

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALESSANDRA FERNANDES ROSA

Estudo proteômico do efeito da atmosfera modificada na estabilidade da cor e na vida útil da carne suína acondicionada em embalagens de transporte tipo masterpack sob refrigeração

Pirassununga

2009

ALESSANDRA FERNANDES ROSA

**Estudo proteômico do efeito da atmosfera modificada na
estabilidade da cor e na vida útil da carne suína
acondicionada em embalagens de transporte tipo
masterpack sob refrigeração**

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos
para a obtenção do Título de Doutor
em Zootecnia

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do
Amaral Sobral

**Pirassununga
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

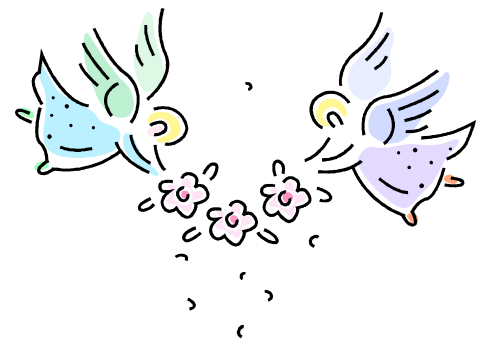
preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

R788e	<p>Rosa, Alessandra Fernandes</p> <p>Estudo proteômico do efeito da atmosfera modificada na estabilidade da cor e na vida útil da carne suína acondicionada em embalagens de transporte tipo masterpack sob refrigeração / Alessandra Fernandes Rosa - Pirassununga, 2008. 126 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Departamento de Zootecnia. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal. Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral.</p> <p>Unitermos: 1. Carne suína 2. Atmosfera modificada 3. Embalagens masterpack 4. Eletroforese bi-dimensional I. Título.</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

*“Não há virtude,
rigorosamente falando,
sem vitória sobre nós próprios,
e nada vale o que nada nos custa”*

(Chico Xavier)



*“Viver é sempre dizer aos outros
o quanto eles são importantes para nós.*

*Por que um dia eles se vão e
ficamos com a nítida impressão
que não amamos o suficiente”*

Dedico este trabalho à minha mãe Nancy
e às minhas filhas Amanda e Giovanna

Agradecimentos

Agradeço profundamente a Deus, pela condução de meus passos nesta jornada;

À FAPESP, pela bolsa de Doutorado (06/50025-6) e Auxílio Pesquisa (06/54338-9);

Ao meu “grande” orientador Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, que muito me honra com a oportunidade de trabalhar junto de si, por todos os ensinamentos e por me fazer enxergar a necessidade da partida...;

Ao meu co-orientador, Prof. Marcelo de Cerqueira César, pela acolhida junto ao Laboratório de Neurociência e Proteômica;

À Prefeitura do Campus de Pirassununga, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Machado de Luca de Oliveira Ribeiro, pelo apoio com a infra-estrutura para o experimento;

Ao Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro, pela amizade e pela análise dos resultados;

Ao Prof. Dr. Albino Luchiari Filho, pelo empréstimo do equipamento e pelos bons conselhos;

À Profa. Catarina Abdala Gomide, pela amizade e incentivos;

À minha irmã de caminhada Mara Aparecida de Aquino, por me ensinar a ter fé e coragem;

À minha amiga Mirele Daiana Poleti, por tudo!

Ao pessoal do LTA pela amizade e paciência comigo, em especial à Mônica, Rose e Bel;

Às meninas do Laboratório de Proteômica, Flávia e Andréia, por todo apoio;

Ao Beto Mazzali, pelo amor e companheirismo;

Ao Srs. Roberto e Nilcelina Mazzali, pelo apoio na retaguarda;

E, aos companheiros do Grupo Socorrista de Ricardo, por todas as orações!!!

Agradeço, finalmente, por todas as dificuldades que enfrentei. Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar!!!

RESUMO

ROSA, A.F. **Estudo proteômico do efeito da atmosfera modificada na estabilidade da cor e na vida útil da carne suína acondicionada em embalagens de transporte tipo masterpack sob refrigeração.** 2008. 103 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Este trabalho teve como objetivo o estudo do efeito da atmosfera modificada associada a embalagens de transporte tipo "masterpack", na vida útil da carne suína refrigerada. Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas, bioquímicas e sensoriais visuais. Foram utilizados cortes de lombo suíno (*Longissimus dorsi*) acondicionados em bandejas de poliestireno expandido recobertas com filme de poli (cloreto de vinila). As bandejas foram acondicionadas em embalagens secundárias de transporte tipo masterpack (6 bandejas por embalagem). Foram utilizados 3 tipos de atmosfera modificada (Composições gasosas): A=75%O₂+25%CO₂; B= 50%O₂+50%CO₂ e C=100%CO₂. As carnes foram armazenadas em câmara frigorífica por 22 dias. Em intervalos pré-determinados (1, 8, 15 e 22 dias) foram realizadas análises microbiológicas (psicrotróficos aeróbios e *Pseudomonas sp.*), físico-químicas (composição gasosa, pH, cor, perda de água por exsudação, perda de água por cocção e maciez), bioquímicas (oxidação lipídica, concentração de metamioglobina e eletroforese bi-dimensional) e sensoriais visuais (em balcão expositor). Observou-se que não houve crescimento de microrganismos psicrotróficos aeróbios e *Pseudomonas sp.* até 15 dias de armazenamento independente da composição gasosa. Houve efeito significativo (P<0,05) de Composição gasosa e de Tempo de armazenamento praticamente em todas as variáveis analisadas, com exceção da perda de água por exsudação, maciez e concentração de metamioglobina. As principais diferenças ocorreram com relação à cor das carnes. De maneira geral, os valores de L* aumentaram durante o armazenamento enquanto que os de a* diminuíram significando que ocorreu certa descoloração da carne. Os bifés das Composições A e B tiveram coloração mais rósea com valores de a* e c* superiores aos da Composição C. As amostras de carne da Composição C tiveram menores valores de TBARS que as demais. A

análise sensorial indicou preferência do consumidor pelas amostras das Composições A e B e os resultados de cor determinados após a análise sensorial indicaram que após a abertura dos masterpacks, os bifes sofreram descoloração, sendo que os bifes da Composição A e B mantiveram a coloração rósea por mais tempo. Na análise de eletroforese bi-dimensional realizada com amostras de carne suína da Composição A em 3 tempos distintos, foram identificados média de 255 spots com ponto isoelétrico variando de 3 a 10 e peso molecular de 13 a 94 kDa. Concluiu-se que, do ponto de vista microbiológico, as três composições gasosas estudadas conservaram os bifes de lombo suíno por até 15 dias de armazenamento, porém, somente as atmosferas com altas concentrações de O₂ (>50%) garantiram a preservação da cor e aparência geral dos bifes. A técnica da eletroforese bi-dimensional é promissora para o entendimento, em nível molecular, das mudanças, principalmente de cor, que ocorrem na carne embalada com atmosfera modificada durante o armazenamento. Porém, ainda há a necessidade de mais estudos.

Palavras-chave: carne suína, atmosfera modificada, proteômica, eletroforese bi-dimensional, vida útil

ABSTRACT

ROSA, A.F. **Proteomics study of the effect of modified atmosphere on colour stability and shelf life of pork meat wrapped in masterpack transport packages under refrigeration.** 2008. 103 p. PhD.Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

The aim of this work was to study the effect of modified atmosphere associated to "masterpack" transport packages in the shelf-life of refrigerated pork meat. Microbiological, physical-chemical, biochemical and visual analyses were made. Pork loin (*Longissimus dorsi*) cuts placed in trays of expanded polystyrene, covered with poly(vinyl chloride) films were used in this study. The trays were placed in a high gas barrier secondary masterpack (78.5 x 48.5 cm, 0.35m², Cryovac) package, with six trays per masterpack (MP). Three modified atmosphere (gas compositions) were tested: A=75%O₂+25%CO₂; B= 50%O₂+50%CO₂ e C=100%CO₂. The meat was kept in a refrigerated chamber for 22 days. At pre-established intervals (1, 8, 15 and 22 days) of storage, microbiological (aerobic psychrotrophic and *Pseudomonas sp.*), physical-chemical (gaseous composition, pH, colour, dripping loss, cooking loss and tenderness), biochemical (lipid oxidation, metmyoglobin concentration and bi-dimensional electrophoresis) and visual analyses were carried out. It was observed that for up to 15 days of storage there was neither growth of aerobic psychrotrophic microorganisms nor *Pseudomonas sp.* independent of the Gas composition. There was significant effect (P<0.05) of Gas composition and of Storage Time in almost all the analyzed variables, except for drip loss, tenderness and metmyoglobin concentration. The main differences found were related to the meat colour. In general, the values of L * increased during storage while a* decreased, meaning some discoloration of meat. The steaks of Gas compositions A and B had better coloration with values of the *a and c * greater than Treatment C. The samples of meat of Gas composition C had lower values for TBARS compared to other treatments. The sensory analysis indicated the panelists' preference for the samples of Gas compositions A and B, and the colour tests made after the sensorial analysis indicated that the steaks of Treatment A and B maintained the pinky coloration for longer time. In the analysis of bi-dimensional electrophoresis applied to the samples of pork loin meat of Treatment A, carried out in 3 replicates, nearly 255 spots were

identified with isoelectric point varying from 3 to 10 and molecular weight from 13 to 94 kDa. Based on the microbiological data, it was concluded that the three studied Gas combinations preserved the pork loin steaks for up to 15 days of storage, however, only the atmospheres with higher concentrations of O₂ (>50%) guaranteed the preservation of the colour and the general appearance of the steaks. The bi-dimensional electrophoresis is a promising technique for the understanding, in molecular level, of the changes, mainly in colour, that happen in modified atmosphere packed meat. However, there is still need for further studies.

Key-words: pork meat, modified atmosphere, proteomics, bi-dimensional electrophoresis, shelf life.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Molécula de mioglobina</i>	19
<i>Figura 2 – Fluxograma de montagem do experimento</i>	30
<i>Figura 3 – Exemplos de bandejas com os bifes</i>	33
<i>Figura 4– Recobrimento das bandejas com os bifes</i>	33
<i>Figura 5 – Montagem das embalagens Masterpack</i>	34
<i>Figura 6 – Cilindros com as misturas gasosas e seladora CVP de ciclo duplo</i>	34
<i>Figura 7 – Embalagens em câmara fria</i>	35
<i>Figura 8 – Analisador de gás portátil</i>	37
<i>Figura 9 – Placas com Pseudomonas sp.</i>	40
<i>Figura 10 – Tubos enriquecidos e Kits de análise para Salmonella</i>	41
<i>Figura 11 – Determinação da Cor</i>	42
<i>Figura 12 – Análise da Força de Cisalhamento com Sonda “Warner Bratzler</i>	45
<i>Figura 13 – Reidratação das “strips” (a) e Focalização Isoelétrica (b)</i>	49
<i>Figura 14 – Corrida eletroforética da segunda dimensão</i>	50
<i>Figura 15 – Balcão expositor com as bandejas para análise sensorial</i>	52
<i>Figura 16 – Aplicação do teste de aceitação</i>	52
<i>Figura 17 – Concentração de O₂ e CO₂ no interior das embalagens</i>	56
<i>Figura 18 – Resultados das contagens de microorganismos psicrotróficos aeróbios</i>	59
<i>Figura 19 – Resultados das contagens de Pseudomonas sp.</i>	60
<i>Figura 20 – Valores médios do pH apresentados por Composição gasosa e Tempo de armazenamento. *Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)</i>	64

*Figura 21 – Valores médios da Perda de Água por Cocção (PAC), apresentados por Tempo de Armazenamento (dias). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 65*

Figura 22 – Valores médios de L^ apresentados por Composição gasosa (a) e Tempo de Armazenamento (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 67*

Figura 23 – Valores médios de a^ por Composição gasosa (a) e Tempo de Armazenamento. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 69*

Figura 24 – Valores médios de b^ apresentados por Composição gasosa. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 71*

Figura 25 – Valores médios de C^ apresentados por Composição gasosa. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 72*

Figura 26 – Valores médios de h^ apresentados por Tempo de Armazenamento. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 74*

Figura 27 – Estudo de regressão para os resultados da análise de TBARS 79

Figura 28 – Valores médios das notas atribuídas para Aparência Geral __ 81

Figura 29 – Valores médios das notas atribuídas para Intenção de Compra 82

Figura 30 – Valores médios de L^ apresentados por Composição gasosa (a) e Tempo de armazenamento (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 85*

- Figura 31 – Valores médios de a^* apresentados por Composição gasosa/Tempo de armazenamento (a) e por dias de display (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) 87
- Figura 32 – Valores médios de b^* apresentados por Composição gasosa (a) e dias de display (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 89
- Figura 33 – Valores médios de C^* apresentados por Composição gasosa/Tempo de armazenamento (a) e Dias de display (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) 90
- Figura 34 – Valores médios de h^* apresentados por Composição gasosa (a) e Tempo de armazenamento (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) _____ 91
- Figura 35 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com extratos de carne contendo 900 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) obtidos 1 e 24 horas post mortem _____ 94
- Figura 36 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com extratos de carne contendo 250 (A) e 500 (B) μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) obtidos 1 hora post mortem _____ 95
- Figura 37 – Termograma de Extratos Cárneos _____ 96
- Figura 38 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com extratos de carne contendo 500 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) em tampão de extração contendo Uréia 8M _____ 98
- Figura 39 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 μg de proteína de músculo suíno (*Longissims dorsi*) com 1 (A1) e 8 (A8) dias de armazenamento da Composição (A) 75%O₂+25%CO₂101

Figura 40 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 µg de proteína de músculo suíno (Longissims dorsi) com 15 (A15) e 22 (A22) dias de armazenamento da Composição (A) 75%O₂+25%CO₂ 102

Figura 41 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 µg de proteína de músculo suíno (Longissims dorsi) com 1 (B1) e 8 (B8) dias de armazenamento da Composição (B) 50%O₂+50%CO₂103

Figura 42 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 µg de proteína de músculo suíno (Longissims dorsi) com 15 (B15) e 22 (B22) dias de armazenamento da Composição (B) 50%O₂+50%CO₂ 104

Figura 43 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 µg de proteína de músculo suíno (Longissims dorsi) com 1 (C1) e 8 (C8) dias de armazenamento da Composição C (100%CO₂)____ 105

Figura 44 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 µg de proteína de músculo suíno (Longissims dorsi) com 15 (C15) e 22 (C22) dias de armazenamento da Composição C (100%CO₂) 106

Figura 45 – Volume de expressão dos spots 1 (A), 7 (B) e 8 (C)_____ 112

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Exemplos de atmosferas utilizadas na embalagem de alimentos*</i>	23
<i>Tabela 2 – Valores de pH obtidos a 1, 6 e 24 horas post mortem</i>	31
<i>Tabela 3 – Caracterização microbiológica da matéria prima</i>	55
<i>Tabela 4 – Número de observações (N), Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV), Mínimo e Máximo das variáveis Psicotróficos aeróbios e Pseudomonas sp.*</i>	57
<i>Tabela 5 – Resumo da Análise de Variância das variáveis psicotróficos aeróbios e Pseudomonas sp.</i>	58
<i>Tabela 6 – Número de observações (N), Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV), Mínimo e Máximo das variáveis</i>	62
<i>Tabela 7 – Resumo da Análise de Variância para as variáveis pH, PAE, PAC e Maciez</i>	63
<i>Tabela 8 – Resumo da Análise de Variância para as variáveis L* e a*</i>	66
<i>Tabela 9 – Resumo da Análise de Variância para as variáveis b* e C*, no experimento</i>	71
<i>Tabela 10 – Resumo da Análise de Variância para a variável h*</i>	73
<i>Tabela 11 – Resumo da análise de variância dos dados de Metamioglobina e TBARS</i>	76
<i>Tabela 12 – Valores médios e erro padrão (EP) da concentração de metamioglobina (%) nas amostras de lombo suíno</i>	76
<i>Tabela 13 – Valores médios e erro padrão (EP) dos resultados das análises de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) em lombo suíno</i>	77
<i>Tabela 14 – Número de observações (N), Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV), Mínimo e Máximo das variáveis estudadas, no experimento</i>	83
<i>Tabela 15 – Resumo da Análise de Variância das variáveis de cor</i>	84
<i>Tabela 16 – Número médio de Spots e erro padrão (EP) apresentados por Composição Gasosa e por Tempo de armazenamento*</i>	107
<i>Tabela 17 – Número de matches observados em relação ao gel “referência”</i>	109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Deterioração microbiológica da carne</i>	13
2.2 <i>Controle da deterioração da carne</i>	15
2.3 <i>Oxidação Lipídica</i>	17
2.4 <i>A cor da carne</i>	18
2.5 <i>Embalagens e atmosfera modificada</i>	20
2.6 <i>Proteômica da Carne</i>	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 <i>Objetivo Geral:</i>	28
3.2 <i>Objetivos Específicos:</i>	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 <i>Período experimental</i>	36
4.2 <i>Análise da Composição Gasosa</i>	36
4.3 <i>Análises Microbiológicas</i>	37
4.4 <i>Análises Físico-Químicas</i>	41
4.4.1 pH e Temperatura.....	41
4.4.2 Cor.....	41
4.4.3 Perda de Água por Exsudação.....	42
4.4.4 Perda de Água por Cocção e Força de Cisalhamento (maciez).....	43
4.5 <i>Análises Bioquímicas</i>	45
4.5.1 Oxidação Lipídica pela análise de TBARS.....	45
4.5.2 Determinação da concentração de metamioglobina.....	46
4.5.3 Eletroforese Bi-Dimensional (2DE).....	47
4.6 <i>Análise Sensorial</i>	51
4.7 <i>Delineamento Experimental</i>	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 <i>Caracterização microbiológica da matéria prima</i>	54
5.2 <i>Composição gasosa do interior das embalagens masterpack</i>	55
5.3 <i>Resultados das análises microbiológicas nas amotras de bife de lombo suíno embalados em três condições de atmosfera modificada</i>	57

<i>5.4 Resultados das análises físico-químicas nas amostras de bife de lombo suíno embalados em três condições de atmosfera modificada</i>	<i>61</i>
<i>5.5 Resultados das de concentração de metamioglobina e TBARS nas amostras de bife de lombo suíno embalados em três condições de atmosfera modificada..</i>	<i>75</i>
<i>5.6 Resultados das análises sensoriais visuais em bifos de lombo suíno expostos em balcão expositor.....</i>	<i>80</i>
5.6.1 Aceitação visual e Intenção de Compra.....	80
5.6.3 Análise Instrumental da Cor.....	82
<i>5.7 Resultados de Eletroforese Bi-dimensional (2DE).....</i>	<i>92</i>
6. CONCLUSÃO	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
8. ANEXOS.....	124

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura industrial vem apresentando elevada taxa de crescimento nos últimos anos, fato este que se deve principalmente ao aumento na produção nacional de suínos que, passou de 1,387 mil toneladas em 1995 para 2,885 mil toneladas em 2006 (ANUALPEC, 2007), elevando o Brasil para o posto de quarto maior produtor e exportador mundial da carne suína. O incremento na produção proporcionou um elevado consumo *per capita*, que atualmente gira em torno de aproximadamente 15 kg/ano conferindo a esta carne, o primeiro lugar das mais consumidas no mundo, seguida pela carne de frango (11,8 kg) e bovina (9,75 kg) (ABIPECS, 2008). No Brasil, o consumo da carne suína segue essa tendência e em decorrência do incremento na produção interna e às campanhas de esclarecimento da população, o consumo *per capita* passou de 7,2 kg em 1970 para 12,7 kg em 2006 (ABIPECS, 2008).

Em produtos cárneos, a perda de qualidade ocorre principalmente devido ao crescimento microbiano, à descoloração, a rancificação e à desidratação superficial. Existe uma atenção especial da indústria na manutenção da qualidade da carne procurando retardar, o tempo que for possível, sua deterioração durante o processo comercial. Para tanto, é necessária a compreensão dos principais mecanismos envolvidos nas degradações *post mortem*, para que estas possam ser minimizadas.

A utilização da tecnologia de atmosfera modificada associada às embalagens de transporte surge como uma ferramenta eficaz na manutenção da qualidade da carne, vindo de encontro às necessidades da indústria frigorífica e do mercado varejista. Portanto, faz-se necessário o conhecimento profundo das principais alterações que ocorrem no armazenamento das carnes sob diferentes composições gasosas e suas implicações, buscando melhor adequação ao mercado brasileiro.

Dessa forma, a premissa deste trabalho foi o estudo do efeito da atmosfera modificada na vida útil da carne suína refrigerada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo definição clássica, carne pode ser considerada como “a parte comestível do músculo esquelético de um animal sadio ao momento do abate” (ABERLE et al., 2001). É quimicamente composta majoritariamente por, água, proteínas, lipídeos e carboidratos e, em menor quantidade por vitaminas, enzimas, pigmentos e compostos aromáticos. A proporção relativa de cada um destes componentes, confere à carne estrutura, textura, aroma, cor e valor nutritivo característicos. Devido à sua natureza química e biológica ímpar, a carne sofre deterioração progressiva desde o momento do abate até o consumo.

Alguns fatores inter-relacionados influenciam a vida útil e manutenção da qualidade da carne, podendo-se citar dentre eles, a temperatura de armazenamento, presença de oxigênio, atividade enzimática, água, luz e, principalmente, presença de microrganismos. Esses fatores atuando em conjunto ou isoladamente podem resultar em mudanças desfavoráveis nos atributos de qualidade da carne.

2.1 Deterioração microbiológica da carne

A contaminação microbiana inicial da carne é resultado da introdução dos microrganismos dentro dos sistema vascular do animal através da ferida da sangria e da utilização das facas não-esterilizadas. Em seguida à sangria, o sangue continua a circular por um pequeno período de tempo, suficiente para que os microrganismos possam ser disseminados por todo o corpo do animal. A contaminação ocorre através da transferência destes microrganismos da superfície para o interior da carne,

durante as operações de desossa, embalagem e distribuição da carne. Outra causa de contaminação da carne é a falta de higiene dos manipuladores (PARDI et al, 1993).

Existem dois grupos de microrganismos importantes que alteram a qualidade da carne: os deteriorantes dos quais são constituídos em sua grande maioria por bactérias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Ancinetobacter*, *Psychrobacter* e *Moraxella* (BORCH et al., 1996) e, os patogênicos, que constituem um perigo potencial para a saúde dos consumidores, dos quais se destacam *Salmonella*, *E. Coli*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. Cabe a indústria inibir o crescimento do primeiro grupo e evitar o máximo possível a contaminação pelo segundo (PORTO, 2006).

A pesquisa de microrganismos indicadores é comumente utilizada para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e indicar riscos de contaminação de origem fecal, bem como as condições higiênico-sanitárias durante o processamento, produção e armazenamento (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A deterioração da carne pode ser definida como um efeito simples ou um conjunto de efeitos de uma evidente atividade microbiana manifestada através de mudanças no odor, sabor ou aparência da carne (GILL, 1996). Pelo fato da deterioração da carne ocorrer, geralmente, em função da atividade de uma população mista de microrganismos, o intervalo de tempo requerido para a deterioração ocorrer depende da composição da carne, do tipo de microrganismos envolvidos e da temperatura de estocagem (LAMBERT et al., 1991).

A flora dominante de carnes estocadas em condições aeróbicas é composta basicamente por *Pseudomonas* que têm uma elevada taxa de crescimento. Esses

microrganismos são nutricionalmente versáteis, porém demonstram preferência à glicose, quando esta se apresenta disponível como substrato. A glicose é relativamente abundante na maioria dos tecidos musculares, permitindo o crescimento de *Pseudomonas* até aproximadamente 10^8 UFC/g antes que esse substrato passe a ser limitado na superfície da carne. Assim que o suprimento de glicose diminui, as *Pseudomonas* passam a utilizar os aminoácidos como substrato para seu crescimento. Embora a utilização da glicose como substrato não implique em produção de subprodutos, na quebra dos aminoácidos, uma série de subprodutos são formados rapidamente os quais são detectados organolepticamente através de odor pútrido.

Segundo Roça e Serrano (1995), ocorre descoloração da superfície da carne em contagens de microrganismos na faixa de 10^6 UFC/g, odores estranhos entre 10^7 UFC/g e 10^8 UFC/g e alterações indesejáveis de sabor e limo superficial entre 10^8 UFC/g e 10^9 UFC/g.

2.2 Controle da deterioração da carne

O desenvolvimento tecnológico no processamento e preservação de alimentos vem oferecendo aos consumidores uma gama de produtos mais seguros e com a vida útil estendida. Conseqüentemente, os consumidores passaram a ser mais seletivos, mais conscientes da qualidade e mais preocupados com as relações custo-benefício, estando cada vez mais sensíveis à presença de odores desagradáveis, sabores fortes, descoloração e outros indícios de deterioração das carnes.

Desde que a carne pôde ser processada e vendida em cortes nas lojas e hipermercados, na maioria das vezes distantes do processador primário, coube a

este segmento empregar métodos de conservação a curto e longo prazo. Tais métodos devem ser eficientes em inibir e/ou eliminar tanto as bactérias patogênicas quanto as deteriorantes sem adição de substâncias tóxicas, e ainda, prolongar a vida útil com manutenção da qualidade inicial. A técnica de preservação aplicada deve preservar as características originais do produto *in natura* por um maior tempo possível.

Dentre os diversos processos físicos, químicos e térmicos disponíveis para extensão da vida útil da carne, a refrigeração é o método mais importante de preservação da carne, embora, segundo Lambert et al. (1991), em condições de refrigeração de 0 a 3°C, continue ocorrendo crescimento de bactérias psicrófilas, principalmente do gênero *Pseudomonas*. Porém, existe a possibilidade de, através da associação de outras tecnologias, se modificarem as condições de estocagem e o ambiente em que essas bactérias são expostas sob as temperaturas de refrigeração. As vantagens da utilização de uma ou mais tecnologias em conjunto são (LAMBERT et al, 1991):

1. Os efeitos colaterais indesejáveis de uma tecnologia isolada podem ser evitados ou reduzidos;
2. O consumo de energia é menor e, portanto, mais econômico do que os métodos convencionais como o congelamento.

Com relação à carne fresca, existem vários métodos de controle de deterioração que empregam uma ou mais barreiras associados à refrigeração. Entre eles incluem-se:

1. Embalagem com atmosfera modificada;
2. Descontaminação química;
3. Doses baixas de irradiação.

2.3 Oxidação Lipídica

Numerosos fatores afetam a oxidação lipídica incluindo a luz, concentração de oxigênio, temperatura, presença de anti e pró-oxidantes, grau de insaturação dos ácidos graxos e presença de enzimas (JAKOBSEN & BERTELSEN, 2000).

Uma vez que a oxidação lipídica ocorre em velocidade inferior à descoloração ou ao crescimento microbiano (ZHAO et al., 1994), normalmente, não é considerada um fator limitante na vida útil de carnes embaladas aerobicamente. Porém, com a utilização de tecnologias de prolongamento da vida útil da carne, onde ocorre supressão destes outros mecanismos de deterioração, a oxidação lipídica pode vir a ser um fator limitante da vida útil.

A deterioração oxidativa dos lipídeos envolve primeiramente reações de autooxidação, as quais são acompanhadas por várias reações secundárias tendo características oxidativas e não oxidativas. Os lipídeos mais importantes envolvidos nesse processo são os ácidos graxos insaturados, como os oléico, linoléico e linolênico (PEARSON et al., 1983).

Os produtos da oxidação de ácidos graxos produzem sabor desagradável usualmente descrito como rancidez (CAMPO et al., 2006). A oxidação lipídica nos sistemas musculares é iniciada nas frações fosfolipídicas da membrana celular onde um radical livre interage com os ácidos graxos formando mais radicais propagando desta forma a cadeia oxidativa (ASHGAR et al., 1988). O malonaldeído é um subproduto formado à partir da oxidação dos ácidos graxos e tem sido medido através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, gerando os valores de TBA, ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os quais têm sido utilizados para estimar o desenvolvimento da rancidez em produtos cárneos.

De acordo com Gray et al.(1996), existe uma relação não muito clara entre oxidação lipídica e oxidação de pigmentos da carne. Pode-se sugerir que as espécies radicais produzidas durante a oxidação lipídica atuem diretamente na oxidação da mioglobina e/ou indiretamente, danificando os sistemas de redução deste pigmento.

2.4 A cor da carne

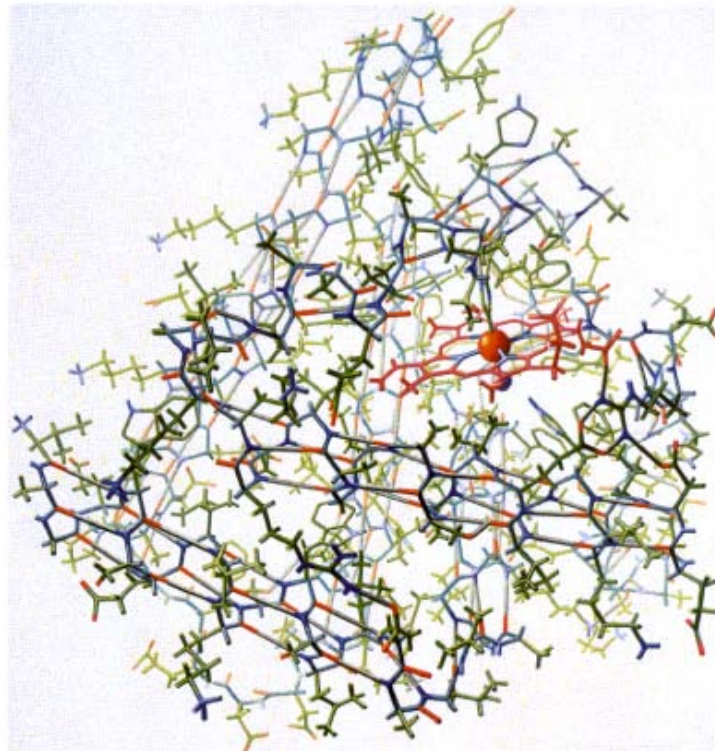
A cor da carne é um dos atributos de qualidade mais considerado pelo consumidor no momento da compra, podendo ser influenciada pela quantidade de pigmentos, forma química desses pigmentos e estrutura da carne. A quantidade de pigmentos no músculo varia de acordo com as raças e também com a função metabólica dos músculos (JOO et al., 1999; LINDAHL et al., 2001).

O maior responsável pela cor das carnes frescas e curadas é o pigmento denominado mioglobina, que faz parte das proteínas sarcoplasmáticas das células musculares (ACTON & DAWSON, 2004) e compreende entre 50 a 80% dos pigmentos da carne dependendo do tipo de músculo (FOX, 1987).

De acordo com Lehninger (2002), a mioglobina é uma proteína simples, solúvel em água, capaz de se ligar ao oxigênio e que pode ser encontrada em quase todos os mamíferos, basicamente no tecido muscular. Tem como função o armazenamento de oxigênio para o metabolismo aeróbio dos músculos.

A molécula de mioglobina consiste em um grupo de hematina ligado a um componente protéico, do tipo globulina, cujo peso molecular é de 17kDa. A porção hematina, ou grupo heme, compreende um anel de quatro núcleos pirrólicos coordenados por um átomo central de ferro (Figura 1). O ferro pode existir tanto na forma reduzida quanto na oxidada. Na forma reduzida pode se combinar com

oxigênio ou óxido nítrico. Porém, a habilidade de combinação com o oxigênio é perdida quando a porção globina da molécula é desnaturada, aumentando a tendência para o ferro se oxidar à sua forma férrica (LAWRIE, 2005).



Copyright © 2000 Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figura 1 – Molécula de mioglobina

* grupo heme (em vermelho) com o íon Ferro (esfera vermelha)

Quando o átomo de ferro se encontra na forma reduzida (Fe^{++}), pode reagir com uma molécula de água, originando a mioglobina ou deoximioglobina, que apresenta coloração vermelho púrpura. Quando o átomo de ferro compartilha elétrons com oxigênio molecular, forma o pigmento denominado oximioglobina, com coloração vermelho vivo. Por outro lado, quando sofre oxidação (Fe^{+++}) forma o pigmento denominado metamioglobina, que confere coloração marrom à carne (ORDÓÑEZ et al., 2005). De acordo com Tang et al. (2005), a oxigenação da

mioglobina é um processo rápido e reversível e, a fração do pigmento na forma oxigenada, aumenta com o aumento da concentração de oxigênio. Por outro lado, a metamioglobina apresenta-se de uma forma mais estável e é reconvertida em mioglobina mais lentamente através da enzima redutora de metamioglobina.

A preservação da aparência dos cortes de carne envolve principalmente a prevenção ou o retardamento da formação da metamioglobina na superfície exposta da carne. Cerca de 20% de metamioglobina na superfície da carne já é suficiente para fazer o consumidor rejeitá-la (GILL, 1996). De acordo com Jeremiah (2001), a utilização de atmosferas ricas em oxigênio, retarda a formação de metamioglobina, entretanto, a quantidade de metamioglobina formada varia de acordo com o tipo de músculo (BEHRENDTS et al., 2003) e aumenta com o aumento da temperatura de estocagem. Jakobsen & Bertelsen (2000) afirmaram que a temperatura de estocagem é o fator de maior importância para manter a oxigenação da cor e um mínimo de oxidação lipídica.

O sistema que melhor combinar embalagem com atmosferas enriquecidas modificadas e baixas temperaturas de estocagem, pode promover maior estabilidade de cor para as carnes frescas.

2.5 Embalagens e atmosfera modificada

De uma perspectiva histórica, os homens têm batalhado no desenvolvimento de meios que promovam a proteção contra estragos causados pelo tempo e pelo ambiente em produtos *in natura* ou processados (PHILIPS, 1996). A embalagem de alimentos existe porque desempenha quatro funções básicas: proteção, contenção, informação e utilidade de uso.

Segundo Jeremiah (2001), a principal função das embalagens de preservação é diminuir a deterioração microbiana através da restrição do desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, principalmente *Pseudomonas*. Porém, comercialmente, outras alterações não microbiológicas também podem ser controladas, como a cor e a umidade.

Existem na literatura, algumas terminologias que se referem a atmosferas gasosas (PHILLIPS, 1996; JEREMIAH, 2001; CUTTER, 2002). Dentre elas, pode-se citar Atmosfera Modificada (ATM) e Atmosfera Controlada (ATC), existindo algumas diferenças entre elas. Basicamente, na utilização da ATM, a composição gasosa é modificada inicialmente e a dinâmica das alterações que ocorrem durante o período de estocagem ou armazenamento depende da taxa de respiração do alimento e da permeabilidade do filme utilizado, ou ainda da estrutura de armazenamento das embalagens. Já na ATC, a atmosfera gasosa é continuamente controlada por todo o período de armazenamento, através da utilização de sachês, por exemplo. Neste estudo, serão abordados os aspectos da ATM e suas implicações.

A utilização de embalagens com atmosfera modificada é uma tecnologia que busca a extensão da vida útil (*shelf life*) de uma gama de alimentos, dentre estes, a carne fresca, ou *in natura* (LUÑO et al., 2000; CAYUELA et al., 2004).

A partir dos anos 70, o desenvolvimento dos polímeros fez a utilização de embalagens com ATM tornar-se um sucesso comercial. Atualmente, os filmes disponíveis para embalagens apresentam diferentes taxas de permeabilidade aos gases para atender às diferentes necessidades dos alimentos (JAYAS & JEYAMKONDAN, 2002).

Recentes avanços na utilização de embalagens com atmosfera modificada têm sido focados na descoberta de uma correta mistura de gases que possam

maximizar a cor inicial, a estabilidade da cor, o tempo de vida útil dessas carnes e, ao mesmo tempo, minimizar o crescimento microbiano e a oxidação lipídica (MANCINI & HUNT, 2005).

As atmosferas mais usadas atualmente combinam concentrações diferentes de oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e nitrogênio (N₂), para conservação tanto sob o ponto de vista microbiano como organoléptico. Mais recentemente, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos com a adição de monóxido de carbono (CO) associado ao CO₂, na manutenção da cor vermelha da carne (VIANA et al., 2005; WILKINSON et al., 2006). A escolha da composição gasosa a ser utilizada deve ser definida pelo tipo de flora microbiana contaminante do alimento, pela sensibilidade do alimento ao O₂ e CO₂ e ainda pela necessidade de manutenção da cor do alimento. Na Tabela 1, apresentam-se as principais atmosferas usadas na conservação dos alimentos.

O oxigênio mantém a mioglobina da carne em sua forma oxigenada, ou oximioglobina, que deixa a carne com uma cor vermelho-cereja, que os consumidores associam à carne fresca. De acordo com Phillips (1996), a carne fresca normalmente é embalada em atmosferas contendo 80% de oxigênio, objetivando-se a obtenção de um nível adequado de oxigenação. O oxigênio pode ainda afetar o crescimento da flora microbiana do produto, promovendo o crescimento das bactérias aeróbias e inibindo as anaeróbias. Baixos níveis de oxigênio (<0,5%) resultam em mudanças na cor da carne fresca e de produtos cárneos para uma coloração marrom/esverdeada característica da metamioglobina (CHURCH, 1994), por outro lado, altas concentrações de oxigênio, podem causar rancidez através dos mecanismos de oxidação, particularmente em produtos com grande quantidade de gordura como o bacon. Alguns autores sugerem que sempre

deve haver pequena concentração de oxigênio nas embalagens para evitar o crescimento de bactérias anaeróbicas patogênicas como o *Clostridium Botulinum*.

Tabela 1 – Exemplos de atmosferas utilizadas na embalagem de alimentos*

Peixe (magro)	40%CO ₂ :30%O ₂ :30%N ₂
Peixe (gordo)	40 - 60%CO ₂ :40 - 60%N ₂
Bacon	20 - 35%CO ₂ :65 - 80%N ₂
Frango cozido	30%CO ₂ :70%N ₂
Frango	100%CO ₂
	25 - 30%CO ₂ :70 - 75%N ₂
	20 - 40%CO ₂ :60 - 80%O ₂
	60 - 75%CO ₂ :5 - 10%O ₂ :20%N ₂
Carne curada	20 - 50%CO ₂ :50 - 80%N ₂
Carne fresca	30%CO ₂ :30%O ₂ :40%N ₂
	15 - 40%CO ₂ :60 - 85%O ₂
Massa	100%N ₂
Queijo	0 - 70%CO ₂ :0 - 30%N ₂
Pães	100%N ₂
	100%CO ₂
	20 - 70%CO ₂ :20 - 80%N ₂
Frutas/Vegetais	3 - 8%CO ₂ :2 - 5%O ₂ :87 - 95%N ₂

* Adaptado de Phillips (1996)

O Dióxido de carbono é o maior fator antimicrobiano na utilização da tecnologia de atmosfera modificada. De acordo com Cutter (2002), a presença de CO₂ além de prolongar a fase lag de crescimento microbiano, diminui a taxa de crescimento durante a fase exponencial. A eficiência do CO₂ é influenciada pela

concentração inicial e final do gás, temperatura de estocagem e pela população microbiana inicial.

Genigeorgis (1985) sugere que a atividade antimicrobiana do CO₂ é resultante da absorção deste gás na superfície do alimento, formando ácido carbônico, o qual promove declínio do pH. O modelo de ação do CO₂ nas bactérias pode incluir alterações nas funções da membrana celular afetando a absorção de nutrientes, inibição ou diminuição das reações enzimáticas, mudanças no pH intracelular e/ou mudanças nas propriedades físico-químicas das proteínas (PHILLIPS, 1996; CUTTER, 2002).

De todo modo, a efetividade do CO₂ como agente microbiano depende muito da flora presente e das características do alimento. De acordo com Phillips (1996), geralmente o CO₂ é mais eficiente em alimentos onde a deterioração é causada por psicrotróficos aeróbios Gram-negativos.

Church (1994) relatou que no passado, alterações indesejáveis de cor na carne foram atribuídas às embalagens contendo 100% CO₂, porém agora, já se sabe que essas alterações são efeito de pequenas quantidades de O₂ no interior da embalagem.

O Nitrogênio é um gás inerte que é utilizado para prevenir o colapso das embalagens. Em produtos embalados com atmosfera modificada, especialmente a carne fresca embalada em altas concentrações de Dióxido de Carbono, pode ocorrer o colapso da embalagem em função da solubilidade do CO₂ na carne. O nitrogênio é utilizado como gás de enchimento porque tem pouca solubilidade em água e lipídios, quando comparado com o CO₂. O nitrogênio também pode ser utilizado em substituição ao O₂ nas embalagens na prevenção da rancidez e inibição do crescimento de microrganismos aeróbios (Phillips, 1996).

De acordo com Jakobsen & Bertelsen (2000), são necessários níveis de oxigênio entre 20 e 50% para promover a estabilidade da cor da carne, porém, esses autores não observaram benefícios adicionais na cor em níveis de oxigênio acima de 55%. Lanari et al. (1995) relataram que amostras de lombo suíno em embalagens contendo 75%O₂ e 25%CO₂ conservaram a cor rósea brilhante por mais de uma semana a 1°C. Porém, Cayuela et al. (2004) não observaram melhora na cor da carne utilizando atmosferas com 70% O₂ e 30%CO₂ e ainda observaram que as altas concentrações de O₂ promoveram a oxidação das gorduras e colesterol.

Em atmosferas com altas concentrações de O₂ e CO₂, o crescimento de *Pseudomonas sp.* é inibido pela alta concentração de CO₂. Ordóñez et al. (1991) e Gill (1996) relataram que 20% de CO₂ já é suficiente para inibir o crescimento de bactérias psicrotróficas pela metade. No entanto, existem na literatura alguns trabalhos (SØRHEIM et al., 1997; LUÑO, et al., 2000; JEREMIAH & GIBSON, 2001; BUYS, 2004) onde foram utilizadas atmosferas com ultra-baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de CO₂, nas quais foi observado que a oxidação lipídica e o crescimento de microorganismos aeróbicos foram minimizados. No entanto, a capacidade do músculo em realizar a oxigenação da mioglobina ("bloom") fica reduzida após um grande período de estocagem, promovendo descoloração da superfície da carne, sendo esse o maior inconveniente desse sistema de embalagem.

2.6 Proteômica da Carne

Pelo fato da proteína ser o principal componente do tecido muscular, a ciência da carne não pode ser dissociada do estudo das proteínas funcionais e estruturais, responsáveis entre outras propriedades pela textura e cor da carne.

Nas últimas décadas, as principais mudanças *post mortem* e a sua relação com os aspectos de qualidade da carne vêm sendo largamente pesquisados através da técnica de eletroforese uni-dimensional e/ou “Western Blotting”, quando do estudo de uma proteína em particular (HWANG et al., 2005). Everett & Zdanis (1988) utilizaram o método da eletroforese uni-dimensional e observaram a degradação de diversas proteínas sarcoplasmáticas. Porém, faltaram respostas de como a degradação destas proteínas se relacionava com a qualidade da carne e ainda, uma caracterização mais detalhada das mudanças moleculares individuais que ocorreram durante o armazenamento.

A análise simultânea das proteínas da carne durante o período de instalação e resolução do *rigor mortis*, é de suma importância para a compreensão das bases biológicas das alterações na carne. No entanto, apenas recentemente, com o desenvolvimento de equipamentos de análise proteômica se tornou possível o estudo de várias proteínas ao mesmo tempo (HWANG et al., 2005).

Segundo definição clássica, proteoma é a proteína complementar do genoma e consiste na quantidade total das proteínas expressas (WILKINS et al., 1996). O objetivo da proteômica é a obtenção de informações sobre a expressão das proteínas celulares e também revelar as funções dos genes. Ultimamente, a proteômica vem também sendo utilizada para explicar como as características hereditárias interagem com o ambiente no controle das funções celulares e fisiológicas dos organismos vivos (BENDIXEN, 2005).

Há 30 anos, iniciou-se o desenvolvimento da tecnologia da 2DE, para a caracterização das vias de expressão das proteínas celulares. No entanto, o desenvolvimento da tecnologia de proteômica atual, teve grande impulso com as informações provenientes dos projetos de seqüenciamento do genoma humano dos

anos 90. A partir daí, rapidamente surgiram estudos dos genomas de mais de 250 organismos vivos, incluindo os genomas de bovinos, suínos e aves.

A eletroforese bi-dimensional (2DE) é uma técnica fundamentada na análise proteômica e tem como objetivo indicar o comportamento das proteínas celulares separando-as em frações individuais de acordo com seu ponto isoelétrico ao longo do eixo X e, com sua massa molecular, ao longo do eixo Y (LAMETSCH & BENDIXEN, 2001).

Estudos recentes demonstram que através da análise proteômica é possível se relacionar mudanças *post mortem* com a maciez da carne (LAMETSCH et al., 2003 e 2006), capacidade de retenção de água (WIEL & ZANG, 2007), L* (HWANG et al., 2005), métodos de abate (MORZEL et al., 2004), mudanças nas proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas (LUCCIA et al., 2005; SAYD et al., 2006; PICARIELLO et al., 2006), entre outros.

Neste contexto, a proteômica surge como uma técnica promissora para que possa se estabelecer uma ligação entre as mudanças das proteínas e a qualidade da carne, propiciando assim, a eleição de alguns biomarcadores para identificação da qualidade da carne (BENDIXEN, 2005).

Além do mais, existem muitas técnicas de processamento e conservação da carne, tais como fermentação, marinagem, liofilização, cozimento, congelamento e atmosfera modificada, entre outros, que influenciam na qualidade da carne através da modificação das suas proteínas. No entanto, os princípios e os mecanismos por detrás destes processos ainda não são suficientemente conhecidos. Assim, a utilização da análise proteômica desponta como de grande valor na otimização das tecnologias de transformação e conservação das carnes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Objetivo geral deste trabalho é o estudo do efeito da atmosfera modificada associada a embalagens de transporte tipo "masterpack", na vida útil da carne suína refrigerada.

3.2 Objetivos Específicos:

- 1) *Estudo microbiológico* do efeito da atmosfera modificada associada a embalagens de transporte tipo "masterpack", na vida útil da carne suína porcionada e armazenada em refrigeração por até 22 dias.
- 2) *Estudo do efeito da atmosfera modificada* sobre as principais propriedades funcionais (cor, textura, capacidade de retenção de água e concentração das proteínas) da carne suína armazenada por até 22 dias, em refrigeração.
- 3) *Estudo proteômico* da carne suína armazenada por 22 dias em refrigeração, em atmosfera modificada, para se verificar as mudanças que ocorrem nos perfis das proteínas e relacioná-las com as principais propriedades funcionais da carne.
- 4) *Estudo da aceitação visual da carne suína pelo consumidor*, após ter sido retirada das embalagens tipo masterpack com atmosfera modificada e submetida a uma condição de varejo por até três dias ("display life").

4. MATERIAL E MÉTODOS

As pesquisas realizadas no contexto deste projeto foram desenvolvidas no Laboratório de Carnes da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), no Laboratório de Tecnologia Alimentos (LTA), no Laboratório de Microbiologia e Micotoxiologia de Alimentos, ambos do Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), e no Laboratório de Neurociência e Proteômica, do Departamento de Ciências Básicas (ZAB), pertencentes à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), da Universidade de São Paulo (USP).

O esquema de desenvolvimento deste trabalho pode ser visualizado na Figura 2. Para este estudo foram adquiridos 20 suínos com Peso Vivo de 90 ± 10 kg de uma granja suinícola particular localizada no município de Pirassununga. Os animais foram entregues pelo proprietário da granja no dia anterior ao abate, diretamente no matadouro-escola (ME) pertencente à PCAPS, onde permaneceram em baias separadas por lotes, em jejum, até o momento do abate. Os animais foram abatidos conforme procedimento rotineiro do próprio ME, descrito na literatura (ROSA et al., 2001).

Os animais foram insensibilizados com insensibilizador elétrico (modelo HS-600, marca GIL) com barra de aplicação manual, com tensão de 200V, amperagem entre 1,5 a 2,0 A, frequência de 60 Hz e tempo de contato dos eletrodos na base das orelhas do animal de três segundos. Imediatamente após a insensibilização, os animais foram abatidos por sangria na veia jugular em posição vertical, seguida de escaldamento, em tanque com água a 75°C, depilagem em máquina, com acabamento à mão, chamoscamento, evisceração, inspeção, serragem das carcaças ao meio e toalete. O pH e a temperatura da carne foram determinados uma hora após a sangria, no músculo *Longissimus dorsi*, entre a 10^a e 11^a costelas das

carcaças direitas. Em seguida, as carcaças foram colocadas em câmara fria (0 - 2°C), para a instalação e resolução do *rigor mortis*, onde permaneceram por um período de 24 horas. Foram tomadas medidas de pH e temperatura também as 6 e 24 horas *post mortem*, no mesmo local onde foram mensuradas as medidas a 1 hora *post mortem*.

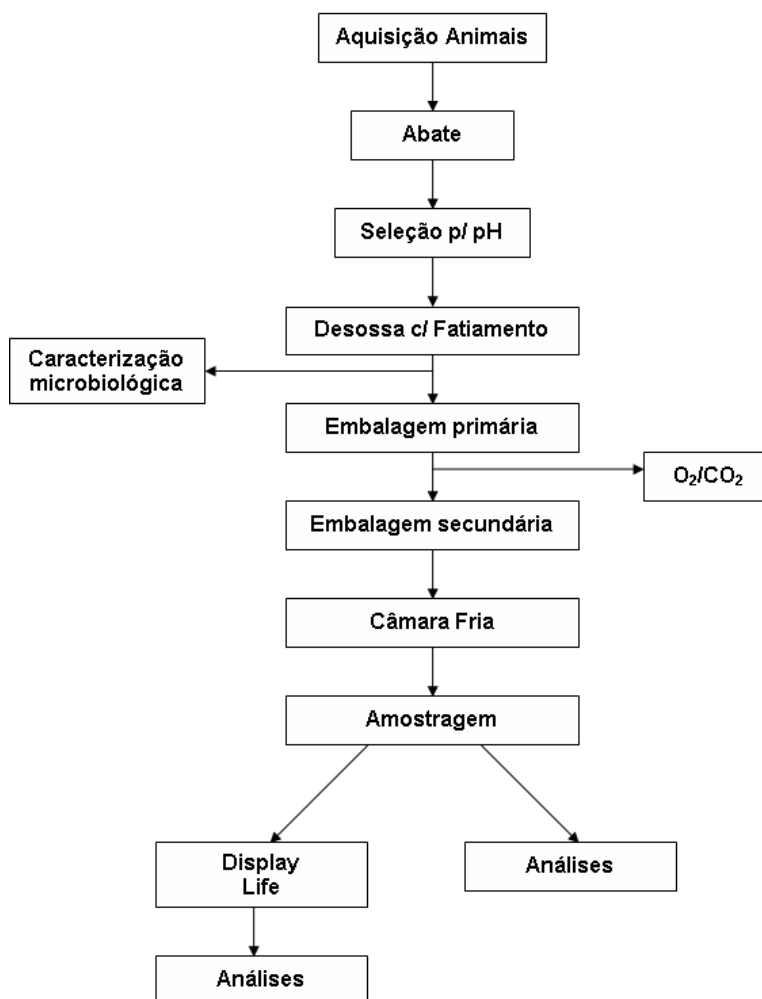


Figura 2 – Fluxograma de montagem do experimento

Foram selecionadas 18 carcaças suínas que tiveram valores de pH dentro da classe considerada normal, ou seja, sem a presença de anomalias PSE (pálida, flácida e exsudativa) ou DFD (escura, firme e dura) que poderiam prejudicar os

resultados do presente trabalho. Assim, foram selecionadas as carcaças que tiveram pH inicial $\geq 6,0$ e pH final entre 5,3 - 5,6, (Buys, 2004) (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de pH obtidos a 1, 6 e 24 horas *post mortem*

Suíno	Sexo	pH (1h)	pH (6h)	pH (24h)
1	F	6,1	5,8	5,2
3	M	6,2	5,6	5,3
4	F	6,0	5,5	5,4
6	M	6,6	5,7	5,6
7	F	6,7	6,3	5,7
8	F	6,5	6,1	5,6
9	M	6,3	5,7	5,5
10	M	6,1	5,6	5,5
12	F	6,1	5,8	5,5
13	F	6,4	5,6	5,5
14	F	6,5	6,2	5,4
15	F	5,9	5,6	5,3
16	F	6,1	5,7	5,7
17	F	6,0	5,6	5,6
18	F	6,4	5,6	5,5
19	F	6,4	6,4	5,7
20	F	6,3	6,2	5,6

As carcaças selecionadas pelos valores de pH foram encaminhadas para a sala de desossa, climatizada (13°C), onde foram feitos cortes entre a 4ª e 5ª costelas de cada meia carcaça para remoção dos lombos (*Longissimus dorsi*). Os lombos foram fatiados, sendo obtidos aproximadamente 50 bifes por animal. Destes, 36 bifes foram acondicionados em uma embalagem de polietileno previamente identificada com o número do animal e nome do grupo de análises às quais seriam destinados. Por exemplo, os bifes das carcaças dos animais 1, 6, 7 e 10 foram destinados para as análises microbiológicas. Os outros 14 bifes que restaram dos 50 foram colocados em outra embalagem para a análise sensorial.

A montagem das bandejas e dos masterpacks foi realizada na mesma sala climatizada onde ocorreu o fatiamento dos bifes, sendo iniciada pela Composição A (75%O₂ + 25%CO₂). Para garantir a aleatorização dos testes foi estabelecido o seguinte esquema: doze bifes eram retirados de uma mesma embalagem e colocados em quatro bandejas de poliestireno expandido com absorvedor de purga, 3 bifes por bandeja, previamente identificadas com o nome do grupo de análises à qual seriam encaminhadas quando da abertura dos masterpacks (p.ex: microbiologia). Na seqüência, essas quatro bandejas, após serem recobertas com o filme de Policloreto de Vinila (PVC) (Figuras 3 e 4), eram colocadas em 4 embalagens masterpacks (1 bandeja por embalagem), também previamente identificadas com a composição gasosa e com o período que permaneceriam em armazenamento (ex: T1A – Composição A, Tempo 1).

As medidas das embalagens masterpacks foram: 78,5 x 48,5 cm, com 0,35m² de área de permeação, com estrutura multicamadas composta por EVA (etini-vinil-acetato), PEBD (polietileno de baixa densidade) e PVDC (Policloreto de Vinilideno), com camada de barreira ao O₂ e vapor de H₂O. As principais propriedades desse filme eram (de acordo com o fabricante, Cryovac):

- espessura, de 48 a 62 µm,
- taxa de permeabilidade (máxima) ao O₂ de 30 cm³/m².dia (1atm/23°C/0%UR),
- taxa de permeabilidade (máxima) ao vapor d'água de 10 gH₂O/m².dia (1atm/38°C/90%UR).



Figura 3 – Exemplos de bandejas com os bifes



Figura 4– Recobrimento das bandejas com os bifes

Em seguida, as bandejas do próximo grupo de análises, por exemplo, físico-químicas eram montadas. Retiravam-se mais doze bifes de outra embalagem, colocando-se três bifes em cada bandeja. Porém, neste caso, eram tomadas as medidas de pH e o peso dos bifes (para a determinação das perdas de água e maciez) antes do recobrimento com o filme de PVC. Após o recobrimento, as bandejas eram acondicionadas dentro das 4 embalagens masterpacks que já continham as bandejas das análises microbiológicas.

Do mesmo modo, foram montadas as bandejas destinadas aos grupos de análises bioquímicas, determinando-se antes do recobrimento com o filme de PVC, a

cor da carne. Nas bandejas destinadas às análises sensoriais foram colocados os bifes retirados da embalagem destinada à análise sensorial (Figura 5). Desta forma, ficaram prontos 4 masterpacks, os quais corresponderam à repetição 1, que foram encaminhados para a adição da mistura gasosa e selagem.

Para a adição da composição gasosa e selagem das embalagens masterpack, foi utilizada uma seladora (mod. A 300, marca CVP), operando com um ciclo de vácuo e outro de injeção de atmosfera a $3,5 \text{ kgf/cm}^2$ (Figura 6). Foi utilizada uma relação 3:1 de volume de gás por kg de carne.



Figura 5 – Montagem das embalagens Masterpack



Figura 6 – Cilindros com as misturas gasosas e seladora CVP de ciclo duplo

Após a selagem, a composição gasosa foi determinada e os masterpacks foram imediatamente transferidos para câmara fria localizada no Laboratório de Carnes (Figura 7), anexo ao Matadouro-Escola da PCAPS, sob temperatura controlada de $2\pm 1^{\circ}\text{C}$, por todo o período experimental. Este procedimento foi realizado mais três vezes, correspondendo às repetições 2, 3 e 4, retirando-se os bifes de outras embalagens, totalizando 16 masterpacks.



Figura 7 – Embalagens em câmara fria

Após a montagem dos masterpacks da Composição A, iniciou-se a montagem das bandejas da Composição B ($50\%O_2 + 50\%CO_2$). Para tanto, foram retirados mais doze bifes da mesma embalagem que anteriormente haviam sido retirados os bifes das análises microbiológicas da Composição A, e colocados nas bandejas das análises microbiológicas, da repetição 1, da Composição B e assim, sucessivamente até a montagem de mais 16 masterpacks da Composição B. Da mesma maneira procedeu-se à montagem dos masterpacks da Composição C ($100\%CO_2$). Este cuidado foi tomado para se garantir que no momento das análises, os bifes provenientes do mesmo animal fossem submetidos ao mesmo grupo de análise em todos os tempos e em todas as Composições gasosas. Vale a pena ressaltar que a

montagem das bandejas e dos masterpacks foi feita rapidamente para se evitar o aumento da temperatura dos bifés.

4.1 Período experimental

O período experimental foi de 22 dias de armazenamento. Durante esse período, em intervalos pré-determinados de 7 dias, que corresponderam a 1, 8, 15 e 22 dias de armazenamento, foram retirados 12 masterpacks da câmara fria (4 por Composição gasosa). Determinou-se a composição gasosa do interior dos masterpacks e, em seguida, as bandejas das análises microbiológicas foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia, as das análises físico-químicas para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos e, as bandejas das análises bioquímicas, para o Laboratório de Carnes, onde foi determinada a cor dos bifés.

Após as medidas de cor, foram retiradas amostras dos bifés, que foram pesadas e em seguida envoltas em papel alumínio, identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As bandejas destinadas às análises sensoriais visuais foram encaminhadas para o restaurante universitário da PCAPS, para exposição em um balcão expositor, onde permaneceram por três dias consecutivos para avaliação visual e determinação do *display life*. Ao final de cada dia de avaliação, 4 bandejas de cada Composição gasosa foram retiradas do balcão expositor e encaminhadas para o Laboratório de Carnes para a determinação da cor.

4.2 Análise da Composição Gasosa

A composição gasosa no interior das embalagens foi determinada diretamente nas embalagens, com um analisador de gás portátil (marca Dansensor, modelo CheckPoint O₂/CO₂), o qual faz a leitura e determinação dos gases (oxigênio e gás carbônico) após punção do filme com uma agulha. O equipamento possui sensor eletroquímico para determinação de O₂ e infravermelho para CO₂ (Figura 8).



Figura 8 – Analisador de gás portátil

4.3 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram conduzidas de acordo com as metodologias do Manual de Microbiologia de Alimentos (SILVA et al. 2001), com exceção da análise de *Salmonella*, que foi conduzida de acordo com o protocolo do Kit Vip Salmonella (Biocontrol System).

Para caracterização da matéria prima, foi realizada pesquisa de *Salmonella*, *S. aureus*, NMP de Coliformes a 35 e 45°C, em amostras de lombo dos suínos selecionados para o experimento. A amostragem da matéria prima foi realizada aleatoriamente, retirando-se dois bifes de lombo dos lotes que continham os bifes para a montagem das bandejas, como explicado anteriormente.

Durante o período experimental, foram realizadas análises para determinação de psicotróficos aeróbicos e *Pseudomonas sp.* nos intervalos pré-determinados. Aos 22 dias de armazenamento, também se realizou análise para presença de *Salmonella sp.*

Para a determinação de Coliformes a 35 e 45°C, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* e Psicotróficos aeróbios, foram retirados assepticamente, 10 gramas de amostra de carne dos bifes de lombo suíno. Estas amostras foram homogeneizadas em 90mL de solução de água peptonada (Oxoid) a 0,1%.(diluição 10^{-1}) em copo homogeneizador previamente esterilizado em autoclave. Tomou-se 1mL desta solução (10^{-1}) e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 9mL da solução de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-2}). Novamente, tomou-se mais 1mL da solução (10^{-1}), transferindo-se para um tubo de ensaio contendo 9 mL da solução de água peptonada a 0,01% (diluição 10^{-3}).

Para a determinação e contagem de coliformes a 35°C, transferiu-se assepticamente 1mL de cada diluição preparada para 3 séries de tubos contendo 10mL do meio Lauril-Sulfato (Merck) e tubinhos de Duhram. Os tubos com as soluções foram cuidadosamente homogeneizados e então incubados em estufa a 35°C, por 48h. Após o período de incubação, foi verificado o número de tubos positivos (com presença de gás nos tubos de Duhram) nas 3 séries e a determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes a 35°C foi realizada utilizando-se uma tabela publicada pelo FDA (Food and Drug Administration) em 2001. Esses resultados foram expressos em NMP/g.

A partir dos tubos positivos de Coliformes a 35°C, procedeu-se a verificação da presença de Coliformes a 45°C. Do conteúdo de cada tubo positivo para Coliformes a 35°C, foi semeada uma alçada, com auxílio de alça de platina, para

uma série de 3 tubos contendo 10mL de caldo EC (Merck) e tubinhos de Duham. Os tubos foram encubados em estufa a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, por 24-48h. Após a incubação, foi verificado o número de tubos positivos (com presença de gás e turvação do meio) e calcularam-se o NMP de Coliformes a 45°C utilizando-se a mesma Tabela do FDA (2001), descrita anteriormente.

Para a determinação de *Staphylococcus aureus*, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram retiradas e colocadas em Placas de Petri contendo o meio de cultura Baird-Parker (MERCK) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (1%) (Oxoid). O espalhamento do inóculo foi feito na placa com auxílio de alça de Drigalsky. A incubação foi realizada invertendo-se as placas, em estufa, a 37°C por 48h, para posterior contagem de colônias típicas. Transcorrido este tempo, um número representativo de colônias típicas foi transferido para o caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid), um tubo para cada colônia, e incubado em estufa a 35°C por 24h. Após este período, foi comprovada a presença de *Staphylococcus aureus* bioquimicamente, utilizando-se o teste coagulase (coagu-plasma, LABOCLIN).

Para a determinação de *Pseudomonas sp.*, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição e transferiu-se para Placas de Petri contendo o meio de cultura *Pseudomonas sp.* Agar Base (CM 559- Oxoid), com adição de suplemento (CFC-SR 103-Oxoid). Fez-se o espalhamento do inóculo na placa com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram encubadas em estufa a 28°C por 48h. Ao fim desse período, fez-se a leitura e interpretação dos resultados (Figura 9).



Figura 9 – Placas com *Pseudomonas* sp.

No caso das análises de *Salmonella*, foram retirados assepticamente, 25 gramas de amostra de carne, dos bifés e homogeneizados com 225 mL de solução de água peptonada a 1% (diluição 10^{-1}). A solução foi transferida para tubos de ensaio que foram incubados por 24h a 35°C , sendo que esta fase foi denominada de pré-enriquecimento.

Passada a fase de pré-enriquecimento, transferiu-se 1 mL de cada amostra para cada respectivo tubo contendo 10 mL de caldo tetrionato (Merck), previamente preparado. Os tubos foram incubados por 24h a 42°C em banho-maria, esta etapa consiste no enriquecimento. Após a incubação, pipetou-se 0,5 mL da solução A do Kit, a mesma quantidade da solução B do Kit e 1 mL da amostra enriquecida em cada tubo de amostra e repetição. Os tubos foram autoclavados a 121°C por 10 minutos. Depois de frios, pipetou-se 0,5 mL da solução na unidade Vip Salmonella (Biocontrol System) para cada amostra. A amostra foi considerada positiva quando apresentou formação de linhas nas janelas de teste e de verificação e, negativa, quando uma linha esteve presente na janela de verificação sem haver formação de linha na janela de teste (Figura 10).



Figura 10 – Tubos enriquecidos e Kits de análise para *Salmonella*

Para a determinação de Psicotróficos aeróbios, transferiram-se alíquotas de 1,0mL de cada diluição previamente preparada com água peptonada para placas de Petri. Em seguida, adicionou-se o meio de cultura Plate Cout Agar (Merck) e as placas foram invertidas e incubadas a temperatura de 7°C por sete dias. Após esse período, foi feita a leitura e interpretação das placas.

4.4 Análises Físico-Químicas

4.4.1 pH e Temperatura

O pH e a temperatura foram determinados com auxílio de um medidor digital portátil de pH, com sonda de perfuração de vidro e de Temperatura, com sonda metálica (marca novatécnica; modelo NT-PHP).

4.4.2 Cor

A cor foi determinada com o auxílio de um colorímetro portátil (mod. MiniScan XE, marca HunterLab), através da escala L*, a*, b*, do sistema CIE Lab, com fonte de luz de D₆₅, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30 mm (Figura 11).



Figura 11 – Determinação da Cor

O aparelho foi sempre calibrado com um padrão branco ($L^* = 93,80$, $a^* = -0,89$, $b^* = 0,95$) e outro preto ($L^* = 1,19$, $a^* = 1,27$, $b^* = 1,92$). As medidas foram tomadas depois de 30 min de exposição ao ar atmosférico, na superfície dos bifes, em três lugares distintos, tomando-se a média como o valor determinado. Foram também obtidos o índice de saturação ou croma [$C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$] e o ângulo hue [$h = (\tan^{-1} b/a) \times (360/2 \times 3,14)$] ou tonalidade, ambos bons preditores da percepção sensorial da cor.

4.4.3 Perda de Água por Exsudação

Para a determinação da Perda de Água por Exsudação (PAE), os bifes foram pesados (P_i) antes de serem acondicionados nas bandejas, em balança semi-analítica ($\pm 0,01$ g, Mod. BG2000, marca GEHAKA). Quando os masterpacks foram abertos, os bifes foram pesados novamente, sempre na mesma balança. Assim, a PAE foi calculada de acordo com a equação 1 (ROSA et al., 2001):

$$PAE = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

onde:

PAE = Perda de Água por Exsudação (%).

P_i = Peso inicial da amostra (g).

P_f = Peso final da amostra (g).

4.4.4 Perda de Água por Cocção e Força de Cisalhamento (maciez)

Para a determinação da Perda de Água por Cocção (PAC) e Força de Cisalhamento (maciez) foi utilizada a metodologia proposta por Koohmaraie et al. (1998). Os bifes foram pesados (P_i) na mesma balança utilizada para a PAE, em bandejas de alumínio previamente taradas (P_b), e assadas em forno elétrico (mod. Luxo 2.4 Classic, marca Layr), à temperatura de 170°C, distância de 21 cm da resistência superior. A temperatura interna dos bifes foi controlada com equipamento Data Logger digital (mod. 700-10s; marca Gulterm) composto por 10 termopares de perfuração, até que a temperatura interna atingisse valores da ordem de 70°C, quando então os bifes eram retirados do forno e deixados à temperatura ambiente (sala climatizada a $\pm 21^\circ\text{C}$) por 30 minutos, para então serem pesados novamente (P_f), ainda na bandeja, em balança semi-analítica. Assim, calculou-se inicialmente, a perda de água por evaporação (equação 2).

$$PAEV = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

onde:

PAEV = perda de água por evaporação (%).

P_i = Peso inicial da amostra antes do cozimento (g).

P_f = Peso final da amostra após o cozimento (g).

Em seguida, as bandejas, sem os bifés, contendo somente o líquido exsudado durante o cozimento, também eram pesadas ($P_{b\text{liq}}$) em balança semi-analítica, para cálculo da perda de líquido no cozimento (equação 3):

$$PLC = \frac{P_{b\text{liq}} - P_b}{P_i} \times 100 \quad (3)$$

onde:

PLC = Perda de Líquido no Cozimento (%).

P_i = Peso inicial da amostra antes do cozimento (g).

P_b = Peso da bandeja (g).

$P_{b\text{liq}}$ = Peso do líquido na bandeja sem amostra (g).

A perda total de água no cozimento (PAC) foi então calculada, como a soma da perda de água por evaporação mais a perda de água líquida no cozimento, sempre em porcentagem.

Para a determinação da força de cisalhamento, utilizaram-se os bifés assados como descrito no item anterior, dos quais foram retirados de 4 a 6 cilindros de 13 mm de diâmetro, sempre no sentido paralelo às fibras musculares, com auxílio de um vazador. Esses cilindros eram, então, acondicionados em sacos de polietileno até o momento da análise.

A maciez da carne, ou força de cisalhamento, foi medida utilizando-se um Texturômetro (mod. TA.XT2i, marca SMS), com sonda Warner Bratzler deslocando-se com velocidade de 500 mm/min (Figura 12). A força de cisalhamento foi determinada diretamente das curvas de força em função da deformação, com o emprego do programa "Texture Expert" V. 1.15 (SMS). A força de cisalhamento (kgf) foi calculada como a média de 4 a 6 medidas.

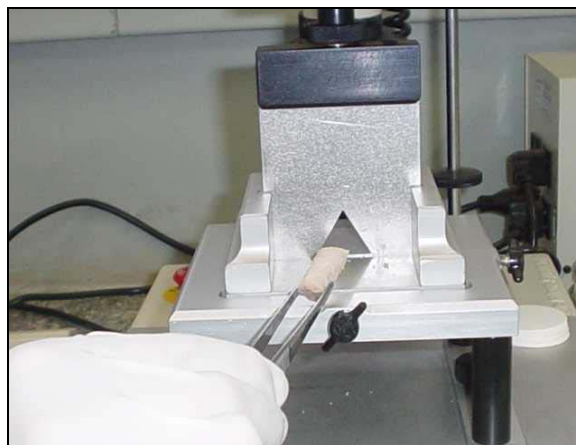


Figura 12 – Análise da Força de Cisalhamento com Sonda "Warner Bratzler"

4.5 Análises Bioquímicas

4.5.1 Oxidação Lipídica pela análise de TBARS

As amostras de carne suína trituradas e homogeneizadas foram analisadas para substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), conforme metodologia proposta por Vyncke et al. (1970). Para esta análise inicialmente preparou-se uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% contendo 1% de EDTA e 1% de propilgalato, e uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,02M. Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma. Foram pesados 5 g de músculo, que foram homogeneizados em 25 mL de solução de TCA 7,5% por 30 segundos a

18000 rpm, utilizando-se homogeneizador Turrtec (modelo TE-102; marca Tecnal). A solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1. Coletou-se 5 mL do filtrado, ao qual foi adicionado 5 mL da solução de TBA 0,02M. Os tubos foram levados a banho-maria fervente por 40 min, depois de frias as amostras foram lidas em espectrofotômetro (mod. DU 640, marca Beckman) a 538 nm. Preparou-se também uma curva com 5 pontos utilizando-se uma solução de tetrametoxipropano (TMP) de concentração conhecida. Para obter-se a concentração de malonaldeído nas amostras de carne suína utilizou-se a equação fornecida pela curva.

4.5.2 Determinação da concentração de metamioglobina

Para a determinação da concentração de metamioglobina foi utilizado o procedimento proposto por Krzywicki (1982). Foram misturados 4 gramas de amostra de carne suína congelada com 40 mL de 40mM PBS (pH 6,8) em homogeneizador Turrtec (modelo TE-102; marca Tecnal). O homogenato foi colocado dentro de um tubo de centrifugação de 50 mL o qual permaneceu em gelo por duas horas. Em seguida, foi centrifugado a 4°C por 60 minutos, a 30.000g. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman nº1 e, em seguida, novamente filtrado com uma membrana Millipore, a fim de se evitar a turbidez, em seguida foi lida a absorbância em 525, 545, 565 e 572 nm com auxílio de espectrofotômetro (mod. DU 640, marca Beckman). Tomou-se o cuidado de evitar exposição à luz durante todo o procedimento, a fim de evitar a oxidação do pigmento. A concentração de metamioglobina foi calculada de acordo com a equação 4:

$$\text{Met (\%)} = [1,098 - (2,514 \times R_1) + (0,77 \times R_2) + (0,8 \times R_3)] \times 100 \quad (4)$$

Onde:

Met(%) = Concentração de metamioglobina em relação ao total de pigmentos (mioglobina + oximioglobina + metamioglobina)

R_1 , R_2 e R_3 são razões entre as absorvâncias de A^{572}/A^{525} , A^{565}/A^{525} e A^{545}/A^{525} , respectivamente.

4.5.3 Eletroforese Bi-Dimensional (2DE)

Para os testes iniciais e padronização dos protocolos foram coletadas amostras de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) 1 e 24 horas *post mortem*, de um experimento piloto.

Para a condução da 2DE com as amostras do experimento propriamente dito foi necessária, primeiramente, a preparação das amostras. Para tanto, foi preparado um “pool” com as amostras de carne suína. Após o descongelamento em temperatura ambiente, foram colocadas em uma placa de vidro, 4 amostras de carne (de aproximadamente 1 grama cada) de cada Composição/tempo. Essas amostras foram picotadas e homogeneizadas com auxílio de uma tesoura cirúrgica, caracterizando assim o “pool”. Retirou-se uma alíquota de 1 grama desse “pool” que foi homogeneizada com um tampão de extração, por 60 segundos, a 16000rpm, com auxílio de homogeneizador Turratec (modelo TE-102; marca Tecnal). Do “pool” de amostras restante, tomaram-se mais três alíquotas de 1 grama cada, as quais foram congeladas e armazenadas em N_2 para testes futuros. O mesmo procedimento de homogeneização com Tampão de extração foi utilizado nas amostras de carne suína coletadas do experimento piloto. Este estudo foi iniciado com a utilização de um Tampão de Extração contendo Tris-HCl (LAMETSCH et al., 2006), o qual foi substituído por outro Tampão de Extração contendo Uréia 8M (LAMETSCH, 2003).

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 4°C por 20 min. a 25.000 x g em centrífuga (mod. J2-21; marca Beckmann) e o sobrenadante resultante foi aliquoteado em microtubos que foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise de 2DE. A quantidade de proteínas totais no sobrenadante foi determinada pelo kit de análise de proteína Comassie Plus (Pierce), utilizando-se como padrão, uma solução de albumina bovina. Essa determinação foi necessária para o cálculo do volume de sobrenadante a ser utilizado na 2DE.

A análise de 2DE constitui-se de duas etapas: I) Focalização Isoelétrica, onde ocorre a separação das proteínas de acordo com seu Ponto Isoelétrico e; II) Corrida Eletroforética, onde há a separação das proteínas de acordo com seu Peso Molecular.

No dia anterior à focalização isoelétrica, procedeu-se à reidratação das tiras de IPG. Uma alíquota do extrato cárneo contendo 500 µg de proteína foi misturada com tampão de reidratação (Solução “DeStreak”: 7 M Uréia, 2 M Thiouréia, 2% p/v CHAPS, 0,002% p/v azul de bromofenol - Amersham Biosciences – contendo 0,5% v/v de tampão de IPG pH 3-10, 20 mM DTT e 1% v/v Inibidores de Protease – Amersham Biosciences). O volume final obtido de 250 µl da solução protéica foi utilizado para uma reidratação passiva das tiras de IPG de 13 cm com faixa de pI de 3-10 L (Amersham Biosciences) à temperatura ambiente por 14 horas no Immobiline Drystrip Reswelling Tray (GE Healthcare) (Figura 13a).

Após a reidratação, as tiras foram colocadas no aparelho Ettan IPGphor (GE Healthcare) para a focalização isoelétrica das proteínas (Primeira Dimensão). A focalização isoelétrica foi realizada à temperatura de 20°C, por aproximadamente 5 horas, com uma voltagem inicial baixa de 500 V, aplicando-se em seguida, um gradiente de 1000 a 8000 V e por fim 8000 V, com um limite de corrente de

75 μ A/tira. O produto total de tempo x voltagem aplicada foi de 17403V/h para cada strip (Figura 13b). Ao final da focalização isoeétrica as tiras foram colocadas em tubos de vidro com tampa e congeladas em freezer doméstico até o dia seguinte quando se procedeu a corrida eletroforética ou Segunda Dimensão.

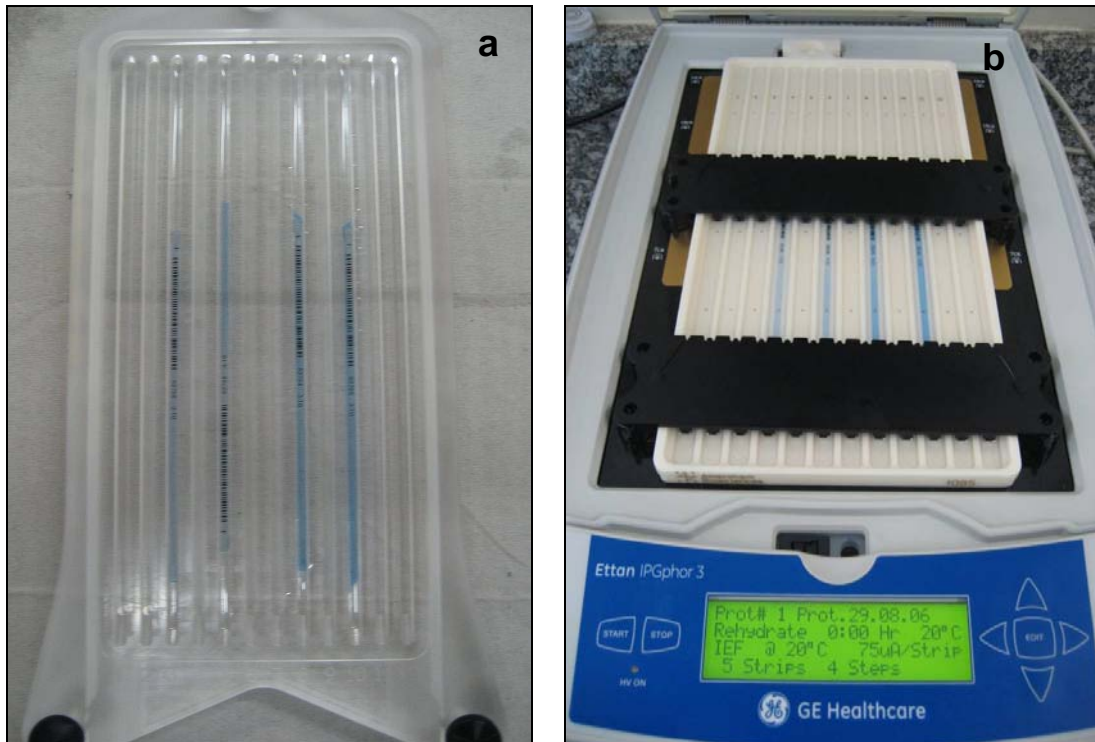


Figura 13 – Reidratação das “strips” (a) e Focalização Isoelétrica (b)

Para a corrida da segunda dimensão, primeiramente as tiras foram equilibradas por 15 minutos em Tampão de Equilíbrio I sob leve agitação (6M Uréia, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% Glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 65 mM DTT) e por mais 15 minutos em Tampão de Equilíbrio II (6M Uréia, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% Glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 197 mM Iodoacetamida), sob leve agitação. Em seguida, as tiras foram sobrepostas ao gel de acrilamida (SDS-PAGE -12,5 %) (18 x 16 x 0.15 cm), preparado no dia anterior, fixando-as com uma solução selante de agarose (25 mM Tris base, 192 mM glicina,

0,1% SDS, 0,5% agarose e 0,002% de azul de bromofenol). O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli 1x concentrado para o anodo e 3x concentrado para o catodo. Para a corrida eletroforética, foi mantida uma corrente de 25 mA/gel a uma voltagem inicial de 90V por 30 minutos para que as proteínas migrassem da tira para o gel e após este tempo a voltagem foi aumentada para 250V por 6 horas (Figura 14). Ao final da corrida, os géis foram corados por 1 hora com azul de Coomassie (0,1% coomassie, 10% ácido acético e 40% metanol) e descorados por 1 h em solução descorante (40% Metanol, 10% Ácido Acético). Em seguida, a solução descorante foi renovada e o gel foi então mantido em descoloração por mais 14 h.



Figura 14 – Corrida eletroforética da segunda dimensão

Após o período de descoloração, os géis foram imersos em água destilada por aproximadamente 2 horas e em seguida, suas imagens foram digitalizadas no ImageScanner (mod. PowerLook 1120; marca Amersham Biosciences). Para análise dos géis *in silico* utilizou-se o software ImageMaster Platinum (Amersham Biosciences). Os *spots* foram detectados e quantificados, permitindo que

comparações entre as amostras do músculo *Longissimus dorsi*, fossem realizadas através de percentuais da intensidade integrada do “spot”. Posteriormente, as análises do gel na segunda dimensão foram feitas através da comparação das posições relativas e das intensidades integradas dos “spots” individuais em cada gel. As expressões relativas dos “spots” individuais foram analisadas e comparadas dentre e entre os grupos de imagens.

4.6 Análise Sensorial

Após a abertura dos masterpacks, três bandejas de cada masterpack foram destinadas à análise sensorial, totalizando 12 bandejas por Composição gasosa. As bandejas foram colocadas em balcão expositor refrigerado (modelo Vega 125 LX, marca Auden) a 4°C onde permaneceram por um período de três dias.

As bandejas foram dispostas em três prateleiras iluminadas com lâmpadas fluorescentes, uma para cada Composição gasosa. As prateleiras foram identificadas com códigos numéricos a fim de evitar-se qualquer interferência no momento da avaliação (Figura 15).

A análise sensorial visual consistiu na aplicação de testes afetivos de aceitação, visando comparar a aceitação sensorial dos lombos armazenados em diferentes atmosferas e determinar a vida útil destes produtos sob refrigeração, utilizando metodologia descrita por Meilgaard et al. (1999).

Os testes foram realizados por no mínimo 100 provadores (não treinados) por dia de análise, recrutados entre alunos, funcionários, professores e visitantes da FZEA/USP (Figura 16). Utilizou-se escala hedônica de 7 pontos (1 = desgostei muitíssimo a 7 = gostei muitíssimo) para avaliação do atributo aparência geral e de 5

pontos (1 = certamente não compraria a 5 = certamente compraria) para a intenção de compra (Anexo A).



Figura 15 – Balcão expositor com as bandejas para análise sensorial

Ao final de cada dia de avaliação, foram retiradas do balcão expositor 4 bandejas de cada Composição gasosa, as quais foram encaminhadas para o Laboratório de Carnes para a determinação da cor objetiva. Assim que as bandejas eram retiradas, havia um remanejamento na disposição das bandejas restantes, visando minimizar possíveis influências no momento das avaliações futuras.

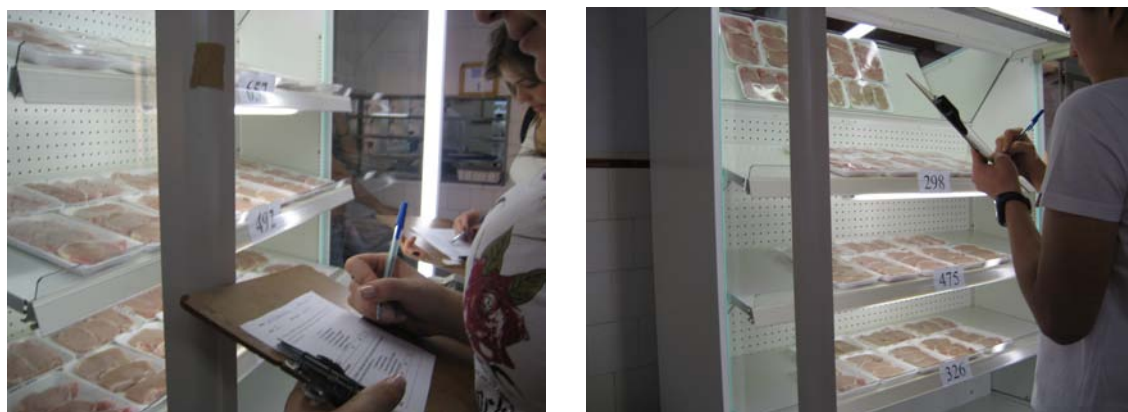


Figura 16 – Aplicação do teste de aceitação

4.7 Delineamento Experimental

Para a avaliação das variáveis microbiológicas (psicrotróficos aeróbios e *Pseudomonas sp.*), físico-químicas (pH, PAE, PAC, Maciez, L*, a*, b* e concentração de proteínas) e bioquímicas (TBARS e concentração de metamioglobina), utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, ou seja, 3 composições gasosas (A=75%O₂+25%CO₂, B=50%O₂+50%CO₂ e C=100% CO₂) e 4 tempos de análise (1, 8, 15 e 22 dias), com quatro repetições para cada combinação composição gasosa x tempo de análise. As análises estatísticas, considerando este modelo, foram realizadas com o auxílio do procedimento PROC GLM do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3. (SAS, 2000). Em caso de resultados significativos para análise de variância, foi utilizado como procedimento de comparações das médias, o Teste Teste *t* de Student. Uma vez que os fatores em questão possuem níveis classificados como quantitativos, o estudo contou também com análises de regressão (simples e múltiplas) visando avaliar o comportamento das Composições (75% de O₂, 50% de O₂ e 0% de O₂) em função dos tempos de estocagem (1, 8, 15 e 22 dias).

Para verificação dos resultados das análises sensoriais, realizadas por meio de *display* em balcão de refrigeração, as variáveis “aparência geral” e “intenção de compra” foram submetidas a um modelo estatístico misto. Este modelo contemplou os efeitos fixos de composição gasosa (A, B e C), tempo de armazenamento (1, 8, 15 e 22 dias), dias de *display* (1, 2 e 3), bem como as interações duplas, composição gasosa *versus* tempo de armazenamento, composição gasosa *versus* dias de *display*, tempo de armazenamento *versus* dias de *display* e a interação tripla composição gasosa *versus* tempo de armazenamento *versus* dias de *display*. Os

efeitos aleatórios considerados foram os efeitos de provadores (dentro das combinações composição gasosa - tempo de armazenamento - dia de *display*) e o efeito residual.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização microbiológica da matéria prima

Segundo os resultados das análises microbiológicas da carne fresca utilizada como matéria prima neste trabalho, não houve contaminação com Coliformes a 35 e 45°C, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (Tabela 3) em nenhuma amostra de carne suína. Assim, pode-se sugerir que as condições higiênico-sanitárias do abate, desossa e manuseio das carnes foram satisfatórias, premissa para o bom desenvolvimento deste experimento. Vale ressaltar que durante os procedimentos de obtenção da carne acima descritos, foram tomados cuidados adicionais a fim de se evitar a contaminação das carnes a serem utilizadas neste trabalho. De acordo com Carvalho et al. (2005), a presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal em alimentos sugere que uma higienização inadequada ocorreu no processamento e manipulação.

Pela portaria da ANVISA nº 12/2001, de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), que dispõe sobre as normas e padrões de controle de qualidade para alimentos, a carne fresca que apresentar *Salmonella* sp. em 25 g de amostra é considerada inapta para o consumo humano. Pela importância deste patógeno para a saúde humana, optou-se também pela análise de presença de *Salmonella*, no último dia do experimento, ou seja, aos 22 dias de armazenamento, sendo que os resultados mais uma vez foram negativos.

Tabela 3 – Caracterização microbiológica da matéria prima

Amostras	Coliformes a 35°C (NMP/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Staphylococcus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> (UFC/g)
1	< 3	< 3	< 10 (est)	negativo
2	< 3	< 3	< 10 (est)	negativo
3	< 3	< 3	< 10 (est)	negativo
4	< 3	< 3	< 10 (est)	negativo

5.2 Composição gasosa do interior das embalagens masterpack

A concentração da composição gasosa do interior das embalagens masterpack foi determinada em intervalos de 7 dias durante o período experimental, que foi de 22 dias (Figura 17). As concentrações de O₂ e CO₂ determinadas no primeiro dia, no interior das embalagens masterpack, confirmaram as concentrações utilizadas neste estudo. Durante o período de armazenamento as composições gasosas A e B permaneceram constantes, na Composição C, foi verificada pequena variação na concentração de CO₂ e também a presença de oxigênio residual, o que poderia possibilitar o crescimento de microrganismos aeróbios. O decréscimo nos valores de CO₂ dentro das embalagens masterpack pode ser atribuído a perdas por difusão da embalagem e por absorção do CO₂ pela carne, podendo chegar a 12,5% (MCMULLEN & STILES, 1991; SØRHEIM et al., 1999). Pode-se sugerir que quando da opção de trabalho por atmosferas com 100% CO₂, recomenda-se a utilização de absorvedores de oxigênio para evitar a presença de oxigênio residual.

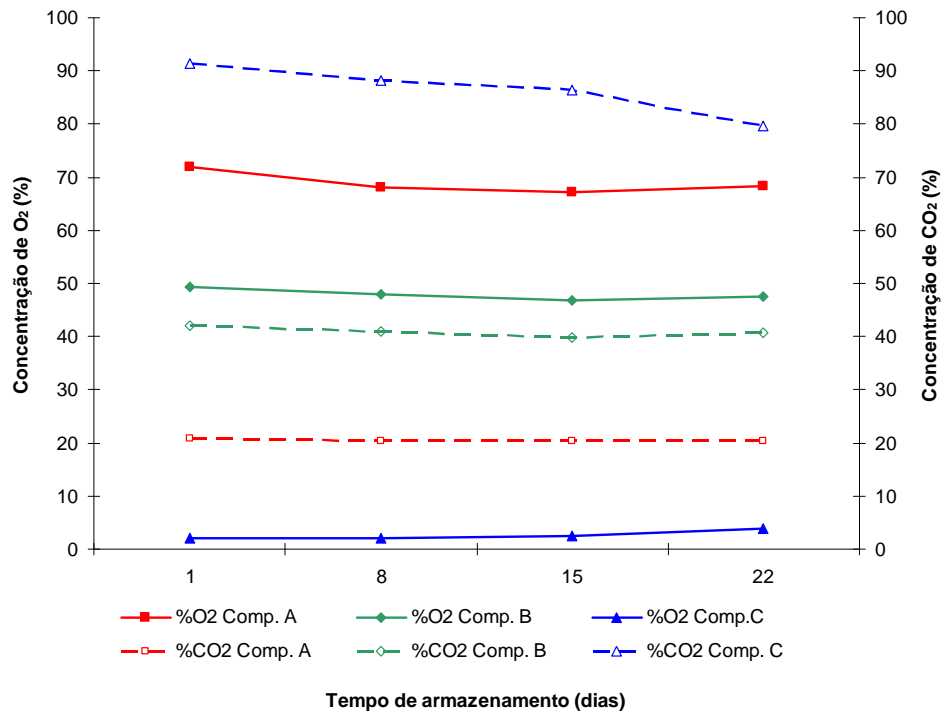


Figura 17 – Concentração de O₂ e CO₂ no interior das embalagens

Buys (2004), em um estudo com amostras de lombo suíno condicionadas em diferentes concentrações de CO₂, observou que na composição inicial de 100% de CO₂, houve uma redução para 91% de CO₂ nos 7 primeiros dias de estocagem, vindo se estabilizar a seguir. Por outro lado, esse autor observou que nas embalagens que continham 20%CO₂+80%O₂ e 25%CO₂+25%O₂+50%N₂, houve redução na concentração de CO₂ para 15% e 20% de CO₂, respectivamente, após 21 dias de estocagem. Mano et al. (2002) trabalharam com carne suína embalada em atmosferas contendo 100% ar, 100% nitrogênio, 20%CO₂+80%O₂ e 40%CO₂+60%O₂ e não observaram alterações nas composições gasosas em até 28 dias de armazenamento. Como pode se observar, os resultados disponíveis na literatura são um pouco contraditórios, provavelmente em função da sensibilidade do equipamento de mensuração ou ainda pela composição da embalagem utilizada.

5.3 Resultados das análises microbiológicas nas amostras de bife de lombo suíno embalados em três condições de atmosfera modificada

A contagem dos microrganismos psicrotróficos aeróbios e *Pseudomonas sp.* foi realizada nas amostras de bife de lombo suíno aos 1, 8, 15 e 22 dias de armazenamento. Na Tabela 4 está contida a análise estatística descritiva das contagens determinadas para os dois grupos de bactérias e na Tabela 5 o resumo da análise de variância dessas contagens. Como se pode observar na Tabela 4, de maneira geral os valores foram baixos, indicando a importância da qualidade da matéria prima a ser utilizada.

Tabela 4 – Número de observações (N), Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV), Mínimo e Máximo das variáveis Psicrotróficos aeróbios e *Pseudomonas sp.**

	N	Média	DP	CV	Min.	Max.
Psicrotróficos Aeróbios	48	1,70	1,53	89,81	1,00	5,81
<i>Pseudomonas sp.</i>	48	1,56	1,29	82,76	1,00	5,81

*resultados expressos em log UFC/g

Na análise de variância dos resultados das contagens de psicrotróficos aeróbios (Tabela 5) foi observada interação entre tempo de armazenamento e composição gasosa, mas nos resultados de contagem de *Pseudomonas*, observou-se efeito apenas de tempo de armazenamento.

Tabela 5 – Resumo da Análise de Variância das variáveis psicotróficos aeróbios e *Pseudomonas sp.*

FV	GL	Quadrados Médios			
		Psicotróficos		<i>Pseudomonas sp.</i>	
Composição	2	1,71	NS	1,18	NS
Tempo	3	23,77	**	15,37	**
Composição x Tempo	6	1,71	*	1,18	NS
Resíduo	34	0,69		0,65	

NS = Não significativo; * = resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste F; ** = resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$) pelo teste F.

Em relação aos resultados da contagem de psicotróficos aeróbios, observa-se na Figura 18 que não houve crescimento, nem diferença entre as Composições gasosas durante os 15 primeiros dias de armazenamento.

Do 15^o para o 22^o dia de armazenamento, houve aumento nas contagens de psicotróficos aeróbios nas amostras dos bifes de lombo suíno de todas as Composições gasosas, sendo que as contagens da Composição A foram inferiores às demais.

As diferenças observadas entre as composições gasosas podem ser atribuídas à presença de microrganismos aeróbios facultativos, que tiveram melhores condições de desenvolvimento nas atmosferas com menores concentrações de O₂. Viana et al. (2005) trabalharam com cortes de lombo suíno embalados com 100%CO₂, 99%CO₂ + 1%CO, 100%O₂ e 100%CO + vácuo (após 1 hora de exposição) e observaram que altas concentrações de CO₂ não inibiram o crescimento microbiano mais que as outras composições testadas. Wilkison et al.

(2006), trabalhando com carne suína embalada em atmosferas contendo 100%CO₂, relataram contagens de bactérias aeróbias da ordem de 3,16 log UFC/g, resultados próximos aos observados neste estudo. Sørheim et al. (1999) reportaram, após 3 semanas de estocagem, aumento total na contagem de bactérias de 2,3 para 5,5-6,0 log UFC/g de carne. No entanto, Luño et al. (1998) estudaram o efeito de composições contendo 20 ou 50%CO₂ na população total de bactérias psicotróficas em amostras de contra-filé bovino e observaram que 20%CO₂ não foi suficiente para manter a aceitabilidade microbiológica durante 4 semanas de estocagem.

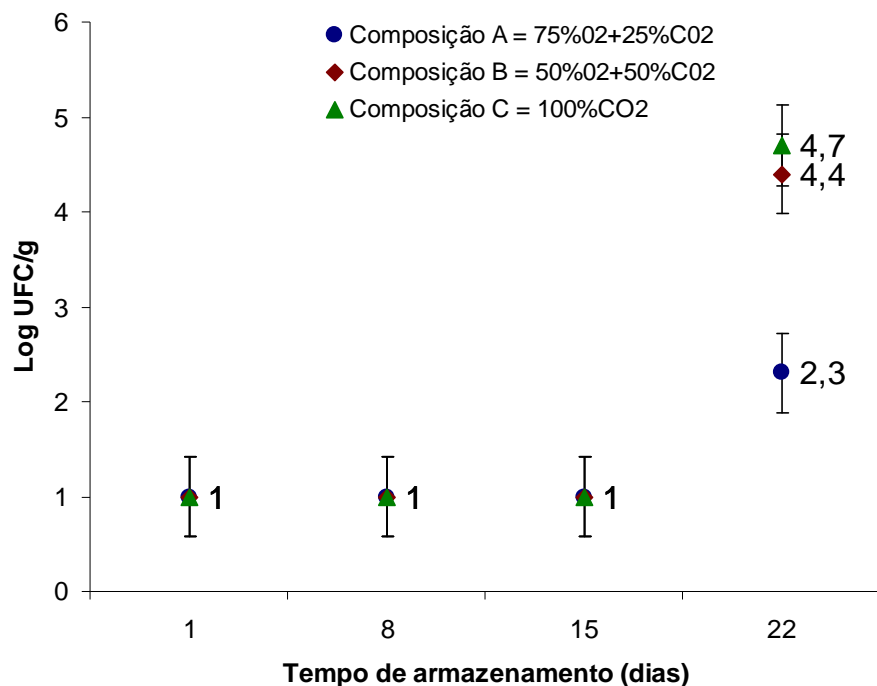


Figura 18 – Resultados das contagens de microorganismos psicotróficos aeróbios

Os resultados da contagem de *Pseudomonas sp.* nas amostras de bife de lombo suíno estão apresentados na Figura 19 por tempo de armazenamento, porque, somente esta variável teve efeito significativo sobre os resultados (Tabela 5). Ou seja, independentemente da composição gasosa estudada, o crescimento de

Pseudomonas sp. foi função apenas do tempo de armazenamento. De maneira geral, as contagens de microrganismos não ultrapassaram valores acima de 10^6 UFC/g, que de acordo com Roça e Serrano (1995) já alteram perceptivelmente as características da carne, como por exemplo, a cor. Por outro lado, é pertinente lembrar que a temperatura de armazenamento é fator condicionante para a obtenção de bons resultados na utilização desta tecnologia.

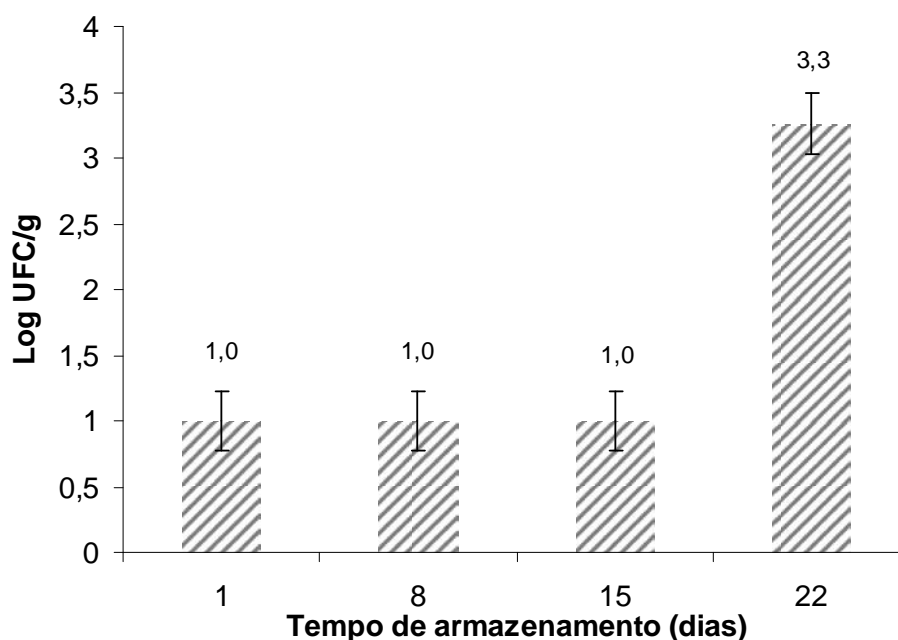


Figura 19 – Resultados das contagens de *Pseudomonas sp.*

Observa-se na Figura 19 que o crescimento de *Pseudomonas* foi inibido efetivamente durante os 15 primeiros dias de armazenamento, corroborando os resultados encontrados na literatura que indicam que as bactérias deste grupo são bastante sensíveis ao CO_2 (BORCH et al., 1996; PHILLIPS, 1996; CUTTER, 2002; JAYAS & JEYAMKONDAM, 2002; LIU et al, 2006).

Embora tenha sido observado o efeito bacteriostático do CO₂ na carne, os resultados deste trabalho demonstraram que concentrações maiores de CO₂ não implicaram em maior retardamento do crescimento microbiano, ou seja, as Composições B e C, não foram mais eficientes que a Composição A. Esses resultados estão de acordo com Gill (1996) e Vianna et al (2005) que afirmam que 20% de CO₂ já é o bastante para inibir o crescimento microbiano.

De acordo com Mano et al. (2002), o aumento nas contagens de *Pseudomonas sp.* em carne embalada contendo 100%CO₂, pode ocorrer devido à dificuldade de se eliminar totalmente o O₂, porque essas bactérias são aeróbias restritas.

É necessário ainda se associar as observações da contagem dos microrganismos às avaliações da qualidade da carne, para se poder inferir sobre a composição gasosa mais adequada. De qualquer modo, pode-se considerar que 15 dias de armazenamento já é um período considerável, resultando em ganhos econômicos, uma vez que em condições de armazenamento normais, isto é, sem a utilização de atmosfera modificada, a vida útil da carne é de, no máximo, 7 dias (GRAY et al., 1996).

5.4 Resultados das análises físico-químicas nas amostras de bife de lombo suíno embalados em três condições de atmosfera modificada

Os resultados da análise estatística descritiva das variáveis analisadas estão apresentados na Tabela 6. De maneira geral, os valores apresentados estiveram dentro da normalidade. As variáveis a*, PAE, PAC, Maciez, TBARS e Metamioglobina tiveram coeficiente de variação mais elevado, que em alguns casos, pode dificultar a percepção de diferenças entre os valores médios.

Em relação aos valores de pH determinados nos bifes de lombo suíno observa-se na Tabela 7 efeito significativo de Composição gasosa, Tempo de Armazenamento e interação significativa entre Composição gasosa e Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$).

Tabela 6 – Número de observações (N), Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV), Mínimo e Máximo das variáveis

Variável	N	Média	DP	CV(%)	Mínimo	Máximo
pH	46	5,4	0,1	2,8	5,0	5,70
PAE (%) ¹	46	4,7	2,1	45,4	2,4	9,9
PAC (%) ²	46	31,7	6,9	21,8	14,2	42,2
Maciez (kgf)	46	3,9	0,9	23,4	2,4	5,9
L*	46	61,8	3,0	4,9	54,2	67,2
a*	46	7,5	1,7	22,2	4,5	11,1
b*	46	16,5	0,9	5,7	12,8	19,0
C*	46	18,2	1,3	7,4	13,5	21,5
h*	46	65,6	4,3	6,6	58,6	73,3
Metamioglobina (%)	46	45,0	10,7	23,9	24,2	76,8
TBARS ³	46	4,3	4,6	108,9	0,10	16,7

¹PAE = Perda de água por exsudação; ²PAC = Perda de água por cocção; ³mg malonaldeído/kg amostra

De maneira geral, observou-se que os valores médios de pH dos bifes estiveram dentro da faixa da normalidade, variando de 5,1 a 5,6 (Figura 20).

Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores de pH entre as Composições gasosas no 8^o dia de armazenamento, onde os bifes da Composição A tiveram valores inferiores aos demais, e aos 15 dias de armazenamento, onde os

bifes da Composição A e B não diferiram entre si e tiveram valores de pH inferiores aos da Composição C (Figura 20). Embora a análise estatística tenha captado diferenças entre os valores de pH dos bifes, elas foram muito pequenas e possivelmente não interferiram nos outros atributos de qualidade da carne como a cor e a capacidade de retenção de água.

Tabela 7 – Resumo da Análise de Variância para as variáveis pH, PAE, PAC e Maciez

FV	GL	Quadrados Médios							
		pH		PAE		PAC		MACIEZ	
Composição	2	0,05	**	10,53	NS	50,58	NS	0,46	NS
Tempo	3	0,16	**	8,82	NS	254,61	**	0,38	NS
ComposiçãoxTempo	6	0,03	**	0,78	NS	22,18	NS	1,04	NS
Resíduo	34	0,30		3,92		33,26		0,85	

^{NS} Não significativo; *resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05) pelo teste F; ** resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade (P<0,01) pelo teste F.

Não foi observado efeito de Composição gasosa e de tempo de armazenamento nos valores de Perda de Água por Exsudação (PAE) deste trabalho (Tabela 7), que tiveram valor médio de 4,7%, variando de 2,4 a 9,9%. Segundo Gill (1996), perdas de até 5% de exsudado da carne são esperadas. Jeremiah et al. (1995) relataram valores médios de PAE de 4,5% e também não observaram aumento no valores de PAE nas amostras de bifes de lombo suínos armazenadas com 100%CO₂ durante 15 semanas de estocagem.

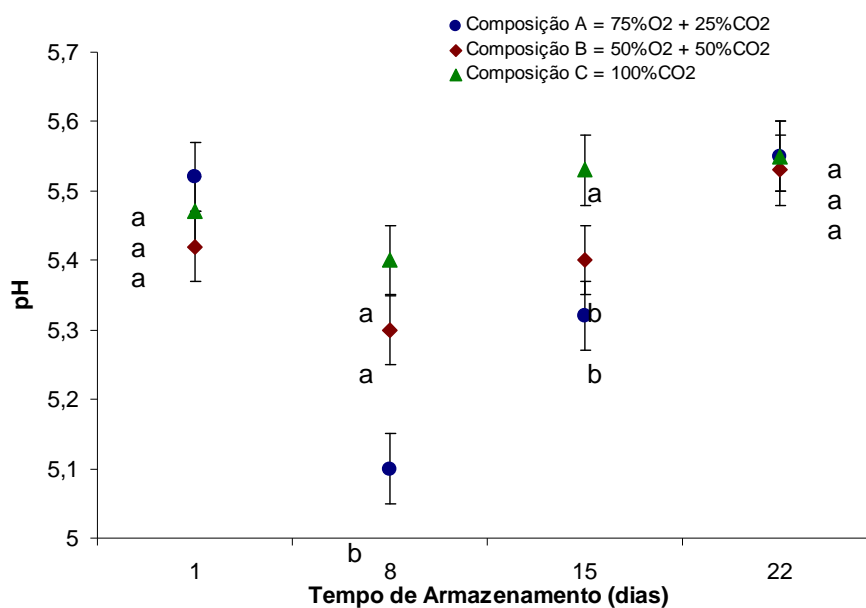


Figura 20 – Valores médios do pH apresentados por Composição gasosa e Tempo de armazenamento. *Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os valores da Perda de Água Cocção (PAC) variaram de 14,2 a 42,2% (Tabela 6) e a análise estatística captou efeito apenas de Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$) (Tabela 7). Observa-se na Figura 21, que os valores de PAC diminuíram do primeiro (33,4%) para o 8^o dia de armazenamento (31,4%), seguido de um acréscimo aos 15^o dias (36,9%), com posterior decréscimo aos 22 dias de armazenamento e em seguida, houve uma redução significativa aos dias de armazenamento.

As diferenças observadas na PAC, aos 15 dias de armazenamento podem ser atribuídas a erros experimentais durante a pesagem. No entanto, pode ser observada uma diminuição gradual dos resultados de PAC do primeiro para o 22^o dia de armazenamento, sugerindo melhora na capacidade de retenção de água da

carne, provavelmente pelo efeito da maturação no grau de gelatinização do colágeno, que só se solubiliza em altas temperaturas (OLIVEIRA et al., 1998).

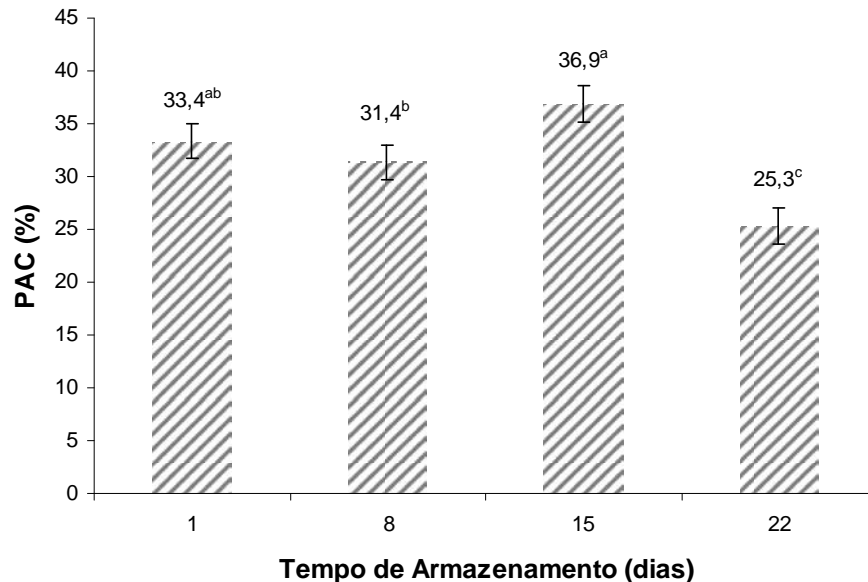


Figura 21 – Valores médios da Perda de Água por Cocção (PAC), apresentados por Tempo de Armazenamento (dias). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os valores da maciez dos bifes de lombo suíno variaram de 2,4 a 5,9 kgf (Tabela 6). O valor médio determinado da maciez foi 3,9 kgf, o que indica que a carne permaneceu macia por todo o período avaliado. Beggan et al. (2004) também não observaram efeito da composição gasosa na maciez da carne. Porém, Seyfert et al. (2005) observaram diminuição da maciez da carne bovina embalada com altas concentrações de oxigênio ($80\%O_2+20\%CO_2$). Mais recentemente, Lund et al. (2007) também observaram diminuição da maciez de carne suína (*Longissimus dorsi*) armazenada em altas concentrações de oxigênio ($70\%O_2+30\%CO_2$) por 14 dias, atribuindo essa diminuição à oxidação das proteínas.

Na análise estatística dos dados deste trabalho foram testados efeitos de covariável em todas as variáveis analisadas. Nas variáveis onde foi observado efeito significativo ($P < 0,05$), foi incluído o efeito da covariável no modelo estatístico. Assim, deve-se observar que os valores de L^* e a^* determinados nos bifes de lombo suíno ao longo do experimento, tiveram efeito de suas covariáveis iniciais, ou seja, os valores foram corrigidos de acordo com os valores de L^* e a^* determinados ao início do experimento, antes da adição da composição gasosa (Tabela 8). Observou-se na análise estatística que os valores L^* tiveram efeito da Composição gasosa ($P < 0,05$) e do Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$) e por isso, os resultados foram apresentados separadamente (Figura 22 a e b).

Tabela 8 – Resumo da Análise de Variância para as variáveis L^* e a^*

FV	GL	Quadrados Médios			
		L^*		a^*	
Composição	2	9,27	*	8,85	**
Tempo	3	42,26	**	20,30	**
ComposiçãoxTempo	6	3,18	NS	0,80	NS
Cov. Inicial	1	161,35	**	8,60	*
Resíduo	33	2,20		1,38	

NS = Não significativo; * = resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste F; ** = resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$) pelo teste F.

Os valores de L^* determinados nos bifes da Composição B tiveram valor médio superior (62,9) aos demais, que não tiveram diferenças entre si (Figura 22a). Também houve ligeiro aumento nos valores de L^* até o 15^o dia de armazenamento (Figura 22b). Embora as diferenças tanto entre as Composições gasosas como entre

os Tempos de armazenamento tenham sido observadas, elas foram muito pequenas não sendo percebidas visualmente.

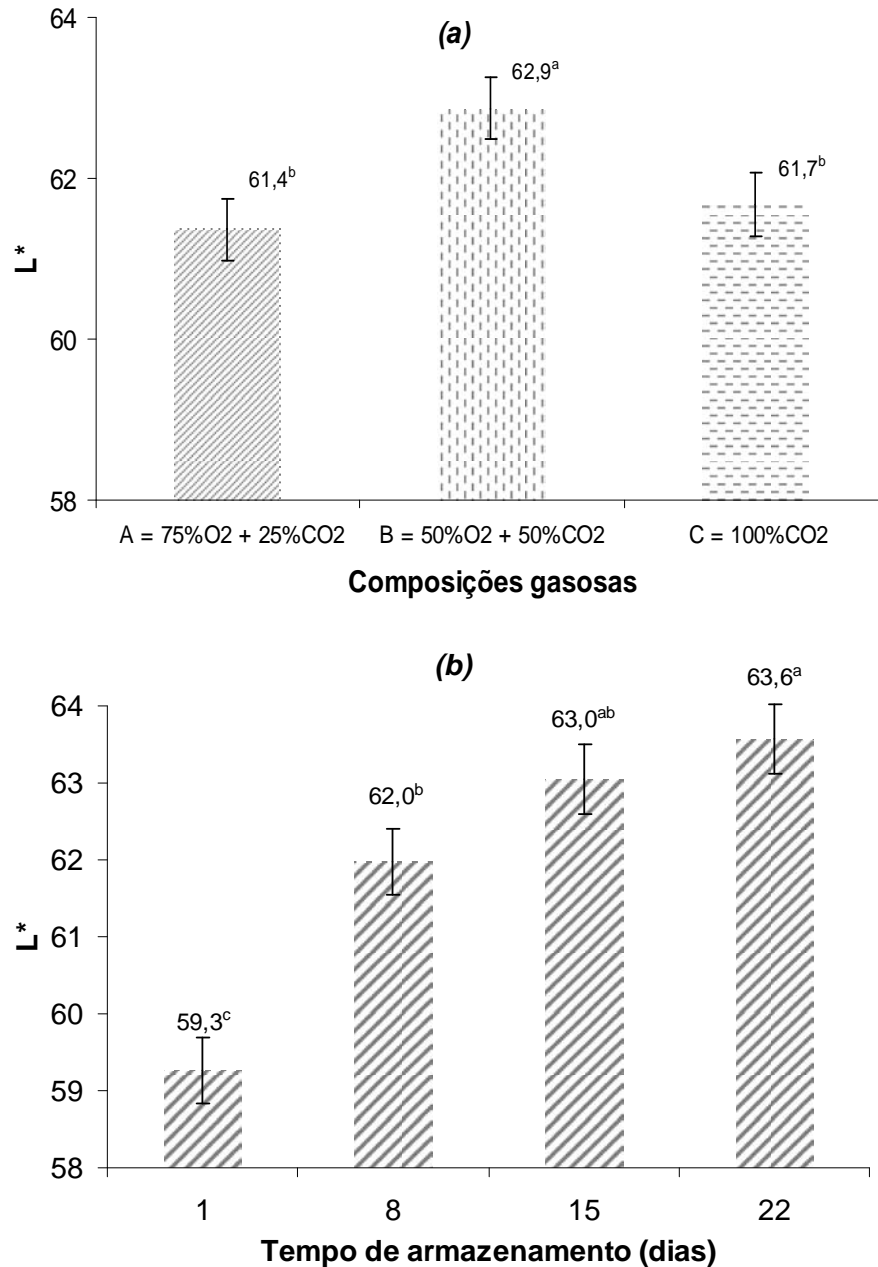


Figura 22 – Valores médios de L* apresentados por Composição gasosa (a) e Tempo de Armazenamento (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

De acordo com McGuire (1992), os valores de L^* indicam a luminosidade da carne, os quais sofrem a influência da quantidade de água na superfície dos bifes no momento da mensuração, sugerindo haver uma relação direta com a PAE (%). Possivelmente, o ligeiro aumento dos valores de L^* nos primeiros dias de armazenamento, foi causado pela variação (embora não significativa) da PAE (%) durante o armazenamento.

Jeremiah & Gibson (1997) trabalharam com amostras de lombo suíno com 100%CO₂, 70%O₂ + 30%CO₂ e 100%N₂ e determinaram valores de L^* superiores nas amostras das embalagens que continham maior quantidade de O₂. Sørheim et al. (1997) trabalharam com atmosferas gasosas contendo 100%CO₂ com 0; 0,5 e 1,0%O₂ residual e observaram que os valores de L^* aumentaram até o 7º dia, estabilizando-se até o final do experimento (21 dias). Por outro lado, Viana et al. (2005) trabalharam com cortes de lombo suíno embalados com 100%CO₂, 99%CO₂ + 1%CO, 100%O₂ e 100%CO + vácuo (após uma hora de exposição) e observaram diminuição dos valores de L^* durante os 20 dias de estocagem.

Com relação aos valores de a^* , além do efeito da covariável inicial, a análise estática identificou efeito significativo de Composição gasosa ($P < 0,01$) e de Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$) (Tabela 8). Os bifes da Composição A e B (8,2 e 7,9 respectivamente) tiveram valores de a^* superiores aos da composição C (6,3) (Figura 23a). Visualmente, os bifes das Composições A e B tenderam a apresentar coloração mais rósea ou mais avermelhada que os demais, o que é esperado em virtude da maior quantidade de oxigênio nesta Composição, que mantém a mioglobina em sua forma oxigenada (oximioglobina) por mais tempo. Entretanto, o aumento da concentração de oxigênio de 50 para 75%, não implicou em melhora na cor.

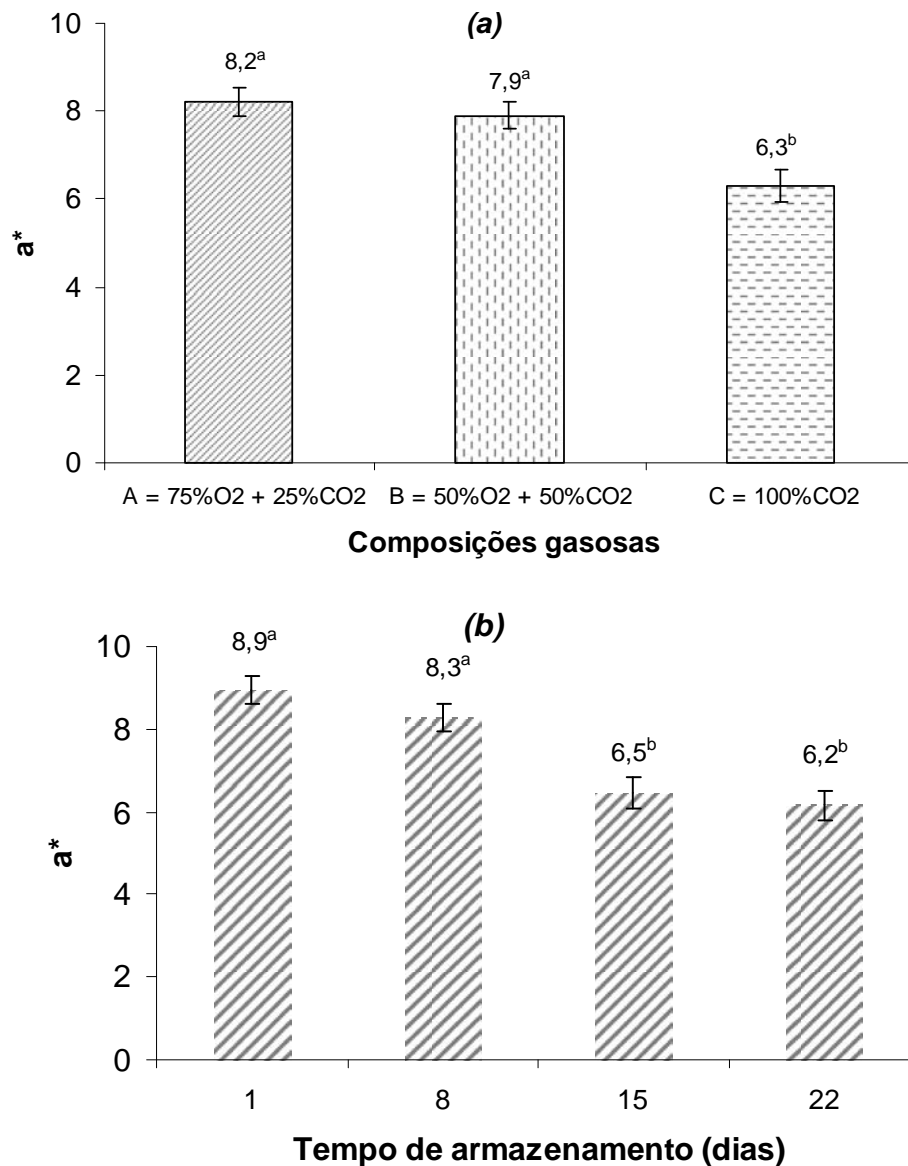


Figura 23 – Valores médios de a^* por Composição gasosa (a) e Tempo de Armazenamento. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Durante o período de armazenamento, percebeu-se uma diminuição dos valores de a^* de 8,9 para 6,2 (Figura 23b), sugerindo uma aparente descoloração na superfície dos bifes. Alguns estudos indicam que os valores de a^* tendem a diminuir progressivamente durante o período de armazenamento, independente do tipo de

embalagem ou da composição gasosa utilizada, indicando que existe uma correlação negativa entre os valores de a^* e tempo de armazenamento (JEREMIAH & GIBSON, 2001; VIANA et al. 2005). Sørheim et al. (1997) trabalharam com carne suína normal e PSE embaladas em atmosfera com 100% CO₂ contendo 0, 0,5 e 1,0% de oxigênio residual e observaram que as embalagens com 0,5 e 1,0% de oxigênio residual tiveram menores valores de a^* para carne normal e PSE. Esses autores sugeriram que baixas concentrações de O₂ promovem a descoloração da superfície da carne pelo acúmulo de metamioglobina.

Uma hipótese para explicar a descoloração da superfície das carnes é que, segundo Walker (1980), as bactérias, principalmente do gênero *Pseudomonas sp.*, consomem o oxigênio perto ou na superfície da carne promovendo sua descoloração. Como foi observado no presente trabalho, houve crescimento exponencial tanto de *Pseudomonas sp.* quanto de psicrotóxicos aeróbios a partir do 15^o dia de armazenamento (Figuras 18 e 19) mesmo período em que os valores de a^* caíram significativamente, sugerindo-se que esta queda dos valores esteja relacionada com o crescimento de microrganismos, apesar dos valores de pH terem sofrido pouca variação (Figura 20).

No resumo da análise de variância das variáveis de cor b^* e C^* (Tabela 9), observa-se efeito significativo ($P < 0,01$) apenas de Composição gasosa. Na Figura 24, os valores médios de b^* nos bifes da Composição C foram inferiores aos demais, que por sua vez, não apresentaram diferença entre si. Lindahl et al. (2001) observaram que 86% na variação dos valores de b^* são causados pela quantidade de metamioglobina presente na superfície do músculo. Nessas condições a forma de minimizar esse problema é armazenar as carnes à 0^o, que segundo Gill (1996) diminui consideravelmente a formação de metamioglobina.

Tabela 9 – Resumo da Análise de Variância para as variáveis b^* e C^* , no experimento

FV	GL	Quadrados Médios			
		b^*		C^*	
Composição	2	5,01	**	8,67	**
Tempo	3	0,09	NS	2,48	NS
ComposiçãoxTempo	6	0,46	NS	1,07	NS
Resíduo	34	0,78		1,45	

NS = Não significativo; * = resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste F; ** = resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$) pelo teste F.

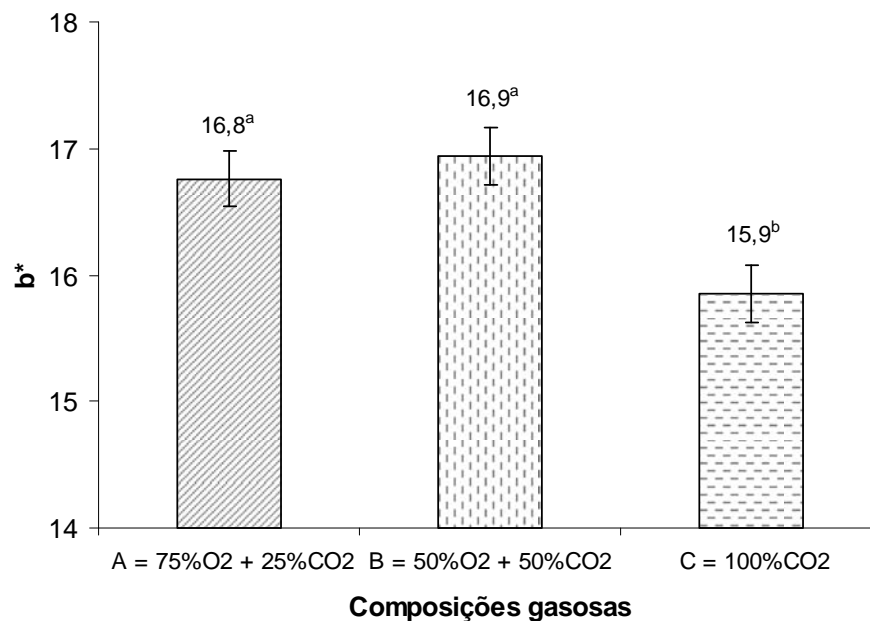


Figura 24 – Valores médios de b^* apresentados por Composição gasosa. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

De acordo com Olivo & Shimokomaki (2001), existe uma relação entre a razão a^*/b^* com o teor de oximioglobina e metamioglobina presentes na superfície da carne. Deste modo, valores mais próximos a 1 contém maior teor de oximioglobina, enquanto que os que tendem a zero, maior teor de metamioglobina. De maneira geral, os valores da razão a^*/b^* deste trabalho estão próximos a 0,5 com 1 e 8 dias de armazenamento, com 0,4 aos 15 dias e 0,3 aos 22 dias de armazenamento. Esses valores sugerem que houve acúmulo de metamioglobina na superfície dos bifes em função do tempo de armazenamento.

Também foram observados valores inferiores de C^* nos bifes de Composição C (Figura 25). Esse resultado era esperado, uma vez que esta variável é calculada utilizando os valores de a^* e b^* , que tiveram valores inferiores aos demais nos bifes da Composição C.

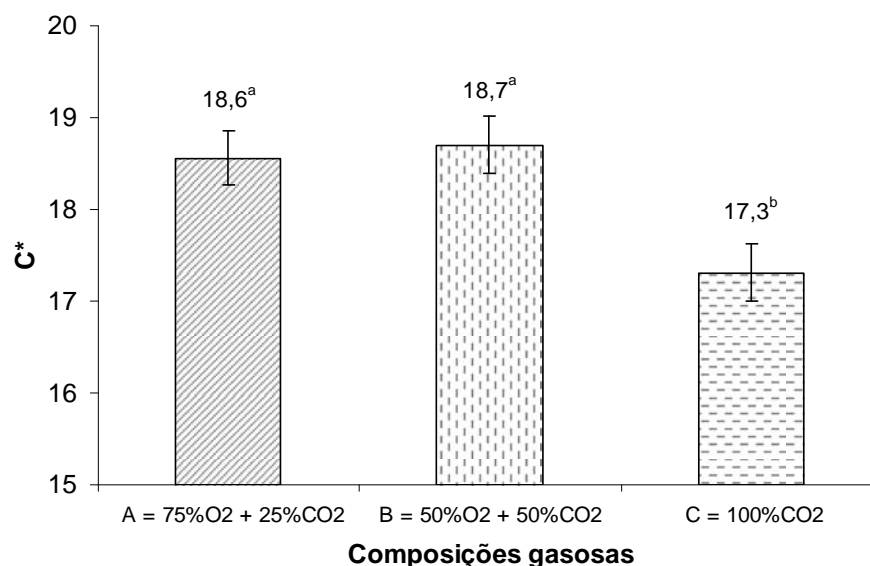


Figura 25 – Valores médios de C^* apresentados por Composição gasosa. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

O resumo da análise de variância contido na Tabela 10 refere-se aos valores do ângulo hue (h^*). Estes dados estão apresentados em tabela separada pelo fato de ter sido verificado efeito das covariáveis iniciais a^* ($P < 0,01$) e b^* ($P < 0,05$), e ainda efeito significativo de Tempo de armazenamento ($P < 0,01$).

Os valores médio do ângulo hue (h^*) aumentaram durante o tempo de armazenamento, com aumento mais pronunciado do 8^o para o 15^o (Figura 26). Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que, assim como para C^* , utilizam-se os valores de a^* e b^* , para o cálculo de h^* e os valores de a^* determinados neste trabalho, diminuíram durante o armazenamento. De acordo com Lanari et al. (1995) valores altos de h^* , ou seja, mais próximos a 90, associados a baixos valores de C^* indicam amarelamento da carne.

Tabela 10 – Resumo da Análise de Variância para a variável h^*

FV	GL	Quadrados Médios	
		h^*	
Composição	2	9,78	NS
Tempo	3	154,35	**
Composição x Tempo	6	4,46	NS
Covariável a^* inicial	1	64,86	**
Covariável b^* inicial	1	35,77	*
Resíduo	33	245,32	

NS = Não significativo; * = resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste F; ** = resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$) pelo teste F.

Cayuela et al. (2004), em estudo utilizando lombo suíno acondicionado em atmosfera modificada contendo 70%O₂+30%CO₂, observaram aumento dos valores

de h^* e de C^* durante todo o período experimental, que foi de 20 dias e ainda que atmosferas com maiores concentrações de O_2 tenderam a ter maiores valores de C^* .

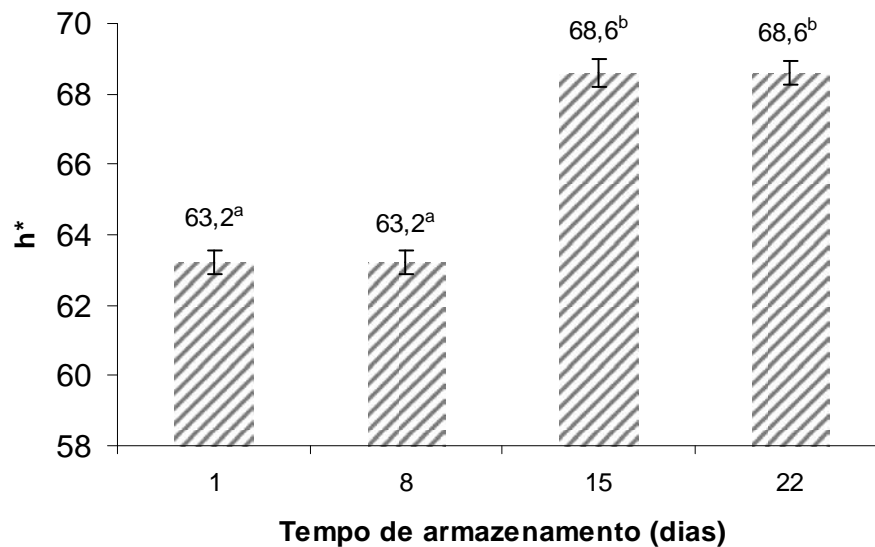


Figura 26 – Valores médios de h^* apresentados por Tempo de Armazenamento.

Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

De maneira geral, as medidas de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) determinadas nos bifes de lombo suíno deste trabalho, permitiram a conclusão de que a concentração de oxigênio no interior das embalagens das Composições A e B promoveram melhor aparência da carne. Visualmente percebeu-se que as carnes das Composições A e B eram mais róseas e mais atraentes, por outro lado, os bifes da Composição C, tiveram cor mais amarronzada durante todo o período experimental, provavelmente pelo acúmulo de metamioglobina. Percebeu-se também que as após a abertura dos masterpacks, a aparência dos bifes das Composições A e B permanecia a mesma, porém a aparência dos bifes da Composição C, até o oitavo dia de armazenamento

se modificava, isto é, após um período de aproximadamente 30 minutos que correspondia ao “*bloom*”, a cor rósea da carne retornava, provavelmente pela ação da enzima redutora de metamioglobina, que tem atividade limitada pelo tempo (MANCINI & HUNT, 2005).

5.5 Resultados das de concentração de metamioglobina e TBARS nas amostras de bife de lombo suíno embalados em três condições de atmosfera modificada

Na análise estatística dos resultados das análises bioquímicas, não se observou efeito significativo de nenhuma fonte de variação para a concentração de metamioglobina. Porém, verificou-se efeito de Composição ($P < 0,01$), Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$) e interação entre Composição e Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$) nos resultados das análises de TBARS determinados nas amostras de lombo suíno (Tabela 11).

De acordo com Krzywicki (1982), a concentração de metamioglobina é expressa em porcentagem, em relação ao total de pigmentos da carne (mioglobina + oximioglobina + metamioglobina). Observa-se na Tabela 12 que os valores da concentração de metamioglobina variaram de 39,0 a 53,3%. De acordo com Gill (1996), concentrações próximas a 20% de metamioglobina na superfície da carne já são perceptíveis a olho nu e acima de 40% já inibem a intenção de compra.

Behrends et al. (2003), trabalhando com carne bovina, utilizaram embalagens com atmosfera modificada contendo 80%O₂+20%CO₂ e determinaram valores negativos (-0,02 a -0,01%) de metamioglobina com 1 dia de armazenamento, sendo que no décimo dia, os valores ficaram entre 40 e 60% de metamioglobina. Buys (2004) acondicionou carne suína em atmosferas contendo 20%CO₂ + 80%O₂ e 25%CO₂ + 25%O₂+ 50%N₂ e relataram que ao início do experimento, os valores de

metamioglobina variaram de 60 a 80%, porém diminuíram até 40% durante os 3 dias de *display life*. Os resultados apresentados no presente trabalho estão próximos dos encontrados por Buys (2004).

Tabela 11 – Resumo da análise de variância dos dados de Metamioglobina e TBARS

Fonte Variação	GL	Soma de Quadrados			
		Metamioglobina		TBARS	
Trat ¹	2	53,21	NS	46,26	**
Tempo ²	3	247,84	NS	267,51	**
Trat. x Tempo	6	140,27	NS	14,02	**
Resíduo	34	3741,36		967,09	

¹ Composição; ²Tempo de armazenamento (dias); NS = não significativo; ** resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade (P<0,01) pelo teste F.

Tabela 12 – Valores médios e erro padrão (EP) da concentração de metamioglobina (%) nas amostras de lombo suíno

Tempo de armazenamento (dias)	Composições Gasosas					
	A (75%O ₂ +25%CO ₂)		B (50%O ₂ +50%CO ₂)		C (100%CO ₂)	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
1	51,4	5,1	43,8	5,1	39,0	5,1
8	36,1	5,1	34,0	5,1	46,0	5,1
15	42,6	5,1	51,3	5,1	53,3	5,1
22	45,5	5,1	47,0	5,1	50,0	5,1

A oxidação lipídica pode ser determinada sensorial ou quimicamente através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é um preditor fortemente relacionado com a rancidez (MCMILLIN, 2008). De acordo com Campo et al. (2006), valores de TBARS da ordem de 2,0 mg malonaldeído/kg carne são considerados como o limite para aceitação do consumidor, porque acima destes valores o odor de rancidez já é bem perceptível. Aos 8 dias de armazenamento (Tabela 13), as amostras provenientes das composições A e B, tiveram valores de TBARS superiores a 2 (2,4 e 2,6 mg malonaldeído/kg amostra, respectivamente), o que era de se esperar, uma vez que o oxigênio no interior das embalagens pode promover aumento nas taxas de oxidação lipídica (PEARSON et al., 1983; GRAY et al., 1996; GUILLÉN-SANS & GUZMÁN-CHOZAS, 1998; CAMPO et al., 2006; MCMILLIN, 2008). Interessante notar que as carnes da Composição C, só tiveram valores de TBARS acima de 2 mg malonaldeído/kg amostra aos 22 dias de armazenamento, corroborando com os autores acima citados.

Tabela 13 – Valores médios e erro padrão (EP) dos resultados das análises de TBARS (mg de malonaldeído/kg de amostra) em lombo suíno

Tempo de armazenamento (dias)	Composições Gasosas					
	A (75%O ₂ +25%CO ₂)		B (50%O ₂ +50%CO ₂)		C (100%CO ₂)	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
1	0,4 ^{aA}	0,5	0,4 ^{aA}	0,5	0,2 ^{aA}	0,5
8	2,4 ^{aB}	0,5	2,6 ^{aB}	0,5	1,5 ^{aA}	0,5
15	5,3 ^{aC}	0,5	4,7 ^{aC}	0,5	1,2 ^{bA}	0,6
22	12,4 ^{bD}	0,5	15,2 ^{aD}	0,6	6,7 ^{cB}	0,5

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Martínez et al. (2005), trabalhando com salsichas de carne suína embaladas em atmosferas com diferentes concentrações de O₂ e CO₂ associadas ao uso de CO, observaram que atmosferas com a mesma concentração de O₂ porém com concentrações diferentes de CO₂ tenderam a ter valores finais de TBARS diferentes. Esses autores observaram que quanto maiores foram as concentrações de CO₂ nas embalagens que continham O₂, maiores foram os valores de TBARS determinados nas amostras. De acordo com os mesmos autores, esse fenômeno pode ser explicado pelo efeito do CO₂ no pH da carne. Altas concentrações de CO₂ associadas a altas concentrações de O₂, promoveram a queda do pH, que por sua vez pode ser responsável pelo aumento das taxas de oxidação. Essas observações parecem explicar os resultados aumentados de TBARS da Composição B neste trabalho. Porém, esses dados não podem ser associados aos valores de pH, que praticamente não diferiram durante os 22 dias de armazenamento (Figura 20). No entanto, é importante esclarecer que as medidas de pH foram tomadas no interior dos bifés, possivelmente na superfície dos mesmos os valores poderiam ter sido inferiores pelo efeito do CO₂.

Os resultados das análises de TBARS permitem sugerir que a utilização de concentrações maiores que 20%CO₂ associadas a altas concentrações de O₂ pode promover maior oxidação lipídica das carnes. Neste contexto, o ideal seria ou a utilização de atmosferas com 75%O₂+25%CO₂ para períodos mais curtos de armazenamento de até 8 dias, ou contendo 100% CO₂ para períodos mais longos de até 22dias.

Jakobsen & Bertelsen (2000) trabalharam com cortes de lombo suíno acondicionados em atmosferas com 80%O₂+20%CO₂ e determinaram valores de TBARS variando de 2 a 18mg de malonaldeído/kg de carne durante 10 dias de

estocagem. Esses autores relataram que para manter a carne com boa aparência e um mínimo de oxidação lipídica, concentrações de 20% de O₂ são necessárias. Os mesmos autores relataram ainda que o fator mais importante na manutenção da cor vermelha da carne (oximioglobina) com baixos níveis de oxidação lipídica é a temperatura de armazenamento.

Outra abordagem dos resultados das análises de TBARS deste trabalho está na Figura 27, onde se apresenta o gráfico de regressão dos resultados de TBARS com os valores estimados pelas equações de regressão e ainda com os valores determinados nas análises. Observa-se que até o oitavo dia de armazenamento as curvas tiveram comportamento semelhante, sendo que em seguida, as atmosferas com maiores concentrações de oxigênio tiveram aumento mais pronunciado do que a atmosfera que continha 100% CO₂.

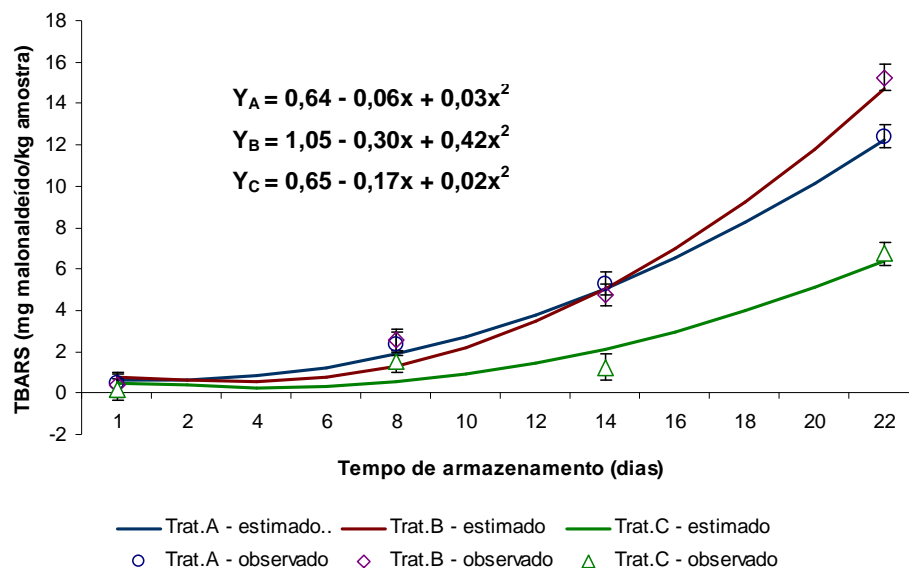


Figura 27 – Estudo de regressão para os resultados da análise de TBARS

5.6 Resultados das análises sensoriais visuais em bifes de lombo suíno expostos em balcão expositor

Nos períodos de amostragem que corresponderam aos 1, 8, 15 e 22 dias de armazenamento, algumas bandejas com os bifes de lombo suíno foram submetidas à análise sensorial. Ao final de cada dia de exposição, também foram tomadas as medidas da cor objetiva dos bifes.

Conforme citado por Muñoz et al. (1993), a vida útil pode ser determinada como o tempo no qual as notas de aceitação global encontram-se acima de um valor mínimo pré-determinado. Neste trabalho, foi estabelecido o final da vida útil como sendo o ponto em que as notas atribuídas pelos avaliadores para o atributo de aparência geral fossem inferiores ao conceito 4, em uma escala 7 pontos (1 = desgostei muito e 7 = gostei muito) utilizada.

5.6.1 Aceitação visual e Intenção de Compra

Durante a análise sensorial visual, foi solicitado aos provadores que atribuísem uma nota para aparência geral das carnes e em seguida, lhes foi solicitado que se o critério econômico não fosse levado em consideração, o quanto de intenção eles teriam em comprar a referida carne. Percebe-se nas Figuras 28 e 29, comportamento bastante semelhante das notas atribuídas pelos avaliadores e, em ambos os casos, os bifes da Composição C receberam notas inferiores a 4, no primeiro dia de Display do 8º dia de armazenamento. Nas outras composições, as notas permaneceram acima deste valor até o final do experimento.

O fato dos avaliadores atribuírem notas inferiores para as carnes provenientes da Composição C pode ser explicado pelo efeito da pequena quantidade de oxigênio verificado no interior das embalagens masterpack e já discutido anteriormente.

Segundo Gill & Harrison (1989), Jeremiah et al. (1995), Jayas & Jeyamkondan (2002), entre outros, a presença de O₂ em baixas concentrações associada a altas concentrações de CO₂ pode promover o acúmulo de metamioglobina na superfície da carne, deixando-a amarronzada, influenciando na aceitação do consumidor.

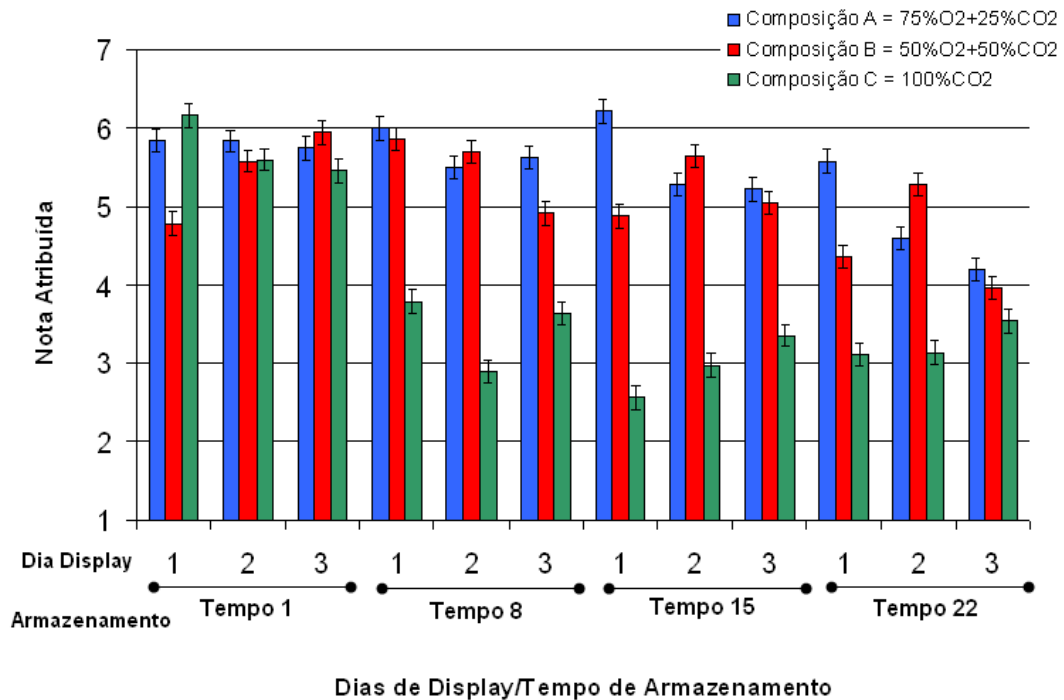


Figura 28 – Valores médios das notas atribuídas para Aparência Geral

De maneira geral, pode ser observado nas Figuras 28 e 29 que a luz do balcão expositor afetou negativamente a aparência das carnes e, dessa forma, as notas tenderam a diminuir do primeiro para o terceiro dia de display em todos os tempos de armazenamento. Jeremiah & Gibson (1997) relataram que a carne suína embalada com 70%O₂ + 30%CO₂ teve aceitação do consumidor por até 24 dias de armazenamento, baseados em critérios visuais e olfativos. Buys (2004), trabalhando com carne suína embalada em 100%CO₂ + absorvedor de oxigênio, 80%O₂+20%CO₂ e 25%O₂+ 25%CO₂+ 50%N₂, relatou que para a Composição que continha 100%CO₂ + absorvedor de oxigênio, após 2 e 4 dias de display, as amostras dos

tempos 0, 7 e 14 dias de armazenamento, foram mais aceitas pelos consumidores do que as com 0 dias de display, sugerindo redução de metamioglobina. Nas Composições com 80%O₂+20%CO₂ e 25%O₂+25%CO₂+50%N₂, as amostras obtiveram resultados dos avaliadores de gostou ligeiramente para gostou muito durante todo o período de armazenamento, porém, esse pesquisador observou que durante os dias de display a aceitação foi diminuindo progressivamente.

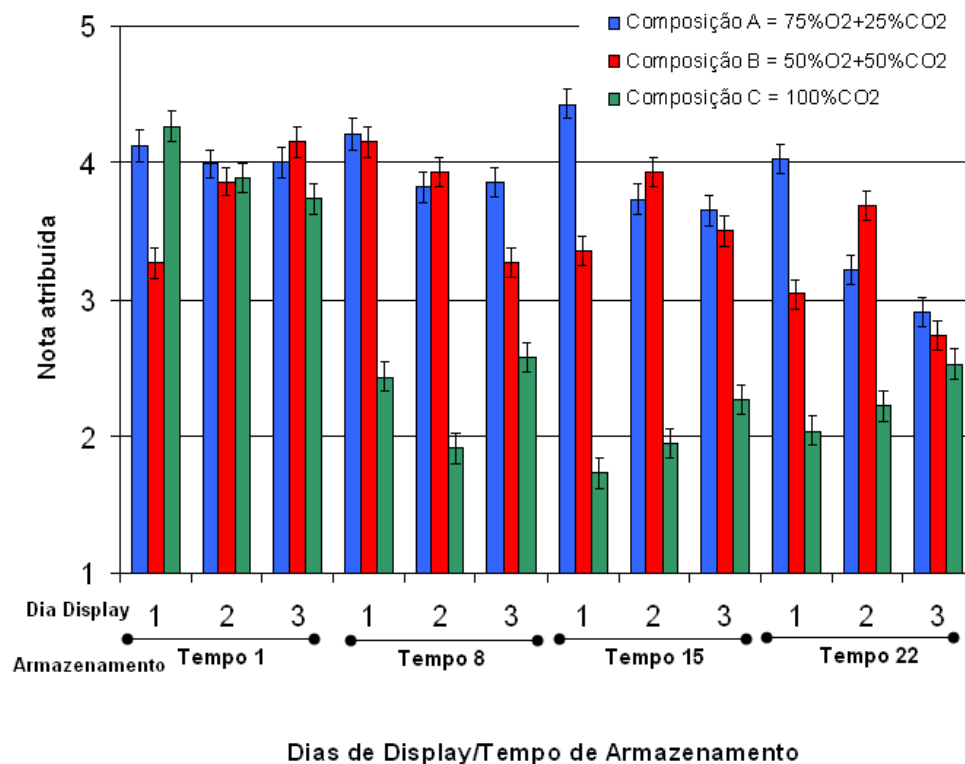


Figura 29 – Valores médios das notas atribuídas para Intenção de Compra

5.6.3 Análise Instrumental da Cor

Os resultados da análise instrumental da cor das amostras de bife de lombo suíno dispostos em balcão expositor, após a análise visual, estão apresentados nas Tabelas 14 e 15 que contêm, respectivamente, uma análise estatística descritiva e um resumo da análise de variância das variáveis estudadas.

Na análise estatística descritiva, notou-se que os valores das variáveis estudadas estiveram dentro na normalidade, com exceção de a* que teve Coeficiente de Variação elevado (26,15%) (Tabela 14).

Tabela 14 – Número de observações (N), Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV), Mínimo e Máximo das variáveis estudadas, no experimento

Variável	N	Média	DP	CV	Mínimo	Máximo
L*	138	62,2	2,7	4,3	56,1	68,0
a*	138	6,7	1,8	26,1	3,1	12,2
b*	138	16,1	0,8	4,7	14,4	17,8
c*	138	17,6	1,2	6,7	15,1	20,8
h*	138	67,1	5,0	7,4	54,1	79,6

Os valores de L* determinados nos bifes de lombo suíno, após a análise sensorial, tiveram comportamento semelhante aos determinados nos bifes durante o armazenamento, ou seja, efeito de Composição gasosa e de Tempo de armazenamento ($P < 0,01$) (Tabela 15). Os bifes da Composição B tiveram valores de L* superiores (63,2) aos demais, os quais não apresentaram diferença entre si (Figura 30a). Com relação ao tempo de armazenamento os valores também tenderam a aumentar nos primeiros quinze dias de armazenamento, se estabilizando a seguir (Figura 30b).

Tabela 15 – Resumo da Análise de Variância de Variáveis de cor

FV	GL	L*	a*	b*	C*	h*	Quadrados Médios		
							L*	a*	b*
Composição gasosa	2	29,43	18,26	5,48	15,74	84,34	**	**	**
Tempo armazenamento	3	122,04	71,34	0,22	14,24	587,05	**	NS	**
Dias de <i>Display</i>	2	0,03	5,53	1,75	4,84	28,61	NS	*	**
Composição x Tempo armazen.	6	3,15	3,62	0,71	2,33	19,97	NS	NS	**
Tempo armazen. x Dias de <i>Display</i>	6	3,90	0,92	0,08	0,41	7,46	NS	NS	NS
Composição x Tempo armazen x Dias de <i>Display</i>	16	3,39	0,74	0,34	0,66	3,99	NS	NS	NS
Residuo	102	464,87	140,38	52,94	79,31	11,89			

NS = Não significativo; * = resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05) pelo teste F; ** = resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade (P<0,01) pelo teste F.

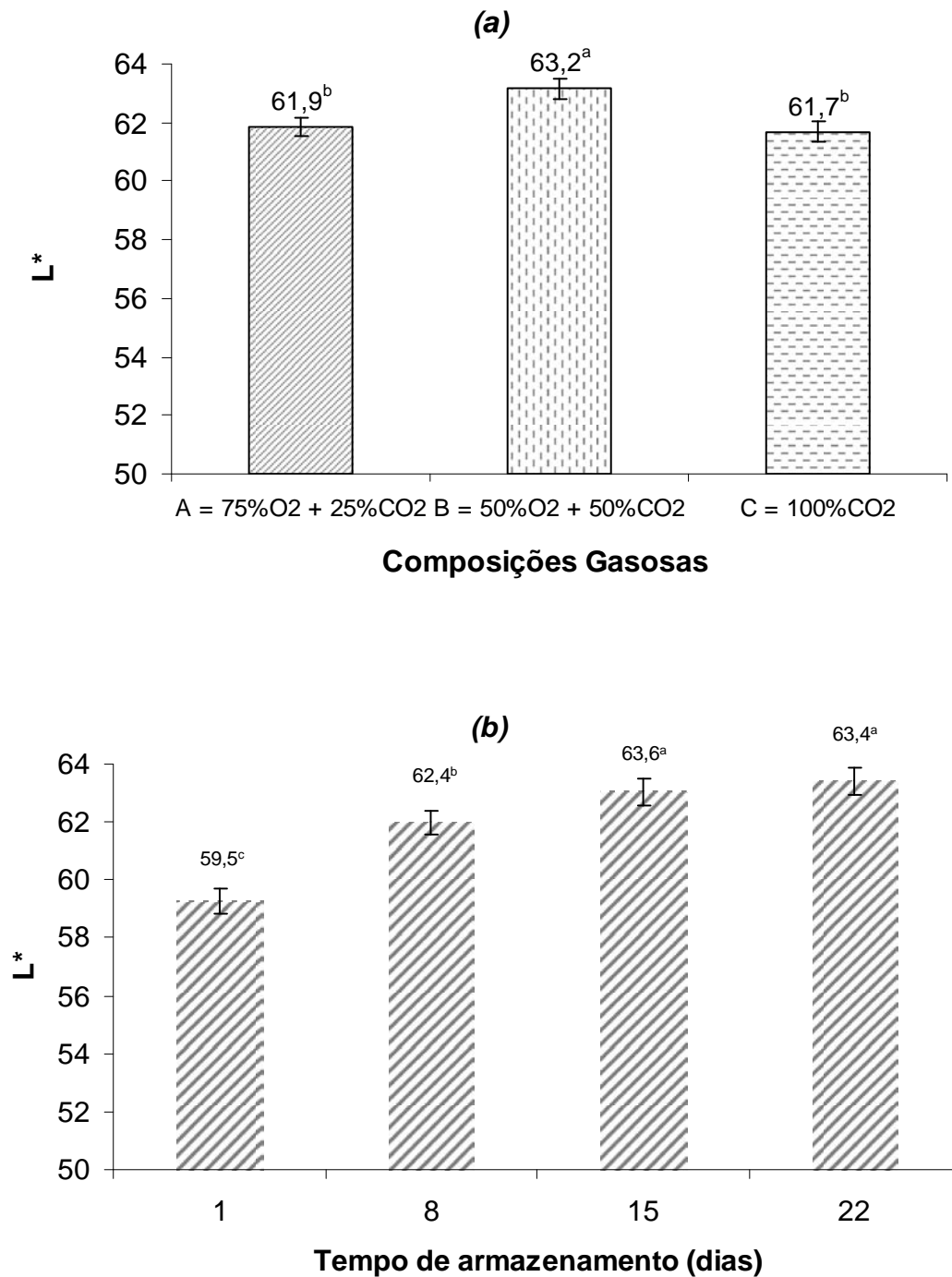


Figura 30 – Valores médios de L^* apresentados por Composição gasosa (a) e Tempo de armazenamento (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Com relação aos valores de a^* , detectou-se efeito significativo de Composição gasosa, Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$), Dias de Display e interação entre Composição e Tempo de armazenamento ($P < 0,05$) (Tabela 15). Nas três Composições gasosas estudadas, os valores de a^* diminuíram durante o período de armazenamento (Figura 31a), comportamento semelhante ao dos valores de a^* determinados durante o armazenamento. No entanto, observa-se na Figura 31b, que de maneira geral, os valores de a^* diminuíram nos 3 dias de display, de 7,2 para 6,5. Essas observações permitem se sugerir que as composições gasosas só influenciaram na conservação das carnes durante o período de armazenamento e, depois da abertura dos masterpacks e exposição das bandejas no balcão expositor, o comportamento da cor dos bifés durante os três dias de display foi o mesmo para todas as Composições. Esse resultado deve ter ocorrido porque não havia nenhum tipo de proteção contra a oxidação provocada pela luz fluorescente do balcão expositor.

Interessante notar que na análise sensorial, de maneira geral os avaliadores também atribuíram notas mais baixas para todas as carnes do primeiro para o terceiro dia de *display*. Jeremiah & Gibson (2001), trabalhando com carne bovina embalada a vácuo e com 100%CO₂, relataram que os valores determinados de a^* diminuíram significativamente durante a estocagem (24 semanas) e também durante o display (30 horas), nos dois tipos de embalagem. Wilkinson et al. (2006) trabalharam com carne suína embalada com 100%CO₂ ou 80%CO₂+19,6%N₂+0,4%CO e observaram que a estabilidade da cor da carne diminuiu quando da exposição ao oxigênio atmosférico. Gill (1996) sugeriu que as carnes armazenadas em atmosferas contendo altas concentrações de Oxigênio + CO₂, quando retiradas de suas embalagens e expostas em display, tinham imediato

crescimento de *Pseudomonas*, sendo a descoloração da carne resultado deste crescimento.

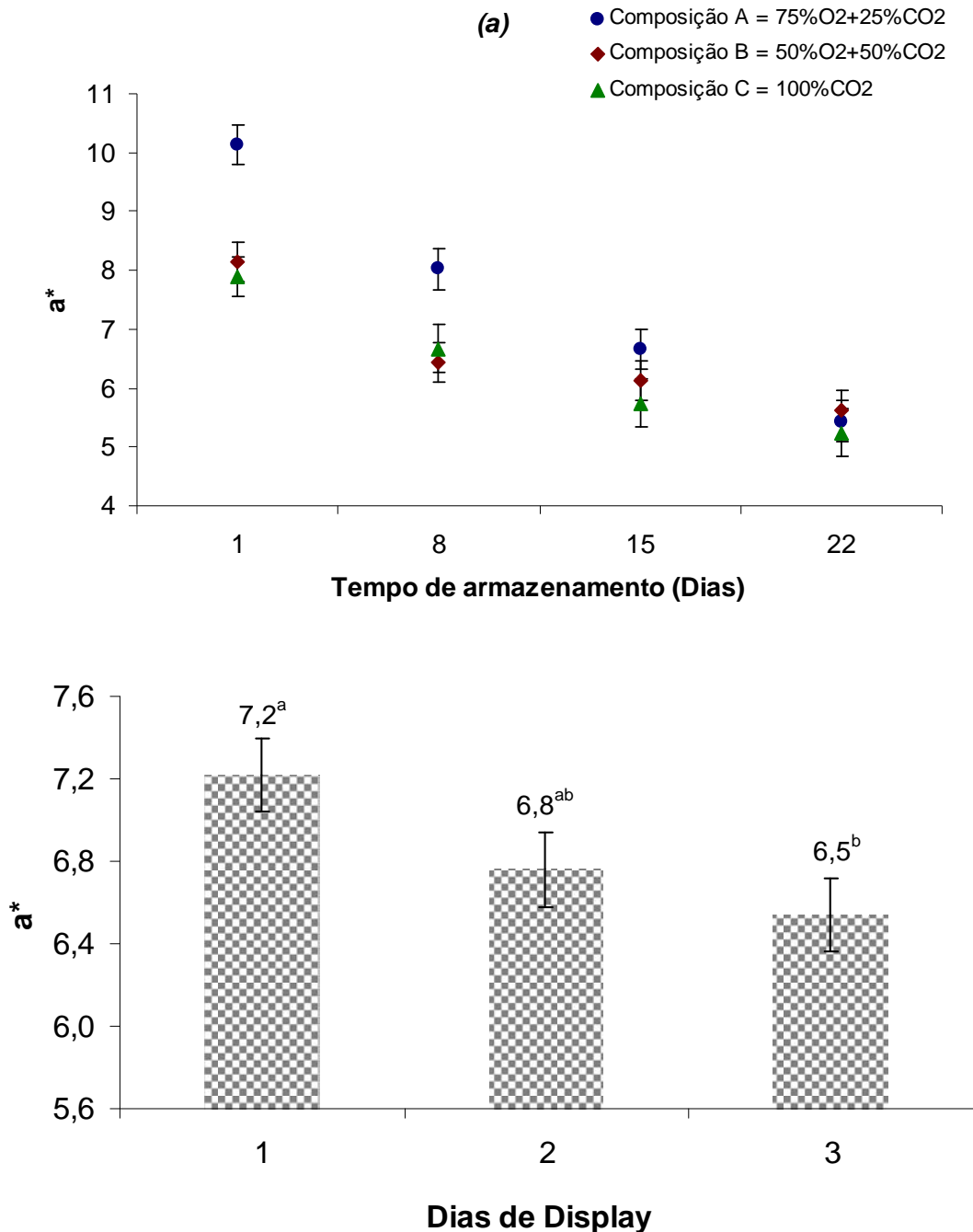


Figura 31 – Valores médios de a* apresentados por Composição gasosa/Tempo de armazenamento (a) e por dias de display (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Apesar de a análise estatística ter captado efeito de Composição ($P < 0,01$) e de Tempo de Armazenamento ($P < 0,05$) (Tabela 15), os valores de b^* apresentados na Figura 32a são muito próximos, não implicando em diferença visual da carne. Quando analisados por dias de display, nota-se uma leve diminuição do primeiro (16,3) para o terceiro dia (15,9) (Figura 32b).

Em relação ao Cromo C^* , os resultados estão apresentados por Tempo x Composição gasosa e por Dia de Display, em função dos resultados das análises estatísticas (Tabela 15).

Observa-se, primeiramente que o comportamento dos dados é bastante semelhante aos valores determinados de a^* , e, do mesmo modo, a Composição A, teve valores de C^* , levemente superiores aos demais nos dois primeiros tempos de armazenamento. Os valores de C^* tenderam a diminuir de maneira geral, durante o tempo de armazenamento. Notou-se ainda diminuição dos valores de C^* durante o período de display (Figura 33 a e b, respectivamente). Apesar das diferenças observadas, mais uma vez se constatou que os valores são muito próximos.

De acordo com os resultados da análise estatística, os valores do ângulo hue (h^*) tiveram efeito de Composição e de Tempo de Armazenamento ($P < 0,01$) (Tabela 15). Observou-se que as Composições B (67,9) e C (68,1) não diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,01$) e foram superiores aos da Composição A (65,6) (Figura 34a). Os valores de h^* aumentaram durante todo tempo de armazenamento, atingindo um valor máximo de 71,2 no vigésimo segundo dia (Figura 34b), indicando uma aparência mais amarronzada da carne.

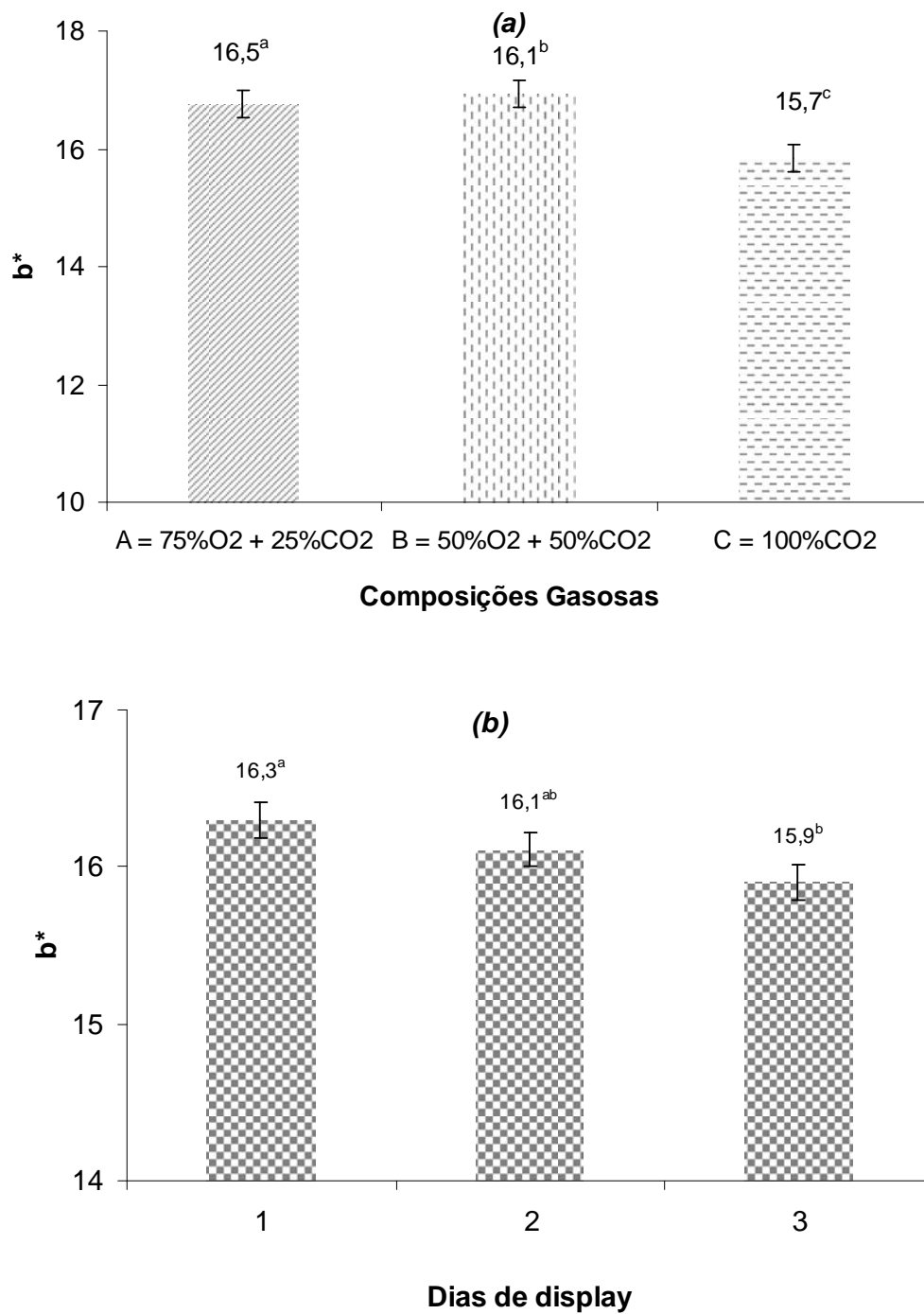


Figura 32 – Valores médios de b^* apresentados por Composição gasosa (a) e dias de display (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

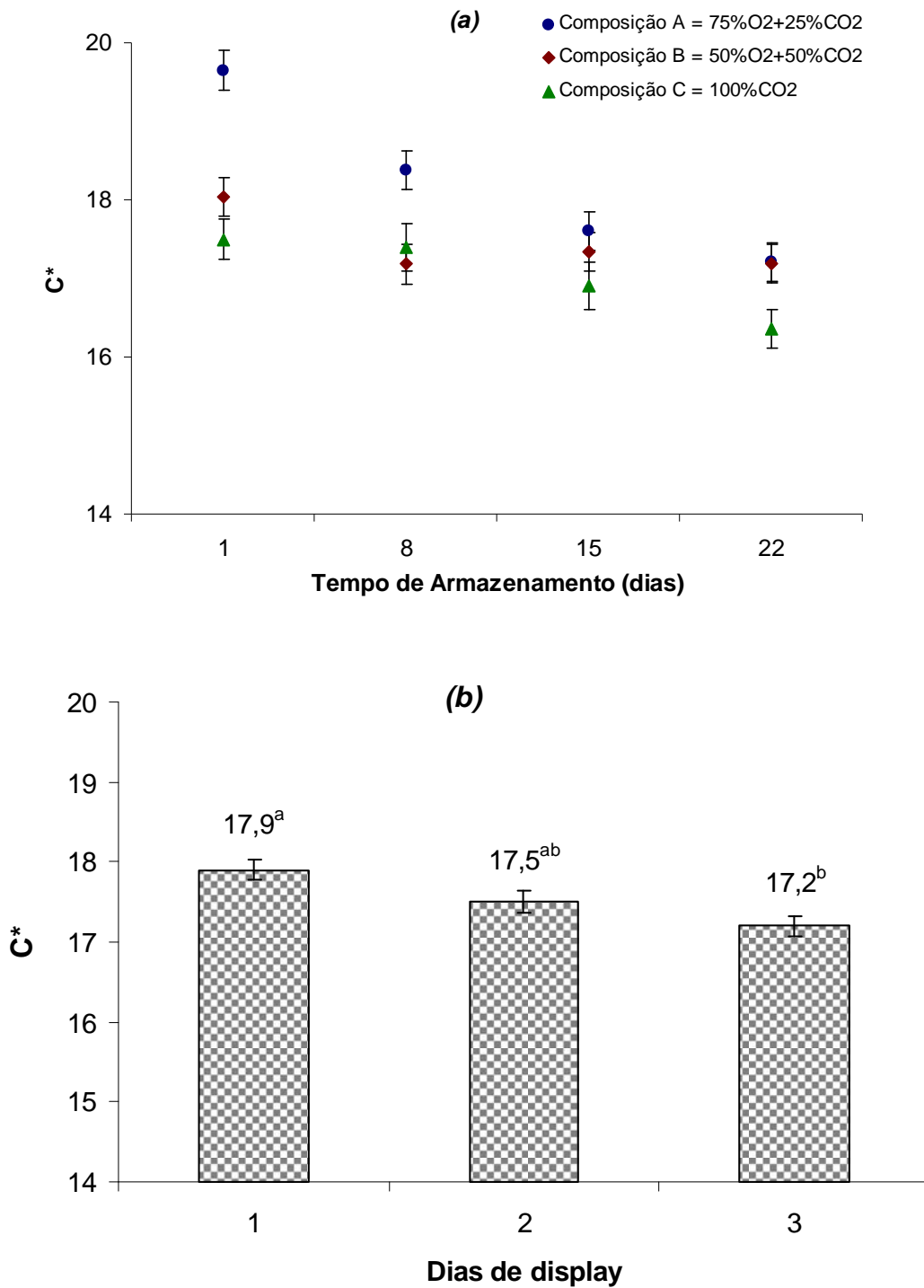


Figura 33 – Valores médios de C* apresentados por Composição gasosa/Tempo de armazenamento (a) e Dias de display (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

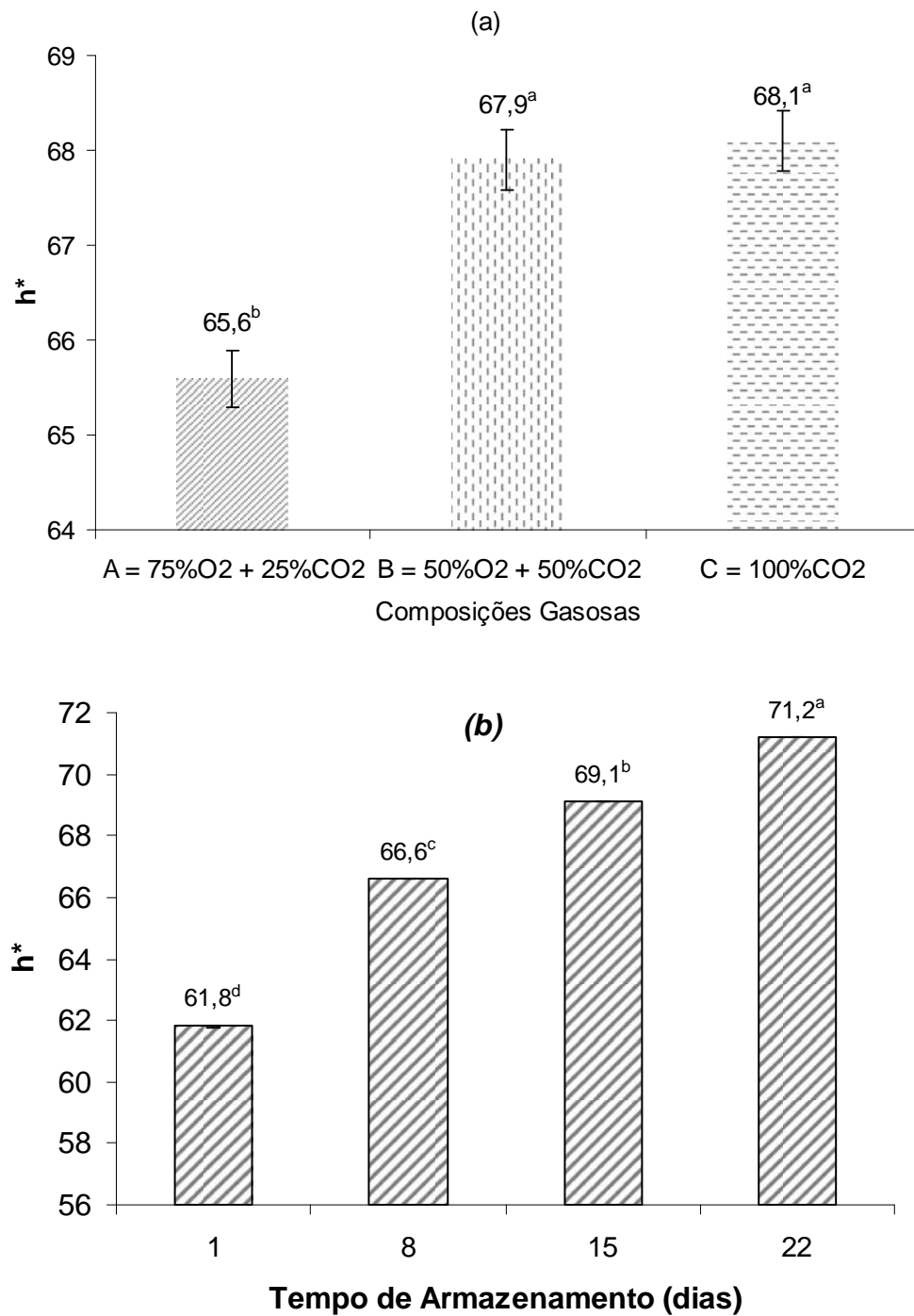


Figura 34 – Valores médios de h^* apresentados por Composição gasosa (a) e Tempo de armazenamento (b). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

5.7 Resultados de Eletroforese Bi-dimensional (2DE)

Os primeiros géis de 2DE foram produzidos com extratos cárneos de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) coletados de um experimento piloto, 1 e 24 horas *post mortem*, (Figuras 35 A e B). Para a confecção desses géis utilizou-se a concentração de 900 µg de proteína.

Pode ser observado na imagem do gel confeccionado com amostras de músculo suíno coletadas 1 e 24 horas *post mortem*, a presença de muitos “rastros” na altura do peso molecular (PM) de 45 kDa, em praticamente toda extensão da faixa de pH de 3 a 10 (em destaque vermelho na Figura 35). Muito possivelmente porque a separação das proteínas na primeira dimensão (focalização isoeletrica) não ocorreu de modo satisfatório. Também se observou nesses resultados, *spots* (proteínas) isolados na faixa de PM de 18 a 34 kDa, e poucos *spots* com peso molecular inferior a 18 kDa. Observou-se também que houve diminuição do volume de alguns *spots* na faixa de 34 kDa (destacados com flechas nas Figuras 35 A e B) de 1 para 24 horas *post mortem*.

De maneira geral, as imagens dos géis da Figura 35 sugerem, em um primeiro momento, que ocorreram problemas na separação das proteínas tanto em relação ao ponto isoeletrico, como ao peso molecular.

Assim, partiu-se para o estudo da melhor concentração de proteínas no gel, que poderia ter efeito na presença dos “rastros”, sabendo-se que vários autores trabalharam com concentrações que variaram de 250 a 1000 µg de proteínas (LAMETSCH et al., 2003; LAMETSCH et al., 2006; MORZEL, 2008; WIEL & ZANG, 2007; HOLLUNG et al., 2007).

Dessa forma, dois géis com amostras de lombo suíno coletadas 1 hora *post mortem*, foram confeccionados com 250 e 500 µg de proteínas (Figura 36A e B,

respectivamente). No gel confeccionado com 250 μg de proteína (Figura 36A) detectou-se um menor número de *spots* (235) quando comparado com o gel confeccionado com 500 μg de proteína (330) (Figura 36B). Observou-se ainda que em ambos os géis os *spots* estiveram mais concentrados na faixa de PM de 75 a 30 kDa e mais perto do pH 10 (em destaque verde). Alguns autores trabalharam com faixas de pH mais específico, por exemplo de 7 a 10 (LAMETSCH & BENDIXEN, 2001; LUCCIA et al., 2005; WIEL & ZANG, 2007), o que pode representar melhor separação e visualização dos *spots* no gel. Porém, como este trabalho teve como proposta inicial o estudo do efeito do Tempo de armazenamento e da Composição gasosa no perfil geral das proteínas da carne suína, a faixa de pH 3 a 10 foi mantida e, com base nas observações dos géis da Figura 36, padronizou-se a utilização de 500 μg de proteína.

Após a confecção dos géis da Figura 36, foi realizado outro teste no qual o Tampão Tris-HCl foi substituído por outro contendo Uréia 8M e detergente CHAPS (2%), o qual lisa as células da carne, extraíndo as proteínas miofibrilares. Também foram testados dois tempos de agitação das amostras com o Tampão Uréia, 30 ou 120 min.

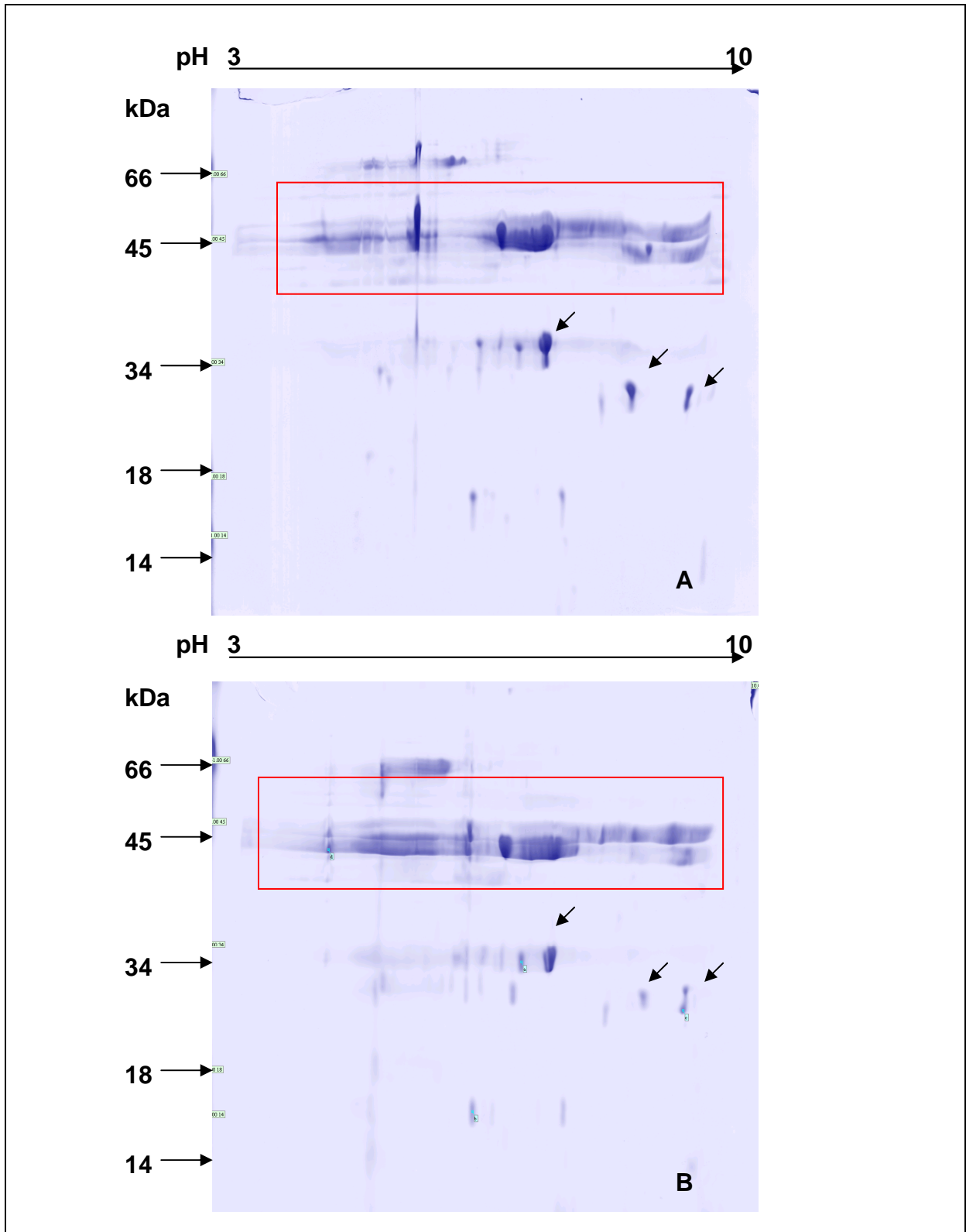


Figura 35 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com extratos de carne contendo 900 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) obtidos 1 e 24 horas *post mortem*

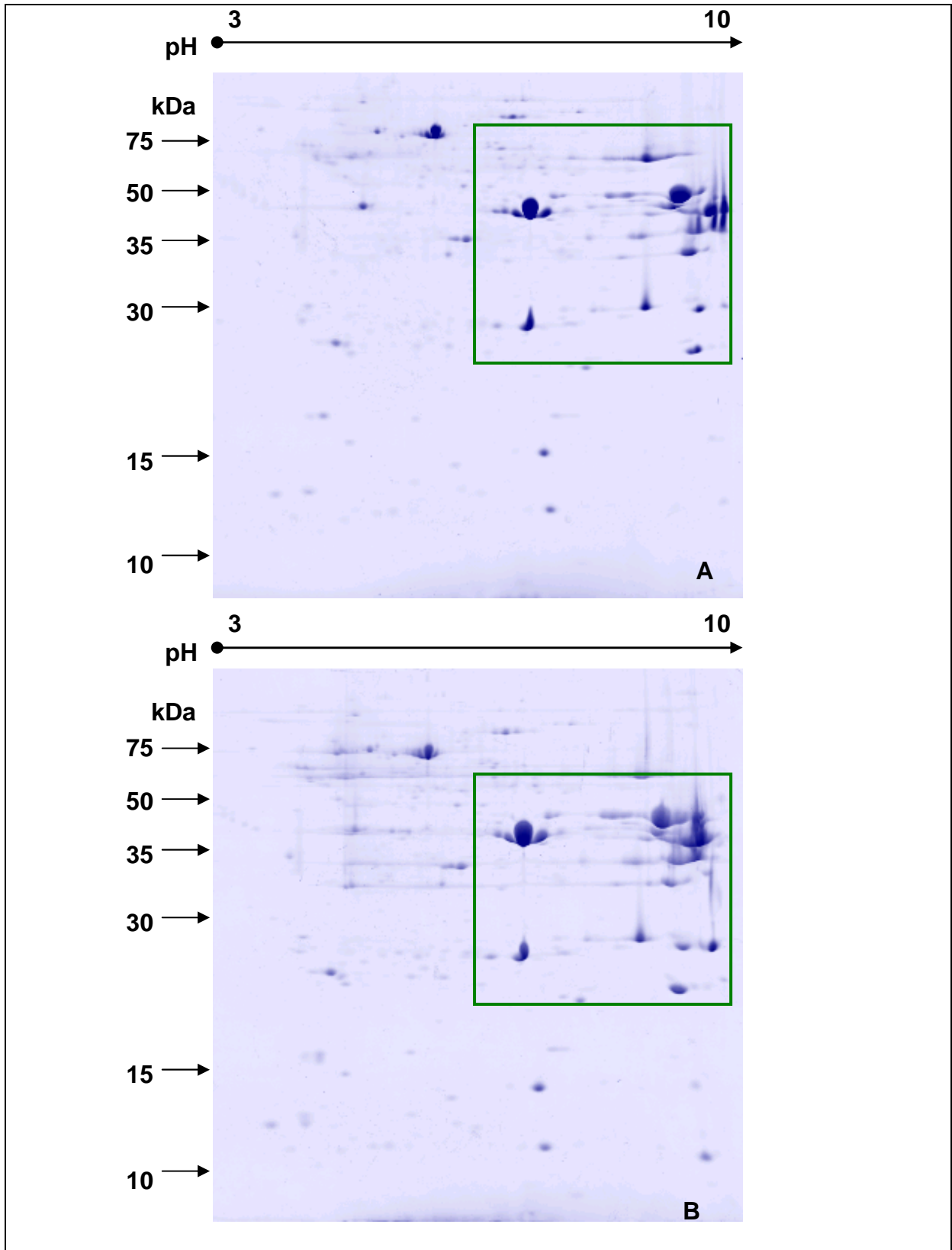


Figura 36 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com extratos de carne contendo 250 (A) e 500 (B) μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) obtidos 1 hora *post mortem*

Para a confirmação de que Tampão Uréia 8M fazia a extração das proteínas miofibrilares, submeteu-se as amostras do extrato cárneo à análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Essa técnica, segundo Coleman & Craig (1996), permite se caracterizar eventos físico ou químicos através de mudanças na entalpia ou calor específico da amostra.

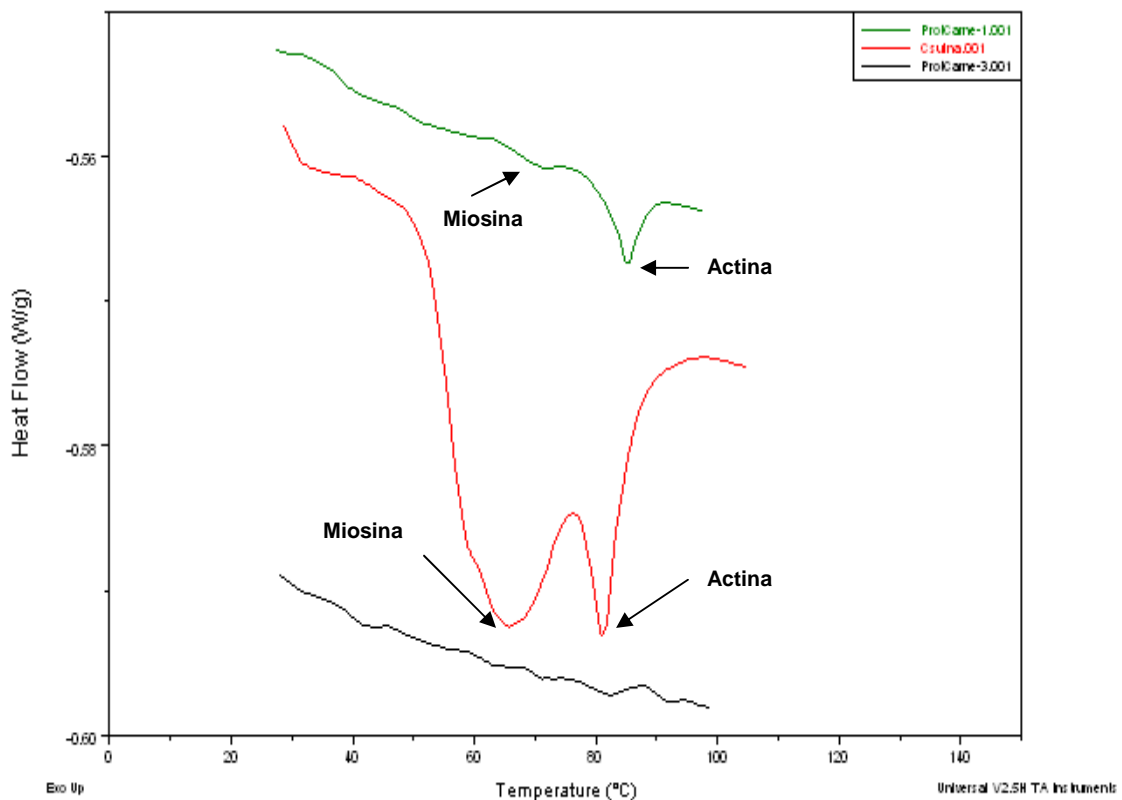


Figura 37 – Termograma de Extratos Cárneos

Observam-se na Figura 37 três curvas típicas de DSC também denominadas de termogramas: a curva verde é o resultado da amostra preparada com Tampão Uréia 8M agitada por duas horas à temperatura ambiente; a curva preta é o resultado da amostra preparada com Tampão Uréia 8M agitada por 30 minutos à temperatura ambiente; e a curva vermelha é o resultado de uma amostra de carne

suína *in natura*. Pode-se observar no termograma da carne suína *in natura* (vermelho) a ocorrência de duas endotermas, a primeira está associada à desnaturação da miosina (Temperatura de desnaturação = 65,76°C) e a segunda endoterma, à desnaturação da actina (Td = 81,14°C). Na curva verde, pode ser notada uma pequena endoterma correspondente à miosina (Td = 71,52°C) e uma maior correspondente à actina (Td = 85,16°C). De maneira geral, pode-se observar que o perfil das curvas de DSC das proteínas no termograma de cor verde foi modificado, em consequência de uma alteração da estabilidade térmica das proteínas. O aumento da estabilidade implicou em aumento da temperatura de desnaturação. A pequena endoterma correspondente à miosina na curva de cor verde pode sugerir que essa proteína foi parcialmente desnaturada pelo Tampão de extração.

Não se observou a presença de endotermas na curva de cor preta o que indica que o tempo de agitação de 30 minutos não foi suficiente para extrair as proteínas miofibrilares da amostra de carne. Assim, foi confeccionado um gel utilizando-se 500µg de proteína das amostras com Tampão Uréia 8M agitadas por duas horas (Figura 38). Apesar de ter havido melhora tanto no número como na distribuição das proteínas, observa-se ainda a presença de “rastros” no gel na faixa de peso molecular entre 35 e 75 kDa (em destaque na cor vermelha na Figura 38), sugerindo que a separação das proteínas na primeira dimensão ainda não se realizava a contento. Foram quantificados 631 *spots* nesse gel.

Em função desses testes preliminares, alguns ajustes foram feitos, podendo-se assim ter iniciado a confecção dos géis com as amostras de carne coletadas dos masterpacks. As imagens de alguns dos géis confeccionados serão apresentadas a seguir (Figuras 39 a 44) e, na seqüência, serão apresentados os resultados dos

estudos estatísticos referentes à expressão das proteínas reconhecidas como “spots” nos géis.

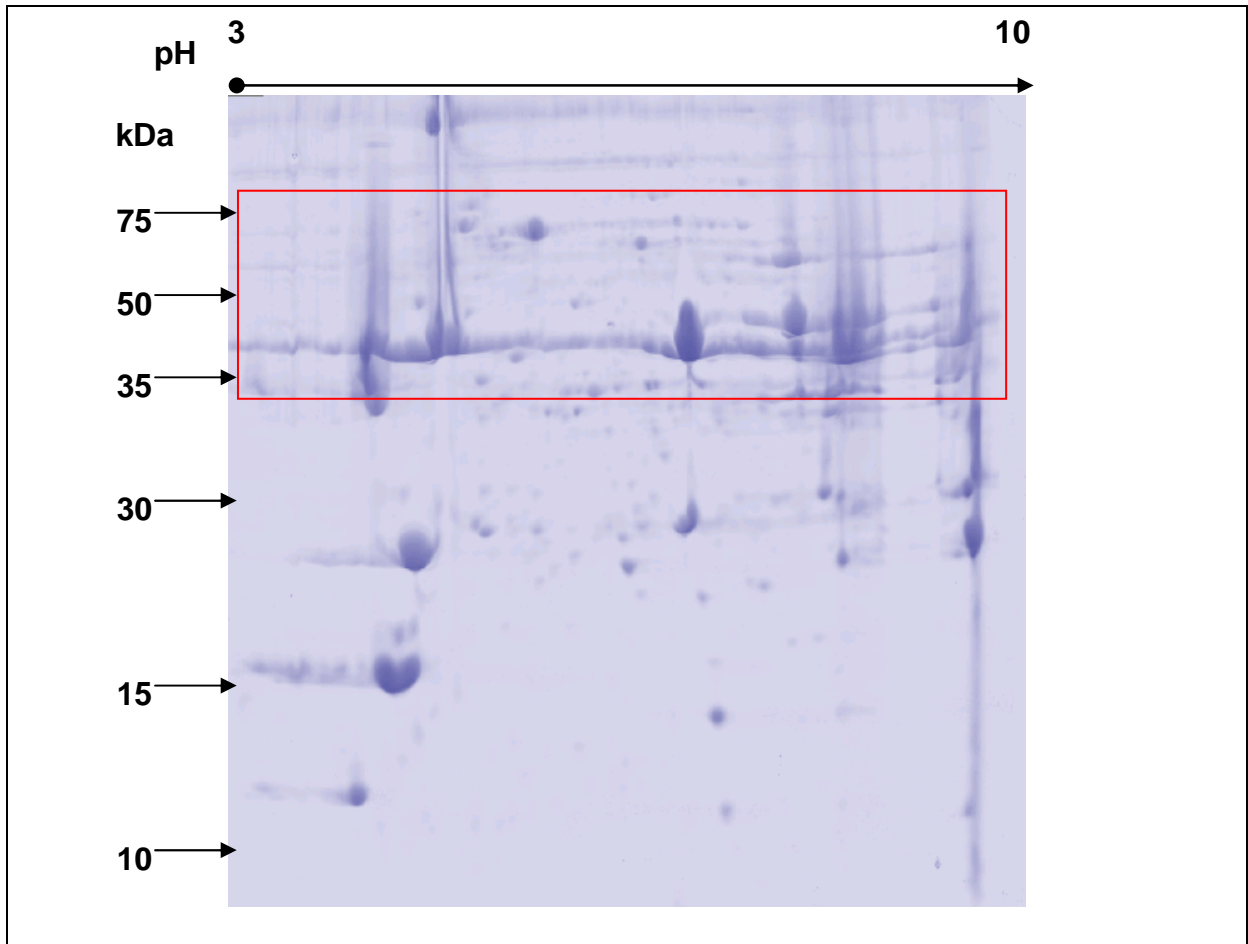


Figura 38 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com extratos de carne contendo 500 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) em tampão de extração contendo Uréia 8M

De maneira geral, houve boa distribuição dos *spots* em função da faixa de pH e do PM em todos os géis confeccionados. Observou-se também a presença de grande número de *spots* de maior volume, bem definidos e pouca ocorrência de “rastros”.

Nos géis confeccionados como amostras de carne suína provenientes dos masterpacks da Composição A (75% C_2 +25% CO_2) com 1 e 8 dias de armazenamento, pode ser observada, além da boa distribuição dos *spots*, maior número desses no gel confeccionado com amostras com 8 dias de armazenamento (Figura 39 A8), principalmente na região entre 24 e 31 kDa (destacada em vermelho na Figura 39), sugerindo efeito da proteólise das proteínas de alto PM, favorecendo o surgimento de outras de menor peso molecular.

Os géis da Figura 40 foram confeccionados com amostras de carne da Composição A, com 15 e 22 dias de armazenamento, observando-se diferenças em relação à quantidade e volume dos *spots*. Visualmente, pode ser observada grande diferença de *spots* tanto em número, como em tamanho, entre 52 e 17 kDa (área destacada em vermelho). O gel da Figura 40 A22 aparentemente tem maior número de *spots* e melhor distribuídos. Isso porque, possivelmente, ocorreu alguma falha na extração das proteínas da amostra da Figura 40 A15.

Com relação aos géis confeccionados com amostras de carne provenientes dos masterpacks da Composição B (50% C_2 +50% CO_2), aparentemente no gel da Figura 41 B1 (1 dia de armazenamento) houve menor detecção de *spots* em relação ao gel da Figura 41B8 (8 dias de armazenamento). Pode-se notar ainda que em ambos os géis a separação dos *spots* deu-se até 24 kDa. Em relação aos géis confeccionados com amostras de 15 e 22 dias de armazenamento (Figura 42 B15 e B22), pode ser observado que esses são bastante semelhantes. Nesses géis pode-se observar ainda que houve maior concentração de *spots* entre 31 e 52 kDa, mais próximos ao pH 10 (em destaque vermelho).

Os géis das Figuras 43 (C1 e C8) e 44 (C15 e C22) foram confeccionados com amostras de carne dos masterpacks da Composição C (100% CO_2) e de

maneira geral estiveram bastante semelhantes entre si e entre os géis das outras Composições gasosas. Nota-se nesses géis, a presença de *spots* bem definidos e de maior volume. Assim como nos demais géis, a separação dos *spots* deu-se principalmente até 24 kDa. Aparentemente, a quantidade de *spots* visualizados nos géis A e B da Figura 43 é a mesma, no entanto, o gel da Figura 44 C22 parece ter maior número de *spots* que o gel da Figura 44 C15.

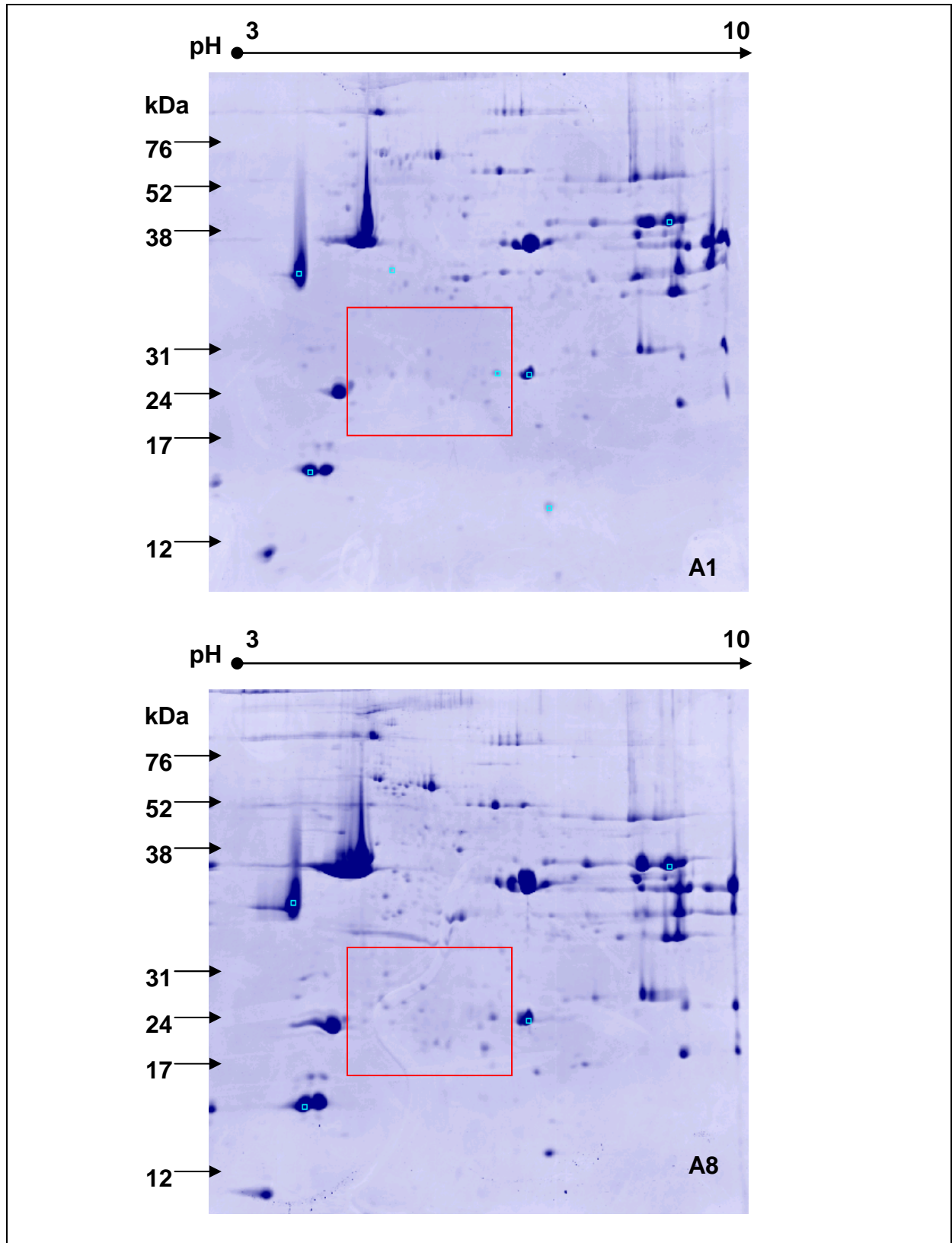


Figura 39 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) com 1 (A1) e 8 (A8) dias de armazenamento da Composição (A) 75%O₂+25%CO₂

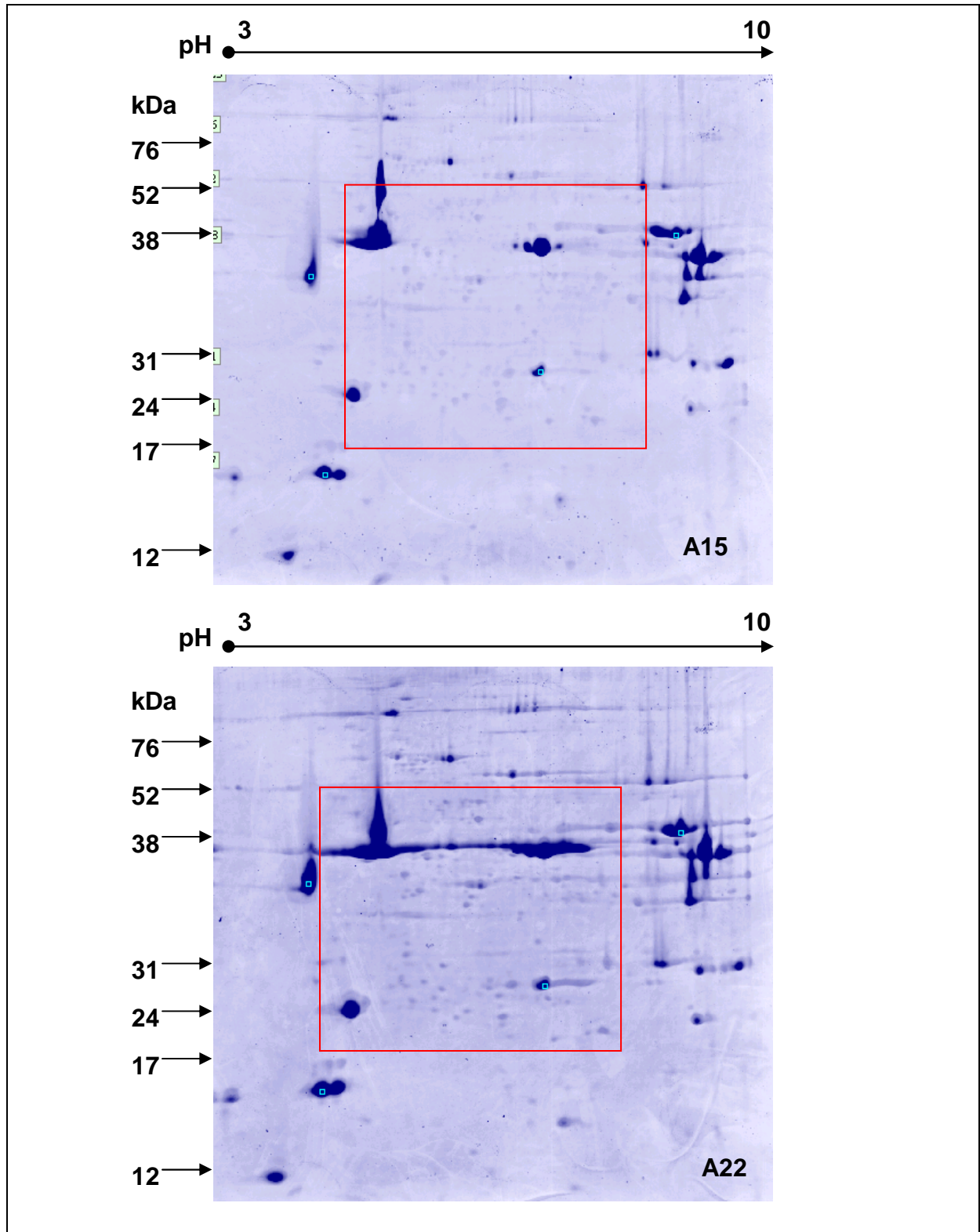


Figura 40 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 μ g de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) com 15 (A15) e 22 (A22) dias de armazenamento da Composição (A) 75%O₂+25%CO₂

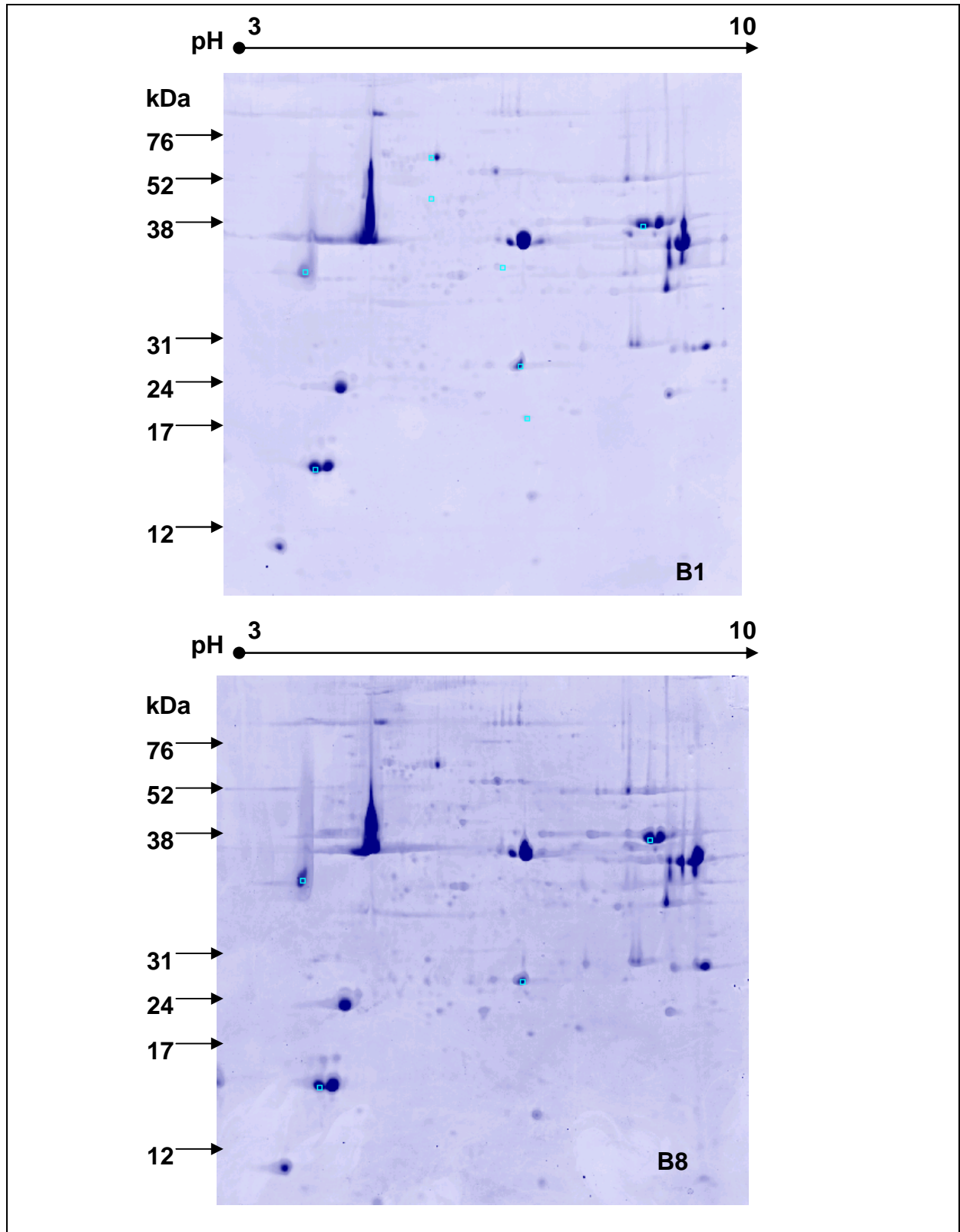


Figura 41 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) com 1 (B1) e 8 (B8) dias de armazenamento da Composição (B) 50%O₂+50%CO₂

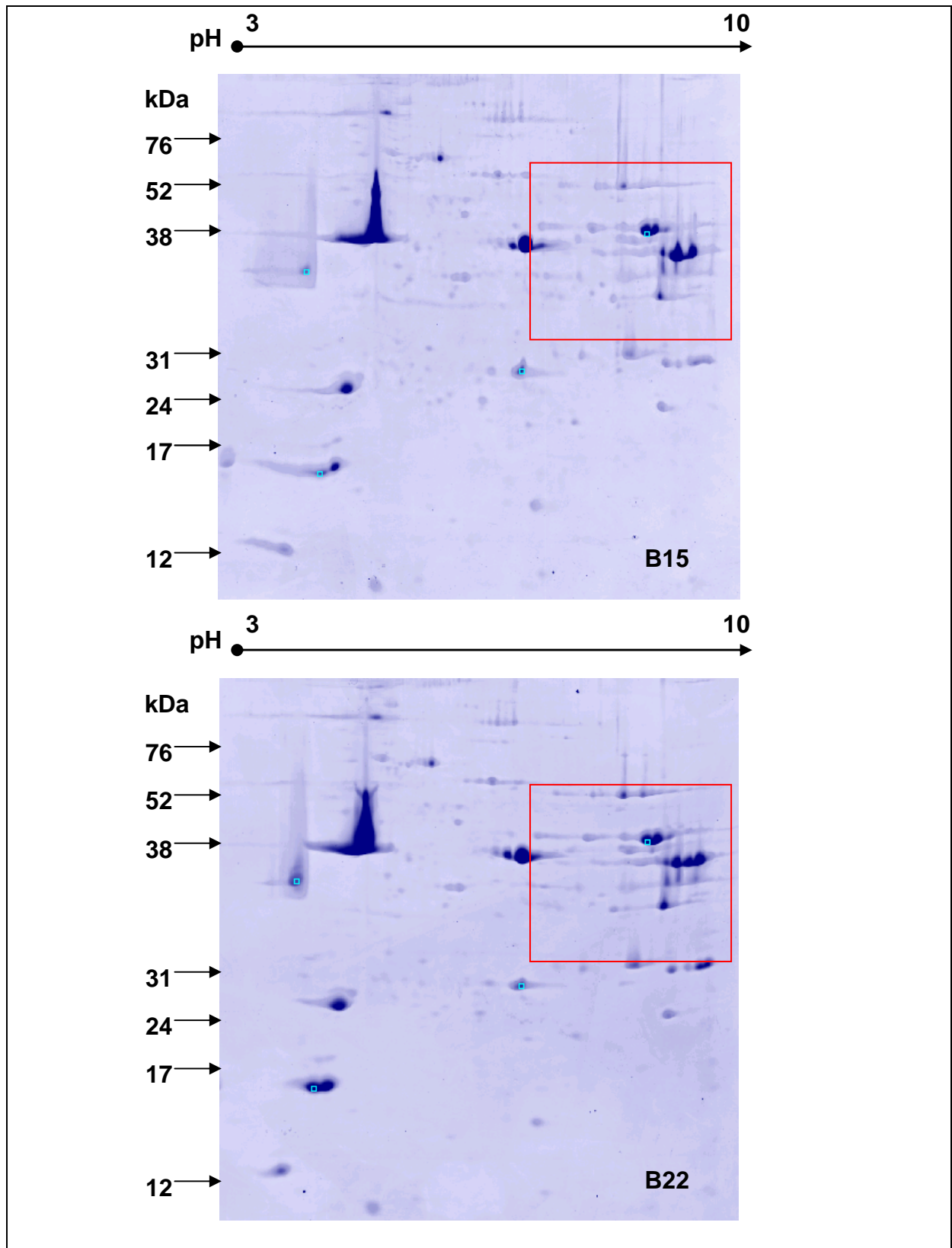


Figura 42 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 μ g de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) com 15 (B15) e 22 (B22) dias de armazenamento da Composição (B) 50%O₂+50%CO₂

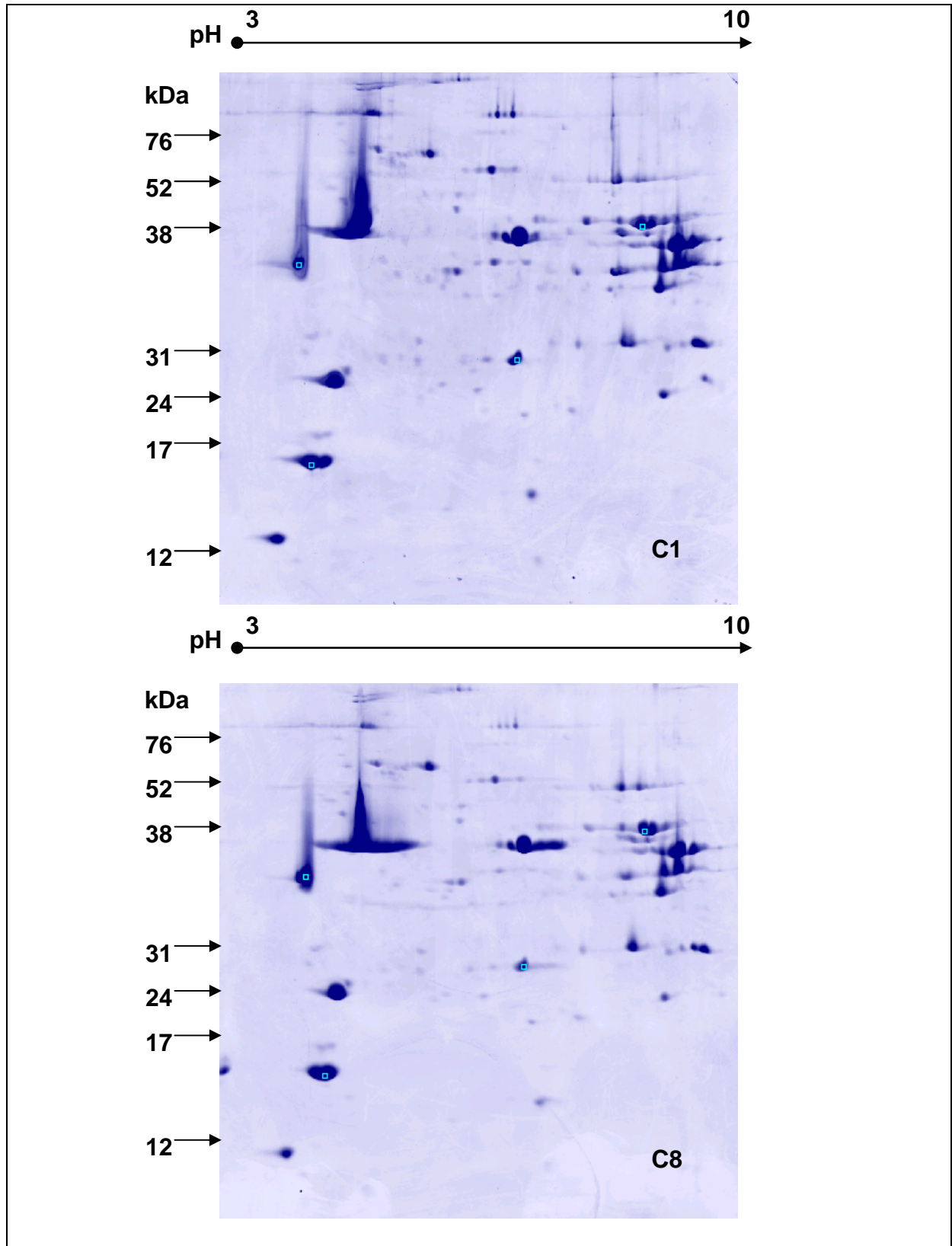


Figura 43 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 μg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) com 1 (C1) e 8 (C8) dias de armazenamento da Composição C (100%CO₂)

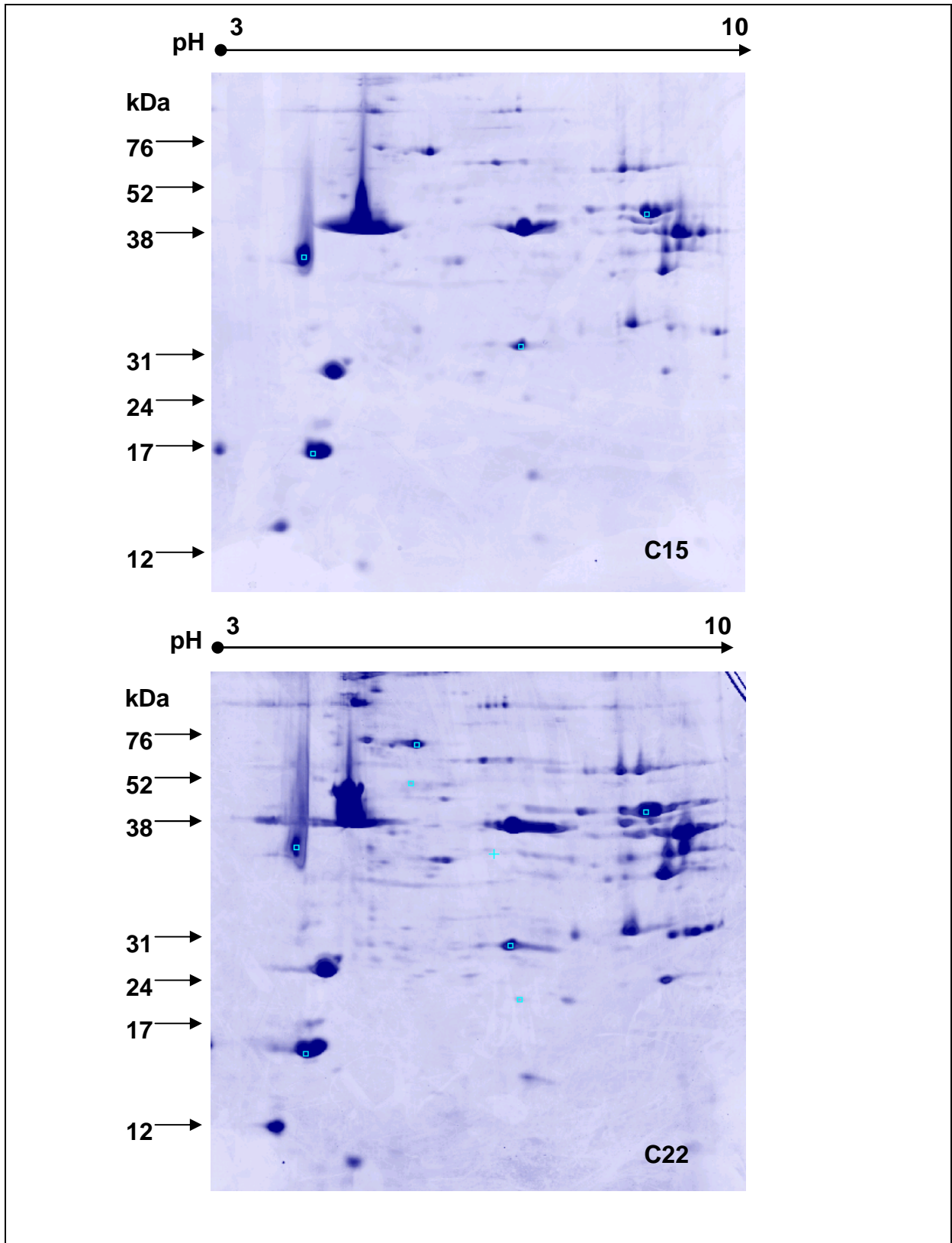


Figura 44 – Eletroforese Bi-dimensional de gel de poliacrilamida (12,5%) e faixa de pH de 3 – 10 com 500 µg de proteína de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) com 15 (C15) e 22 (C22) dias de armazenamento da Composição C (100%CO₂)

Esses géis foram digitalizados e suas imagens foram analisadas em software específico, que permitiu uma análise quantitativa através dos percentuais da intensidade integrada do *spot*. Com base nesses resultados, foi realizada uma análise estatística. A Tabela 16 contém os valores médios e erro padrão do número médio de “*spots*” quantificados nesses géis.

Tabela 16 – Número médio de *Spots* e erro padrão (EP) apresentados por Composição Gasosa e por Tempo de armazenamento*

Tempo de armazenamento (dias)	Composição Gasosa					
	A (75%O ₂ +25%CO ₂)		B (50%O ₂ +50%CO ₂)		C (100%CO ₂)	
	Média**	EP	Média*	EP	Média*	EP
1	263 ^{aA}	11	235 ^{aB}	11	252 ^{aAB}	11
8	300 ^{aA}	12	229 ^{bB}	11	215 ^{bB}	10
15	159 ^{bB}	9	276 ^{aAB}	12	296 ^{aA}	12
22	312 ^{aA}	12	307 ^{aA}	13	291 ^{aA}	12

* n = 2; **Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,01)

Após verificação de interação significativa entre as fontes de variação (P<0,01), buscou-se em um primeiro momento, identificar possíveis efeitos de Tempo de armazenamento nas amostras de carne suína. Para tanto, foi feita a comparação do número médio de *spots* dos géis de uma mesma Composição gasosa entre todos os Tempos de armazenamento. Nesta etapa, foram constatadas diferenças entre os Tempos de armazenamento em todas as composições gasosas. Na composição A, o número de *spots* aos 15 dias de armazenamento (159) foi inferior aos demais, os quais não tiveram diferenças entre si (\approx 290). Na Composição

B, o número de *spots* aos 22 dias de armazenamento (307) foi um pouco superior aos demais, que não tiveram diferença entre si ($\cong 247$) e, na Composição C, no 8º dia de armazenamento, o número de *spots* foi inferior aos demais dias ($\cong 280$).

Além disso, foi conduzida a análise estatística no sentido de se comparar, dentro de um mesmo tempo de armazenamento, as possíveis diferenças entre as composições gasosas. Foi observado que só ocorreram diferenças no 8º e 15º dia de armazenamento, onde os géis confeccionados com as amostras de carne provenientes da Composição A tiveram número maior de *spots* (300) no 8º dia, enquanto que no 15º dia, esses géis apresentaram o menor número de *spots* (159). Apesar da análise estatística ter captado diferenças significativas, de acordo com Lametsch et al. (2003), poderiam ser esperadas variações de até 20% do número de *spots*, em função da dificuldade de repetibilidade dos géis.

Na análise proteômica existe uma etapa que consiste da comparação individual das posições relativas dos *spots* nos géis. Para tanto, se faz a comparação ou “*match*” do gel que se quer analisar com outro gel denominado gel “referência”. Neste trabalho, elegeu-se como gel “referência”, o gel que foi confeccionado com amostras de músculo suíno (*Longissimus dorsi*) coletadas 24 horas *post mortem*, no qual foram identificados 360 *spots*.

Considerando que cada *spot* é uma fração de proteína, esta etapa da análise permite comparar o volume de expressão de uma mesma fração protéica em dois géis simultaneamente e, desse modo, identificar se houveram diferenças de expressão causadas pelas fontes de variação (Tempo de armazenamento e Composição gasosa). Na Tabela 17 se encontram apresentados o número médio de *matches* identificados bem como a porcentagem destes *matches* em relação ao número total de *spots* do gel de referência. Exemplificando, na comparação dos

spots do gel da Composição A, com um dia de armazenamento, com os *spots* do gel referência, observaram-se 175 *spots* em comum (*matches*) representando 56% do total de *spots*. O número de *matches* da cada gel de cada Tempo de Armazenamento/Composição gasosa variou de 110 a 183, e a porcentagem de 41,4 a 57,7% (Tabela 17).

Tabela 17 – Número de *matches* observados em relação ao gel “referência”

Composição gasosa	Tempo de armazenamento (dias)	N. Matches	% Matches*
Composição A (75%O₂+25%CO₂)	1	175	56,0
	8	181	54,5
	15	110	41,4
	22	186	55,3
Composição B (50%O₂+50%CO₂)	1	143	46,4
	8	147	48,3
	15	163	51,3
	22	183	54,7
Composição C (100%CO₂)	1	166	54,1
	8	132	45,3
	15	183	55,7
	22	174	53,3

* %matches = 2 x número total de *matches*/número total *spots* gel referência + número total de *spots* do gel

Os valores médios do número de *spots* observados nos géis estão próximos aos observados na literatura. Lametsch et al. (2003) identificaram 345 *spots* em géis confeccionados com carne suína (*Longissimus dorsi*), corados com nitrato de prata.

Desses, 103 *spots* mudaram significativamente de intensidade durante as primeiras 72 horas *post mortem*. Desses 103 *spots*, 27 foram identificados através da espectrometria de massa, como proteínas miofibrilares (19 *spots*) e o restante (8 *spots*), como proteínas sarcoplasmáticas. Morzel et al. (2004) também trabalharam com carne suína, identificando aproximadamente 252 *spots*, sendo que desses, 37 tiveram a intensidade variando significativamente. Desses 37 *spots*, 10 não foram detectados a 0 hora *post mortem*, enquanto que 12 aumentaram e 15 diminuíram de intensidade durante as primeiras 72 horas *post mortem*. Hwang et al. (2005) estudaram, através da proteômica, o efeito da proteólise *post mortem* em algumas características de qualidade da carne suína, tais como: maciez, perda de água e valores de L* e relataram mudanças em 27 *spots* de proteína dos 133 encontrados.

Com base nos *matches* observados entre os géis de cada Composição gasosa/Tempo de armazenamento, partiu-se para uma segunda etapa que se constituiu da comparação dos *matches* de todos os géis simultaneamente, onde foram identificados 8 *spots* em comum. A porcentagem de volume de cada *spot* foi analisada estatisticamente e os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 45 e no Anexo 2. Através da análise estatística identificou-se que dos 8 *spots* analisados, apenas 3 tiveram diferença significativa no volume de expressão.

No resultados do *spot* 1 (Figura 45A) identificou-se interação significativa entre Composição gasosa e Tempo de armazenamento ($P < 0,04$). No desdobramento das interações, na comparação entre as Composições dentro de um mesmo tempo de armazenamento, foi observado que as diferenças de volume ocorreram aos 8 e 15 dias de armazenamento. No dia 8, as Composições A e C tiveram volume superior (6,8%) que a Composição B (1,8%); aos 15 dias de armazenamento, as diferenças de volume ocorreram entre as Composições A

(2,4%) e C (7,1%). Entre os tempos de armazenamento dentro de uma mesma Composição gasosa, observaram-se diferenças na Composição A entre 8 (6,8%) e 15 dias de armazenamento (2,4%) e na Composição C, onde o volume aos 1 e 22 dias de armazenamento ($\cong 2,1\%$) não teve diferença e foi inferior aos demais ($\cong 7,0\%$).

A análise estatística não captou diferença significativa ($P < 0,05$) nos *spots* **2**, **3**, **4**, **5** e **6**, os valores do volume médio de expressão foram 7,3; 0,14; 0,3; 1,8 e 4,4%, respectivamente.

Nos *spot* **7** (Figura 45B) observaram-se diferenças ($P < 0,05$) apenas entre as Composições gasosas aos 15 dias de armazenamento, onde a Composição B teve volume maior (0,63%) que as demais, que por sua vez não tiveram diferença entre si (0,14%).

No *spot* **8** (Figura 45C) também se observaram diferenças ($P < 0,06$) apenas entre as Composições gasosas aos 15 dias de armazenamento, onde o volume da Composição A (0,8%) foi inferior ao da Composição C (3,7%).

Embora tenham sido observadas diferenças entre o volume dos *spots*, esses resultados não são suficientes para a inferência de que a Composição gasosa ou o Tempo de armazenamento tiveram influência na expressão das proteínas da carne suína deste trabalho. Os resultados observados até o presente momento indicam que avanços foram realizados no que concerne à padronização das técnicas de extração, condução da eletroforese bi-dimensional, bem como análise da imagem nos géis. Porém, ainda é precipitado se pronunciar para algum tipo de conclusão a esse respeito, sendo necessária a continuidade de estudos nessa área.

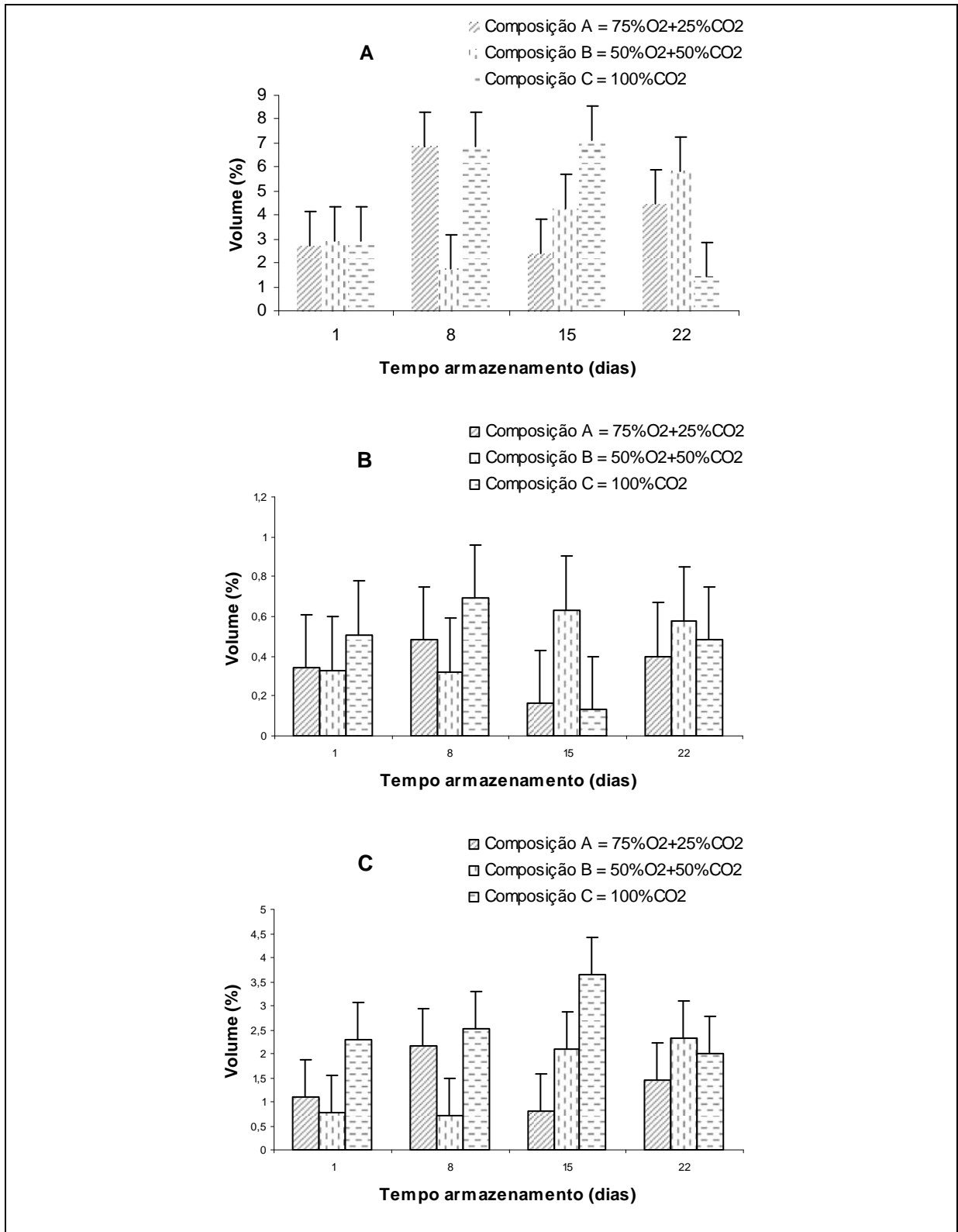


Figura 45 – Volume de expressão dos spots 1 (A), 7 (B) e 8 (C)

6. CONCLUSÃO

Os dados apresentados e discutidos permitem concluir que:

1. Sob o ponto de vista microbiológico, as três composições gasosas avaliadas conservaram os bifes de lombo suíno por até 15 dias de armazenamento, sob refrigeração.
2. A perda de água por exsudação e a maciez não foram influenciadas pelas composições gasosas avaliadas.
3. Sob o ponto de vista de cor e visual, as atmosferas contendo 75%O₂+25%CO₂ e 50%O₂+50%CO₂ garantem a conservação da carne suína armazenada a 2°C por até 15 dias, com preservação da cor e aparência geral da carne.
4. A concentração de metamioglobina não foi influenciada pelas composições gasosas avaliadas.
5. Sob o ponto de vista da oxidação lipídica, embalagens com 100%CO₂ são as mais indicadas para períodos de armazenamento superiores a 15 dias enquanto que com 75%O₂+25%CO₂ são as mais indicadas para períodos de armazenamento de até 8 dias .
6. A técnica da eletroforese bi-dimensional é promissora para o entendimento, em nível molecular, das mudanças, principalmente de cor, que ocorrem na carne embalada com atmosfera modificada, durante o armazenamento. Porém, ainda há a necessidade de mais estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; GERRARD, D.; MILLS, E.W. Principles of meat science. **Kendall Hunt Publishing Company**. 4ed, 2001, 354p.

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína. Capturado em 27/06/08. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/>.

ACTON, J. C.; DAWSON, P.L. **Impact of proteins on food colour**. In: **Proteins in food processing**. Woodhead Publish: Cambridge, 2004.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira: São Paulo, Instit. FNP, 2007. 368p.

ASHGAR, A.; GRAY, J.I.; BUCKLEY, D.J.; PEARSON, D.J.; BOOREN, A.M. Perspectives on warmed-over flavour. **Food Technology**, v.42, p.102-108, 1988.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 11 ed. Washington D.C., 1980, 1051p.

BEGGAN, M.; ALLEN, P.; BUTLER, F. Shelf-life of retail beef muscles following storage in a low oxygen environment. **J. Muscle Foods**, v.15, p.269-285, 2004.

BEHRENDT, J.M.; MIKEL, W.B.; ARMSTRONG, C.L.; NEWMAN, M.C. Color stability of semitendinosus, semimembranosus, and biceps femoris steaks packaged in a high-oxygen modified atmosphere. **J. Anim. Sci**, v.81, p.2230-2238, 2003.

BENDIXEN, EMØKE. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, v.71, p.138-149, 2005.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Int. J. Food Microbiology**, v.33, p.103-120, 1996.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (ANVISA). Resolução – RDC n.12/01. Regulamento técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília, 02 de janeiro, 2001.

BUYS, E.M. Colour changes and consumer acceptability of bulk packaged pork retail cuts stored under O₂, CO₂ and N₂. **Meat Science**, v.68, p.641-647, 2004.

CAMPO, M.M.; NUTE, G.R.; HUGHES, S.I.; ENSER, M.; WOOD, J.D.;

RICHARDSON, R.I. Flavour perception of oxidation in beef. **Meat Science**, v.72, p.303-311, 2006.

CARVALHO, A. C. F. B., CORTEZ, A. L. L., SALOTTI, B. M., BURGER, K. P., VIDAL-MARTINS, A. M. C.. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotóxicos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n.3, p303-307, jul/set., 2005.

CAYUELA, J.M.; GIL, M.D.; BAÑÓN, S.; GARRIDO, M.D. Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the quality of pork loin. **Eur. Food Res. Technol**, v.219, p.316-320, 2004.

CHURCH, NICK Developments in modified atmosphere packaging and related technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v.5 (11), p.345-352, 1994.

COLEMAN, N.J. & CRAIG, D.Q. Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis, **Int. J. Pharm.** 135, p. 13–29, 1996.

CUTTER, CATHERINE NETTLES. Microbial Control by Packaging: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.2, p.151-161, 2002.

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm.

EVRETT, B.; ZDANIS, D. An immunological method to assess protein degradation in *post mortem* muscle. **Meat Science**, v.22, p.1-19, 1988.

FDA. Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em:

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html> Capturado em 28/05/2007.

FOX JR., J. B. The pigments of meat. **The science of meat products**. Food & Nutrition Press: Westport, 1987.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.

GENIGEORGIS, C.A. Microbial an safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, p. 237-251, 1985.

GIL, J.I. **Manual de Inspeção Veterinária de Carnes**. Fundação Calouste Gulbenkian/ Lisboa, v.1, ed.2, 2000, p.485

GILL, C. O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, v.43, p.S99-S109, 1996.

GILL, C.O.; HARRISON, J.C.L. The storage life of chilled pork packaged under carbon dioxide. **Meat Science**, v.26, p.313-214, 1989.

GRAY, J.I.; GOMAA, E.A.; BUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, p.111-123, 1996.

GUILLÉN-SANS, R.; GUZMÁN-CHOZAS, M. The tiobarbituric acid (TBA) reactions in foods: A review. **Critical review in Food Sicence and Nutrition**, v.38(4), p.315-330, 1998.

HOOLUNG, K.; VEISETH, E.; JIA X.; FAERGESTAD, E.M.; HILDRUM, K.I. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science**, v.77, p.97-104, 2007.

HWANG, I.H.; PARK, B.Y.; KIM, J.H.; CHO, S.H.; LEE, J.M. Assessment of post mortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. **Meat Science**, v.69, p.79-91, 2005.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. **Meat Science**, v.54, p.49-57, 2000.

JAYAS, D.S.; JEYAMKONDAN, S. Modified atmosphere storage of grains metas fruits and vegetables. **Biosystems Engineering**, v.82, n.3, p.235-251, 2002.

JEREMIAH, L. E. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. **Food Research International**, v.34, p.749-772, 2001.

JEREMIAH, L.E. & GIBSON, L.L. The influence of packaging and storage time on the retail properties and case-life of retail ready beef. **Food Research International**, v.34, p.621-631, 2001.

JEREMIAH, L.E. & GIBSON, L.L. The influence of storage and display conditions on the colour stability and display-ready pork loin roasts. **Meat Science**, v.47, p.1-16, 1997.

JEREMIAH, L.E.; GIBSON, L.L.; ARGONOSA, G. The influence of inherent muscle quality upon the storage life of chilled pork stored in CO₂ at -1,5°C. **Food Research International**, v.28, n.1, p.51-59, 1995.

JOO, S.T.; KAUFFMAN, R.G.; KIM, B.C.; PARK, G.B. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. **Meat Science**, v.52, p.291-297, 1999.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.P. Beef tenderness: regulation and prediction. Center, NE: USDA-ARS, US Meat Animal Research Center, 1998. 90 p.

KRZYWICKI, K. The determination of haem pigment in meat. **Meat Science**, v.7, p.29-36, 1982.

LAMBERT, A.D.; SMITH, J.P.; DODDS, K.L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – a review. **Food Microbiology**, v.8, p.267-297, 1991.

LAMETSCH, R. KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H.J.;

ROEPSTORFF, P. BENDIXEN, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **J. Agric. Food. Chem.** V.51, p.6992-6997, 2003.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome analysis applied to meat science:

Characterizing *Post mortem* changes in porcine muscle. **J. Agric. Food. Chem.**

V.49, p.4531-4537, 2001.

LAMETSCH, R.; KRISTENSEN, L.; LARSEN, M.R.; THERKILDSEN, M.;

OKSBJERG, N.; ERTBJERG, P. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. **J. Anim. Sci.**, v.84, p.918-924, 2006.

LANARI, M.C.; SCHAEFER, D.M.; SCHELLER, K.K. Dietary Vitamin E

supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v.41(3), p.237-250, 1995.

LAWRIE, M. Ciência da Carne, Porto Alegre, **Artmed**, 2005, 384p.

LEHNINGER, ALBERT LESTER. **Lehninger – Princípios da Bioquímica**. Ed.

Savier, 3ª ed., São Paulo, 2002. 975p.

LINDAHL, G.; LUNDSTROM, K.; TORNBERG, E. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. **Meat Science**, v.59, p.141-151, 2001.

LIU, F.; YANG, R.; LI, Y. Correlations between parameters of spoilage micro-

organisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10°C. **Food Microbiology**, v.23, p.578-583, 2006.

LUCCIA, A.; PICARIELLO, G.; CACACE, G.; SCALONI, A.; FACCIA, M.; LIUZZI, V.; ALVITI, G.; MUSSO, S.S. Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. **Meat Science**, v.69, p.479-491, 2005.

LUND, M.N.; LAMETSCH, R.; HVIID, M.S.; JENSEN, O.L.; SKIBSTED, L.H. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine *longissimus dorsi* during chill storage. **Meat Science**, v.77, p.295-303, 2007.

LUÑO, M.; BELTRÁN, J.A.; RONCALÉS, P. Shelf life and colour stabilization of beef packaged in a low O₂ atmosphere containing CO: loin steaks and ground meat. **Meat Science**, v.48, p.75-84, 1998.

LUÑO, M.; RONCALÉS, P.; DJENANE, D.; BELTRÁN, J.A. Beef shelf life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations. **Meat Science**, v.55, p.413-419, 2000.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. Current research in meat colour. **Meat Science**, v.71, p.100-121, 2005.

MANO, S.B.; PEREDA, J.A.O.; FERNANDO, G.D.G. Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.22, p.1-10, 2002.

MARTÍNEZ, L.; DJENANE, D.; CILLA, I.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Effect of different concentrations of carbon dioxide and low concentration of carbon monoxide on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. **Meat Science**, v. 71, p. 563-570, 2005.

MARTÍNEZ, L.; DJENANE, D.; CILLA, I.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. **Meat Science**, v. 94, p. 219-225, 2006.

MCGUIRE, RAYMOUND. Reporting of objective color measurements. **Hort Science**, v.27, n.12, p.1254-1255, 1992.

MCMILLIN, KENNETH W. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. **Meat Science**, v80, p.43-65, 2008.

MCMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Changes in microbial parameters and gas composition during modified atmosphere storage of fresh pork loin cuts. **J. Food Protection**, v.54(10), p.778-783, 1991.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3rd ed. **Boca Raton: CRC**, 1999. 390p.

MORZEL, M.; CHAMBON, C.; HAMELIN, M.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; SAYD, T.; MONIN, G. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. **Meat Science**, v.67, 689-696, 2004.

MUÑOZ, A. M.; CIVILLE, V. G.; CARR, B. T. Sensory evaluation in quality control. 2 ed. Florida: Academic Press, Inc., 1993.

OLIVEIRA, L.B.; SOARES, G.J.D.; ANTUNES, P.L. Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. **Ver. Bras. Agrociência**, v.4. n.3, p.166-171, 1998.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: No caminho da pesquisa**. Cocal do Sul: IMPRINT, 2001, 155p.

ORDÓÑEZ, J.A.; PABLO, B.; CASTRO, B. P.; ASENSIO, M.A.; SANZ, B. Selected chemicals and microbiological changes in refrigerated pork stored in carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres. **J. Agric. Food Chem.**, v.39, p.668-672, 1991.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C. ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F.; PERALES, L. de la H.; CORTECERO, M. D. S.

Tecnologia de Alimentos. Vol 2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. CEGRAF-Goiânia/EDUFF-Niterói, v.1, 1993, 586p.
- PEARSON, A.M.; GRAY, J.I.; WOLZAK, A.M.; HORESTEIN, N.A. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technology**, v.37 (7), p.121-129, 1983.
- PHILLIPIS, CAROL A. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.463-479, 1996.
- PICARIELLO, G.; MARTINO, A.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ADDEO, F.; FACCIA, M. SPAGNAMUSSO, S.; LUCCIA, A.D. Proteomic study of muscle sarcoplasmic proteins using AUT-PAGE/SDS-PAGE as two dimensional gel electrophoresis.
- PORTO, ERNANI. Microbiologia de carnes. In: Carmen J.C. Castillo. **Qualidade da Carne**. Varela: São Paulo, 2006, cap.6, p.101-131.
- ROÇA, R.O.; SERRANO, A.M. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, v.9, p.589-596, 2004.
- ROSA, A.F; SOBRAL, P.J.A.; LIMA, C.G.; GOMES, J.D.F. Determinação das características físico-químicas da carne de suínos em fase de crescimento. **Revista TeC Carnes**, Campinas/SP, v. 3, n. 1, p. 13-18, 2001.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT®** OnlineDoc®, Version 8, Copyright ©2000, February 2000.
- SAYD, T.; MORZEL, M.; CHAMBON, C.; FRANCK, M.; FIGWER, P.; LARZUL, C.; ROY, P.; MONIN, G.; CHÉREL, P.; LAVILLE, E. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig *semimembranosus* muscle: implications on meat color development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2732-2737, 2006.

SEYFERT, M.; HUNT, M.C.; MANCINI, R.A.; HACHMEISTER, K.A.; KROPF, D.H.; UNRUH, J.A.; LOUGHIN, T.M. Beef quadriceps hot boning and modified-atmosphere packaging influence properties of injection-enhanced beef round muscles. **J. Anim. Sci.**, v83, p.686-693, 2005.

SILVA N., JUNQUEIRA V.C.A. AND SILVEIRA N.S.A. 2001. **Manual de microbiologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo:Varela. 317p.

SØRHEIM, O.; ERLANDSEN, T.; NISSEN, H.; LEA, P.; HØYEM, T. Effects of modified atmosphere storage on colour and microbiological shelf life of normal, pale and exsudative pork. **Meat Science**, v.47, p.147-155, 1997.

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKLEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Science**, v.52, p.157-164, 1999.

TANG, J.; FAUSTMAN, C.; MANCINI, R.A.; SEYFERT, M.; HUNT, M.C. Mitochondrial reduction of metmyoglobin: dependence on the electron transport chain. **J. Agric. Food. Chem.**, v.53(13), p.5449-5455, 2005.

VIANA, E.S.; GOMIDE, L.A.M.; VANETTI, M.C.D. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. **Meat Science**, v.71, p. 696-705, 2005.

VYNCKE, W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**, Hamburg, 72(12):1084-1087.

WALKER, H.W. Effects of microflora on fresh meat colour. In: **Proceedings 33rd reciprocal meat conference**, West Lafayette, Indiana, USA, p.22-25, 1980.

WIEL, D.F.M van de; ZHANG, W.L. Identification of pork quality parameters by proteomics. **Meat Science**, v.77, p.46-54, 2007.

- WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino-acids analysis. **Biotechnology (NY)**, v.14, p.61-65, 1996.
- WILKINSON, B.H.P.; JANZ, J.A.M.; MOREL, P.C.H.; PURCHAS, R.W.; HENDRIKS, W.H. The effect of modified atmosphere packaging with carbon monoxide on the storage quality of master-packaged fresh pprk. **Meat Science**, v.73, p.605-610, 2006.
- ZHAO, Y.; WELLS, J.H.; MCMILLIN, K.W. Applications of dynamic modified atmosphere packaging systems for fresh red meats: review. **J. Muscle Foods**, v.5, p.299-328, 1994.

8. ANEXOS

Anexo A – Ficha de avaliação da análise sensorial

Ficha n°

Nome : _____ Data: ____/____/____

Idade: _____ Sexo: masculino () feminino ()

1. Por favor, utilizando a escala a abaixo avalie cada PRATELEIRA com as bandejas de carne suína e marque o quanto você gostou ou desgostou do produto com relação ao seguinte atributo:

- 7 - Gostei muito
- 6 - Gostei moderadamente
- 5 - Gostei ligeiramente
- 4 - Nem gostei / nem desgostei
- 3 - Desgostei ligeiramente
- 2 - Desgostei moderadamente
- 1 - Desgostei muito

AMOSTRA N°	298	475	326
Aparência geral			

2. Utilizando a escala abaixo responda: se estas bandejas de carne suína estivessem a venda e o preço não fosse problema, você:

- 5 - Certamente compraria
- 4 - Provavelmente compraria
- 3 - Talvez compraria / talvez não compraria
- 2 - Provavelmente não compraria
- 1 - Certamente não compraria

AMOSTRA N°	298	475	326
Nota			

Anexo B – Volume de expressão (%) dos spots de 1 a 8

Spot N.	Tempo Armazenamento (dias)	Composição Gasosa (O ₂ :CO ₂)					
		A (75:25)		B (50:50)		C(0:100)	
		Média	E.P	Média	E.P	Média	E.P
1	1	2,7	1,4	2,9	1,4	2,9	1,4
1	8	6,9	1,4	1,8	1,4	6,8	1,4
1	15	2,4	1,4	4,3	1,4	7,1	1,4
1	22	4,5	1,4	5,8	1,4	1,4	1,4
2	1	6,7	5,2	2,2	5,2	3,1	5,2
2	8	16,6	5,2	1,7	5,2	16,3	5,2
2	15	2,4	5,2	5,2	5,2	14,4	5,2
2	22	6,9	5,2	9,1	5,2	2,8	5,2
3	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
3	8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
3	15	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
3	22	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
4	1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1
4	8	0,4	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1
4	15	0,1	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1
4	22	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1
5	1	1,7	0,9	1,0	0,9	2,5	0,9
5	8	3,2	0,9	0,4	0,9	2,5	0,9
5	15	1,1	0,9	1,5	0,9	3,3	0,9
5	22	0,5	0,9	2,4	0,9	1,6	0,9
6	1	4,1	3,6	4,0	3,6	5,2	3,6
6	8	6,8	3,6	2,5	3,6	4,5	3,6
6	15	3,7	3,6	3,7	3,6	2,5	3,6
6	22	5,6	3,6	5,9	3,6	4,0	3,6
7	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3
7	8	0,5	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3
7	15	0,2	0,3	0,6	0,3	0,1	0,3
7	22	0,4	0,3	0,6	0,3	0,5	0,3
8	1	1,1	0,8	0,8	0,8	2,3	0,8
8	8	2,1	0,8	0,7	0,8	2,5	0,8
8	15	0,8	0,8	2,1	0,8	3,7	0,8
8	22	1,4	0,8	2,3	0,8	2,0	0,8