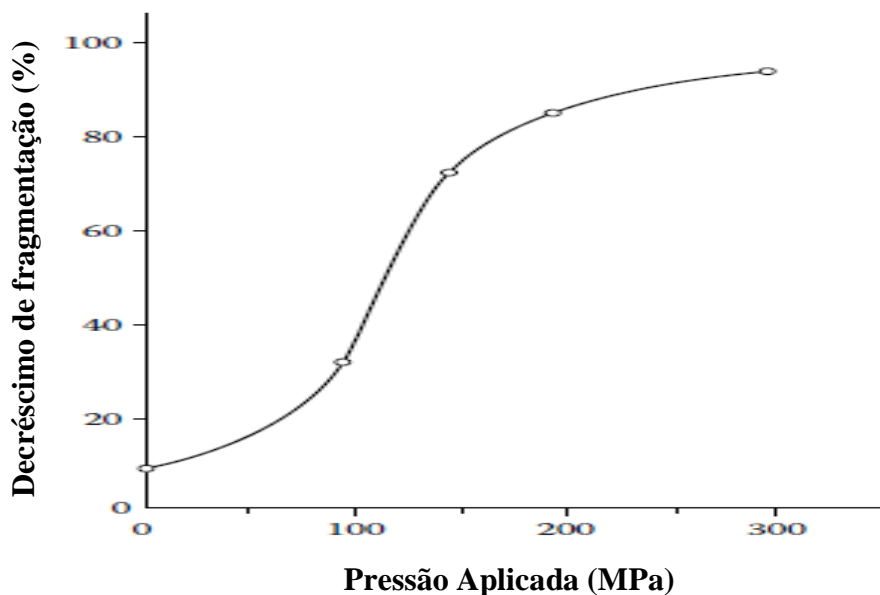


Figura 11. Efeito da APH na fragmentação das miofibrilas.

Fonte: Adaptado de Suzuki et al. (2006).

2.3.7 Efeito no tecido conjuntivo

O colágeno é estabilizado por ligações de hidrogênio e a APH afeta muito pouco essas ligações (HAN-JUN MA e LEWARD, 2004). As principais modificações da APH na textura da carne são devido às proteínas miofibrilares. Em geral, as mudanças são reversíveis em pressões na faixa de 100 a 300 MPa, e irreversíveis acima dessa pressão (RASTOGI et al., 2007).

O estudo das forças de cisalhamento em carne (*Biceps femoris* and *Longissimus dorsi*) foram investigadas no *post rigor* (dia 2) e durante maturação, tendo sido maiores nas amostras de ambos os músculos pressurizados a 2 dias do que no controle, e mantendo-se superior ao longo da maturação. As curvas de força de cisalhamento a partir de amostras de deformação sob pressão revelou que o aumento da resistência foi devido ao aumento na força de cisalhamento dos componentes miofibrilares e não do componente de colágeno. A carne pressurizada levou a uma diminuição no comprimento do sarcômero e maior perda de cozimento. O tratamento de alta pressão hidrostática induz a atividade da catepsina D e não foi observado nenhum efeito conclusivo no *post mortem* sobre a taxa de amaciamento ou maciez da carne (JUNG et al., 2000).

De acordo com UENO et al. (1999), o músculo pressurizado apresentou deformação na estrutura de favo de mel do endomísio conforme o aumento da pressão e no músculo pressurizado a 400 MPa foi notado a expansão da malha do endomísio.

As estabilidades térmicas do perimísio e endomísio do colágeno de músculo *Semitendinosus* se modificaram durante o processamento à alta pressão hidrostática. Devido à exposição da alta pressão, os tecidos colagenosos, perimísio e endomísio, foram desnaturados e fundiram-se a 500 MPa. Os efeitos da APH nas temperaturas de encolhimento térmico do

endomísio são mais significativos que o perimísio, especialmente em pressões acima de 500 MPa e por maior tempo, 20 minutos, de processamento. A pressão acima de 500 MPa, o tempo de processamento pode conduzir a altas temperaturas de encolhimento do endomísio, principalmente na temperatura de pico. Entre 500 e 600 Mpa, as pressões do tratamento foram críticas, afetando as temperaturas térmicas de encolhimento do perimísio e endomísio durante o processamento por 10 e 20 minutos. As modificações nas temperaturas térmicas de encolhimento do perimísio e endomísio pela APH em carne são atribuídas às modificações nas características térmicas de estabilidade, induzidas pela pressão, em tecido conjuntivo colagenoso (CHANG et al., 2012).

O decréscimo na estabilidade térmica no colágeno do tecido conjuntivo em carnes tratadas pela APH tende a ser mais estável. Comparando com o grupo controle, a temperatura térmica de desnaturação do colágeno pelo tratamento à alta pressão por 10 minutos e 20 minutos foram todas aumentadas. Houve correlação positiva entre a temperatura de desnaturação de início e pico, assim como a força mecânica e o conteúdo de colágeno do tecido conjuntivo (CHANG et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As amostras utilizadas foram de carne bovina em *post rigor* conhecida comercialmente como músculo bovino ou braço, cujo grupo muscular compreende os músculos: Flexor digital superficial, Flexor digital profundo, Pronador redondo. As amostras foram adquiridas em um hipermercado local. Apresentavam embalagem à vácuo, de mesmo lote, com selo do Serviço de Inspeção Federal.

3.2 Métodos

3.2.1 Planejamento Experimental

Foi utilizado o delineamento fatorial completo. Variando a pressão a 200, 400 e 600 Mpa e os tempos de 10 e 20 minutos, obtendo-se 6 tratamentos. Foi utilizada a amostra controle, para fins comparativos, sem pressurização. As análises foram realizadas em duplicata.

A Tabela 3 apresenta a descrição dos tratamentos conforme o tempo de processamento e os níveis de pressão utilizados.

Tabela 3. Descrição dos tratamentos utilizados.

Tratamentos	Tempo (min.)	Pressão (MPa)
TC (controle)	Zero	Zero
T2	10	200
T4	10	400
T6	10	600
T8	20	200
T10	20	400
T12	20	600

3.2.2 Tratamento sob Alta Pressão Hidrostática

A fim de se avaliar os diferentes níveis de pressão sobre as características do colágeno as amostras de músculo bovino foram cortadas em pedaços de 5 cm x 4 cm x 3 cm, embaladas em material de polipropileno, seladas à vácuo e pressurizadas. Houve o monitoramento da temperatura, que não ultrapassou 45°C. As amostras foram mantidas em câmara de congelamento, a -18°C até a realização das análises.

As amostras foram pressurizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro. O equipamento experimental para promover a

alta pressão hidrostática, Stansted Fluid Power, modelo S-FL-850-9-W, possui capacidade de 100mL de amostra por batelada.

3.2.3 Extração do Colágeno

O colágeno foi separado das carnes pressurizadas (T2, T4, T6, T8, T10, T12) e não pressurizadas, TC (tratamento controle), em porções de perimísio e endomísio. A extração do colágeno foi baseada na metodologia de Stanton e Light (1987) modificado por Li et al. (2008).

A extração foi realizada com 60 g de cada amostra de carne (parcialmente descongelada), cortada em cubos de 1 cm e homogeneizado em 100 mL de cloreto de cálcio 0,5M refrigerado durante 30 segundos à velocidade máxima do equipamento blender, Waring Commercial, modelo 34BL197. O homogeneizado foi filtrado através de uma camada de rede de nylon, abertura de 1 mm², e o material retido no filtro foi novamente homogeneizado em cloreto de cálcio e refiltrado. O retido, que contém perimísio, foi dividido em 2 partes. Cerca de 10 g de perimísio foi imerso em 1% de sulfato de dodecil de sódio, sob agitação, por 2h e foi dialisado em água por 24h. Após esse período o material foi recolhido para a análise de eletroforese. Parte do perimísio foi imerso em SDS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o SDS foi removido a 4°C com água destilada por 24 horas. Após esse período, foi utilizado metanol a 40% por 24 horas e, por fim, lavado com água destilada por mais 24 horas. A porção de perimísio foi liofilizada.

3.2.4 Análise de proteínas por Eletroforese

Para a análise das proteínas por eletroforese, foi necessário extrair as proteínas da carne bovina. A metodologia utilizada possibilitou a análise das proteínas estromáticas, sarcoplasmáticas e miofibrilares.

Após a diálise, retirou-se uma alíquota de 3 µL do sobrenadante obtido, que foi utilizado para a eletroforese. A eletroforese de proteínas em gel de poli(acrilamida) foi realizada no laboratório de bioquímica de alimentos da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, utilizando-se o sistema de eletroforese vertical PROTEAN II xi Cell da BIORAD, conforme metodologia proposta por Laemmli (1970).

Foi utilizada acrilamida na concentração de 12% no gel de corrida e de 4% no gel de aplicação. A corrida eletroforética foi realizada durante um período de sete horas e sob uma tensão de 100V. As proteínas dos géis foram coradas com ácido acético 10% (v/v), álcool metílico 40% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R250 1% (v/v), durante uma noite. O gel foi descorado em solução contendo 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de álcool metílico, renovando-se a solução a cada 30 minutos, até obtenção de revelação nítida. O cálculo da massa molecular das frações proteicas foi efetuado mediante a construção das curvas padrão, com massas moleculares dos marcadores contra as respectivas distâncias percorridas no gel.

Os marcadores de massa molecular foram os da marca BIO-RAD LABORATORIES (Richmond, EUA), sendo os de alto peso molecular: miosina (202,44kDa), β -galactosidase (116,58kDa), albumina sérica bovina (98,08kDa), ovalbumina (49,49kDa), e os de baixo peso molecular: fosforilase B (103,04kDa), albumina sérica bovina (80,66kDa), ovalbumina (49,49kDa), anidrase carbônica (36,55kDa), inibidor de tripsina de soja (28,83kDa) e lisozima (19,45kDa).

As análises de eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) têm por objetivo estudar o comportamento do colágeno extraído da carne

bovina. Utilizou-se 200µL de amostra de fibra de colágeno e 100 µL de solução tampão para eletroforese para cada tratamento.

3.2.5 Análise Cromatográfica

A quantificação de hidroxiprolina foi feita pelo cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Waters modelo Alliance 2695, coluna Waters C18 com 3,9 x 150mm, volume injetado de 10 µL, detector fluorescência da marca Waters 474 e os dados gerados pelo programa Empower. Foi utilizada a técnica de derivação pré-coluna com 6-aminoquinolyl-N-succinimidyl carbamate (COHEN e DENNIS, 1993). O padrão de hidroxiprolina (trans-4-hydroxy-L-proline), SigmaUltra, foi adquirido do laboratório Sigma. A Figura 12 mostra o cromatograma do padrão de hidroxiprolina com o tempo de retenção de 11 minutos, de acordo com o encontrado por Abreu (2008).

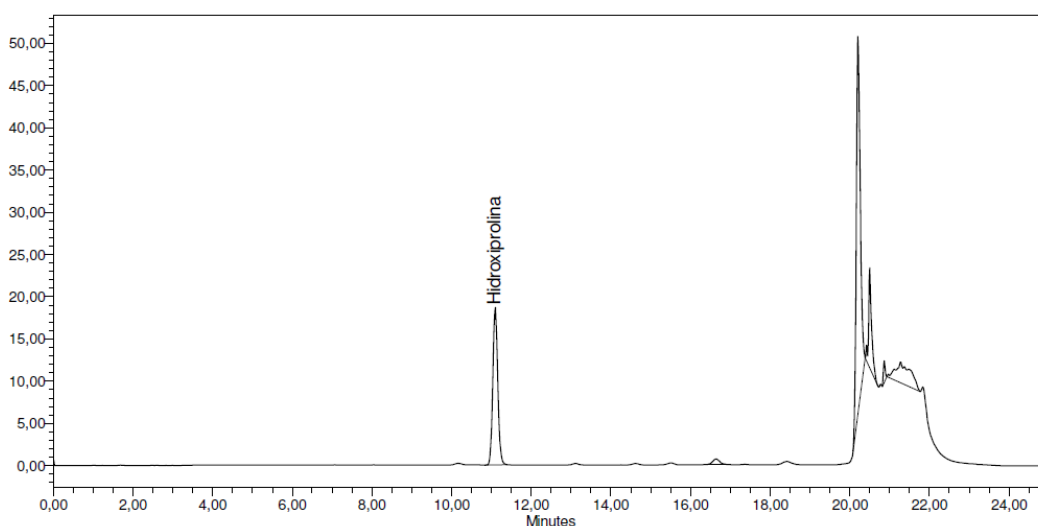


Figura 12. Cromatograma do padrão de hidroxiprolina

A Figura 13 apresenta a curva de calibração para o padrão de hidroxiprolina. A curva de calibração foi calculada baseando-se em quatro pontos, conforme as massas injetadas para cada volume de injeção. O valor encontrado para o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9971.

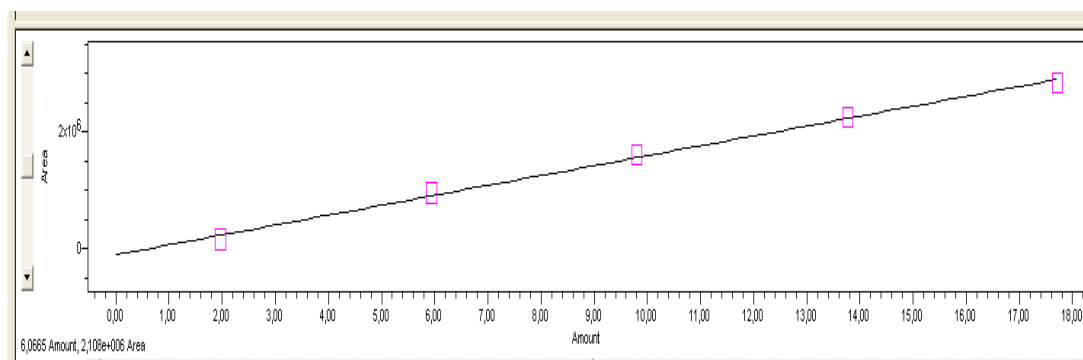


Figura 13. Curva de calibração para hidroxiprolina

O preparo da amostra foi realizado a partir dos perimísios liofilizados foram triturados em blender por 30 segundos e foram pesados 500 mg em ampolas de vidro identificadas. As ampolas foram lacradas e hidrolisadas à vácuo, em estufa a 110°C durante 24 horas (AOAC, 2005). Após esse período, as amostras foram avolumadas e foram retiradas duas alíquotas, uma para a análise de hidroxiprolina e outra para os demais aminoácidos. Em seguida, foram retirados 50 µL para tubos tipo “vial” e dessecados a vácuo durante 24 horas. As amostras foram reconstituídas e homogeneizadas após o período de 24 horas, foram adicionados os reagentes AQC (6-aminoquiunolyl-N-succinimidyl carbamate) e tampão borato. Em seguida, foram levadas para o banho de areia a 55°C por 10 min. Os tubos foram inseridos no equipamento e para a injeção no cromatógrafo, foi programada uma alíquota de 5 µL de cada amostra. A leitura e a quantificação dos aminoácidos nas amostras foram obtidas com base na curva de calibração e no aminograma, utilizando o programa Empower. A Figura 14 mostra os procedimentos necessários para a realização da análise cromatográfica na quantificação da hidroxiprolina.

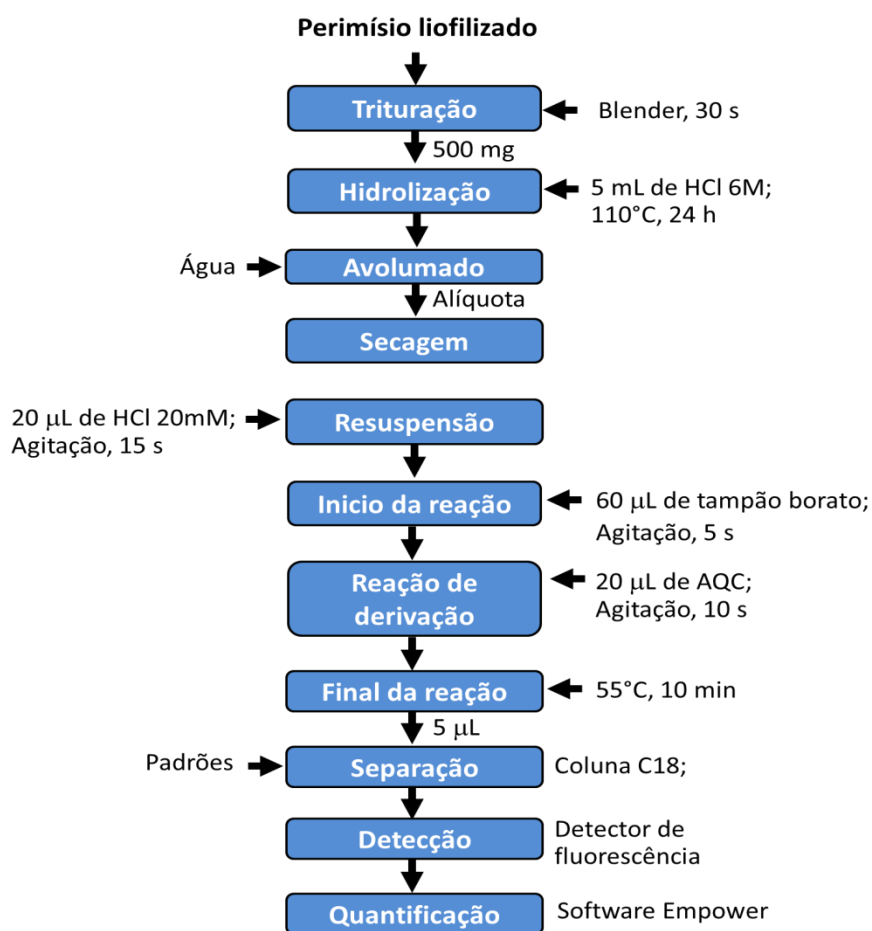


Figura 14. Procedimentos realizados para a análise cromatográfica

3.2.6 Análise Térmica por Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC)

O calorímetro diferencial de varredura foi usado para o estudo térmico de desnaturação das proteínas em colágeno liofilizado pressurizado e não pressurizado.

As curvas calorimétricas foram geradas por um calorímetro exploratório diferencial TA Instruments, DSC 2920 Modulated DSC Q200 V24.10 Build 122. O equipamento foi calibrado utilizando índium. Amostras de 3mg foram pesadas em cadinho de alumínio

padronizados, adicionadas de água destilada e seladas hermeticamente. Os cadinhos permaneceram *overnight* para a completa hidratação. O calorímetro foi utilizado em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50mL/min, em um intervalo de temperatura de 20°C a 100°C, com vazão de aquecimento de 2°C/min. Em seguida, as amostras foram resfriadas até 20°C, com a mesma vazão, e reaquecidas até 100°C, com vazão de 10°C/min.

As propriedades térmicas de colágeno bovino, temperatura inicial (T_0), temperatura de desnaturação (T_d) e entalpia de desnaturação (ΔH), foram investigadas através da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), de acordo com o método de Chang et al.(2010).

O software utilizado para as análises das temperaturas de desnaturação (T_d) e entalpia de desnaturação (ΔH) foi o Universal V4.5A TA Instruments, instalado no computador de controle do calorímetro.

3.2.7 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas pelo equipamento microscópio eletrônico de varredura tabletop scanning electron microscopes TM 3000 (Hitachi Corporation, Tokyo – Japan) no modo.

3.2.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006). Para a análise estatística foi utilizado o pacote estatístico Statistica 6.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da APH sobre o perfil das proteínas

A análise do efeito da APH sobre o perfil das proteínas foi realizada nas fibras extraídas da carne bovina e contemplam as proteínas miofibrilares, sarcoplasmáticas e estromáticas. Todos os tratamentos e amostra controle, para efeito comparativo, são observados na Figura 12. Dessa forma, o gel de poliacrilamida SDS-PAGE, com suas cadeias polipeptídicas, apresenta o perfil das proteínas. As modificações são visualizadas pelas distintas colorações do gel, causadas pelo tratamento de APH. As amostras foram identificadas e quantificadas no total de 18 cadeias polipeptídicas. Contudo, em algumas amostras esse valor é menor devido às modificações realizadas pela pressurização.

Pode-se verificar que, no caso dos tratamentos efetuados com 10 min. de duração, à medida que se eleva o nível de pressão de 200, 400 e 600 MPa (tratamentos T2, T4 e T6), novas bandas surgem e ficam mais intensificadas em menores pesos moleculares. Em paralelo, passa a ocorrer diminuição da banda situada entre 180 e 200 kDa, com aumento da banda situada em torno de 45 kDa, bem como em níveis inferiores.

No caso do processamento mais prolongado por alta pressão, compreendendo 20 minutos de tratamento, na mesma faixa de pressão de 200 a 600 MPa (T8, T10 e T12), também verificou-se comportamento análogo, porém com maior diminuição da banda entre 180 e 200 kDa e da própria banda situada entre 45 kDa e igualmente o surgimento de novas bandas.

O estudo mostrou que as principais cadeias de peptídeos originárias da molécula de colágeno mantiveram-se presentes após os tratamentos com alta pressão, baseado na similariedade do perfil eletroforético. As bandas principais no gel com massa molecular de 200 kDa e 100 kDa são identificadas, com base em estudos anteriormente realizados, como sendo a cadeia- β e cadeia- α do colágeno (ICHINOSEKI et al.,2006).

Um estudo com proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas conclui que a APH (300 MPa/5 min.) induz a precipitação de uma proteína de 97 kDa a partir de proteínas sarcoplasmáticas, que pode corresponder ao glicogênio fosforilase. Assim, é possível que as interações por APH induzida por uma proteína na proteína miofibrilar, gelificação da proteína afetada, e esses efeitos foram reforçados pela adição de proteína sarcoplasmática (LEE et al., 2011).

Desse modo, as variações verificadas na intensidade das bandas em torno de 100 kDa e entre 180 e 200 kDa podem refletir tais alterações, abrangendo proteínas do colágeno, miofibrilares e sarcoplasmáticas.

No entanto, no caso específico do colágeno, há indícios que as moléculas podem não se degradar pelo tratamento de alta pressão, ao contrário da degradação das moléculas de colágeno durante a maturação (ICHINOSEKI et al.,2006).

Em pesquisa realizada em tecido intramuscular conectivo isolado de músculo bovino pressurizado (100 MPa, 300 MPa e 500 MPa) e não pressurizado, foi concluído que não houve diferenças na densidade dessas bandas durante o tratamento de alta pressão (ICHINOSEKI et al.,2006).

Por outro lado, outros estudos preconizam que a alta pressão possui um efeito significativo na estrutura histológica e na textura de carnes tratadas fundamentado pela rede do gel formado com o colágeno derretido, proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas

desnaturadas e agregadas. Segundo esses autores, a pressurização pode alterar a perda da continuidade estrutural do músculo devido à ruptura dos filamentos-I, perda da proteína linha-M e rompimento dos filamentos-A, bem como a solubilização e gelificação do colágeno, compreendendo principalmente o perimísio e endomísio (SUZUKI et al., 1993).

Já a maturação da carne bovina promove modificações na estrutura do colágeno, conforme comprovado pelo estudo realizado por Stanton e Light (1987) que, com o decréscimo nas bandas peptídicas de colágeno de 100 kDa foram encontradas novas bandas durante o *post-mortem*, indicando que o colágeno foi destruído durante a maturação.

Na presente análise foi possível visualizar as proteínas miofibrilares, que são responsáveis pela contração muscular e também mantêm relação estreita com a maciez da carne. Elas foram caracterizadas pelo tamanho de suas moléculas, de acordo com o padrão de baixo peso molecular.

Pode ser observado na faixa peptídica entre 31 e 33 kDa em que, provavelmente, a APH desnaturou proteínas da actina e conseqüentemente, resultou em novas bandas polipeptídicas. O mesmo fenômeno pode ser observado entre 22 e 24 kDa, e também entre 16 e 19 kDa, porém as proteínas que foram alteradas pertencem à cadeia leve da miosina.

Em pesquisa realizada por Lee et al. (2007), concluíram que o aumento da quantidade de proteínas solúveis tratadas por APH foi atribuído à liberação de proteínas de baixo peso molecular, incluindo troponina-T, tropomiosina, troponina-C e cadeias leves da miosina (15-37 kDa).

Já no presente estudo, a banda em torno de 12 kDa, somente na amostra T6 foi encontrado maior intensidade, indicando a presença de polipeptídeos. Este resultado é esperado, uma vez que o tratamento T6 possui maior intensidade em relação aos outros tratamentos.

A presença de uma banda aproximada de 65 kDa não é verificada em todos os tratamentos, uma vez que a amostra controle não apresentou essa cadeia. Comparando T2 e T8 com os outros tratamentos, nota-se que a pressurização a 200 MPa por 10 e 20 minutos respectivamente, não foi suficiente para modificar a estrutura de certas proteínas responsáveis pela aparecimento da banda próxima de 65 kDa.

Em termos da relação entre o efeito do processamento por alta pressão hidrostática na estrutura das proteínas e na maciez da carne, certos estudos comprovam que o amaciamento de carnes ou resistência decorrem de alterações em ambos a “dureza da actomiosina” e “dureza de fundo”. Nesse sentido, a dureza da actomiosina refer-se a dureza atribuída à proteína miofibrilar e a dureza de fundo corresponde à dureza devido à presença de colágeno do tecido conjuntivo e outras proteínas do estroma (SUZUKI et al., 1993).

Desse modo, as mudanças na ultraestrutura dos músculos pressurizados e sua relação com a maciez têm sido relatadas por diversos autores (MA e LEDWARD, 2004; GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010).

Algumas pesquisas sugerem que pressões acima de 200 MPa, em temperatura ambiente, podem causar a dissociação de estruturas oligoméricas em subunidades, bem como a abertura parcial e modificação nas estruturas monoméricas, geralmente irreversíveis. Ainda, quando a combinação entre pressão e a concentração de proteínas são suficientes, há a gelatinização das proteínas (CHEFTEL e CURIOLLI; HEREMANS e SMELLER, 1997).

Já em termos do efeito na maciez, o aumento da pressão, 200-600 MPa e de tempo de processo, de 10 min. e 20 min., acarretou redução significativa na força de cisalhamento em amostras de músculos *Semitendinosus* (CHANG et al., 2010).

Em outro estudo, a força de cisalhamento de músculos pressurizados a 100 MPa tiveram redução mais acentuada com decréscimo gradual com elevação da pressão. A amostra controle teve uma força de cisalhamento de 605g e os músculos pressurizados de 100 a 500 MPa utilizaram uma força de cisalhamento variando entre 443 e 497g (ICHINOSEKI et al.,

2006). Suzuki et al. (1998), obtiveram um resultado semelhante com redução significativa de dureza em tratamentos com pressões até 300 MPa.

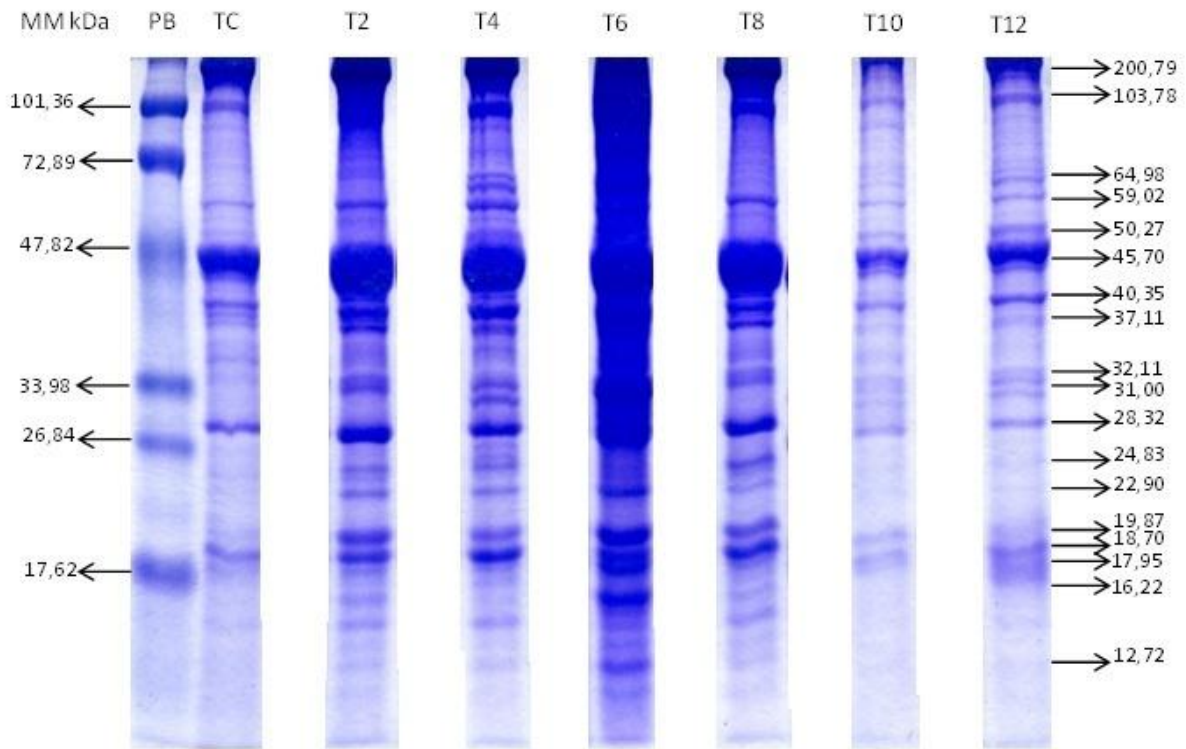


Figura 15. Perfil eletroforético das proteínas extraídas do perimísio.

4.2 Efeito da APH sobre a solubilidade do perimísio e endomísio

As solubilidades do perimísio e endomísio tratados e não tratados por APH foram analisadas através da cromatografia líquida por alta eficiência (CLAE).

A Figura 16 mostra o cromatograma de uma das amostras do perimísio. Para cada amostra é feita a quantificação de hidroxiprolina, que é realizada conforme a área apresentada no cromatograma. Multiplicando-se esse valor calculado por um fator de correção, encontra-se o teor de colágeno.

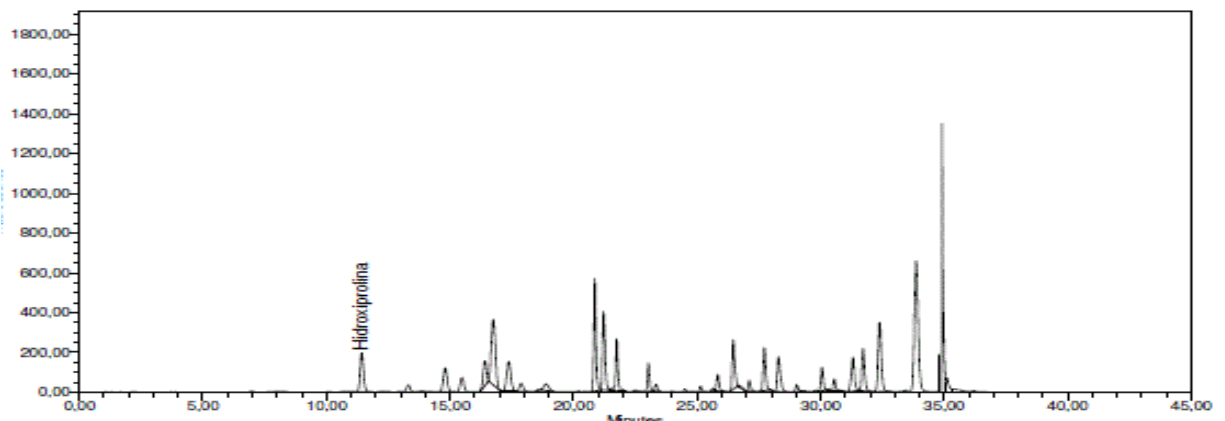


Figura 16. Cromatograma da hidroxiprolina

A Tabela 4 mostra o conteúdo de colágeno do endomísio e perimísio da carne liofilizada, conforme os tratamentos de APH, apresentando variações de pressão e tempo, baseados na análise cromatográfica.

A Tabela 4 apresenta os teores de colágeno solúvel e insolúvel quantificados posteriormente aos tratamentos por alta pressão e na amostra controle. Os teores de colágeno solúvel diferiram significativamente do controle nas amostras provenientes dos tratamentos T4, T6 e T12. O tratamento T4 apresentou a menor quantidade de colágeno em relação aos demais tratamentos. Deve-se observar que os tratamentos T6 e T12, que possuíram o mesmo nível de pressurização (600 MPa) porém tempos distintos, diferem significativamente entre si. Ou seja, com base em tais, o tempo de pressurização teria sido supostamente mais importante que o nível de pressão em relação ao colágeno solúvel.

Tabela 4. Conteúdo de colágeno da porção endomisial e perimisial da carne pressurizada e não pressurizada.

Tempo	Tratamento	Solúvel		Insolúvel	
		Hidroxi prolina	Colágeno (mg/100g)	Hidroxi prolina	Colágeno (mg/100g)
0 minuto	Controle	802,20	6417,60 ^c ± 5,9	2375,30	19002,40 ^{ab} ± 412,38
	T2 (200 MPa)	799,55	6396,40 ^c ± 1,63	2691,55	21532,40 ^{ab} ± 302,85
10 minutos	T4 (400 MPa)	765,00	6120,00 ^d ± 0,28	2130,75	17046 ^b ± 94,68
	T6 (600 MPa)	825,25	6602,00 ^b ± 11,10	3218,50	25748 ^a ± 101,68
	T8 (200 MPa)	791,75	6334,00 ^c ± 3,61	885,15	7081,20 ^c ± 199,90
20 minutos	T10 (400 MPa)	798,55	6388,40 ^c ± 0,64	2446,95	19575,60 ^{ab} ± 81,67
	T12 (600 MPa)	868,40	6947,20 ^a ± 4,81	3261,40	26091,20 ^a ± 160,51

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste Tukey; valores de hidroxiprolina convertidos em colágeno pelo fator de correção, segundo AOAC (1995).

De modo a tornar mais evidente os teores de colágeno, os mesmos foram separados em solúvel e insolúvel, apresentados em gráficos pelas figuras: Figura 14 e Figura 15, respectivamente.

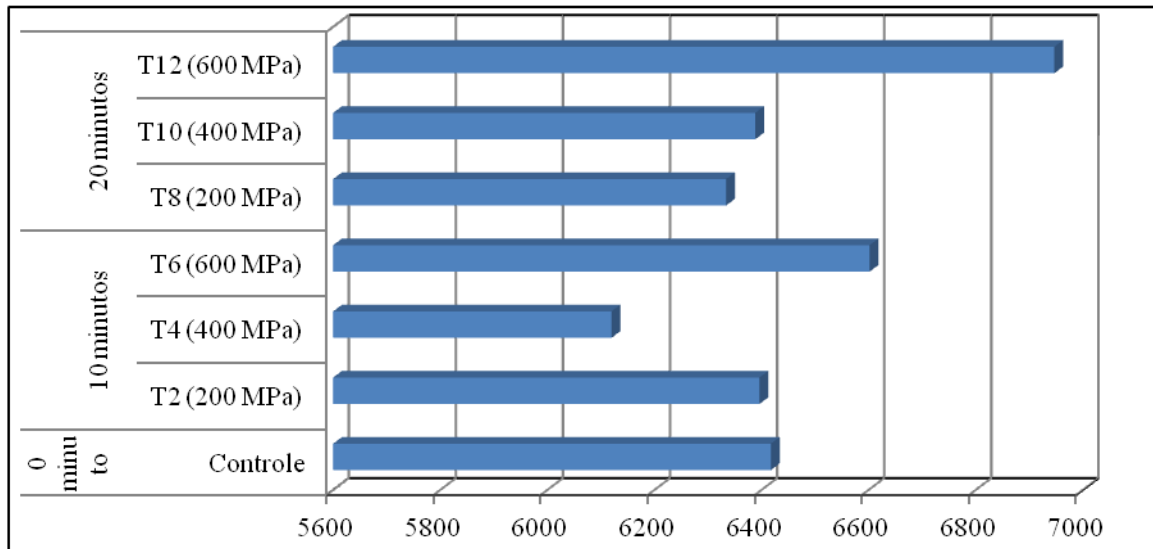


Figura 17. Gráfico dos tratamentos de APH sobre a quantidade de hidroxiprolina do endomísio.

De acordo com a Figura 17, em relação às pressurizações mais severas, T6 e T12, é possível verificar que o tempo de pressurização é mais importante que o nível de pressão em relação ao colágeno solúvel.

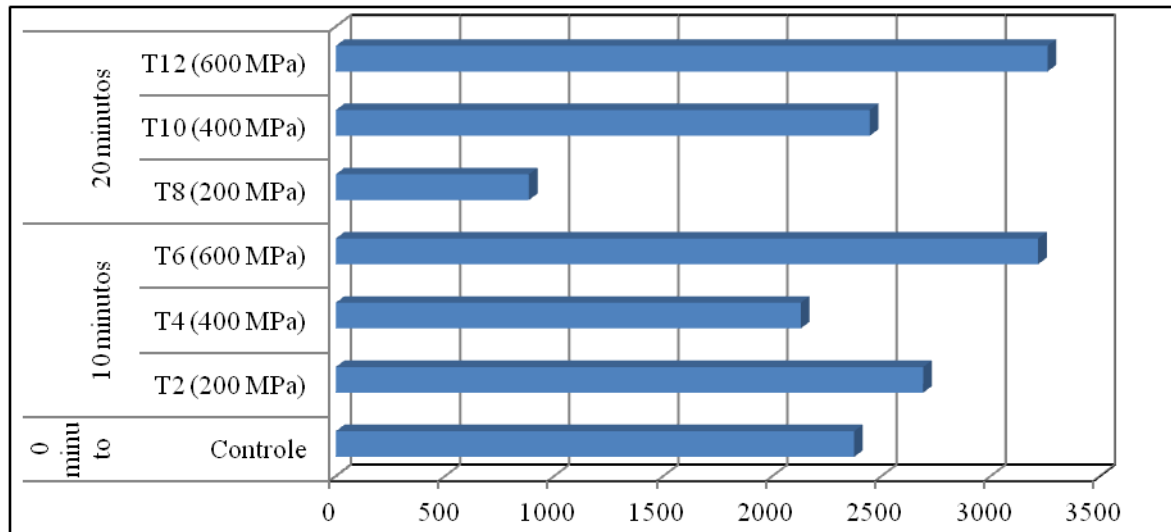


Figura 18. Gráfico dos tratamentos de APH sobre a quantidade de hidroxiprolina do perimísio.

Todavia, considerando os outros tratamentos para o colágeno insolúvel, esta correlação não é similar. Ou seja, o tempo de pressurização não é tão importante quanto o nível de pressão, conforme observado na Figura 18.

Os dados experimentais para o planejamento fatorial completo com dois fatores (pressão e tempo) e dois níveis (+1 e -1) foram utilizados para definir as variáveis que afetam o colágeno na carne pressurizada, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Valores e Resultados experimentais da hidroxiprolina no endomísio e perimísio.

	Variáveis Independentes				Hidroxiprolina	
	1	2	1	2	Endomísio	Perimísio
1	(-1)	200	(-1)	10	798,4	2477,40
2	(+1)	600	(-1)	10	833,1	3146,60
3	(-1)	200	(+1)	20	789,2	1026,50
4	(+1)	600	(+1)	20	871,8	3147,90
5	(-1)	200	(-1)	10	800,7	2905,70
6	(+1)	600	(-1)	10	817,4	3290,40
7	(-1)	200	(+1)	20	794,3	743,80
8	(+1)	600	(+1)	20	865	3374,90

1 – pressão (MPa); 2- tempo (min); Ensaio 1 – Endomísio (Solúvel); Ensaio 2 – Perimísio (Insolúvel)

A Tabela 6 traz a análise de variância dos dados experimentais, na qual é possível observar que a pressão foi estatisticamente significativa para a variável endomísio, com $p < 0,05$. O mesmo foi observado para a interação com o tempo.

Tabela 6. Análise de Variância para o Endomísio.

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pressão	5237,761	1	5237,761	129,3155	0,000341
(2) tempo	624,811	1	624,811	15,4260	0,017138
1 by 2	1297,951	1	1297,951	32,0452	0,004800
Erro Puro	162,015	4	40,504		
Total SQ	7322,539	7			

A Tabela 7 mostra a análise de variância dos dados experimentais, na qual é possível observar que a pressão foi estatisticamente significativa na modificação do perimísio, com $p < 0,05$. O mesmo foi observado para a interação com o tempo.

Tabela 7. Análise de Variância para o Endomísio.

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pressão	4214285	1	4214285	100,4694	0,000557
(2) tempo	1554966	1	1554966	37,0707	0,003679
1 by 2	1709955	1	1709955	40,7657	0,003088
Erro Puro	167784	4	41946		
Total SQ	7646990	7			

As Tabelas 6 e 7 apresentam a análise de variância para o endomísio e perimísio. É possível observar que, de acordo com o valor p, o efeito da pressão, tempo e a interação pressão-tempo foram estatisticamente significativos (com $p < 0,05$).

A Tabela 8 exibe o planejamento experimental para o endomísio, com os valores dos efeitos mais significativos para as mudanças no endomísio.

Tabela 8. Efeitos do Planejamento Experimental para o Endomísio.

Fator	Efeito	Erro Padrão Erro Puro	t(4)	p
Significância/Interação	821,2375	2,250104	34,9775	0
(1) pressão	51,1750	4,500208	11,3717	0,000341
(2) tempo	17,6750	4,500208	3,9276	0,017138
1 by 2	25,4750	4,500208	5,6608	0,004800

Na Tabela 8 foi possível identificar que a pressão foi o efeito mais relevante, seguido da interação pressão-tempo. Observou-se que o tempo foi o efeito menos significativo para alteração do endomísio.

A Tabela 9 traz o planejamento experimental para o perimísio, com os efeitos mais significativos para as mudanças no perimísio.

Tabela 9. Efeitos do Planejamento Experimental para o Perimísio.

Fator	Efeito	Erro Padrão Erro Puro	t(4)	p
Significância/Interação	2514,150	72,4102	34,72091	0,000004
(1) pressão	1451,600	144,8205	10,02344	0,000557
(2) tempo	-881,750	144,8205	-6,08857	0,003679
1 by 2	924,650	144,8205	6,38480	0,003088

Na Tabela 9 observou-se novamente que a pressão exerce maior influência nas modificações do colágeno, sendo este o efeito mais significativo.

São considerados significativos os termos que possuem desvio padrão com pelo menos uma ordem de grandeza a menos que seus coeficientes. O sinal negativo do fator tempo para o perimísio indica que existe uma correlação inversa entre essa variável. Isso pode ser demonstrado através do exemplo: com o aumento da pressão é necessário reduzir o tempo para manter a mesma modificação do perimísio.

A seguir, a Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão do planejamento experimental para o endomísio.

Tabela 10. Coeficiente de Regressão do Planejamento Experimental para o Endomísio.

Fator	Efeito	Erro Padrão Erro Puro	t(4)	p
-------	--------	--------------------------	------	---

Significância/Interação	819,9750	15,91064	51,53627	0,000001
(1) pressão	-0,0631	0,03558	-1,77431	0,150681
(2) tempo	-3,3275	1,00628	-3,30674	0,029745
1 by 2	0,0127	0,00225	5,66085	0,004800

A Tabela 10 mostrou os coeficientes de regressão através dos quais foi possível obter o modelo matemático que descreve a modificação de endomísio em termos dos valores experimentais, disposto abaixo:

$$Y = 819,98 - 0,06 A - 3,33 B + 0,01 AB$$

Sendo:

Y = Modificação do Endomísio

A = Pressão

B = Tempo

Para o perimísio, os coeficientes de regressão do planejamento experimental são mostrados,

conforme a Tabela 11.

Tabela 11. Coeficiente de Regressão do Planejamento Experimental para o Perimísio.

Fator	Efeito	Erro Padrão Erro Puro	t(4)	p
Significância/Interação	5159,125	512,0178	10,07607	0,000546
(1) pressão	-3,306	1,1449	-2,88746	0,044677
(2) tempo	-273,105	32,3828	-8,43363	0,001083
1 by 2	0,462	0,0724	6,38480	0,003088

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão, de onde é possível calcular o modelo matemático que descreve a modificação do colágeno insolúvel, conforme mostrado abaixo:

$$Y = 5159,12 - 3,31 A - 273,10 B + 0,46 AB$$

Sendo:

Y = Modificação do Perimísio

A = Pressão

B = Tempo

As Figuras 18 e 19 apresentam a superfície de resposta para o endomísio e perimísio, respectivamente.

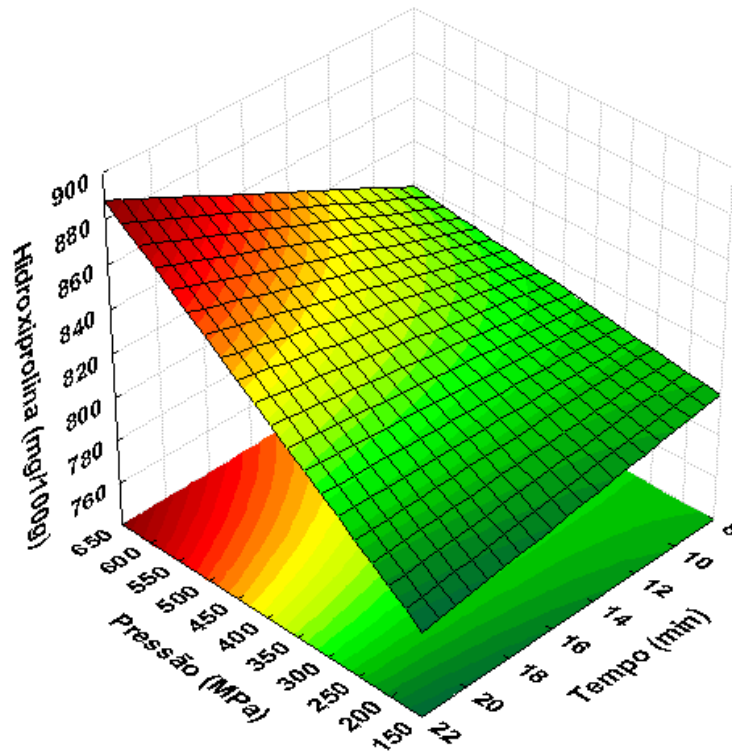


Figura 18. Superfície de Resposta para o Endomísio.
Os valores do endomísio são expressos em mg/100g; o tempo em minutos e a pressão em MPa.

Na Figura 18, nota-se que as maiores porcentagens que modificam o endomísio são obtidos com elevadas pressões e maiores tempos. Nesse sentido, as condições mais drásticas são as que apresentam os melhores resultados para alterar o endomísio.

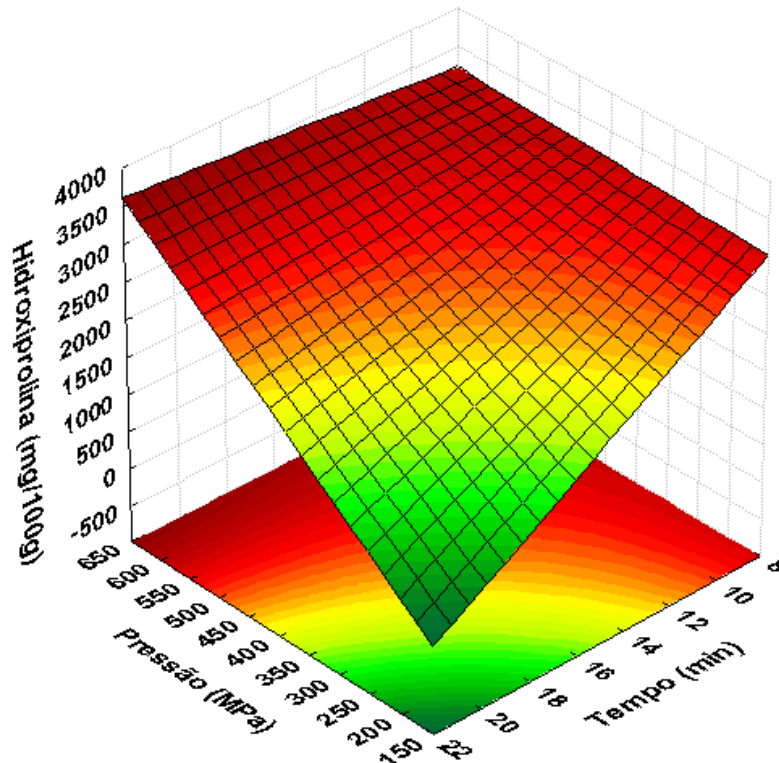


Figura 19. Superfície de Resposta para o Perimísio.

Os valores do perimísio são expressos em mg/100g; o tempo em minutos e a pressão em MPa.

A Figura 19 mostra que as maiores mudanças no perimísio se devem aos menores fatores de pressão e tempo. Portanto, nas condições deste estudo, quanto menor o tempo e menor a pressão exercida na carne, o perimísio terá as maiores modificações.

De acordo com Riley et al. (2007), o fator mais importante que determina a maciez da carne é a quantidade de colágeno insolúvel. Estudo realizado por Ichinoseki et al. (2006), comprovou que o tratamento de alta pressão hidrostática foi capaz de amaciar não somente a carne, mas também o tecido conjuntivo intramuscular de carne bovina. Suzuki et al. (2006) mensuraram a dureza e a elasticidade do músculo dianteiro de um bovino em *post-rigor* após a aplicação de alta pressão, o tratamento foi de 100, 150 e 300 MPa por 5 minutos e a dureza reduziu 60%, 20% e 10%, respectivamente em relação ao controle. Porém, não foi encontrada diferença significativa no tributo elasticidade. Esse resultado indicou que uma pequena exposição à alta pressão hidrostática foi capaz de amaciar a carne sem a necessidade de tratamento térmico.

Deve-se observar, também, que o conteúdo de colágeno solubilizado por alta pressão, no presente estudo, aumenta com o acréscimo da pressão aplicada acima de 200 MPa, indicando que o conteúdo de hidroxiprolina é de 0,23 µg/g de tecido conjuntivo a 0,1 MPa para 0,89 µg/g de tecido conjuntivo a 400 MPa. O conteúdo de hidroxiprolina na fração, incluindo o colágeno molecular e unido, foi desse modo incrementado pela pressurização. Por outro lado, os peptídeos derivados de colágeno não sofreram alteração, baseado no perfil eletroforético. Estes conteúdos de hidroxiprolina foram aproximadamente 0,1 mg/g de tecido conjuntivo de 0,1 MPa a 400 MPa. Esta fração contém peptídeos e aminoácidos livres que resultaram na degradação da molécula de colágeno pelo tratamento de APH. Estes resultados sugerem que o tratamento de alta pressão hidrostática poderia não degradar a estrutura molecular do colágeno, mas poderia dissociar a estrutura supramolecular das fibras ou fibrilas de colágeno em fibrilas ou moléculas, respectivamente. A dissociação da estrutura supramolecular do colágeno parece influenciar no aumento da solubilidade pelo tratamento de alta pressão (ICHINOSEKI et al., 2006).

O estudo realizado em músculo *Semitendinosus*, conclui que possui maior teor de colágeno total e menor colágeno solúvel em relação aos músculos *Triceps brachii* e *Longissimus dorsi*. Comparando *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus*, pesquisas indicam que o primeiro possui menor teor de tecido conjuntivo intramuscular e maiores teores de colágeno solúvel (RHEE et al., 2004; STOLOWSKI et al., 2006). Estas diferenças entre os músculos devem ser pela função locomotora que o músculo exerce (BAILEY e LIGHT, 1989; LI et al., 2008), sendo determinantes para a maciez da carne.

É bem conhecido que o amaciamento da carne *post-mortem* é seguido de mudanças durante o armazenamento, principalmente como resultado da atividade das proteases endógenas: enfraquecimento das interações actina-miosina, fragmentação das miofibrilas em pequenos segmentos devido à desintegração da linha-Z, degradação dos filamentos elásticos pertencentes à conectina e o enfraquecimento do tecido conjuntivo (SUZUKI et al., 2006).

No período pré-rigor, a pressurização provoca uma forte contração no comprimento das bandas (35% a 50%), endurecendo inicialmente o músculo. Em seguida, há a quebra da estrutura muscular pelo colapso do disco-Z e desaparecimento das zonas-H e linhas-M, além da grande alteração estrutural do sarcômero. Entretanto, no período *post-rigor*, também há uma intensa alteração da estrutura do sarcômero, porém as bandas não são contraídas e nem há modificações no disco-Z. há o desaparecimento das linhas-M e a banda-I é desintegrada (SUZUKI et al., 1990).

Em pressões acima de 200 MPa provocam o desaparecimento das linhas-M, dissociação dos filamentos finos e grossos e destruição da linha-Z.

A dureza da carne tratada por APH está diretamente relacionada com o aumento da pressão. Ainda, nesta pesquisa concluiu que esta dureza da carne foi diminuída quando havia processamento térmico e pressurização, observados no tratamento de 200 MPa à 60°C e 70°C os melhores em *post-rigor* de *Longissimus dorsi* (MA e LEDWARD, 2004).

Outro aspecto relacionado com alteração da maciez pela pressurização está associado com o aumento da atividade das enzimas proteolíticas da carne, com diminuição da atividade da calpaínas, variando conforme a origem da enzima (LAMBALLERIE-ANTON et al., 2002).

A APH em carnes causa também aumento nos níveis de atividade da catepsinas D e fosfatase ácida (LAMBALLERIE-ANTON et al., 2002). A APH é capaz de inativar as catepsinas H e as aminopeptidases à 200 MPa, enquanto que a catepsinas D somente é inativada em pressões acima de 500 MPa (MONTERO e GÓMEZ-GUILLÉN, 2002).

Suzuki et al., (1990) mostrou que o decréscimo da fragmentação, que é menor que 10% no músculo não tratado, foi acelerado por pressurização e alcançou 30%, 70%, 80% e 90% a 100, 150, 200 e 300 MPa, respectivamente. O decréscimo na fragmentação, 80 a 90%, é além do nível máximo da fragmentação das miofibrilas que naturalmente ocorrem no músculo condicionado. Dos resultados dessa fragmentação, uma pequena exposição do músculo *post-rigor* na pressurização parece ser útil para o amaciamento da carne.

Em um estudo realizado por Suzuki et al. (1990) foram analisados os efeitos da alta pressão hidrostática na estrutura miofibrilar em músculo bovino *post-rigor*. Nas miofibrilas pressurizadas a 100 MPa, a contração do sarcômero foi observada e a diferença na densidade entre a banda-A e a banda-I tornou-se indistinguível quando comparado com o controle, sem pressurização. Marcada ruptura das estruturas dos filamentos da banda-I e a perda de materiais da linha-M foram observadas nas miofibrilas do músculo pressurizado a 150 MPa. Nas miofibrilas dos músculos pressurizados a 200 MPa, a continuidade estrutural do sarcômero foi quase completamente perdida, com a quebra dos filamentos A e I, distribuídos pelo sarcômero. Foi observado perda completa da linha-M e espessamento da linha-Z, provavelmente pelo colapso do filamento-I. Foi observada a clivagem da banda-A em razão dessas muitas mudanças nas miofibrilas de músculos pressurizados a 300 MPa. O comprimento do sarcômero, inicialmente contraído pela pressurização a 100 MPa, parecia ter gradualmente recuperado com o aumento da pressão por causa do aumento contínuo da perda estrutural. Como foi mencionada, a fragmentação das miofibrilas durante condicionamento é derivado da quebra das miofibrilas na linha-Z, ao passo que a linha-Z nas miofibrilas fragmentadas dos músculos pressurizados aparentemente permaneceu intacta.

Apesar de um curto tempo (5 minutos) e baixa temperatura (cerca de 10°C) do tratamento de pressão aplicada ao músculo em *post-rigor*, mudanças na ultraestrutura das miofibrilas foram principalmente de acordo com os reportados por Macfarlane e Morton (1978) e Locker e Wild (1984). A aplicação por APH é conhecida por influenciar o estado de agregação da actina e miosina, que são os principais constituintes das miofibrilas. Diversos estudos descrevem a despolimerização da actina-F, polímero de miosina e actomiosina sob pressurização. Ainda não é claro como a despolimerização da actina-F ocorre no músculo pressurizado “in situ”, degradação dos filamentos-I pode ser uma das causas da fragmentação. Uma aceleração da fragmentação das miofibrilas e coagulação de cada proteína miofibrilar em um estado dissociado sugerido por Macfarlane (1985) pode causar o amaciamento da carne exposta à APH.

Da observação ultra estrutural e análise SDS-PAGE das miofibrilas, o mecanismo para a quebra da continuidade estrutural das miofibrilas induzidas pela pressurização pode ser diferente do que o músculo condicionado.

Considerando os vários efeitos advindos da APH sobre produtos cárneos, incluindo efeito sobre as proteínas miofibrilares, as enzimas proteolíticas e o próprio colágeno, em termos de indução de solubilização, pode-se inferir que a aplicação e os efeitos das tecnologias são extremamente complexos com relação às suas implicações sobre a qualidade da carne no tocante à maciez da mesma. Desse modo, o tipo de músculo considerado e o maior ou menor teor de tecido conjuntivo são fundamentais para ter-se uma maior ou menor efetividade do processo.

4.3 Efeitos da APH nas propriedades térmicas do perimísio

A análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) está relacionada com a desnaturação individual das proteínas musculares, possivelmente relacionadas a mudanças de textura da carne causadas por cozimento ou por pressurização (ANGSUPANICH et al., 1999).

Entalpia é conhecida como a grandeza física que descreve a energia interna total de um sistema, e esta se consegue através da soma da energia interna mais o produto da pressão pelo volume. O conteúdo em calor total, para as diferentes amostras (Tabela 3) mostra as modificações na variação de entalpia (ΔH), realizadas em equipamento de calorímetro para cada um dos tratamentos de pressurização.

Tabela 12. Variação da Entalpia.

Tempo	Tratamento	ΔH (J/g)
0 minuto	Controle	11,42 ^b ± 0,15
	T2 (200 MPa)	13,06 ^b ± 1,15
10 minutos	T4 (400 MPa)	9,46 ^b ± 0,51
	T6 (600 MPa)	11,64 ^b ± 4,72
	T8 (200 MPa)	12,33 ^b ± 1,15
20 minutos	T10 (400 MPa)	22,81 ^a ± 2,57
	T12 (600 MPa)	25,81 ^a ± 2,31

Letras diferentes na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste Tukey.

É possível uma melhor visualização da variação de entalpia de acordo com o tratamento de pressurização, conforme a Figura 20.

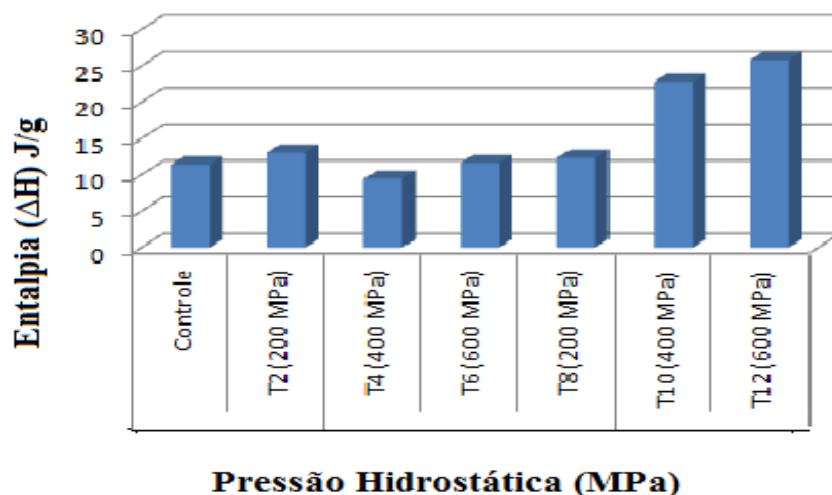


Figura 20. Efeito de diferentes pressões hidrostáticas nos valores de entalpia de diferentes amostras de perimísio.

Pode-se observar que houve diferença significativa somente nos tratamentos com maior tempo e com pressões a partir de 400 MPa. Isso pode ser explicado pelas mudanças na conformação do perimísio provocadas pelos tratamentos com pressões mais drásticas.

Nas pressurizações à 10 minutos, a entalpia não apresentou alterações significativas em relação à amostra controle. Houve ligeiro aumento na entalpia do perimísio pressurizado a 200 MPa por 10 minutos que pode ser devido à formação de uma nova estrutura que necessite de uma quantidade energia maior. Enquanto que o tratamento a 400 MPa por 10 minutos houve uma pequena redução da entalpia, sendo requerida uma energia menor e isso pode ser causado por uma desagregação da estrutura do perimísio.

Neste trabalho, os valores da temperatura inicial (T_0) e temperatura de pico (T_p) não diferiram significativamente.

A Figura 21 apresenta gráficos com o resultado da análise de DSC, com os valores de entalpia e temperaturas: inicial, de pico, final e média. Nesse sentido, o enfoque do gráfico deve ser em torno da curva de DSC, de modo a observar as diferenças entre os tratamentos submetidos à APH e a relação com o tempo de pressurização.

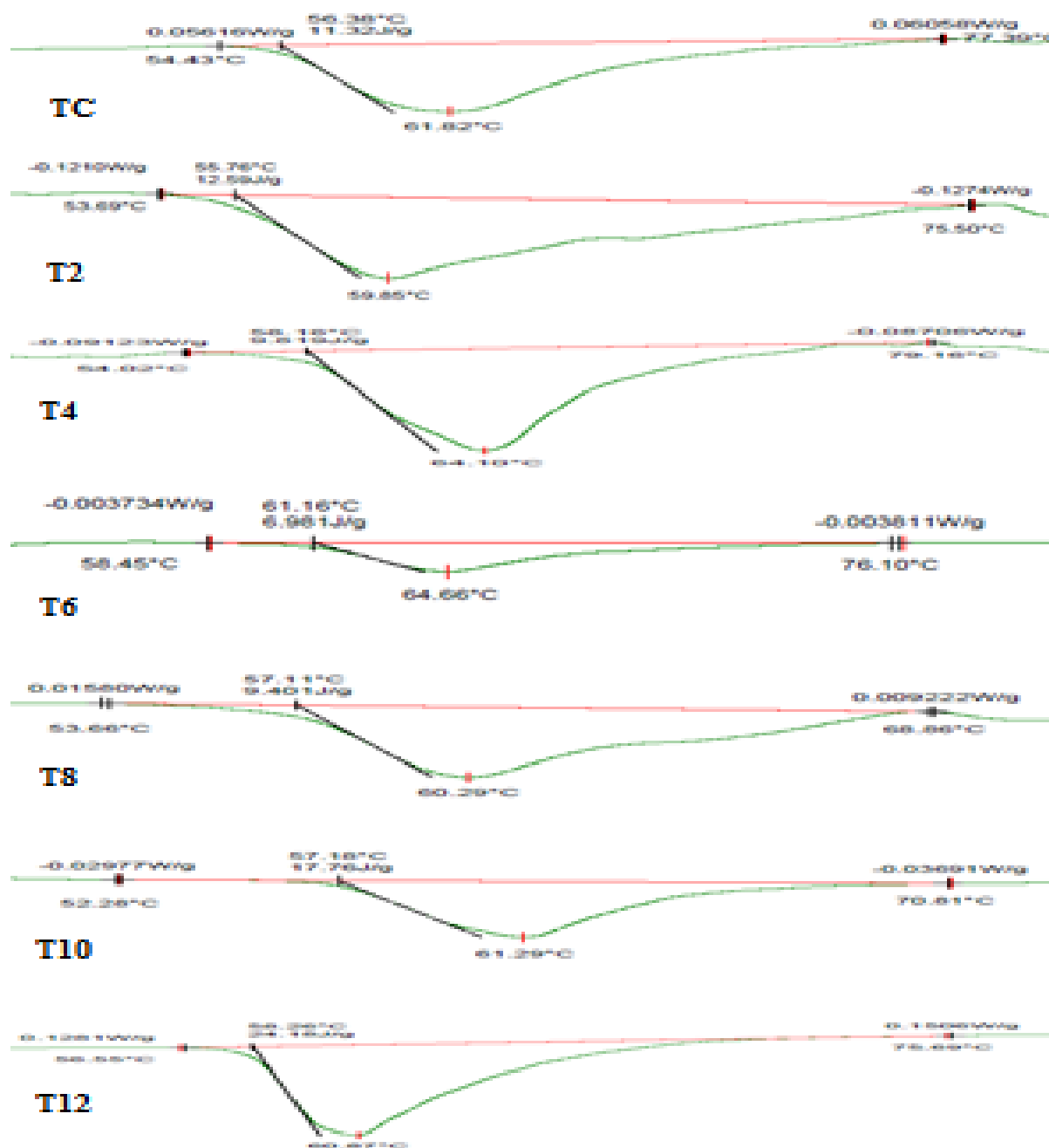


Figura 21. Gráfico das análises de DSC em todos os tratamentos de pressurização e controle (TC) no perimísio.

As três maiores transições comumente verificadas por calorimetria na carne são atribuídas à miosina, colágeno e actina e estão comumente associadas com as mudanças específicas na textura da carne. Além de tais alterações, Macfarlane (1985) também encontrou um pico de transição atribuído à F-actina, que não estava presente no termograma de músculos pressurizados.

A pressurização causa nenhum ou um pequeno efeito no amaciamento do tecido conjuntivo, que é suportado por estudos que não indicaram mudanças significativas no padrão de DSC do tecido conjuntivo (MACFARLANE, 1985; BEILKEN et al., 1990; SUZUKI et al.,

1993). Além disso, não foram encontradas em outros estudos diferenças significativas na ultra estrutura, padrão eletroforético e solubilidade térmica do colágeno intramuscular fibroso (perimísio), isolado em amostras de músculos pressurizados e não pressurizados (SUZUKI et al., 1993). Contudo, a alta pressão quebra a estrutura do endomísio, enquanto que nenhuma mudança foi observada na extração de proteoglicanos (UENO et al., 1999).

O decréscimo da estabilidade térmica do perimísio possui correlação com o amaciamento da carne e do tecido conjuntivo intramuscular que a pressurização pode refletir na quebra da estrutura do tecido conjuntivo intramuscular ou moléculas de colágeno (ICHINOSEKI et al., 2006). Em termos de alterações no colágeno, verificou-se que a T_p de perimísio de mamíferos é aproximadamente 65°C, sendo esses valores alteram para diferentes músculos e espécies de animais. A T_0 é utilizada para descrever o perimísio menos estável e a T_p para quantificar a estabilidade média do perimísio. Bailey e Light (1989) constataram uma pequena diferença entre diferentes músculos, espécies animais e tipos de colágeno. Nesse estudo, as porções de perimísio e endomísio não eram porções colagenosas de tecido conjuntivo puras, devido à mistura de proteínas do tecido miofibrilar e conectivo que dificultaram a homogeneização e separação dos componentes misturados perfeitamente. Embora as amostras de DSC não foram colágenos puros, as temperaturas de encolhimento térmico do colágeno foram semelhantes aos relatados na carne inteira.

A Tabela 13 apresenta o comportamento térmico do colágeno através das temperaturas inicial, média e final do perimísio conforme o tempo e o nível de pressurização.

Tabela 13. Temperatura inicial, de pico e final do perimísio dos tratamentos.

Tempo	Tratamento	Temperatura Inicial (T_0 em °C)	Temperatura Média (T_p em °C)	Temperatura Final (T_f em °C)
Zero	TC	55.66 ± 1,74 ^a	62.52 ± 1,0 ^a	78,54 ± 1,63 ^a
	T2 (200 MPa)	54.12 ± 4,74 ^a	69.39 ± 6,73 ^a	76,70 ± 8,12 ^a
10 minutos	T4 (400 MPa)	54.51 ± 0,70 ^a	62.89 ± 1,70 ^a	75,85 ± 4,68 ^a
	T6 (600 MPa)	57.59 ± 1,20 ^a	64.38 ± 0,40 ^a	77,63 ± 2,16 ^a
	T8 (200 MPa)	52.82 ± 1,18 ^a	59.51 ± 1,10 ^a	71,27 ± 3,42 ^a
20 minutos	T10 (400 MPa)	52.36 ± 0,11 ^a	60.58 ± 1,0 ^a	71,30 ± 0,70 ^a
	T12 (600 MPa)	55.63 ± 1,30 ^a	60.31 ± 0,78 ^a	76,38 ± 0,98 ^a

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste Tukey

As temperaturas térmicas foram analisadas e os tratamentos por APH a 10 min. obtiveram um leve aumento nos valores térmicos que nos tratamentos por 20 min. Entretanto, verifica-se que as temperaturas térmicas do colágeno não diferem significativamente entre os tratamentos conforme o nível e o tempo de pressurização.

Estes resultados estão em desacordo com o encontrado por Chang et al. (2012), que estudaram o comportamento térmico do perimísio em músculo Semitendinosus processados por alta pressão hidrostática. Foram analisadas as temperaturas de encolhimento térmico, incluindo temperatura inicial, temperatura de pico e temperatura final (T_f). As T_0 e T_f do perimísio apresentaram a mesmas tendências de variação mesmo durante altas pressões de processamento. Os valores de T_0 e T_f para o produto pressurizado por 20 minutos foram maiores que os tratados por 10 minutos, com exceção da amostra a 600 MPa. Houve ligeiras mudanças na temperatura de T_f do perimísio para amostras pressurizadas.

Chang et al. (2012) também constataram que os efeitos da alta pressão hidrostática sobre as temperaturas de encolhimento térmico do endomísio do músculo Semitendinosus são mais significativas que do perimísio, especialmente em pressões elevadas (≥ 500 MPa) e com o tempo de processamento maior (20 minutos). Em pressões acima de 500 MPa, o longo tempo de processamento pode levar às temperaturas elevadas de encolhimento térmico do endomísio, principalmente em Tp. Constataram, também, que o pico de temperatura do endomísio após o processamento por 20 minutos foi maior que o processado por 10 minutos quando a pressão está entre 500 MPa e 600 MPa. Isso provavelmente pode ser justificado pelo enfraquecimento da estabilidade média do perimísio, resultando em gelificação e desnaturação promovida pela alta pressão (CHANG et al., 2012).

4.4 Visualização do perimísio

A Figura 22 apresenta os resultados dos perimísios pressurizados através da análise de microscopia eletrônica de varredura.

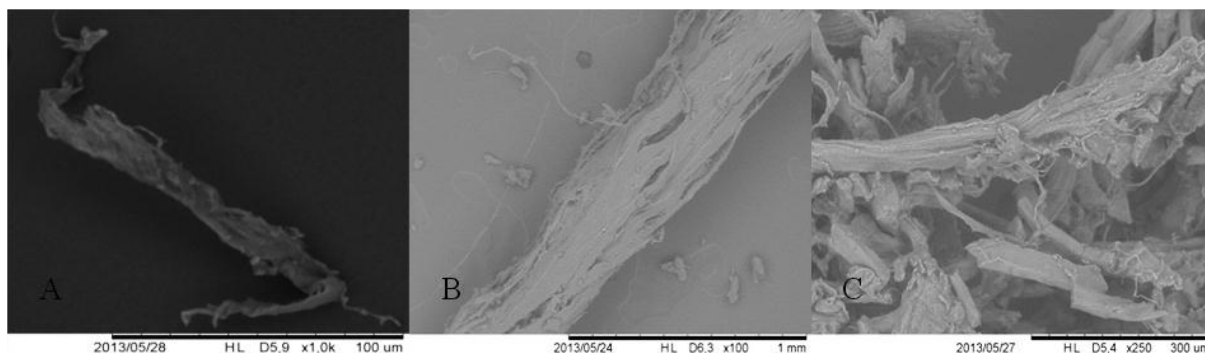


Figura 22. Imagens dos liofilizados.

(A) Fibra controle a 1000x de aproximação; (B) Fibra pressurizada a 200 MPa/10 min a 100x de aproximação; (C) Fibra pressurizada a 600 MPa/20min a 250x de aproximação.

Não foi possível visualizar pela microscopia disponível as modificações geradas pela APH. Apesar de o material ter sido extraído e liofilizado, essa análise foi uma tentativa de acompanhar as mudanças ocorridas pelo processamento. Possivelmente, devido à metodologia utilizada e limitações de infraestrutura, não foram encontradas alterações que corroborassem com a literatura e com os resultados encontrados neste trabalho.

Em outros trabalhos, a microscopia eletrônica de varredura foi realizada em tecido intramuscular conectivo em bovinos, após pressurização de 150 MPa e 500 MPa e em controle sem pressurização. Foram destacadas as folhas do perimísio, que consistem em fibras de colágeno em um padrão ondulado extremamente regular (ICHINOSEKI et al., 2006). Tais resultados foram semelhantes ao encontrado por Nishimura et al. (1994).

Esperava-se encontrar, neste trabalho, a visualização de um aumento no índice de fragmentação das amostras de colágeno. Conforme o trabalho de Suzuki et al. (1990), que mostraram o pequeno decréscimo que é inferior a 10% no músculo não tratado, tal índice foi acelerado por pressurização e alcançou 30%, 70%, 80% e 90% a 100, 150, 200 e 300 MPa, respectivamente. O decréscimo na fragmentação, 80 a 90%, é além do nível máximo da fragmentação das miofibrilas, que naturalmente ocorrem no músculo condicionado. Dos

resultados dessa fragmentação, uma pequena exposição do músculo *post-rigor* na pressurização parece ser útil para o amaciamento da carne.

Neste mesmo trabalho, foram analisados os efeitos da alta pressão hidrostática na estrutura miofibrilar em músculo bovino *post-rigor*. Nas miofibrilas pressurizadas a 100 MPa, a contração do sarcômero foi observada e a diferença na densidade entre a banda-A e a banda-I tornou-se indistinguível quando comparada com o controle, sem pressurização. Marcada ruptura das estruturas dos filamentos da banda-I e a perda de materiais da linha-M foram observadas nas miofibrilas do músculo pressurizado a 150 MPa. Já nas miofibrilas dos músculos pressurizados a 200 MPa, a continuidade estrutural do sarcômero foi quase completamente perdida, com a quebra dos filamentos A e I, distribuídos pelo sarcômero. Foi observado perda completa da linha-M e espessamento da linha-Z, provavelmente pelo colapso do filamento-I. Foi observada a clivagem da banda-A em razão dessas muitas mudanças nas miofibrilas de músculos pressurizados a 300 MPa. O comprimento do sarcômero, inicialmente contraído pela pressurização a 100 MPa, parecia ter gradualmente recuperado com o aumento da pressão por causa do aumento contínuo da perda estrutural. Como foi mencionado, a fragmentação das miofibrilas durante condicionamento é derivado da quebra das miofibrilas na linha-Z, ao passo que a linha-Z nas miofibrilas fragmentadas dos músculos pressurizados aparentemente permaneceu intactas. Nesse sentido, o mecanismo para a quebra da continuidade estrutural das miofibrilas induzidas pela pressurização pode ser diferente do que o músculo condicionado.

Apesar de um curto tempo (5 minutos) e baixa temperatura (cerca de 10°C) do tratamento de pressão aplicada ao músculo em *post-rigor*, mudanças na ultraestrutura das miofibrilas foram principalmente de acordo com os reportados por Macfarlane e Morton (1978) e Locker e Wild (1984). A aplicação por APH é conhecida por influenciar o estado de agregação da actina e miosina, que são os principais constituintes das miofibrilas. Diversos estudos descrevem a despolimerização da actina-F, polímero de miosina e actomiosina sob pressurização. Ainda não é claro como a despolimerização da actina-F ocorre no músculo pressurizado *in situ*, degradação dos filamentos-I pode ser uma das causas da fragmentação. Uma aceleração da fragmentação das miofibrilas e coagulação de cada proteína miofibrilar em um estado dissociado sugerido por Macfarlane (1985) pode causar o amaciamento da carne exposta à APH.

Por outro lado sabe-se que o colágeno é uma proteína fibrosa caracterizada por grande diversidade biológica e ampla força de tensão. Esta diversidade na sua estrutura e função pode ser observada nas diferentes formas de ocorrência do colágeno, como por exemplo: na presença de fibras colágenas nos tendões, fibras entrelaçadas formando camadas flexíveis na pele, películas transparentes de fibras finas na córnea, estrutura de membrana amorfa presente na cápsula e nos glomérulos renais, na lubrificação de cartilagem das articulações, presença de colágeno mineralizado no osso, na dentina e filamentos finos circundando e suportando as células; promovendo então, elasticidade e resistência à pele, aos músculos, tendões, ligamentos, distribuindo fluidos nos vasos sanguíneos e linfáticos, e auxiliando na deposição mineral nos ossos, entre outros (SARCINELLI et al., 2007). Nesse sentido, para cada caso os parâmetros de aplicação da APH deverá ser considerado e somente conhecendo-se as suas características de reprodutibilidade dos tratamentos por APH oferecerão a garantia da qualidade do processo em questão.

5 CONCLUSÃO

As modificações ocorridas no perimísio foram notadas pela análise eletroforética. Os resultados mais evidentes são em torno das bandas próximas de 200 kDa, que representam as proteínas β da cadeia de colágeno e em torno de 180 kDa da cadeia pesada da miosina. Já as cadeias com 103 kDa representam as proteínas α da cadeia de colágeno.

Além disso, novas faixas de peptídeos foram observadas nos tratamentos em relação à amostra controle. O melhor tratamento que expressa essa mudança é o T4 (400 MPa por 10 minutos), onde se nota a formação de bandas em torno de 100 kDa. Esse fato pode consequência da mudança ocorrida no perimísio pela APH, por proteínas miofibrilares e, ou sarcoplasmáticas.

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que a pressurização é capaz de aumentar a solubilização do colágeno, pela ação direta na alteração de estrutura ou pelo incremento da atividade enzimática da carne.

Utilizando a análise de microscopia eletrônica de varredura, não foi possível visualizar alterações no perimísio.

Verificou-se que o endomísio sofreu as maiores alterações nas condições menos drásticas, ou seja, o tempo e a pressão são menores, enquanto as maiores modificações no perimísio foram observadas nas condições mais drásticas.

De acordo com o presente trabalho, pode-se concluir que a APH é capaz de modificar a estrutura do perimísio e endomísio. Sugere-se a realização de novos estudos para aprofundar a compreensão da influência da pressurização na formação das aminas biogênicas, na solubilização do colágeno e de suas enzimas, com a possibilidade de não somente amaciar a carne e reduzir o tempo de maturação, mas também no desenvolvimento de novos produtos cárneos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Relatórios detalhados sobre as exportações de carne brasileira**. São Paulo: 2013. Acesso em: 25 jan. 2013. Online. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=842#.UQUMfmfFCbc>>.

ABREU, R.L. **Análise de hipoxantina e hidroxiprolina em carne resfriada de javali (*Sus scrofa scrofa*) por cromatografia líquida de alta eficiência e averiguar a relação entre tempo, temperatura e pH com a concentração de hipoxantina**. 2008. 101f. Niterói. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

AERTSEN, A.; MEERSMAN, F.; HENDRICKX, M. E. G.; VOGEL, R. F.; MICHIELS, C. W. Biotechnology under high pressure: Applications and Implications, **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 434-441, 2009.

ABERLE, E. D.; REEVES, E. S.; JUDGE, M. D.; HUNSLEY, R. E.; PERRY, T. W. Palatability and muscle characteristics of cattle with controlled weight gain: Time on a high energy diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 52, p. 757-763, 1981.

ABERLE, E. D.; FORREEST, J. C.; EDWAR, W. M. **Principles of meat science**. 4th. ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.

AKTAS, N. The effects of pH, NaCl and CaCl₂ on thermal denaturation characteristics of intramuscular connective tissue. **Thermochemica Acta**, v. 407, p. 105-112, 2003.

ALVES, D. E.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina: uma revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 193-216, 2007.

AOAC, Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis**. Arlington: AOAC, 1995. v. 2, Cap. 39 Meat and meat products, p.13-15.

ARNOCZKY, S. P.; AKSAN, A. Thermal modification of connective tissues: basic science considerations and clinical implications. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, p. 305-313, 2000.

ASGHAR, A.; HENRICKSON, R. L. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. **Advances in Food Research**, v. 28, n. 23, p. 1-372, 1982.

AVERY, N. C.; BAILEY, A. J. The effects of the maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagens. **Pathologie Biologie**. Paris, v. 54, p. 387-395, 2006.

AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v. 78, n. 1, p. 114-129, 2008.

BADEA, E.; MIL, L.; BUDRUGEAC, P.; GIURGINCA, M.; MASIC, A.; BADEA, N.; GATTA, G. D. Study of deterioration of historical parchments by various thermal analysis

techniques complemented by SEM, FTIR, UV-VIS-NIR and unilateral RMN investigations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, p. 17-27, 2008.

BALASUBRAMANIAM, C.; KANNAN, R.; REVASHETTI, S. B.; SAMPATH, S.; KATCHAPALAYAM, B. 2004. U.S. **Patent No. 6,701,441**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

BALASUBRAMANIAM, V. M.; FARKAS, D. High-Pressure Processing, **Food Technology**, v. 11, p. 33-38, 2008.

BALASUBRAMANIAM, V. M.; FARKAS, D.; TUREK, E. **Preserving foods through high-pressure processing**. *Food technology*, v. 62, n. 11, p. 32-38, 2008.

BAILEY, A. J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mechanisms of Ageing and Development**. Limerick, v. 122, p. 735-755, 2001.

BAILEY, A. J.; ETHERINGTON, D. J. Metabolism of collagen and elastin. In: FLORKIN, M.; STOTZ, E. H. **Comprehensive biochemistry**. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1980. chap. 19b, p. 299-432.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **The connective tissue of meat and meat products**. London: Elsevier, 1989. 356 p.

BAILEY, A. J.; SIMS, T. J. Meat tenderness: distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 28, p. 565-570, 1977.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114p.

BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Analytical Chemistry**. Washington, v. 35, n. 12, p. 1961-1965, 1963.

BERNAL, V. M.; STANLEY, D. W. Stability of bovine muscle connective tissue. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 876-878, 1987.

BOLEMAN, S. J.; MILLER, R. K.; BUYCK, M. J.; CROSS, H. R.; SAVELL, J. W. Influence of realimentation of mature cows on maturity, color, collagen solubility, and sensory characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 2187-2194, 1996.

BOUTTEN, B.; BRAZIER, M.; MORCHE, N.; MOREL, A; VENDEUVRE, J. L. Effects of animal and muscle characteristics on collagen and consequences for ham production. **Meat Science**, v. 55, n. 2, p. 233-238, 2000.

BURSON, D. E.; HUNT, M. C. Heat-induced changes in the proportion of types I and III collagen in Bovine *Longissimus dorsi*. **Meat Science**, Barking, v. 17, p. 153-160, 1986.

BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging technologies: Chemical aspects, **Food Research International**, v. 35, n. 2. p.279- 284, 2002.

BUZRUL, S.; ALPAS, H.; LARGETEAU, A.; BOZOGLU, F.; DEMAZEAU, G. Compression heating of selected pressure transmitting fluids and liquid food during high

hydrostatic pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 466-472, 2007.

BYRNE, K. A.; WANG, Y. H.; LEHNERT, S. A.; HARPER, G. S.; MCWILLIAM, S. M.; BRUCE, H. L.; REVERTER, A. Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1-12, 2005.

CABRAL NETO, O. Modificações físico-químicas na carne *in natura* bovina decorrentes da alta pressão hidrostática. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 14, n. 2, p. 91-100, 2011.

CAMPOS, F. P. **Estudo do processamento de suco de laranja através da tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão**. 2004. 100f. Campinas. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 845p.

CANHOS, D. A. L.; DIAS, E. L. **Tecnologia de Carne Bovina e Produtos Derivados**. Campinas: FTPT, 1985. 440p.

CHAMPE, C. P.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1996. 446 p.

CHANG, H. J.; NIU, X. Y.; TANG, C.; WANG, Q. Effects of High Pressure Processing on Physical and Chemical Quality of Beef. **Food Science**, v. 34, n. 7, 2012.

CHANG, H. J.; NIU, X. Y.; TANG, C. Effects of High Pressure Processing on Thermal Characteristics of Perimysium and Endomysium Collagen from Beef Semitendinosus Muscle. **Food Science**, v. 34, n. 13, p. 14-18, 2013.

CHAWLA, R.; PATIL, G. R.; SINGH, A. K. High Hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review, **Journal of Food Science Technology**, v. 48, p. 260-268, 2011.

CHEFTEL, J. C. High pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v. 1, p. 75-90, 1995.

CHEFTEL, J.; CURIOLI, J. Effects of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, p. 46, n. 3, p. 211-236, 1997.

DONG SUN, X.; HOLLEY, R. A. High Hydrostatic Pressure Effects on the Texture of Meat and Meat Products. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 17-23, 2010.

DONSÌ, G.; FERRARI, G.; MARESCA, P. Pulsed high pressure treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of process parameters. **Journal of Food Engineering**. v. 78, n. 3, p. 984-990, 2007.

DRANSFIELD, E. Intramuscular composition and texture of beef muscles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, p. 833-842, 1977.

DUARTE, M. S., P. V. R. Paulino, M. A. Fonseca, L. L. Diniz, J. Cavali, N. V. L. Serão, L. A. M. Gomide, S. F. Reis, and R. B. Cox. Influence of dental carcass maturity on carcass traits and meat quality of Nelore bulls. **Meat Science** v. 88, n. 3, p. 441-446, 2011.

DUTSON, T. R. Relationship of pH and temperature to distribution of specific muscle proteins and activity of lysosomal proteases. **Journal of Food Biochemistry**. v. 7, p. 223-245, 1983.

EARNSHAW, R. G.; APPELYARD, J.; HURST, R. M. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p.197-219, 1995.

EGELANDSDAL, B.; DINGSTAD, G.; TOGERSEN, G.; LUNDBY, F; LANGSRUD, O. Autofluorescence quantifies collagen in sausage batters with a large variation in myoglobin content. **Meat Science**, v. 69, p. 35-36, 2005.

EISENMENGER, M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 331-347, 2009.

FARKAS, D. F. High - Pressure processing Pathways to commercialization. In Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D., Yuan, J.T.C., **Nonthermal Processing Technologies for Food**. Iowa, E.U.A: Wiley-Blackwell, 2011. p. 28-35.

FAUSTO, D. A. **Contribuição do tecido conjuntivo intramuscular na textura da carne de fêmeas zebuínas adultas submetidas a diferentes sistemas de manejo**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center For Food Safety And Applied Nutrition. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies**. High Pressure Processing. 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101456.htm>>. Acesso em: 09 dez 2011.

GARRIGA, M. et al. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, p. 451-457, 2004.

GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Advanced decontamination technologies: High hydrostatic pressure on meat products. In: TOLDRÁ, F. **Safety of meat and processed meat**. New York: Springer, 2009. p. 183–208.

GASPAR, A. **Avaliação do abate e da quantidade da carne de tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro para consumo humano**. 2003. 145f. Niterói. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense.

GOLL, D. E.; HOEKSTRA, W. G.; BRAY, R. W. Age-associated changes in bovine muscle connective tissue. II. Exposure to increasing temperature. **Journal Food Science**, Champaign, v. 29, p. 615, 1964.

GUIMARÃES, E. Safra 2010: Brasil está na vanguarda dos produtores mundiais de alimentos. **Blog do Planalto**. Disponível em: <<http://blog.planalto.gov.br/safra-2010-brasil-esta-na-vanguarda-dos-produtores-mundiais-de-alimentos/#more-21097>>. Acesso em: 19 jun. 2011.

GREBOL, N. Commercial use of high hydrostatic pressure of sliced cooked ham in Spain. In: HAYASHI, R. **Progress in biotechnology**. Kyoto: Elsevier, v. 19. p.385-388, 2002.

HAN, J. H. Packaging for NonThermal processed Foods. In HAN, J. H. **Packaging for Nonthermally processed foods**. Reino Unido: Blackwell Publishing. 2007. p. 3-16.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN der BROECK, I.; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality, **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 197-203, 1998.

HEREMANS, K.; SMELLER, L. Review: Protein structure and dynamics at high pressure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1386, p. 353-370, 1997.

HERRING, H. K.; CASSENS, R. G.; BRISKLEY, E. J. Factors affecting collagen solubility in bovine muscles. **Journal of Food Science**, v. 32, p. 534-538, 1967.

HILL, F. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 31, p. 161-166, 1966.

HINRICHS, J.; RADEMACHER, B.; KESSLER, H. G. **Reaction kinetics of pressure-induced denaturation of whey proteins**. *Milchwissenschaft*, v. 51, n. 9, p. 504-509, 1996.

HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M.; FARKAS, D. F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**, v. 43, n. 3, p. 99-107, 1989.

HOOVER, D.G. Pressure effects on biological systems. **Food Technology**, v.47, p.150-155, 1993.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J. M. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. **Meat Science**, v. 62, p. 359-371, 2002.

ICHINOSEKI, S.; NISHIUMI, T.; SUZUKI, A. Tenderizing effect of high hydrostatic pressure on bovine intramuscular connective tissue. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 276-281, 2006.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Other food protection methods. In Jay, J. H., Loessner, M. J., Golden, D. A, **Modern Food Microbiology**, 7th ed. p.457-470. New York: Springer. 2005.

JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; BOVER-CID, S.; GARRIGA, M. Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. **International Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 497-503, 2010.

JUDGE, M.; ABERLE, A.; FORREST, J.; HEDRICK, H.; MERKEL, R. **Principles of meat**

science. 2nd ed. Kendall/Hunt publishing company. 1989.

JUNG, S.; GHOU, M.; LAMBALLERIE-ANTON, M. Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing. **Meat Science**, v. 56, n. 3, p. 239–246, 2000.

JUNG, S.; SAMSON, C. T.; LAMBALLERIE-ANTON, M. High hydrostatic pressure food processing. In PROCTOR, A. **Alternatives to conventional food processing**, p. 254-296. E.U.A: RSC Publishing. 2011.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KEIM, S.; HINRICHS, J. Influence of stabilizing bonds on the texture properties of high pressure induced whey protein gels. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 355-363, 2004.

KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxiprolin as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **Journal – Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 54- 57, 1990.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v. 36, n. 1, p. 93-104, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBALLERIE-ANTON, M.; TAYLOR, R. G.; CULIOLI, J. High pressure processing of meat. In: KERRY, J.; KERRY, J.; LEDWARD, D. **Meat processing: Improving quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, v. 16, p. 313-324, 2002. 492p.

LAWRIE, R. A. **Ciencia de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1977. 455 p.

LEE, J. E.; KIM, Y. H.; LEE, N. H.; HONG, S. I.; YAMAMOTO, K. KIM, Y. J. The role of sarcoplasmic protein in hydrostatic pressure-induced myofibrillar protein denaturation. **Meat Science**, v. 87, p. 219-222, 2011.

LEE, J. E.; KIM, J. Y.; LEE, H. N.; HONG, I. S.; YAMAMOTO, K. Differences in properties of myofibrillar proteins from bovine semitendinosus muscle after hydrostatic pressure or heat treatment. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 40-46, 2007.

LI, C.; ZHOU, G.; XU, X. Changes of meat quality characteristics and intramuscular connective tissue of beef *semitendinosus* muscle during post mortem aging for Chinese Yellow bulls. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 838-845, 2008.

LIGHT, N.; CHAMPION, A. E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. **Journal of Food Chemistry**, Westport, v. 219, p. 1017-1026, 1984.

LISTRAT, A.; HOCQUETTE, J. F. Analytical limits of total and insoluble collagen content measurements and of type I and III collagen analysis by electrophoresis bovine muscles. **Meat Science**, v. 68, p. 127-136, 2004.

LISTRAT, A.; LETHIAS, C.; HOCQUETTE, J. F.; RENAND, G.; MÉNISSIER, F.; GEAY, Y.; PICARD, B. Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. **The Histochemical Journal**, v. 32, p. 349-356, 2000.

LOEY, A. V. et al. High hydrostatic Pressure Technology In.:Zeuthen, P., Bagh-Sorensen, L. **Food Preservation Technique**, p. 428-441. E.U.A: Food Science and Technology, 2003.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: Luchiari Filho, A. 2000. 135p.

MA, H. J.; LEDWARD, D. A. High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. **Meat Science**, v. 68, p. 347-355, 2004.

MACFARLANE, J. J. High pressure technology and meat quality. In: Lawine, R. A. (Ed.). **Developments in Meat Science**. London: Elsevier Applied Science. 1985. p 155-84. vol. 3.

MACFARLANE, J. J.; MORTON, D. J. Effects of pressure treatment on the ultrastructure of striated muscle. **Journal of Food Science**, v. 2, p. 281-288, 1978.

MIN, S.; ZHANG, Q. H. Packaging for High-pressure processing, irradiation and pulsed electric field processing. In: HAN, J. H. **Packaging for Nonthermal Processing of Food**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 67-83.

MURCHIE, L. W.; CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; SMIDDY, M.; KELLY, A. L. High pressure processing of Shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 257-270, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**. New York, v. 39, n. 3, p. 261-272, 2003.

NEUMAN, R. E.; LOGAN, M. A. The determination of hydroxyproline. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v. 184, p. 299-306, 1950.

NISHIMURA, T. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. **Animal Science Journal**. v. 81, p. 22-27, 2010.

NISHIMURA, T. Structural changes in the intramuscular connective tissue during development of bovine semitendinosus muscle. **Tissue and Cell**, v. 28, p. 527-536, 1996.

NISHIMURA, T. et al. Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. **Acta Anat**, v. 151, p. 250-257, 1994.

NORTON, T.; SUN, D-W. Recent Advances in the Use of High pressure as an effective processing technique in the food industry. **Food Biopress Technology**, v. 1, p. 2-34, 2008.

OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. **Industrialización de subproductos de origen**

animal. Zaragoza: Acribia; 1994.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: no caminho da pesquisa**. Cocal do Sul: Imprint; 2001.

PALMIERI, L. C. **Estudo do enovelamento e agregação do monômero da proteína amiloidogênica transtirretina (M-TTR)**. 2005. 105f. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

PALOU, E. High pressure Treatment in Food preservation. In: RAHAMAN, M.S. **Handbook of Food preservation**. Nova York: Marcel Dekker. 1999. p. 533-570.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. v. I, 2 ed., Goiânia: CEGRAF; UFG, 2007.

PATTERSON, M. F. A review: Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 1400-1409, 2005.

PATTERSON, M. F.; LEDWARD, D. A.; LEADLEY, C.; ROGERS, N. High Pressure Processing. In: BRENNAN, J. G.; GRANDISON, A. S. **Food Processing Handbook**. Reino Unido: Willey, 2006. p.173-196.

PURSLOW, P. P. Strain-induced reorientation of an intramuscular connective tissue network: implications for passive muscle elasticity. **Journal of Biomechanical**, New York, v. 22, p. 21-31, 1989.

PURSLOW, P. P.; DUANCE, V. C. The structure and function of intramuscular connective tissue. In: HUNKINS, D. W. L. **Connective tissue matrix**. New York: MacMillan, v. 2, p. 127-166, 1990.

PURSLOW, P. P.; TROTTER, J. A. The morphology and mechanical properties of endomysium in series-fibred muscles; variations with muscle length. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, London, v. 15, p. 299-304, 1994.

RAO, B. R., HENRICKSON, R. L. Food grade hide collagen in bologna effect on functional properties, texture and color. **Journal of Food Quality**. v. 6, p. 1-10, 1983.

RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v. 47, n. 1, p. 69-112, 2007.

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. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, Belo Horizonte, 1999.

REISER, K. M.; AMIGABLE, M. A.; LAST, J. A. Non-enzymatic glycosylation of tipe I collagen. **Journal of Biological Chemistry**. v. 267, p. 24207-24216, 1992.

RENAND, G.; PICARD, B.; TOURAILLE, C.; BERGE, P.; LEPETIT, J. Relationship

between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. **Meat Science**. v. 59, p. 49-60, 2001.

RENDUELES, E.; OMER, M. K.; ALVSEIKE, O.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R.; PRIETO, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. **LWT, Food Science and Technology**. v. 44, n. 5, p. 1251-1260, 2011.

RIBEIRO, M. H. L.; AFONSO, C.; VILA-REAL, H. J.; ALFAIA, A. J.; FERREIRA, L. Contribution of response surface methodology to the modeling of naringin hydrolysis by naringinase Ca-alginate beads under high pressure. **LWT-Food Science and Technology**. v. 43, p. 482-487, 2010.

RILEY, D. G.; JOHNSON, D. D.; CHASE, Jr., C. C.; WEST, R. L.; COLEMAN, S. W.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**, v. 70, p. 347-356, 2007.

ROSE, P. I. Gelatin. In: MARK, H. F. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. New York: John Wiley, p. 488-513, 1987.

ROWE, R. W. D. Morphology of perimysial and endomysial connective tissue in skeletal muscle. **Tissue and Cell**, v. 13, p. 681-690, 1981.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. F.; SILVA, L. C. **Estrutura da carne**. Boletim Técnico, Espírito Santo, 2007, 14p.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D. G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Products*, v. 15, p. 1095-1104, 2005.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, AM; IBARZ, A; BARBOSA-CÁNOVAS, GV. La Alta Presión Hidrostática: Una Alternativa en el Procesamiento no Térmico de Alimentos. **Alimentária**, p. 33-43, 1997

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição – Fator de saúde e desenvolvimento**. São Paulo: Almed, 1996. 387p.

SIKES, A.; TORNBERG, E.; TUME, R. A proposed mechanism of tenderizing post rigor beef using high pressure-heat treatment. **Meat Science**, v. 84, p. 390-399, 2010.

SLONGO, A. P. **Uso de alta pressão hidrostática em presunto fatiado: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano**. 2008. 163f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade de Santa Catarina.

SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing, **Food Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 152-158, 1998.

STANTON, C.; LIGHT, N. The effects of conditioning on meat collagen: part 1—evidence for gross in situ proteolysis. **Meat Science**, v. 21, p. 249–265, 1987.

STOLOWSKI, G. D.; BAIRD, B. E.; MILLER, R. K.; SAVELL, J. W.; SAMS, A. R.; TAYLOR, J. F.; SANDERS, J. O.; SMITH, B. Factors influencing the variation in tenderness

of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. **Meat Science**, v. 73, n. 3, p. 475-483, 2006.

SUZUKI, A. KIM, K.; TANJI, H.; NISHIUMI, T. **Application of high hydrostatic to meat and meat processing**. In L. M. L. Nollet, F. Toldrá (Eds.), *Pressure Advanced Technologies for Meat Processing*, p. 194-212. Taylor & Francis Group, 2006.

SUZUKI, A.; WATANABE, M.; IKEUCHI, Y.; SAITO, M.; TAKAHASHI, K. Effects of high pressure treatment on the ultrastructure and thermal behavior of beef intramuscular collagen. **Meat Science**, v. 35, p. 17-25, 1993.

TAYLOR, R. G.; KOOHMARAIE, M. Effects of post mortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipygolongissimus. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2811-2817, 1998.

TARRANT, V. Prioridades na pesquisa para a indústria da carne, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 1., 2001, São Pedro. **Anais...** Campinas: Ital, 2001. p. 380, 2001.

TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; PÉREZ-LÁMELA, C.; VÁZQUEZ, M.; SIMAL-GÁNDARRA, J. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 2, p. 66-80, 2001.

TING, E.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Determining thermal effects in high-pressure processing. **Food Technology**, v. 56, n. 2, p. 31-35, 2002.

TONELLO, C. Case studies on high-pressure processing of foods. In: HOWARD, Z.Q. et al. **Nonthermal processing technologies for food**. Iowa: John Wiley & Sons, 2011. Cap. 4, p. 36-50.

TORNBERG, E. Biophysical aspects of meat tenderness. **Meat Science**, v. 43, p. 175-191, 1996.

TORRES, J. A., VELÁZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 95-112, 2005.

TORRESCANO, G. et al. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. **Meat Science**, v. 64, p. 85-91, 2003.

UENO, Y.; IKEUCHI, Y.; SUZUKI, A. Effect of high pressure treatment on intramuscular connective tissue. **Meat Science**, v. 52, p. 143-150, 1999.

UYTTERHAEGEN, L.; CLAEYS, E.; DEMEYER, D. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 5, p. 1209-1223, 1994.

VAN der REST, M; GARRRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB Journal**, v. 5, p. 2814-2823, 1991.

VELLEMAN, S. The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development. **Poultry Science**, v. 78, p. 778-784, 1999.

VIEIRA, S. **Análise de variância – ANOVA**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. **Fundamentos da bioquímica: A vida em nível molecular**. 2008. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 1264p.

WARRISS, P. D. **Meat Science: An introductory text**. Wallingford: CABI Publishing. CAB Internacional, 2000. 310p.

WOESSNER JUNIOR, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, p. 440-447, 1961.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1886–1894, 2009.

YORDANOV, D. G.; ANGELOVA, G. V. High pressure processing for foods preserving. **Biotechnol. & Biotechnol Eq**, v. 24, p. 1940-1945, 2010.

ZHOU, G. H.; ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation Technologies for fresh meat – a review. **Meat Science**, v. 86, p. 119-128, 2010.

ZIEGLER, F. L. F. **Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos**. 2006. 269p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas.