



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**PAMELA LEMOS CRUZ**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE  
GENGIBRE E SEU EFEITO NA FRAGMENTAÇÃO DE MIOFIBRILAS EM CARNE  
DE FRANGO**

ALEGRE – ES  
FEVEREIRO - 2018

PAMELA LEMOS CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE  
GENGIBRE E SEU EFEITO NA FRAGMENTAÇÃO DE MIOFIBRILAS EM CARNE  
DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Consuelo Domenici Roberto

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Raquel Vieira de Carvalho

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Pollyanna Ibrahim Silva

ALEGRE – ES  
FEVEREIRO - 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

---

C955c Cruz, Pamela Lemos, 1991-  
Caracterização parcial do extrato enzimático bruto de gengibre e seu efeito na fragmentação de miofibrilas em carne de frango / Cruz, Pamela Lemos. – 2018.  
74 f. : il.

Orientador: Consuelo Domenici Roberto.

Coorientadores: Raquel Vieira de Carvalho; Pollyanna Ibrahim Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Proteínas - Pesquisa. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Gengibre. 4. Frango de corte. I. Roberto, Consuelo Domenici. II. Carvalho, Raquel Vieira de. III. Silva, Pollyanna Ibrahim. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

---

PAMELA LEMOS CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE  
GENGIBRE E SEU EFEITO NA FRAGMENTAÇÃO DE MIOFIBRILAS EM  
CARNE DE FRANGO**

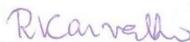
Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.



---

Profa. Dra. Consuelo Domenici Roberto  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora



---

Profa. Dra. Raquel Vieira de Carvalho  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora



---

Profa. Dra. Pollyanna Ibahim Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora



---

Profa. Dra. Maria Emília Rodrigues Valente  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora

## DEDICATÓRIA

À Deus, minha rocha, minha fortaleza e meu refúgio.

À UFES, em especial ao Programa de Ciência de Tecnologia de Alimentos pelo acolhimento e pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela bolsa de pesquisa durante a execução do curso.

À professora e orientadora Consuelo Domenici Roberto pela orientação, pelos conselhos como professora, pesquisadora e profissional.

À professora Raquel Vieira de Carvalho e a professora Pollyanna Ibrahim Silva pela coorientação, pelos conselhos e direcionamentos.

Aos meus colegas Pedro Henrique Panno, Wanessa Ferrari, Victor Pizzol, Samira Maximo e Marcella Menezes pelo companheirismo e ajuda.

Aos técnicos de laboratório Amanda, Letícia e Eduardo pela ajuda, sugestões e compreensão no momento da realização das análises.

À professora Tais Soares por toda a contribuição para a realização deste experimento.

Ao professor Wellington Clarindo pela disposição em ajudar na análise de microscopia.

À minha família pelo apoio incondicional.

À minha pessoa favorita, que me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia, Rémi.

E a todos que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

**OBRIGADA !**

***“Rien ne s’est fait de grand qui ne soit une espérance exagérée.”***

Jules Verne

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Texturômetro modelo TexturePro CT V1.4 Build 17 (Brookfield); (b) Lâminas de cisalhamento de 3,05mm modelo “V” Warner-Bratzler (WB), com espessura de 1,016mm; e (c) Amostras padronizadas. ....	25
Figura 2: Efeito da temperatura na atividade residual do extrato enzimático bruto de gengibre durante 20 minutos em pH 7,0 (100% de atividade residual = $0,063 \pm 0,07$ U.mg <sup>-1</sup> de proteína). ....	26
Figura 3: Efeito do pH na atividade residual do extrato enzimático bruto de gengibre durante 20 minutos a 60 °C (100% de atividade residual = $0,120 \pm 0,04$ U.mg <sup>-1</sup> de proteína). ....	28
Figura 4: Efeito das concentrações de substrato (azocaseína) na atividade enzimática do extrato enzimático bruto de gengibre a 60 °C/ 20 minutos e pH 5,5. ....	31
Figura 5: Efeito das concentrações de extrato miofibrilar na atividade enzimática do extrato enzimático bruto de gengibre a 60 °C/ 20 minutos e pH 5,5. ....	33
Figura 6: Microscopia de contraste de fase de extrações miofibrilares de peito de frango (Controle) (a), tratadas com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1) (b) e tratadas com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2). Barra = 1 cm. ....	39
Figura 7: Gráfico de correlação de Pearson entre a textura instrumental (Kgf) e o índice de fragmentação miofibrilar (IFM). ....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química aproximada de carnes de diferentes espécies de animais.....	6
Tabela 2 - Valores médios e desvio-padrão de pH, umidade, teor de cinzas, teor de proteínas, capacidade de retenção de água (CRA) e parâmetros de cor do peito de frango .....	35
Tabela 3 - Resultados da ANOVA Índice de fragmentação miofibrilar (IFM), comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL), textura instrumental comprimento de sarcômero, e perda de peso pós-cocção de peito de frango (Pectoralis major).....	36

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO GERAL .....	3
2.1 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Carnes de animais de açougue: composição e estrutura .....	4
3.2. Carne de frango .....	5
3.3 Maturação da carne .....	6
3.3.1 Avaliação da qualidade da carne .....	7
3.4 Enzimas proteolíticas .....	9
3.4.2 Proteases Vegetais.....	10
3.5 Gengibre .....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Planejamento experimental e análise estatística dos dados .....	15
4.2 Obtenção do extrato enzimático bruto de gengibre.....	16
4.3. Determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre .....	17
4.3.1 Efeito da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre .....	17
4.3.2 Efeito do pH na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre .....	17
4.3.3 Efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre.....	18
4.4. Determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre nas proteínas miofibrilares .....	18

4.4.1. Obtenção e caracterização parcial da carne de frango.....	18
4.4.2. Extração das proteínas miofibrilares de carne de frango.....	20
4.4.3 Ensaio de hidrólise das proteínas miofibrilares.....	21
4.5. Aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre em peito de frango.....	21
4.5.1. Testes preliminares.....	22
4.5.2. Determinação do comprimento de sarcômero .....	22
4.5.3. Determinação do índice de fragmentação miofibrilar (IFM) .....	23
4.5.4. Determinação do comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL) .....	23
4.5.5. Avaliação da textura instrumental.....	24
4.5.6. Determinação da perda de peso pós-cocção .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Efeito da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre .....	26
5.2. Efeito do pH na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre .....	28
5.3. Efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre .....	30
5.4. Hidrólise de proteínas miofibrilares .....	32
5.4.1 Efeito da concentração do extrato miofibrilar na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre.....	32
5.5. Aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre na carne de frango.....	34
5.5.1 Qualidade da carne de frango.....	34
5.5.2. Efeito da aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre na carne de frango.....	36
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

## RESUMO

CRUZ, Pamela Lemos. **Caracterização parcial do extrato enzimático bruto de gengibre e seu efeito na fragmentação de miofibrilas em carne de frango**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Consuelo Domenici Roberto. Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Vieira de Carvalho e Prof<sup>a</sup>. Dra. Pollyanna Ibrahim Silva.

A aplicação de proteases é de interesse da indústria de alimentos e o gengibre é uma das fontes vegetais da qual se extrai uma protease de cisteína que tem aplicação na melhoria da textura da carne. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o extrato enzimático bruto de gengibre, avaliar sua atividade proteolítica em proteínas miofibrilares extraídas do músculo *Pectoralis major* de frango de corte. Posteriormente, foram testados três tratamentos para avaliar seu efeito quando aplicado em peito de frango: Controle (peito de frango), peito de frango adicionado de 5% (m/v) de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e peito de frango adicionado de 5% (m/v) de extrato enzimático bruto de gengibre. Foram determinados textura instrumental, índice de fragmentação miofibrilar (IFM), comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL), comprimento de sarcômero e rendimento pós-cocção. O extrato enzimático bruto de gengibre apresentou temperatura ótima de 60 °C e pH ótimo de 5,5. O extrato enzimático bruto de gengibre apresentou atividade residual de 55,4% a 70 °C e mais de 55% em pH variando de 6 a 8. No estudo cinético utilizando a azocaseína como substrato, foram encontrados valores de  $V_{max}$  de 23,50 U.mL<sup>-1</sup> e  $K_m$  de 3,47 mg. mL<sup>-1</sup>. Para o extrato miofibrilar como substrato, foram encontrados valores para  $V_{max}$  de 1,29 U.mL<sup>-1</sup> e  $K_m$  de 21,48 mg. mL<sup>-1</sup>, indicando uma menor especificidade do extrato enzimático bruto de gengibre por este substrato. Não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os tratamentos para comprimento de sarcômero e rendimento pós-cocção. Houve redução no valor de textura instrumental ( $p < 0,05$ ) e aumento no índice de fragmentação miofibrilar ( $p < 0,01$ ) do tratamento com 5% (m/v) de extrato enzimático bruto de gengibre em relação aos demais tratamentos. Por microscopia de contraste de fases, observou-se que as amostras tratadas com 5% (m/v) de extrato enzimático bruto de gengibre apresentaram miofibrilas com maior grau de fragmentação em comparação com os demais tratamentos, apresentando comprimentos de 4,542  $\mu\text{m}$ , 11,324  $\mu\text{m}$  (Controle) e 10,893  $\mu\text{m}$  para peito de frango adicionado de 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). A aplicação de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre em peito de frango, portanto, promoveu a fragmentação das miofibrilas e a redução da força de cisalhamento sem alterar excessivamente a textura da carne e resultar em diminuição do rendimento pós-cocção dos cortes.

**Palavras-chave:** atividade proteolítica, *Zingiber officinale Roscoe*, textura, *Pectoralis major*, proteínas miofibrilares.

## ABSTRACT

CRUZ, Pamela Lemos. **Partial characterization of the crude enzymatic extract from ginger and its effect on the fragmentation of myofibrils in chicken meat.** 2018. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Supervisor: Prof. Dr. Consuelo Domenici Roberto. Co-supervisor: Prof. Dr. Raquel Vieira de Carvalho e Prof. Dr. Pollyanna Ibrahim Silva.

The application of proteases is of great interest to the food industry and ginger is one of the plant sources from which a cysteine protease is obtained and which has application in improving meat texture. In this context, the present study aimed to characterize the crude enzymatic extract of ginger, to evaluate its proteolytic activity in myofibrillar proteins extracted from the *Pectoralis major* muscle of broiler chicken. Afterwards, three treatments were applied to evaluate its effect on the chicken breast: Control (chicken breast), breast of chicken added of 5% (w/v) of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) and breast of chicken added with 5% (w/v) of crude ginger enzymatic extract. It was determined instrumental texture, myofibrillar fragmentation index (MFI), length of myofibrillar fragments (MFL), sarcomere length and cooking loss. The crude enzymatic extract of ginger showed an optimum temperature of 60 °C and an optimum pH of 5.5. The crude enzymatic extract of ginger showed residual activity of 55.4% at 70 °C and more than 55% at pH ranging from 6 to 8. In the kinetic study with azocasein as a substrate,  $V_{max}$  values of 23.50 U. mL<sup>-1</sup> and  $K_m$  of 3.47 mg. mL<sup>-1</sup> were obtained. For the myofibrillar extract as substrate, values for  $V_{max}$  of 1.29 U.mL<sup>-1</sup> and  $K_m$  of 21.48 mg. mL<sup>-1</sup> were found, indicating a lower specificity of the crude ginger enzymatic extract by this substrate. There was no significant difference ( $p \geq 0.05$ ) between treatments for sarcomere length and cooking loss. There was a reduction in the value of instrumental texture ( $p < 0.05$ ) and an increase in the myofibrillar fragmentation index ( $p < 0.01$ ) of the treatment with 5% (w/v) crude ginger enzymatic extract compared to the other treatments. Phase contrast microscopy showed that the samples treated with 5% (w/v) crude ginger enzymatic extract presented myofibrils with a higher degree of fragmentation compared to the other treatments, with a length of 4.542  $\mu\text{m}$ , 11.324  $\mu\text{m}$  (Control) and 10.893  $\mu\text{m}$  for chicken breast added with 5% of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0). Therefore, the application of 5% crude enzyme extract of ginger in chicken breast promoted the fragmentation of the myofibrils and the reduction of the shear force without excessively altering the texture of the meat and resulting in a increase in the cooking loss of the samples.

**Key words:** proteolytic activity, *Zingiber officinale* Roscoe, texture, *Pectoralis major*, myofibrillar proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

O setor de produção de carne é um dos mais importantes segmentos da pecuária e desde a metade do século 20 despertou interesse de pesquisadores para estudos científicos em relação à qualidade da carne (LANA; ZOLLA, 2016).

De uma maneira geral, as carnes podem ser definidas como massas musculares maturadas de animais de açougue, constituídas por músculos esqueléticos com uma aparência heterogênea, devido à presença de fibras musculares, tecido conectivo, tecido adiposo, tecido vascular e tecidos nervosos (LISTRAT et al., 2016). As fibras musculares por sua vez, possuem como organela contrátil as miofibrilas, que se apresentam como o maior componente do músculo esquelético e, estão diretamente relacionadas a vários aspectos da qualidade da carne como a textura, pH e cor (LAWRIE; LEDWARD, 2006).

A demanda dos consumidores por uma carne de melhor qualidade é crescente e a textura representa um dos principais fatores de influência na satisfação do consumidor. Dessa forma, pesquisadores vêm procurando novos métodos eficientes de maturação após o período *post-mortem* para melhorar a qualidade da carne, dentre eles, métodos bioquímicos, físicos, químicos e enzimáticos (GOT et al., 1999; STADNIK, J.; DOLATOWSKI, 2011; JOO et al., 2013; SIRIN et al., 2017).

O uso de proteases exógenas, como método enzimático, visando a melhoria da textura da carne tem atraído muito interesse da indústria, com a visão de uma produção consistente de carnes de qualidade e aumento do valor agregado de cortes de baixo interesse comercial (BEKHIT et al., 2013). A aplicação de enzimas de origem vegetal como a papaína, bromelina e a ficina como aditivos cárneos é comum por estas serem capazes de hidrolisar proteínas do tecido conectivo e do tecido muscular (GERELT et al., 2000; ASHIE et al., 2002; GRZONKA et al., 2007). Nas últimas décadas, a enzima proteolítica derivada do rizoma de gengibre *Zingiber officinale Roscoe* vem sendo reportada por sua eficiência na hidrólise de proteínas da carne (NAVEENA; MENDIRATTA, 2004; NAVEENA et al., 2004; GARG; MENDIRATTA, 2006).

A protease do gengibre (GP) ou zingibaína, a qual foi reportada pela primeira vez por Thompson et al. (1973) exibe uma atividade proteolítica elevada sendo muito ativa na hidrólise de proteínas da carne, principalmente, do colágeno e de outras

proteínas do tecido conectivo (THOMPSON et al., 1973; CHOI; LAURSEN, 2000; BHASKAR et al., 2006; KIM et al., 2007; NAFI et al., 2014). Pode ser descrita como uma protease de cisteína e possui uma vantagem em comparação a outras enzimas exógenas, que está relacionada a sua temperatura ótima de atividade de 60 °C, o que pode ser favorável para sua aplicação em carnes e produtos cárneos submetidos ao calor (NAVEENA; MENDIRATTA, 2001; NAFI et al., 2014).

A maior parte dos estudos conduzidos anteriormente sobre a atividade proteolítica utilizando o rizoma de gengibre demonstrou sua ação direta na aplicação em carnes de diversas espécies, como em carne de galinhas poedeiras (NAVEENA; MENDIRATTA, 2001), carne de búfalo (NAVEENA; MENDIRATTA, 2004) e peito de pato (TSAI et al., 2012) ou estudos *in vitro* de caracterização da enzima do gengibre purificada em substratos padrão (NAFI et al., 2013; NAFI et al., 2014) e da protease comercial (zingibaína) em SDS-PAGE com proteínas extraídas da carne (HA et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o extrato enzimático bruto de gengibre *Zingiber officinale Roscoe* e avaliar seu efeito na fragmentação de miofibrilas extraídas do músculo *Pectoralis major* de frango de corte. Posteriormente, avaliou-se os efeitos de sua aplicação em corte de peito de frango, utilizado como um sistema modelo, na textura, fragmentação miofibrilar e rendimento pós-coção dos cortes.

A carne de frango foi utilizada como sistema modelo, uma vez que apresenta menor quantidade de lipídios e maior teor de proteínas quando comparada com carnes de outras espécies. Além disso, a carne de frango foi escolhida devido à magnitude do Brasil como produtor e exportador mundial deste produto e ao consumo de carne desta espécie no país (OECD/FAO, 2017).

Apesar de métodos de purificação serem empregados para melhorar a estabilidade de extratos enzimáticos obtidos de fontes naturais, especialmente do gengibre, como a purificação com acetona (THOMPSON et al., 1973); precipitação com sulfato de amônio seguido de liofilização (NAFI et al., 2013; NAFI et al., 2014) e o uso de estabilizantes como EDTA, ácido ascórbico e cisteína (ADULYATHAM, 2005; NAFI et al., 2013; NAFI et al., 2014), no presente estudo a utilização do extrato enzimático na forma bruta justifica-se com base na demanda tanto da indústria de alimentos quanto de consumidores pela adição de ingredientes com características

mais próximas do alimento *in natura*, visando sua aplicação em alimentos processados.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar parcialmente o extrato enzimático bruto de gengibre e avaliar seu efeito na fragmentação de miofibrilas extraídas do músculo *Pectoralis major* de frango de corte. Posteriormente, realizar a aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre no corte de peito de frango, utilizado como um sistema modelo, para verificar os efeitos nas características físicas da carne.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Obter o extrato enzimático bruto do gengibre da variedade *Zingiber officinale Roscoe*.
- Determinar o efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre.
- Determinar o efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre.
- Avaliar a fragmentação de miofibrilas extraídas do músculo *Pectoralis major* da carne de frango pelo extrato enzimático bruto de gengibre.
- Determinar o índice de fragmentação miofibrilar, comprimento de fragmentos miofibrilares, comprimento de sarcômero, textura instrumental e rendimento por cocção do músculo *Pectoralis major* de frango após aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Carnes de animais de açougue: composição e estrutura**

As carnes de animais de açougue são definidas como massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária de acordo com Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), Art. 17, Decreto nº 30691 de 29 de março de 1952 (BRASIL, 1952).

O músculo esquelético consiste de aproximadamente 90% de fibras musculares e 10% de tecido conectivo e tecido adiposo. O tecido conectivo no músculo esquelético é dividido em endomísio, no qual envolve cada fibra muscular, o perimísio, no qual envolve grupos de fibras musculares e o epimísio, que envolve o músculo como um todo (ASTRUC, 2014a; ASTRUC, 2014b). Bioquimicamente, os músculos esqueléticos contêm, em média, aproximadamente 75% de água, 20% de proteínas, 1 a 10% de gordura e 1% de glicogênio (LISTRAT et al., 2016).

A fibra muscular é a unidade estrutural do tecido muscular e consiste em uma célula altamente especializada. Estas são células fusiformes, alongadas e multinucleadas de aproximadamente 10 a 100 micrômetros de diâmetro e comprimento variável de acordo com a espécie do animal. Em todas as espécies, o tamanho das fibras aumenta com a idade do animal e é um importante parâmetro do crescimento muscular pós-natal. A membrana plasmática da fibra muscular é conhecida como sarcolema e sua organela mais abundante é a miofibrila, que pode ser encontrada de centenas a milhares de unidades por fibra (PEARSON; YOUNG, 1989; ZEOLA et al., 2007).

As miofibrilas possuem diâmetro de aproximadamente 1 micrômetro, são constituídas pelos miofilamentos finos e grossos e apresentam uma aparência estriada, na qual é facilmente observada em microscopia de luz como uma alternância entre bandas claras e escuras, devido ao arranjo espacial dos miofilamentos. A banda clara é chamada de Banda-I e a banda escura Banda-A. A região central da Banda-A é chamada de zona-H, e no centro desta, pode ser observada a Banda-M. Os miofilamentos finos são formados, principalmente, por actina, enquanto os miofilamentos grossos são formados, predominantemente, por miosina. Longitudinalmente, a proteína titina conecta a linha Z e a linha M. Outras principais

proteínas miofibrilares são a nebulina (menor componente dos miofilamentos finos), complexo troponina (T, I e C) e tropomiosina. O sarcômero é a unidade contrátil que se repete ao longo das miofibrilas (LANA; ZOLLA, 2016; ERTBJERG; PUOLANNE, 2017).

As proteínas miofibrilares compreendem aproximadamente 50% das proteínas total do músculo e são consideradas insolúveis em soluções de baixa força iônica (< 0,2 M), requerendo concentrações salinas maiores que 0,3 M para sua solubilização (CHEN et al., 2015).

O sarcoplasma corresponde ao citoplasma das fibras musculares, no qual são encontradas as proteínas sarcoplasmáticas, incluindo enzimas da via glicolítica e mioglobina. Estas transportam oxigênio para a mitocôndria e glóbulos vermelhos (LISTRAT et al., 2016). As proteínas sarcoplasmáticas se apresentam solúveis em água ou soluções de baixa força iônica (< 0,2 M) (CHEN et al., 2015).

O tecido conectivo que envolve as fibras musculares e os feixes de fibras consiste, principalmente, de uma rede composta de fibras de colágeno envolvidas em uma matriz de proteoglicanos, que pode ser descrita como um gel hidrofílico (BAILEY; LIGHT, 1989; PICARD et al., 1998; ASTRUC, 2014b). O colágeno é uma proteína fibrosa, sendo o tropocolágeno sua unidade estrutural básica em formato helicoidal constituído por três cadeias polipeptídicas formando uma espiral. Moléculas de tropocolágeno são estabilizadas por ligações intermoleculares para formar fibras de 50 nm de diâmetro. Essas fibras, por sua vez, são estabilizadas por ligações intramoleculares e intermoleculares conhecidas como ligações cruzadas (NISHIMURA, 2015; LISTRAT, 2016). As proteínas do tecido conectivo, também conhecidas como proteínas estromais, mantêm-se insolúveis em soluções com alta concentração salina (CHEN et al., 2015).

### **3.2. Carne de frango**

O consumo de carne no Brasil e no mundo apresenta uma tendência crescente. Em 2016, o consumo de carne de frango no mundo representou 34,6% em relação à carne bovina e suína (USDA, 2016). A produção brasileira de carne de frango foi de 13605 milhões de toneladas em 2016, representando 14,8% da produção mundial (USDA, 2016). Segundo projeções da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a

Agricultura (OECD/FAO) em 2019, a produção brasileira de carne de frango representará mais da metade das carnes produzidas no país, superando a produção da carne bovina somada à suína (OECD/FAO, 2017).

Nesse sentido, a carne de frango atende a uma alta demanda de consumo interno e externo, visto que além de ser um alimento rico nutricionalmente, apresenta baixo custo e gera alta renda econômica para sociedade brasileira como um todo, possuindo um papel fundamental no desenvolvimento do país (CANAN, 2004; UBABEF, 2012).

A composição química da carne de aves, especialmente a de frango, apresenta algumas características que se destacam em relação à carne vermelha, principalmente em relação ao maior conteúdo proteico e menor conteúdo de lipídios (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química aproximada de carnes de diferentes espécies de animais

Macronutrientes	Carne Vermelha			Carne de aves	
	Bovina	Suína	Cordeiro	Frango	Peru
Água (%)	70,62	72,34	73,42	74,76	74,12
Proteína (%)	20,78	21,07	20,29	23,09	24,60
Lipídios (%)	6,16	5,88	5,25	1,24	0,65
Cinzas (%)	1,02	1,04	1,06	1,02	1,02

Fonte: Damodaran, Parkin e Fennema (2010).

### 3.3 Maturação da carne

No músculo esquelético estriado dos animais de açougue ocorrem diversas alterações bioquímicas no período *post-mortem* que resultam na alteração das propriedades físico-químicas e sensoriais da carne (LANA; ZOLLA, 2016).

O processo de conversão do músculo em carne inicia-se no momento do abate, no qual as funções vitais são interrompidas, cessam o suprimento de oxigênio e a circulação sanguínea. Essa fase, considerada *pre-rigor mortis*, termina com o esgotamento das reservas de ATP e o enrijecimento do músculo, o que em geral ocorre em torno de 3 a 6 horas dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos, caracterizando o *rigor mortis*. Nessa fase a carne apresenta-se extremamente dura, o

que é gradativamente mitigado durante o processo *post-rigor*, na fase de maturação, onde ocorrerá o amaciamento natural da carne (LANA; ZOLLA, 2015; LANA; ZOLLA, 2016). As evidências científicas apontam um período de maturação de no máximo três semanas para a carne com uma maturação lenta, e pode variar devido a diferentes fatores como o tipo de músculo, espécie do animal, entre outros (WAN et al., 2011).

### **3.3.1 Avaliação da qualidade da carne**

Maciez, textura, suculência e sabor são atributos sensoriais multi-parâmetros que formam a percepção do consumidor em relação à qualidade da carne (LAWLESS; HEYMAN, 2010; CHEN; ENGELEN, 2012). Dentre eles, a textura da carne é determinada por fatores intrínsecos, tais como a quantidade e solubilidade do tecido conectivo (PURSLOW, 1994), encurtamento do sarcômero durante o desenvolvimento do *rigor mortis* e a proteólise *post-mortem* das proteínas miofibrilares, principalmente, pelas enzimas endógenas calpaínas e catepsinas (MARSH; LEET, 1966; ERTBJERG et al., 1999; KOOHMARAIE et al., 2002; GEESINK, 2006).

Em razão de diversos fatores que podem influenciar a qualidade da carne, faz-se necessária a utilização de metodologias instrumentais de avaliação que sejam padronizadas e sensíveis a pequenas alterações que ocorrem na estrutura da mesma, tais como medição da textura, do comprimento de sarcômero, determinação do índice de fragmentação miofibrilar, entre outras.

Para avaliação da textura da carne podem ser utilizados ao menos dois tipos de métodos. Um dos métodos é a análise sensorial empregando testes afetivos (consumidores) ou analíticos (avaliadores treinados), e o segundo é o uso de instrumentos mecânicos, também conhecidos como métodos objetivos, mais rápidos e práticos, que avaliam a maciez pela medida de força de cisalhamento (BATTAGLIA, 2016).

Outro método que pode ser empregado é a medida do comprimento do sarcômero. O sarcômero é considerado a menor unidade contrátil estrutural repetitiva da miofibrila e alterações em sua estrutura podem afetar a textura da carne. Além de efeitos marcantes na textura da carne, alterações no sarcômero podem impactar em sua capacidade de retenção de água e efeitos indiretos na cor e sabor (ERTBJERG; PUOLANNE, 2017). O comprimento do sarcômero pode ser medido diretamente por

microscopia de contraste de fases, que envolve a homogeneização do músculo, extração das miofibrilas e sua subsequente medição direta em microscópio de contraste de fases. A microscopia de contrastes é uma técnica que requer tempo para ser realizada, entretanto, os valores obtidos para o comprimento do sarcômero são obtidos diretamente por medidas na miofibrila, sendo um método preciso (CROSS et al., 1980; KOOLMEES et al., 1986).

Já pela técnica de determinação do índice de fragmentação miofibrilar (IFM), quantifica-se o grau de hidrólise de proteínas miofibrilares. A integridade da miofibrila contribui com mais de 50% das alterações *post-mortem* que levam a alterações na textura da carne (CULLER et al., 1978). Uma das técnicas utilizadas para se calcular o IFM requer a homogeneização do músculo e verificação das miofibrilas pela análise microscópica, avaliando-se o tamanho total de miofibrilas escolhidas ao acaso, conhecido como método do comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL). Por outra, após homogeneização do músculo, determina-se o teor total de proteínas e mede-se a turvação das amostras ajustadas para uma concentração comum de proteína (HOPKINS et al., 2000). Esta técnica baseia-se no princípio de que a quantidade de luz absorvida a um determinado comprimento de onda pelo extrato miofibrilar é proporcional ao tamanho relativo da miofibrila e de resíduos no extrato, sendo que valores maiores de absorbância indicam maior a fragmentação miofibrilar (OLSON et al., 1976).

A determinação do método do IFM é frequentemente utilizada por pesquisadores de diversos países. A metodologia empregada e o processamento das amostras nem sempre são os mesmos, encontrando assim alterações impactantes nos valores observados em diferentes estudos. Dentre as diferenças existentes para a metodologia podemos citar a utilização de amostras frescas e congeladas, a velocidade e o tempo de homogeneização do músculo e fatores utilizados para os cálculos do índice (HOPKINS et al., 2000).

Outro importante fator relacionado a qualidade da carne é a perda de peso pós cocção, que pode ser entendido como a perda de líquidos e nutrientes durante o cozimento da carne. Estas perdas se dividem em perdas por gotejamento, que ocorrem com o desprendimento da água e da gordura fundida durante a cocção, e perdas por evaporação, devida à volatilização da água que se desprende durante a cocção em si. Estes dois fenômenos são favorecidos pela desnaturação de proteínas

da carne e, em excesso, influencia negativamente na textura da carne atribuindo à mesmas características de “seca” e “quebradiça” (NAVEENA; MENDIRATTA, 2001; EUCLIDES FILHO, 2003).

### **3.4 Enzimas proteolíticas**

As proteases são enzimas da classe 3, das hidrolases, e subclasse 3.4, das peptídeo-hidrolases ou peptidases (EC 3.4), que se dividem em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com o posicionamento onde ocorrerá a clivagem na cadeia peptídica (BEYNOM; BOND, 1989).

As exopeptidases atuam somente sobre as extremidades das cadeias polipeptídicas. Enzimas que agem sobre a extremidade N- ou C-terminal são conhecidas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases operam em regiões internas das cadeias polipeptídicas, longe das extremidades (RAO et al., 1998). Quanto à estrutura química do sítio ativo, as exopeptidases são definidas como serino proteases (E.C. 3.4.21), cisteíno proteases (E.C. 3.4.22) e metalo proteases (E.C. 3.4.24) (LEOPOLD; FRICKE, 1997).

#### **3.4.1 Enzimas proteolíticas em carnes**

A maturação natural da carne é causada pela degradação de proteínas estruturais da carne por proteases endógenas. O conhecimento dos mecanismos endógenos proteolíticos de maturação ainda continua a se expandir. Contudo, existe uma evidência conclusiva de que as calpaínas estão envolvidas na proteólise *post-mortem* (HUFF-LONERGAN et al, 1996; KOOHMARAIE et al, 2006).

As calpaínas são cisteino-proteases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . São divididas em  $\mu$ -calpains e m-calpains, no qual requerem respectivamente, concentrações da ordem de micro e milimolar de  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade, sendo seu inibidor endógeno a calpastatina.

Outro sistema de enzimas que vem sendo apontado como sinérgico ao sistema das calpains, são as catepsinas (OUALI et al., 2006). As catepsinas são exo- e endopeptidases divididas em cisteína, aspártica e serina peptidases. O papel das catepsinas na maturação da carne ainda é controverso e debatido. Muitos autores rejeitam seu papel no *post-mortem*, devido ao seu confinamento nos lisossomos.

Contudo evidências apontam que a diminuição do pH do músculo no *post-mortem* está correlacionada com a liberação de catepsinas dos lisossomos para o meio intracelular (HOPKINS; TAYLOR, 2002).

Há evidências científicas de que o proteossomo é outro sistema de enzimas que também está associado à hidrólise *post-mortem* das proteínas do músculo. O proteossomo corresponde ao complexo de proteases multicatalíticas que está envolvido na maturação *post-mortem* com alta eclosão no músculo esquelético. (ROBERT et al., 1999).

### **3.4.2 Proteases Vegetais**

As aplicações industriais de proteases obtidas de fontes vegetais, animais ou microbianas no processamento de alimentos e bebidas (panificação, cervejaria, sucos e vinhos, lácteos, amidos, entre outros), formulação de detergentes e produção de medicamentos são relatadas em diversos estudos científicos, evidenciando seu potencial de aplicação em escala industrial. Em termos econômicos, essas proteases representam 60% do mercado mundial de enzimas (RAO et al., 1998; JOHNVESLY; NAIK, 2001; MAURER, 2004; SUMANTHA et al., 2006; SABOTIČ; KOS, 2012; NIYONZIMA; MORE, 2015).

Em vegetais, as enzimas proteolíticas estão envolvidas nos processos de amadurecimento, de germinação, de diferenciação e morfogênese, de morte celular, de resposta de defesa de plantas a processos de estresse oxidativo, entre outros (MENEZES, 2011). Algumas enzimas envolvidas no amadurecimento de frutos, como a ficina (EC 3.4.22.3) extraída do figo, a papaína (EC 3.4.22.2) obtida do mamão e a bromelina (EC 3.4.22.4) obtida do abacaxi, podem ser extraídas em grandes quantidades com importância econômica significativa, sendo as enzimas de origem vegetal mais utilizadas (LIMA et al, 2008).

Outras proteases vegetais como a actinidina (EC 3.4.22.14) e a zingibaina (EC 3.4.22.67) vêm sendo estudadas nas últimas décadas, com a vantagem de que os estudos científicos indicam uma maior especificidade das mesmas pelas proteínas da carne em comparação à papaína, bromelina e ficina de uso mais comum. A aplicação dessas enzimas em carne fresca, entretanto, requer o estudo cinético dessas enzimas e suas características específicas, junto ao entendimento do impacto das condições a

que estarão sujeitas quando usadas na carne, principalmente, em relação ao pH e temperatura em sua atividade proteolítica (BEKHIT et al., 2013).

### **3.4.3 Protease de gengibre e aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre**

A protease do gengibre (GP) ou zingibaína é uma cisteíno protease e foi reportada pela primeira vez por Thompson et al. (1973). Os autores encontraram uma temperatura ótima de atividade de 60 °C e um pH ótimo de 5,0 e 5,6 em albumina de soro bovino a 3% como substrato, indicando a presença de ao menos duas enzimas no extrato de gengibre purificado parcialmente com acetona.

Os mesmos autores também observaram uma alta atividade proteolítica do preparado enzimático em colágeno purificado em temperatura ótima de 60 °C, sendo essa atividade 30 vezes maior do que a atividade proteolítica no complexo actomiosina purificado. Para verificar a atividade proteolítica do preparado enzimático de gengibre, cortes bovinos foram armazenados a 5 °C por 20 horas, seguidos de cocção e avaliação de força de cisalhamento no equipamento Warner-Bratzler. Como resultado, foram obtidas carnes significativamente mais macias ( $p < 0,05$ ). As amostras controles apresentaram valores de força de cisalhamento de 4,27 kg enquanto para as tratadas com a enzima do gengibre os valores foram de 2,8 kg (THOMPSON et al., 1973).

Nas últimas décadas, vários trabalhos vêm explorando a capacidade proteolítica do extrato de gengibre em carnes. Naveena e Mendiratta (2001) estudaram o efeito do extrato enzimático bruto aquoso de gengibre em carne de galinhas poedeiras. Neste trabalho, foram testadas as concentrações de 0%, 1%, 3% e 5% (v/m) de extrato de gengibre em marinados por 24 horas a 4 °C. Como resultado, os autores reportaram um aumento do pH, da umidade, do rendimento pós cocção, do teor de pigmentos totais, da capacidade de retenção de água, da solubilidade do colágeno, da capacidade de extração das proteínas miofibrilares, do diâmetro da fibra muscular e uma redução na força de cisalhamento das amostras tratadas com extrato de gengibre. O gel de eletroforese das proteínas musculares mostrou uma extensa proteólise e redução no número de bandas de proteínas nas amostras tratadas com o extrato de gengibre. Na análise sensorial, a maciez e a suculência observada pelos julgadores foram maiores nas amostras tratadas com extrato de gengibre. Com base

nos resultados obtidos, os autores determinaram como 3% a concentração ótima de extrato de gengibre para o amaciamento de carne de galinhas poedeiras.

Naveena et al. (2004) compararam o efeito amaciante de diferentes proteases vegetais ao marinar carne de búfalo por 48 horas a 4 °C com 2% de extrato desidratado de *cucumis*; 5% de extrato enzimático bruto aquoso de gengibre; 0,2% de papaína desidratada comercial, todos para um total de 15 mL de marinado; e um controle com 15 mL de água destilada. Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da solubilidade do colágeno, da solubilidade das proteínas sarcoplásmicas e miofibrilares, além de uma redução ( $p < 0,01$ ) na força de cisalhamento para todos os tratamentos em relação ao controle. No gel de eletroforese das proteínas musculares também foi encontrada uma redução no número de bandas proteicas para todos os tratamentos em relação ao controle. Os atributos sensoriais como sabor, suculência, maciez e aceitação global foram significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) em todos os tratamentos em relação ao controle. As amostras tratadas com extrato enzimático bruto de gengibre apresentaram melhores notas na escala hedônica para aparência, sabor, maciez e aceitabilidade global em relação aos demais tratamentos. Os autores concluíram que tanto o extrato de *cucumis* e gengibre podem ser usados efetivamente como alternativa à papaína no amaciamento da carne.

Tsai et al. (2011) estudaram o efeito da marinação com extrato enzimático bruto de gengibre em peito de pato da raça *Muscovy*. Os peitos foram divididos em 10 cortes iguais de 5 mm cada. Cinco cortes foram imersos em 500 mL de extrato de gengibre e marinados por 5 diferentes intervalos de tempo (0, 1, 3, 7 e 14 dias) a 5 °C. Os outros 5 cortes foram embalados a vácuo e armazenados pelo mesmo tempo como controle. As amostras tratadas com extrato de gengibre apresentaram maiores valores de pH ( $p < 0,05$ ) e menores valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As análises de eletroforese SDS-PAGE e de *western blot* indicaram que as proteínas titina, desmina, miosina (cabeça) e  $\alpha$ -actina degradaram mais rapidamente nas amostras marinadas com extrato de gengibre do que no controle. Além disso, apenas nas amostras tratadas com o extrato de gengibre houve aparecimento de peptídeos provenientes da degradação da troponina-T. Os autores concluíram que além de retardar a oxidação lipídica, o extrato de gengibre também aumentou a proteólise do músculo do peito de pato *Muscovy*.

Anandh e Lakshmanan (2014) avaliaram o efeito da adição de 5% de extrato enzimático bruto aquoso de gengibre em produtos cárneos de rúmen de búfalo defumados durante 15 dias a 25 °C em embalagens anaeróbias e verificaram um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de características físico-químicas (pH, umidade e ácido tiobarbitúrico) e nas notas na escala hedônica sensorial (atributos de aparência, cor, sabor, suculência, maciez e aceitabilidade global) durante o armazenamento de 15 dias dos produtos cárneos defumados com o extrato enzimático bruto aquoso de gengibre. Durante o período de armazenamento, a contagem microbiológica aumentou, mas se manteve dentro do permitido pela legislação para produtos cárneos.

He et al. (2015) estudaram o efeito do extrato de gengibre combinado com ácido cítrico na maciez de cortes de peito de pato. Foram preparados 6 marinados com combinações de ácido cítrico (0 e 0,3 M ácido cítrico) e extrato enzimático bruto de gengibre (0, 15 e 30%). Os cortes de peito de pato foram aspergidos na superfície com 15 mL/100 g e as amostras foram marinadas por 72 horas a 4 °C. Não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os tratamentos em relação a umidade e o rendimento pós-cozimento. Contudo, no tratamento com o extrato enzimático bruto de gengibre ocorreu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na força de cisalhamento e um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no pH e índice de fragmentação miofibrilar em relação ao controle. Além disso, a solubilidade de proteínas total e miofibrilar aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) nas amostras tratadas com o extrato de gengibre (com ou sem adição de ácido cítrico) comparado às amostras sem a adição do extrato de gengibre. O gel de eletroforese das amostras com adição de ácido cítrico demonstrou uma degradação da miosina (cabeça) e da actina. Nas amostras com adição de extrato de gengibre em conjunto com o ácido cítrico, houve um aumento na degradação da actina.

Abdel-Naeem e Mohamed (2016) estudaram o efeito da adição de amaciantes cárneos na formulação de hambúrguer de carne de camelo. Foram processadas 4 diferentes formulações de hambúrgueres. A primeira foi adicionada de 7% de extrato enzimático bruto aquoso de gengibre, a segunda de papaína comercial desidratada na concentração de 0,01%, na terceira foi realizada uma mistura entre 5% de extrato enzimático bruto de gengibre e papaína comercial 0,005% e, por último, um controle com apenas a formulação base do hambúrguer. A adição do extrato de gengibre, da

papaína e da mistura resultou em um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas notas da escala hedônica dos atributos sensoriais suculência, maciez e aceitação global e redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores de força de cisalhamento. Observou-se também um aumento da solubilidade do colágeno para a formulação com 7% de extrato de gengibre em relação ao controle e ao tratamento com papaína, porém menor quando comparado à formulação com a adição de extrato de gengibre e papaína. Em relação à estabilidade lipídica dos hambúrgueres durante o armazenamento, tanto o tratamento com adição do gengibre quanto da papaína resultou em um aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao tratamento controle.

### 3.5 Gengibre

O gengibre da variedade *Zingiber officinale Roscoe* é classificado como uma planta herbácea, perene, composto por um rizoma, formado por ramificações horizontais (dedos), palmadas, carnosas e pouco fibrosas. A parte aérea, formada por caules articulados eretos de 30 a 150 cm de altura, apresenta folhas grandes lanceoladas ramificadas dispostas distintamente com larga bainha na base envolvendo o caule. O gênero *Zingiber* apresenta em torno de 85 espécies (SILVESTRINI et al., 1996; GONZAGA; RODRIGUES, 2001; LUCIO, 2010).

Botanicamente, o gengibre é classificado como pertencente ao Reino: Plantae; Filo: Magnoliophyta; Classe: Liliopsida; Ordem: Zingiberales; Família: Zingiberaceae; Gênero: *Zingiber P. Moller*; e Espécie: *Zingiber officinale Roscoe* (EMBRAPA, 2001).

No Brasil, conforme a Resolução RDC n° 276, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o gengibre é considerado uma especiaria ou condimento vegetal, sendo um produto constituído de plantas ou parte delas, que contêm substâncias aromáticas, sápidas, com ou sem valor nutritivo (BRASIL, 2005). No grupo de especiarias e outros condimentos naturais, o gengibre *Zingiber officinale Roscoe* é considerado um alimento seguro para o consumidor (FDA, 2009).

Em sua composição, apresenta oleorresina, 1% a 4% de óleo essencial (ZANCAN et al., 2002), 80 a 90% de água e uma quantidade considerável de amido e fibras (5,4 a 16,2 %) (TAVEIRA MAGALHÃES et al., 1997). A composição dos rizomas pode sofrer influência de diversos fatores como a origem geográfica, radiação,

temperatura, método de secagem, época de colheita, solo, entre outros (GOUINGUENÉ; TURLINGS, 2002; ELPO; NEGRELLE, 2004).

Em relação à produção agrícola, o Brasil está entre os pequenos produtores, cuja produção destina-se, principalmente, para a exportação. Cerca de 70 a 80% dessa produção é comercializada, principalmente, no estado fresco destinando-se especialmente aos mercados dos Estados Unidos da América, Reino Unido, Holanda e Canadá (ELPO; NEGRELLE, 2005).

O Espírito Santo é o estado responsável pela maior parte da produção no Brasil, com cerca de 8 a 9 mil toneladas e também o maior exportador de gengibre (80% das exportações), tendo como principais mercados Europa, Canadá e Estados Unidos. Em Santa Maria de Jetibá, 70% da produção de 400 toneladas/ano é exportado para Europa e Estados Unidos (FAES, 2015), sendo essa a maior plantação de gengibre do Brasil (DESLANDES, 2010).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Tecnologia de Produtos Agrícolas e Química de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES.

##### **4.1 Planejamento experimental e análise estatística dos dados**

Todas as análises foram realizadas no programa RStudio versão 1.0.153 de livre acesso (RSTUDIO TEAM, 2015).

A etapa de caracterização parcial do extrato enzimático bruto de gengibre foi realizada em delineamento em blocos casualizados (DBC) com três repetições ( $n = 3$ ), onde os gengibres das colheitas entre os meses de Abril/2017 e Maio/2017 foram os blocos. As análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância e análise de regressão.

A etapa de avaliação do efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre foi realizada em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas em triplicata. Foram testados dois substratos, sendo um a azocaseína

como substrato padrão e o outro um extrato de proteínas miofibrilares extraídas do músculo *Pectoralis major* de frango de corte (extrato miofibrilar). Para cada substrato foi ajustado o modelo clássico *two-parameters* Michaelis-Menten através da função *MM.2* e os parâmetros do modelo matemático obtido por regressão não-linear (*nls*). Foi utilizado o pacote *drc* versão 3.0-1 do Programa RStudio (RITZ et al. 2015).

A etapa de aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre nas amostras de peito de frango (músculo *Pectoralis major*) foi realizada em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições ( $n = 5$ ). As análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e, quando significativa a 5% pelo Teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Todos os gráficos foram gerados com o pacote *ggplot2* versão 2.2.1 do Programa RStudio (WHICKHAM, 2009).

#### **4.2 Obtenção do extrato enzimático bruto de gengibre**

Os rizomas de gengibre da variedade *Zingiber officinale Roscoe* foram obtidos em estágio de maturação comercial, entre os meses de Abril/2017 e Julho/2017, no comércio local de Alegre, Espírito Santo. Os rizomas foram provenientes de uma propriedade de Presidente Kennedy, localizada no extremo sul do Espírito Santo, latitude 21°05'56" sul, longitude 41°02'48" oeste e altitude de 55 m.

Baseado no procedimento padrão de extração descrito por Nafi et al. (2013), foram pesados 100 g de rizomas, após lavagem e fatiamento, e homogeneizados em 200 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. O homogeneizado foi filtrado com o auxílio de uma tela de nylon. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 10500 g (HERMLE modelo Z 326 K) a 4 °C por 30 minutos. Imediatamente após extração foram realizados os ensaios para caracterização parcial da atividade proteolítica da enzima contida no extrato enzimático bruto de gengibre. A dosagem de proteínas totais no extrato foi realizada segundo o método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino para obtenção da curva padrão. O conteúdo foi expresso em mg. mL<sup>-1</sup> de proteína.

O pH do extrato foi determinado utilizando-se potenciômetro de bancada modelo DLA-PH (Del Lab) segundo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

### **4.3. Determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre**

A atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Nafi et al. (2013) com modificações. Foi utilizada como substrato uma solução de azocaseína 1,0 mg. mL<sup>-1</sup> preparada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Foi adicionado em *ependorf* de 2 mL, 0,1 mL de extrato enzimático bruto de gengibre, 1 mL de solução de azocaseína e 0,6 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Essa solução foi incubada em banho-maria a 60 °C por 20 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 0,3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) e a solução foi centrifugada a 9000 g por 10 minutos a 4 °C. O mesmo procedimento foi realizado com o controle contendo todos os reagentes do ensaio exceto o TCA, que foi adicionado juntamente com o extrato de gengibre após período de incubação. A turbidez do meio foi medida em comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 410 nm igual a 1 unidade em 20 minutos (JANSEN et al., 1994). A atividade específica do extrato foi expressa em U.mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### **4.3.1 Efeito da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre**

O efeito da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre foi determinado com base na metodologia descrita por Nafi et al. (2013). As amostras de solução contendo 0,1 mL de extrato enzimático bruto, 0,6 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), 1,0 mL de azocaseína foram incubadas a 4, 7, 10, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. A atividade enzimática foi determinada após 20 minutos de incubação em cada temperatura de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.

#### **4.3.2 Efeito do pH na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre**

O efeito do pH na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto foi avaliado nos valores de pH de 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 com base na metodologia descrita

por Nafi et al. (2013). As soluções tampão utilizadas foram 100 mM citrato (pH 5,5), 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0, 6,5 e 7,0) e 100 mM tris-HCL (pH 7,5 e 8,0). A azocaseína foi dissolvida em cada solução tampão a fim de se obter uma solução 1,0 mg. mL<sup>-1</sup>. A atividade enzimática foi determinada após 20 minutos de incubação em cada pH de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.

#### **4.3.3 Efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre**

O efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto foi determinado com base na metodologia de Nafi et al. (2014).

A análise foi realizada utilizando a azocaseína como substrato na temperatura e pH ótimos determinados previamente conforme descrito nos itens 4.3, 4.3.1 e 4.3.2. O extrato enzimático bruto de gengibre foi preparado de acordo com o item 4.2. As soluções apresentaram concentrações de azocaseína de 0,1, 0,5, 1, 1,5 e 2,0 mg. mL<sup>-1</sup>, baseado na metodologia de Nafi et al. (2014).

Os resultados foram expressos em atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>). Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 1) utilizando o programa RStudio.

$$f(x, (d, e)) = \frac{d}{1 + (\frac{e}{x})} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde a função cresce em função do aumento da concentração de substrato  $x$ , relacionado ao limite superior  $d$  para concentrações infinitamente grandes (assíntota horizontal). A variável  $d$  é conhecida como a velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ). O parâmetro  $e$  corresponde à concentração de substrato que produz uma resposta referente à metade do valor de  $d$ . O parâmetro  $e$  é conhecido como  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

#### **4.4. Determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre nas proteínas miofibrilares**

##### **4.4.1. Obtenção e caracterização parcial da carne de frango**

Os peitos de frango (músculo *Pectoralis major*) foram coletados em um abatedouro frigorífico no município de Castelo, Espírito Santo. Com base na

metodologia de Novello et al. (2009), a coleta foi feita entre 2-3 horas após abate, imediatamente após desossa da carcaça de frango de corte. Em seguida, as amostras foram imediatamente armazenadas em caixa térmicas com gelo e mantidas a 4 °C durante o transporte até o Laboratório de Tecnologia de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES.

Os cortes de peito de frango foram, então, armazenados e mantidos por 24 horas a 4 °C em BOD. Posteriormente, foram cortados cubos de aproximadamente 3 cm de tamanho dos músculos e realizada a extração das proteínas miofibrilares dos peitos de frango conforme descrito no item 4.4.1.

As características de pH, capacidade de retenção de água e cor dos cortes de frango foram determinadas como indicadores da qualidade dos peitos de frango utilizados como matéria-prima, para garantir a utilização de uma carne com características de curva de queda de pH normal. As amostras foram coletadas e analisadas após 24 horas de resfriamento em BOD a 4 °C. Foram realizadas também análises para determinação da umidade, teor de cinzas e proteínas da carne.

A determinação do pH foi realizada utilizando-se o potenciômetro de bancada, segundo a metodologia 017/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação de umidade foi realizada pelo método gravimétrico em estufa, a 105 °C, até peso constante (metodologia 012/IV) e a determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl baseado na quantificação do nitrogênio proteico total, segundo a metodologia 036/IV, ambas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação da cor foi realizada em colorímetro Spectrophotometer CM-5 (Konica Minolta) por leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares "L\*" (oscilando de branco 100% a preto 0%), "a\*" (componente vermelho +60 a verde -60), "b\*" (componente amarelo +60 e azul -60) (HUNTER; HAROLD, 1987). A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Naveena et al. (2004) com adaptações, na qual em um tubo de centrífuga foram adicionados 1 g de carne e 1,5 mL de uma solução 0,6 M de NaCl. Os tubos foram homogeneizados com um bastão de vidro por cerca de 1 minuto e mantidos a 4 °C por 15 minutos. Os tubos foram novamente homogeneizados, e em seguida foram centrifugados (HERMLE modelo Z 326 K) a 3000 g por 25 minutos a 4 °C. O teor de cinzas foi obtido de acordo com a metodologia de resíduo por incineração obtido por

aquecimento a 550-570°C, segundo a metodologia 018/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008).

A CRA foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$CRA = \frac{P_{is} - P_{fs}}{P_{is}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: CRA = Capacidade de retenção de água; Pis = Peso inicial da carne; Pfs = Peso final da carne.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.2. Extração das proteínas miofibrilares de carne de frango

A extração das proteínas miofibrilares dos peitos de frango (músculo *Pectoralis major*) foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Culler et al. (1978) com modificações e por Battaglia (2016).

Foram preparados 2 litros de solução de extração miofibrilar utilizando 14,91 g de KCl, 2,72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,76 g de EDTA, 0,41 g de MgCl<sub>2</sub>. Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o pH da solução ajustado para 7,0, utilizando solução 1 M de NaOH. Em seguida, foram transferidos para um balão volumétrico de 2 L. A solução de extração miofibrilar foi mantida a 4 °C durante o período das análises (BATTAGLIA, 2016).

Para a extração das miofibrilas foi retirado 1 g de amostra, em duplicata, dos peitos de frango (*Pectoralis major*) com auxílio de um bisturi, eliminando as partes visíveis de tecido conectivo e gorduras. Em seguida, as amostras foram cortadas e colocadas em tubo de centrífuga de polietileno e adicionados de 10 mL de solução de extração miofibrilar a 4 °C seguido de homogeneização com mixer Philips Walita, modelo Viva RI1364. Os tubos foram centrifugados a 1000 g por 15 minutos a 4 °C (HERMLE, modelo Z 326 K). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspenso novamente com adicionais 10 mL de solução de extração miofibrilar (4 °C) com o auxílio de um bastão de vidro. O material foi novamente centrifugado a 1000 g por 15 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mais uma vez suspenso com 2,5 mL de solução de extração miofibrilar (4 °C), agitado em vortex até completa homogeneização e, em

seguida, separado em peneira de polietileno para remover fragmentos de tecido conectivo. Em seguida, foi realizada uma última lavagem dos tubos de centrifuga vazios adicionando-se novamente 2,5 mL de solução de extração miofibrilar (4 °C), agitados e, posteriormente, novamente peneirados para lavagem dos tubos.

O teor proteico das suspensões de proteínas miofibrilares foi determinado pelo método de Biureto, utilizando-se comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific) (GORNALL et al., 1949).

#### **4.4.3 Ensaio de hidrólise das proteínas miofibrilares**

A hidrólise das proteínas miofibrilares foi determinada com base nas metodologias descritas por Ashie et al. (2002), Ha et al. (2012) e Nafi et al. (2014) com adaptações.

Foram preparados extratos com concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 60 e 95 mg. mL<sup>-1</sup> de miofibrilas. O extrato miofibrilar foi diluído para cada concentração testada em tampão de ácido fórmico 0,2 mM titulado com ácido acético até pH 3 (HA et al., 2012) e em seguida ajustado para o pH ótimo, previamente determinado conforme descrito no item 4.3.2.

Em eppendorfs contendo 0,6 mL de tampão de ácido fórmico, foram adicionados 0,1 mL de extrato enzimático bruto de gengibre e 1 mL das suspensões de proteínas miofibrilares diluídas nas respectivas concentrações testadas. Essas misturas de reação foram incubadas por 20 minutos na temperatura ótima (60 °C), previamente determinada conforme descrito no item 4.3.1. A reação foi paralisada com a adição de 0,9 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 15%. As misturas foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 9000 g por 10 minutos a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific) a 280 nm (ASHIE et al., 2002).

Os resultados foram expressos em atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>) e os dados experimentais ajustados ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 1), utilizando o programa RStudio (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

#### **4.5. Aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre em peito de frango**

Foram cortados 100 g de peito de frango para padronizar o tamanho e formato dos cortes do músculo *Pectoralis major*. A aplicação do extrato nos cortes foi feita por

injeção. Os tratamentos testados foram cortes sem adição de extrato (Controle), cortes com injeção de 5% (m/v) de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1) e cortes com injeção de 5% (m/v) de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2). Após preparo, os cortes foram acondicionados em embalagens de polietileno e mantidos a 4 °C por 24 horas.

#### **4.5.1. Testes preliminares**

A concentração de 5% (m/v) de extrato enzimático bruto de gengibre foi baseada em resultados de testes preliminares realizados. Nesta etapa, realizou-se um experimento em DIC com 5 repetições e os dados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey a 5%. Foram testadas as concentrações de 3%, 5% e 10% de extrato enzimático bruto para um total de 20% (m/v) de marinado com água destilada, além do controle adicionado apenas de água destilada. Os tratamentos foram aplicados por injeção e avaliados: capacidade de retenção de água; solubilidade de proteínas totais e miofibrilares; e ou perda de peso pós-cocção.

Nos estudos realizados por Naveena et al. (2001) e Naveena et al. (2004), utilizados como referência para as metodologias empregadas no presente trabalho, também foi utilizada concentração de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre.

#### **4.5.2. Determinação do comprimento de sarcômero**

A determinação do comprimento de sarcômero foi realizada com base na metodologia descrita por Culler et al. (1978) e Battaglia (2016) com adaptações. Após preparo das suspensões miofibrilares, em duplicata, como descrito no item 4.4.1, uma gota do extrato miofibrilar foi depositada sobre uma lâmina (26 x 76 mm). Foram preparadas 5 lâminas para cada um dos 3 tratamentos (Controle; Amostra 1; Amostra 2) com 5 repetições, totalizando 75 lâminas. As lâminas foram examinadas por microscopia de contraste de fases em microscópio da marca Zeiss, modelo Scope.A1, utilizando objetiva de aumento de 40x e ocular de 10x.

Foram selecionadas duas miofibrilas por *frame* (quadro de captura) que apresentavam as estruturas miofibrilares mais nítidas e número mínimo de aproximadamente 5 sarcômeros em sequência. Foram capturados 5 *frames* por lâmina por meio de câmera acoplada ao microscópio da marca Zeiss, modelo AxioCam ERc 5s (CULLER et al., 1978; BATTAGLIA, 2016).

As miofibrilas foram, posteriormente, analisadas utilizando o software Photoshop CS3 Extended, e os comprimentos dos sarcômeros centrais de cada miofibrila foram medidos através da ferramenta de seleção do software. Foram medidos ao menos 100 sarcômeros por amostra. Os resultados para cada amostra foram expressos, em micrômetros (CULLER et al., 1978; BATTAGLIA, 2016).

#### **4.5.3. Determinação do índice de fragmentação miofibrilar (IFM)**

A análise de índice de fragmentação miofibrilar (IFM) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Davey e Gilbert (1969) com modificações sugeridas por Olson et al. (1976), Culler et al. (1978) e Koohmaraie (2002). Foram utilizadas amostras das suspensões das proteínas miofibrilares utilizadas para determinação de comprimento de sarcômero descritas no item 4.5.2.

Para determinação do IFM foram realizadas diluições das suspensões miofibrilares com a solução de extração, cujo preparo foi descrito no item 4.4.1, para se obter a concentração de 0,5 mg de proteína/mL. Em seguida, as suspensões diluídas foram agitadas em vortex e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific). O índice de fragmentação miofibrilar foi estimado de acordo com a Equação 3 (CULLER et al., 1978; CHEN et al., 2006; ZHAO, et al., 2011).

$$IFM = A_{540} \times 200 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: IFM = Índice de Fragmentação Miofibrilar;  $A_{540}$  = Absorbância lida a 540 nm.

#### **4.5.4. Determinação do comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL)**

A determinação do comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL) das amostras das suspensões de proteínas miofibrilares utilizadas nas análises para cálculo do comprimento de sarcômero e do IFM (item 4.5.1 e 4.5.2) foi realizada de acordo com o método de Strydom et al. (2009). Foram utilizadas

O total de 100 fragmentos miofibrilares por amostra foram capturados em microscópio da marca Zeiss, modelo Scope.A1, por microscopia de contraste de fases, utilizando objetiva de aumento de 40x e ocular de 10x e, posteriormente, medidas através da ferramenta de seleção do software Photoshop CS3 Extended.

Foram medidos ao menos 100 miofibrilas por amostra. O MFL foi expresso em micrômetros.

Além da medição do tamanho dos fragmentos miofibrilares também foi realizada a contagem do número de sarcômeros em cada miofibrila analisada. Após a contagem do número de sarcômeros de ao menos 100 miofibrilas por amostra, foi calculada a média das contagens, obtendo-se como resultado o número de sarcômeros médios por miofibrila para cada tratamento e seu respectivo desvio padrão (FISHELL et al., 1985).

#### **4.5.5. Avaliação da textura instrumental**

As amostras provenientes da aplicação dos tratamentos como descrito no item 4.5 foram submetidas ao cozimento em forno elétrico Modelo Calábria Grill da marca NARDELLI com temperatura constante de 170 °C até atingirem a temperatura interna de 71 °C, monitorada com o auxílio de um termômetro tipo espeto digital da marca Incoterm®. Ao atingirem a temperatura interna de 40 °C, as amostras foram viradas e mantidas no forno até atingirem a temperatura de 71 °C internamente. Após resfriamento em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, as amostras foram armazenadas em embalagens de polietileno e permaneceram em BOD por 12 horas a 4 °C. de acordo com o procedimento padronizado de análise de textura pelo Centro de Pesquisas em Carnes *US. Meat Animal Research Center* do (USDA) (WHEELER et al., 1995).

Em seguida, foram retirados pelo menos seis paralelogramos de 1 cm de altura por 1 cm de largura por 4 cm de comprimento seguindo a orientação paralela das fibras musculares (LYON; LYON, 1998) (Figura 1c).

A análise instrumental de textura foi realizada em texturômetro modelo TexturePro CT V1.4 Build 17 (Brookfield) (Figura 1a), equipado com as lâminas de cisalhamento de 3,05 mm modelo "V" Warner-Bratzler (WB), com espessura de 1,016 mm (Figura 1b).

Durante as análises de determinação de textura instrumental foram adotadas as seguintes configurações para o texturômetro: velocidade de pré-teste de 10 mm/s e de 5 mm/s durante o teste, tendo como carga de 25 Kg com base em Barbanti e Pasquini (2005). Os valores de textura instrumental foram calculados pela média dos

valores obtidos para força de cisalhamento (Kgf) das seis repetições (paralelogramos) de um mesmo corte.

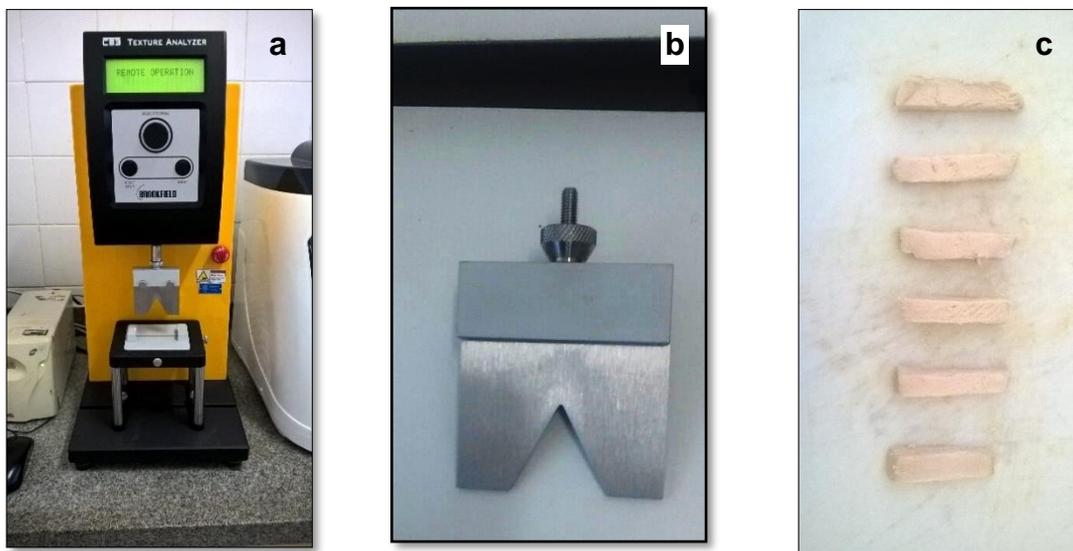


Figura 1: (a) Texturômetro modelo TexturePro CT V1.4 Build 17 (Brookfield); (b) Lâminas de cisalhamento de 3,05mm modelo “V” Warner-Bratzler (WB), com espessura de 1,016mm; e (c) Amostras padronizadas.

#### 4.5.6. Determinação da perda de peso pós-cocção

As amostras utilizadas para a determinação da perda de peso pós-cocção foram as mesmas utilizadas para a avaliação de textura instrumental (Item 4.5.5). As mesmas foram pesadas antes e após o cozimento. A perda de peso pós cocção foi obtida de acordo com a Equação 3. As perdas foram expressas em porcentagem do peso da amostra original (AQUINO, 2016).

$$PP = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: PP = Perda de peso pós-cocção; Pi = Peso inicial (amostra crua); Pf = Peso final (pós-cocção).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre

O extrato de gengibre utilizado neste trabalho apresentou em média  $2,32 \pm 0,28$  mg. mL<sup>-1</sup> de proteína. Nas condições testadas no presente estudo, a temperatura de atividade ótima do extrato enzimático bruto de gengibre foi 60 °C, sendo a atividade específica nesta temperatura de  $0,063 \pm 0,07$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína. Considerando a atividade específica a 60 °C como 100%, a partir de 70 °C o extrato manteve 55,4% de sua atividade, reduzindo para 32,4% a 80 °C (Figura 2).

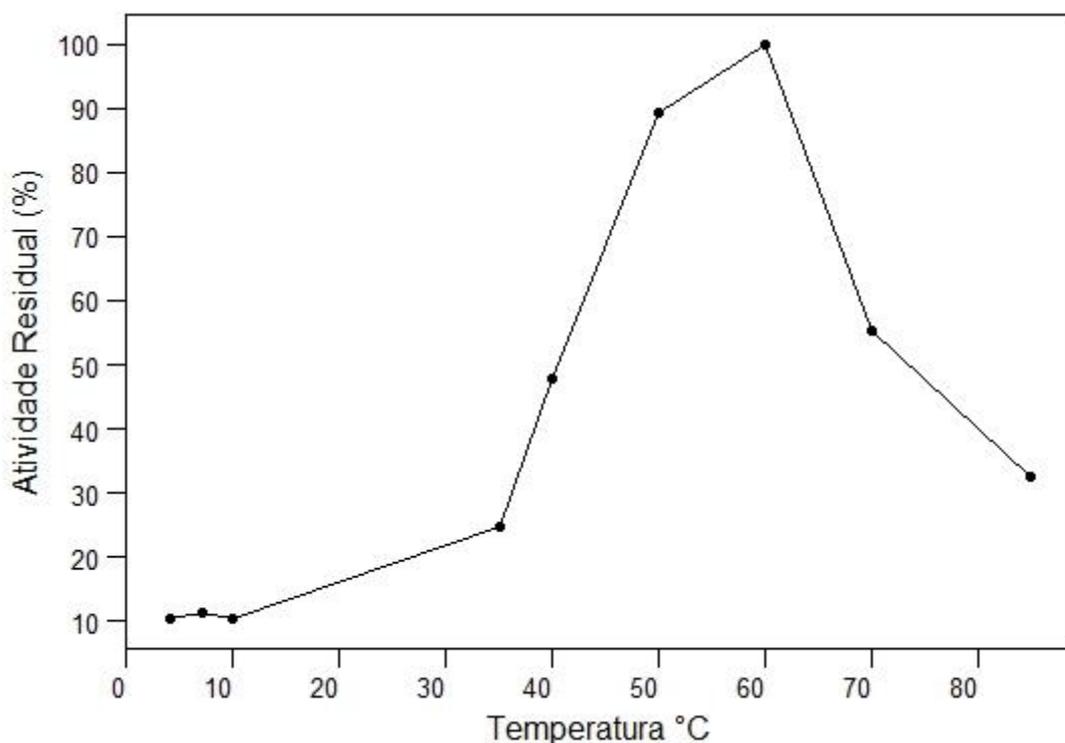


Figura 2: Efeito da temperatura na atividade residual do extrato enzimático bruto de gengibre durante 20 minutos em pH 7,0 (100% de atividade residual =  $0,063 \pm 0,07$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína).

No estudo feito por Thompson et al. (1973) foi realizada a purificação parcial do extrato enzimático bruto de gengibre com acetona e sua temperatura ótima foi obtida a 60°C utilizando albumina de soro bovino 3% (m/v) como substrato. A queda na atividade a partir de 70 °C foi descrita pelos autores como uma aparente desnaturação enzimática. Em estudos mais recentes realizados por Nafi et al. (2013), com o

gingibre da variedade *Zingiber officinale Roscoe*, e Nafi et al. (2014), com gengibre da variedade *Bentong*, também foram reportadas temperaturas ótimas de 60 °C para extratos de gengibre extraídos com estabilizantes (EDTA e cisteína), precipitados com 60% de sulfato de amônio seguidos de diálise e liofilização utilizando azocaseína 0,1% (m/v) como substrato. Ambos os trabalhos encontraram uma queda na atividade das proteases do gengibre a partir de 70 °C também justificada pelos autores por uma aparente desnaturação enzimática ocorrida nessa temperatura.

No presente estudo, o extrato enzimático bruto de gengibre manteve 55,4% de sua atividade residual a 70°C (Figura 2), apresentando uma maior atividade residual nesta temperatura em comparação aos estudos realizados por NAFI et al. (2013) e NAFI et al. (2014), citados anteriormente. Esses autores relataram que o extrato enzimático purificado de gengibre manteve 36% de sua atividade a 70 °C (NAFI et al., 2013; NAFI et al., 2014).

A protease de gengibre atraiu interesse dos pesquisadores devido a sua temperatura ótima (60 °C) estar localizada no intermédio entre as proteases vegetais já conhecidas. Dentre as proteases mais conhecidas aplicadas no amaciamento da carne, a bromelina (E.C. 3.4.22.4) apresenta uma temperatura ótima entre 35 ou 45 °C, dependendo do local de extração do fruto (coroa, casca ou polpa) e desnaturação acima de 50 °C (DEVAKATE et al, 2009). Já a papaína (E.C. 3.4.22.2) a temperatura ótima é de 65 °C, podendo apresentar atividade até 80 °C, onde ocorre sua desnaturação (SUFANG et al., 2002).

De acordo com *US. Meat Animal Research Center* do USDA (WHEELER et al., 1995), as carnes devem atingir uma temperatura interna de 71 °C para o consumo. Para aplicação em produtos cárneos, a protease deve agir de forma eficiente na temperatura de cozimento do produto, porém não deve resultar no amaciamento excessivo da carne como relatado por Cronlund e Woychik (1987). Este amaciamento excessivo da carne foi relatado também por Miller et al. (1989) e Ashie et al. (2002) em relação a papaína. Os autores descreveram a ação da papaína em proteínas miofibrilares como pouco específica, o que poderia gerar problemas na qualidade final da carne, como perda no rendimento e alterações indesejáveis na textura (MILLER E et al., 1989; ASHIE, 2002).

A temperatura ótima de 60 °C e a queda da atividade proteolítica de aproximadamente 50% quando elevada a 70 °C do extrato enzimático bruto de

gingibre (Figura 2) é um indicativo de que sua aplicação em produtos cárneos que serão submetidos ao cozimento durante o preparo pode ser viável e contribuir para a melhoria de suas características como textura, capacidade de retenção de água, solubilidade de proteínas, entre outras.

## 5.2. Efeito do pH na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre

Nas condições testadas no presente estudo, o pH ótimo do extrato enzimático bruto de gengibre foi de 5,5, apresentando atividade específica de  $0,120 \pm 0,04 \text{ U.mg}^{-1}$  de proteína neste pH a  $60^\circ\text{C}$ . Em relação à atividade residual, observou-se que o extrato enzimático bruto de gengibre manteve pelo menos 55% de atividade proteolítica em ampla faixa de pH (6,0 a 8,0) (Figura 3).

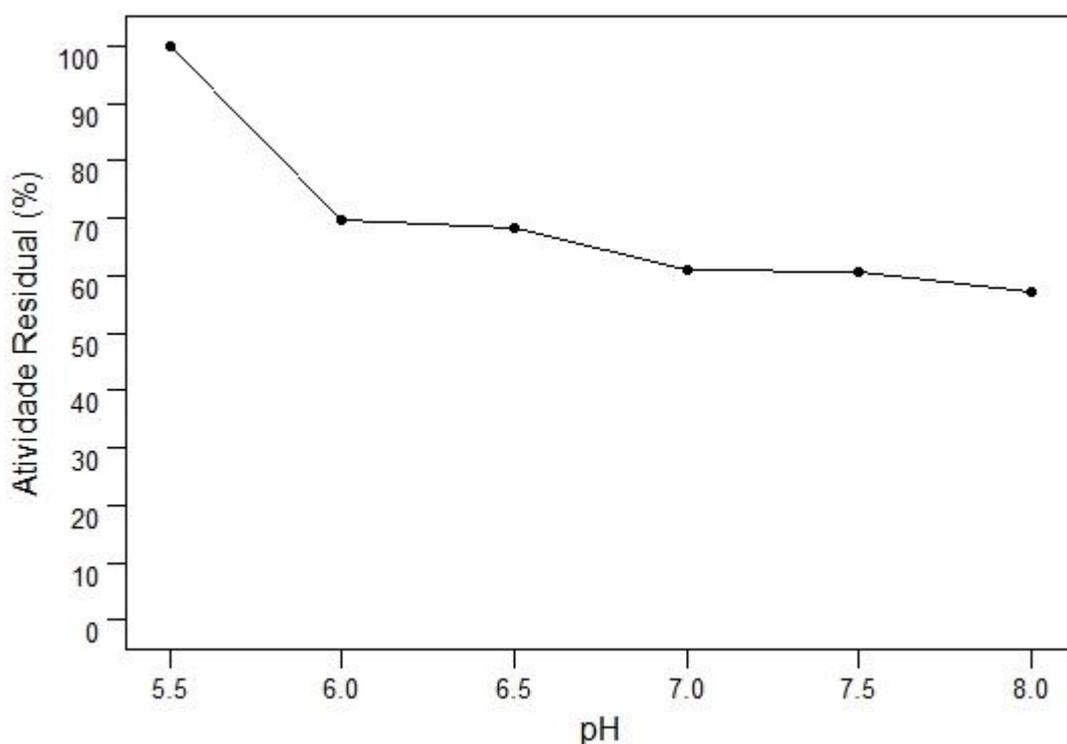


Figura 3: Efeito do pH na atividade residual do extrato enzimático bruto de gengibre durante 20 minutos a  $60^\circ\text{C}$  (100% de atividade residual =  $0,120 \pm 0,04 \text{ U.mg}^{-1}$  de proteína).

Thompson et al. (1973) estudaram o efeito do pH na atividade proteolítica do extrato de gengibre parcialmente purificado com acetona em albumina de soro bovino

3% (m/v) e observaram dois picos de atividade máxima. Os valores de pH ótimos foram de 5,0 e 5,6, os quais os autores atribuíram à presença de ao menos duas enzimas proteolíticas diferentes presentes no extrato.

Estudos realizados posteriormente por Ohtsuki et al. (1995) objetivando a purificação de proteases do gengibre pelas técnicas de DEAE-Sephrose e focalização isoelétrica, relataram que suas proteases poderiam ser separadas em três frações. A atividade proteolítica dessas frações atuando simultaneamente em determinado substrato (caseína 1% (m/v) a 50 °C por 20 minutos) apresentou pH ótimo entre 5,0 e 5,6. Separadamente, dependendo da fração analisada, o pH de atividade proteolítica ótima variou entre 6,5 e 7,0 assim como relatado por Thompson et al. (1973) e Ichikawa et al. (1973). Nos estudos realizados por Nafi et al. (2013) e Nafi et al. (2014) foi relatada atividade proteolítica ótima em pH 7,0 para extratos purificados obtidos de duas variedades diferentes de gengibre.

O pH ótimo de proteases vegetais já estudadas se mostra próximo ao do presente estudo. Em estudos realizados com extratos brutos vegetais, a papaína (EC 3.4.22.2) retirada de látex de papaia (*Carica papaya*) apresentou pH ótimo de 7,0 para atividade em caseína. Similar à bromelina (EC 3.4.22.4) extraída da coroa de abacaxi (*Ananas comosus*), que apresentou pH ótimo de 7,0 para atividade em caseína (GRZONKA et al., 2007). Em estudos com a actinidina (EC3.4.22.14), na forma purificada com sulfato de amônio 60%, dializada e liofilizada foi verificada alta atividade em colágeno em pH ótimo de 8,5 (CHALABIE et al., 2008).

A especificidade da protease do gengibre para o colágeno, assim como sua atividade moderada no complexo actomiosina e sua temperatura ótima de atividade em valores próximos a outras proteases vegetais já utilizadas pela indústria, como relatado no trabalho de Thompson et al. (1973), reforçam o interesse dos pesquisadores na sua aplicação em produtos cárneos.

A carne de frango, em geral, apresenta um pH médio de 5,97 (SANFELICE et al., 2010). Considerando a atividade residual do extrato bruto enzimático de gengibre acima de 55% entre pH 6,0 e 8,0 (Figura 3), sua atividade específica seria de aproximadamente 70% se aplicada em carne de frango a 60 °C. O que é desejável, visto que, como citado anteriormente, para aplicação em produtos cárneos, a protease não deve levar ao amaciamento excessivo da carne como relatado por Cronlund e Woychik (1987) e, conseqüentemente, acarretar em problemas na qualidade final da

carne, como já relatado em outros estudos com proteases vegetais como a papaína (MILLER et al., 1989; ASHIE, 2002).

### **5.3. Efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre**

O estudo do efeito da variação de substrato na atividade enzimática quando a concentração de enzima e o tempo de incubação são constantes, em geral, gera um gráfico com perfil de hipérbole retangular, no qual se observa um aumento gradual na atividade enzimática com o aumento da concentração de substrato até que se atinja um patamar. A partir deste ponto a atividade não se modifica significativamente, mesmo que sejam adicionadas quantidades crescentes de substrato. Esta situação é considerada como uma condição em que atividade da enzima está se aproximando da velocidade máxima da reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ), que corresponde à situação em que todas as enzimas (E) estão com substratos (S) ligados em seus sítios ativos, formando o complexo ES (LINEWEAVER; BURK, 1934).

No presente estudo, este comportamento pode ser observado pelo ajuste dos dados amostrais ao modelo de Michaelis-Menten (Figura 5). Os dados de atividade foram expressos em atividade enzimática ( $U.mL^{-1}$ ) obtidos a partir da hidrólise da azocaseína em diferentes concentrações pelo extrato enzimático bruto de gengibre após 20 minutos de incubação a 60 °C e pH 5,5, que correspondem aos valores de temperatura e pH ótimos (Figuras 2 e 3).

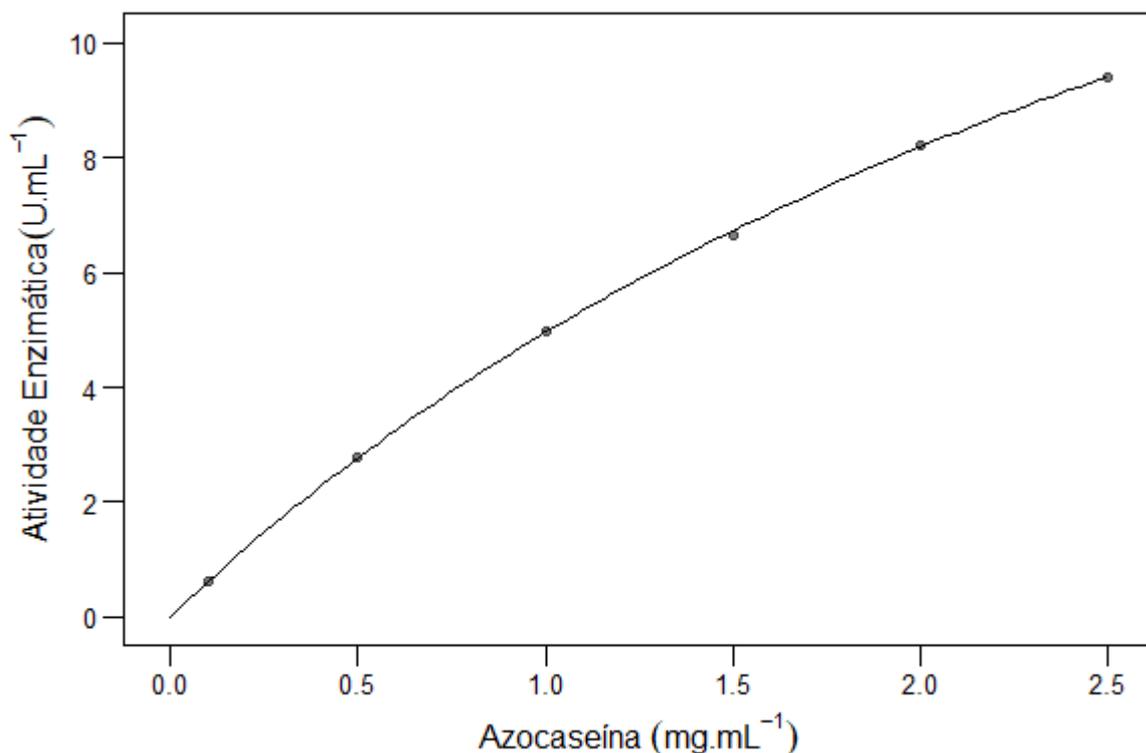


Figura 4: Efeito das concentrações de substrato (azocaseína) na atividade enzimática do extrato enzimático bruto de gengibre a 60 °C/ 20 minutos e pH 5,5.

Na Figura 4, é possível observar que o aumento da concentração de azocaseína no meio causa um aumento na atividade do extrato enzimático bruto de gengibre. Pode-se verificar também ao se observar o perfil da curva que há uma tendência de aumento de atividade do extrato para concentrações acima de 2,5 mg. mL<sup>-1</sup> de azocazeína até que se atinja, possivelmente, um patamar, como mencionado anteriormente. Nessas condições, a atividade enzimática máxima ( $V_{max}$ ) foi estimada em 23,50 U. mL<sup>-1</sup> e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foi estimada em 3,74 mg. mL<sup>-1</sup>, o que significa que são necessárias 3,74 mg. mL<sup>-1</sup> de azocaseína para que seja alcançada metade da atividade enzimática máxima de 1 mL de extrato enzimático bruto enzimático de gengibre nas condições testadas.

Um menor valor para  $K_m$  indica maior afinidade da enzima, ou do extrato enzimático, pelo substrato testado. A enzima terá um diferente valor de  $K_m$  para diferentes substratos e condições de incubação (LINEWEAVER; BURK, 1934).

Não foram encontrados estudos semelhantes utilizando o extrato enzimático bruto de gengibre. Contudo, no estudo pioneiro realizado por Thompson et al. (1973), já descrito anteriormente, foi encontrado o valor de 0,37 mg. mL<sup>-1</sup> para a constante de

Michaelis-Menten ao se incubar o extrato desidratado e purificado de gengibre, em albumina de soro bovino como substrato a 60° C e pH de 5,0.

Em estudos mais recentes realizados por Nafi et al. (2013) com extrato purificado e liofilizado de gengibre da variedade *Zingiber officinale Roscoe* e Nafi et al. (2014) com extrato purificado e liofilizado de gengibre da variedade *Bentong* foram encontrados valores para Km de 0,18 e 0,21 mg. mL<sup>-1</sup>, e Vmax de 34,48 mg. mL<sup>-1</sup> e 35,74 mg. mL<sup>-1</sup>, respectivamente utilizando azocaseína como substrato.

Os estudos citados utilizaram métodos de purificação e adição de estabilizantes ao extrato de gengibre, enquanto no presente estudo buscou-se sua utilização o mais próximo de seu estado *in natura*. Ainda sim, os valores do presente estudo apresentaram-se próximos aos citados, indicando uma alta afinidade da protease de gengibre, mesmo no estado bruto, pela azocaseína. Estes resultados mostram que é possível a utilização do extrato enzimático bruto de gengibre mais próximo ao natural (sem adição de estabilizantes ou utilização de métodos de purificação) sem que hajam grandes perdas em sua atividade enzimática, o que é extremamente positivo visando sua aplicação em produtos alimentícios.

## **5.4. Hidrólise de proteínas miofibrilares**

### **5.4.1 Efeito da concentração do extrato miofibrilar na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre**

A carne de frango utilizada para extração das proteínas miofibrilares apresentou 76,37 ± 0,26 % de umidade, 21,30 ± 0,50 % de proteínas totais e pH de 6,26 ± 0,01. A concentração de extrato miofibrilar utilizada como substrato no ensaio de atividade proteolítica variou de 1 mg.mL<sup>-1</sup> até 95 mg.mL<sup>-1</sup>, uma vez que o teor de proteínas do extrato de proteínas miofibrilares obtido do músculo *Pectoralis major* de frango de corte utilizado no presente estudo foi de 94,88 ± 1,26 mg.mL<sup>-1</sup>.

Na Figura 6 encontra-se o modelo de Michaelis-Menten (Equação 1) ajustado aos dados de atividade enzimática obtidos da hidrólise do extrato miofibrilar em diferentes concentrações pelo extrato enzimático bruto de gengibre em 20 minutos a 60 °C e pH 5,5 (condições ótimas). O modelo foi não significativo para falta de ajuste ( $p \geq 0,05$ ) e os parâmetros do modelo foram significativos pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

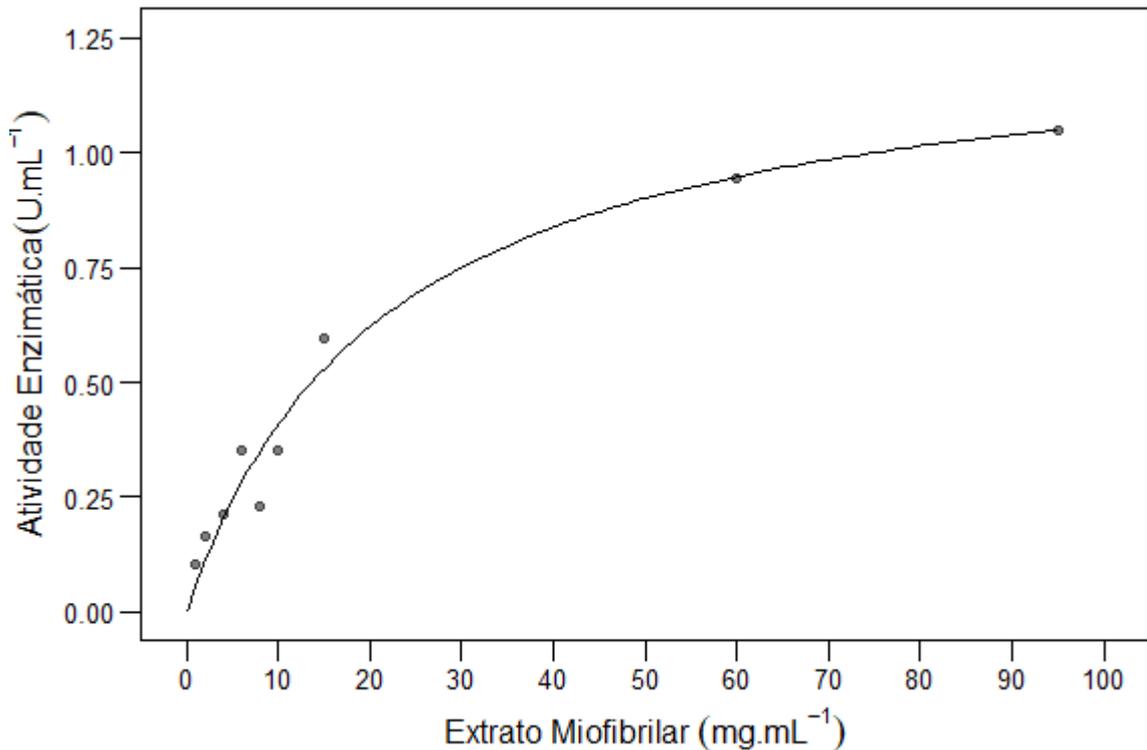


Figura 5: Efeito das concentrações de extrato miofibrilar na atividade enzimática do extrato enzimático bruto de gengibre a 60 °C/ 20 minutos e pH 5,5.

O aumento da concentração de extrato miofibrilar no meio resultou no aumento gradual da atividade do extrato enzimático bruto de gengibre até a concentração de aproximadamente 60 mg. mL<sup>-1</sup> de extrato miofibrilar. A partir desta concentração, a curva apresentou uma menor variação, sugerindo a tendência de formação de um patamar, e indicando, portanto, que acima desse valor o aumento da concentração de extrato miofibrilar no meio não interferiu significativamente na atividade enzimática do extrato enzimático bruto de gengibre como ocorreu para concentrações menores (Figura 5). Esta situação indica uma aproximação da velocidade máxima da reação enzimática, como explicado anteriormente.

Considerando o teor de proteínas de  $94,88 \pm 1,26$  mg.mL<sup>-1</sup> do extrato de proteínas miofibrilares, referentes ao processo de extração de 1 g de músculo *Pectoralis major* de frango de corte utilizado no presente estudo, os resultados demonstram que 1 mL de extrato enzimático bruto de gengibre foi capaz de hidrolisar as proteínas miofibrilares na concentração média final de extração (95 mg.mL<sup>-1</sup>) com uma atividade enzimática de 1,05 U.mL<sup>-1</sup> (Figura 5).

A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foi estimada em 21,48 mg. mL<sup>-1</sup> e a atividade enzimática máxima ( $V_{max}$ ) estimada em 1,29 U.mL<sup>-1</sup>. Portanto, são necessárias 21,48 mg de extrato miofibrilar para que seja alcançada metade da velocidade máxima de 1 mL de extrato enzimático bruto de gengibre nas condições testadas.

Quando os valores de  $K_m$  são comparados, pode-se inferir sobre a afinidade do extrato enzimático testado (LINEWEAVER; BURK, 1934). Quanto menor o  $K_m$ , mais afinidade a enzima ou o extrato enzimático possui pelo substrato utilizado. O  $K_m$  encontrado para a azocaseína (substrato padrão para proteases) foi de 3,74 mg. mL<sup>-1</sup> (Figura 4). Já para o extrato de proteínas miofibrilares o  $K_m$  estimado foi de 21,48 mg. mL<sup>-1</sup> (Figura 5), demonstrando menor afinidade do extrato enzimático bruto de gengibre pelo extrato de proteínas miofibrilares extraídas do músculo *Pectoralis major* de frango de corte. Estes resultados podem indicar uma vantagem na aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre em produtos cárneos, visto que a menor afinidade das proteases do gengibre pelo extrato miofibrilar evita o problema de hidrólise excessiva das proteínas miofibrilares que, por sua vez, podem acarretar em problemas na qualidade final da carne, como perda no rendimento e alterações indesejáveis na textura como relatado por Miller et al. (1989) e Ashie et al. (2002) utilizando papaína.

## **5.5. Aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre na carne de frango**

### **5.5.1 Qualidade da carne de frango**

Na Tabela 2 encontram-se os valores médios e desvio-padrão de pH, umidade, teor de cinzas e de proteínas, capacidade de retenção de água (CRA) e parâmetros de cor do músculo *Pectoralis major* utilizado para avaliar os efeitos do extrato enzimático bruto do gengibre na fragmentação miofibrilar e características físicas de peito de frango.

Tabela 2 - Valores médios e desvio-padrão de pH, umidade, teor de cinzas, teor de proteínas, capacidade de retenção de água (CRA) e parâmetros de cor do peito de frango

	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
pH	6,14	0,10
Umidade (%)	76,78	0,97
Teor de Cinzas (%)	1,20	0,07
Teor de Proteínas (%)	23,11	0,69
Capacidade de retenção de água (CRA) (%)	59,38	2,66
L* (luminosidade)	52,47	2,00
a* (verde a vermelho)	4,18	1,54
b* (azul a amarelo)	17,45	1,32

Parâmetros de cor e valor de pH medidos após 24 horas após abate do animal auxiliam na identificação da qualidade da carne, indicando se as carnes apresentam características de RFN (“Reddish Pink, Firm and Non-Exudative”), PSE (“Pale, Soft and Exudative”) e DFD (“Dark, Firm and Dry”) que, por sua vez, podem influenciar na capacidade de retenção de água, solubilidade e rendimento dos cortes de frango. Kijowski e Niewiarowicz (1978) sugeriram que o pH indicativo de carne “PSE” em frangos seria de 5,7, enquanto Lawrie e Ledward (2006) relata que o pH de carnes “DFD” após 24 horas de abate encontra-se em valores superiores à 6,2.

Pizato et al. (2017) encontraram valores similares para cortes de frango *in natura* em relação a cor, e estudos como o de Praxedes (2007) demonstram que L\* acima de 53,0 são indícios de carnes “DFD”, enquanto valores de L\* abaixo de 44,0 indicam carnes “PSE”.

A carne de frango imediatamente antes da injeção do extrato de gengibre apresentou valores de pH de  $6,14 \pm 0,1$ . Quanto à cor, os cortes apresentaram L\* de  $52,47 \pm 2,00$ , a\* de  $4,18 \pm 1,54$  e b\* de  $17,45 \pm 1,32$  (Tabela 2). Comparando aos valores obtidos por Kijowski e Niewiarowicz (1978) e Praxedes (2007), os peitos de frango utilizados no presente estudo para aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre podem ser considerados como carne RFN. As carnes RFN são as de cor normal, textura firme e não exsudativas (BRIDI e SILVA, 2016).

## 5.5.2. Efeito da aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre na carne de frango

### 5.5.2.1. Índice de fragmentação miofibrilar (IFM), comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL), comprimento de sarcômero, textura instrumental e rendimento pós-cocção

Os resultados da análise de variância e as médias analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para Teste F significativo ( $p < 0,05$ ), do índice de fragmentação miofibrilar (IFM), comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL), comprimento de sarcômero, textura instrumental e perda de peso pós-cocção são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da ANOVA Índice de fragmentação miofibrilar (IFM), comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL), textura instrumental comprimento de sarcômero, e perda de peso pós-cocção de peito de frango (*Pectoralis major*)

	Controle	Amostra 1	Amostra 2	Níveis de significância
<b>IFM</b>	23,82 <sup>b</sup>	24,95 <sup>b</sup>	76,05 <sup>a</sup>	**
<b>MFL (µm)</b>	11,32 <sup>b</sup>	10,89 <sup>b</sup>	4,54 <sup>a</sup>	***
<b>Textura instrumental (Kgf)</b>	2,66 <sup>a</sup>	2,53 <sup>a</sup>	1,63 <sup>b</sup>	*
<b>Comprimento de sarcômero (µm)</b>	1,33	1,29	1,35	NS
<b>Perda de peso pós-cocção (%)</b>	30,94	31,20	31,41	NS

Níveis de significância: \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , NS:  $p \geq 0,05$ .

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

Controle: Peito de frango (*Pectoralis major*).

Amostra 1: Peito de frango tratado com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0).

Amostra 2: Peito de frango tratado com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre.

O IFM e o MFL são importantes indicadores da extensão da fragmentação de miofibrilas (OLSON et al., 1976; HOPKINS et al., 2000; ZHAO et al., 2011). A estrutura

da linha Z é destruída durante o processo de degradação enzimática, levando ao encurtamento do comprimento da miofibrila como um todo pela redução do número de sarcômeros em sequência. Conseqüentemente há uma redução no comprimento dos fragmentos miofibrilares (MFL) e um aumento na turbidez do meio experimental e, portanto, do IFM. Um maior IFM e um menor MFL são correlacionados com uma redução na força de cisalhamento da carne (OLSON et al., 1976).

Observou-se que o valor do Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM) é significativamente maior nos cortes com adição de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2) quando comparados ao peito de frango com injeção de 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1) e o peito de frango (Controle). O valor de fragmentação miofibrilar da amostra tratada com extrato enzimático bruto de gengibre equivale a um aumento de aproximadamente 211,7% em relação ao das amostras sem adição de extrato, demonstrando significativa hidrólise da fração miofibrilar das proteínas do peito de frango devido à atividade proteolítica do extrato enzimático bruto de gengibre após armazenamento por 24 horas a 4 °C (Tabela 3).

Valores semelhantes foram encontrados por Gerelt et al. (2000) ao avaliarem o efeito do tratamento com 0,1% de papaína comercial e 1% de proteases de *Aspergillus sojae* e *Aspergillus oryzae*, também comerciais, em carnes bovinas desidratadas. Após processo de desidratação, as amostras foram imersas nas soluções enzimáticas por 3 horas a 4 °C. No tratamento controle uma amostra foi imersa em água deionizada. Após serem removidas das soluções, as amostras foram armazenadas por 24, 48 e 168 horas a 4 °C. As carnes tratadas com as soluções enzimáticas apresentaram um aumento no índice de fragmentação miofibrilar nas primeiras 24 horas de armazenamento quando comparadas ao controle. Além disso, foi observada uma degradação notável da miosina nas miofibrilas extraídas desses cortes quando observados em SDS-PAGE. O aumento dos valores do índice de fragmentação miofibrilar nos tratamentos com proteases em relação ao controle foram de 240, 200 e 190%, para *A. sojae*, papaína e *A. oryzae*, respectivamente, em apenas 24 horas de armazenamento.

Analisando-se os valores de MFL das amostras tratadas com extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2), observou-se que foram aproximadamente 59,12% menores em relação ao peito de frango (Controle) e o peito de frango com a injeção de 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1), (Tabela 3). Esse

resultado indica que no tratamento utilizando 5% de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2) as miofibrilas apresentaram uma redução no número de sarcômeros em sequência e, conseqüentemente, no comprimento dos fragmentos das miofibrilas capturadas pela análise microscópica (Figura 6).

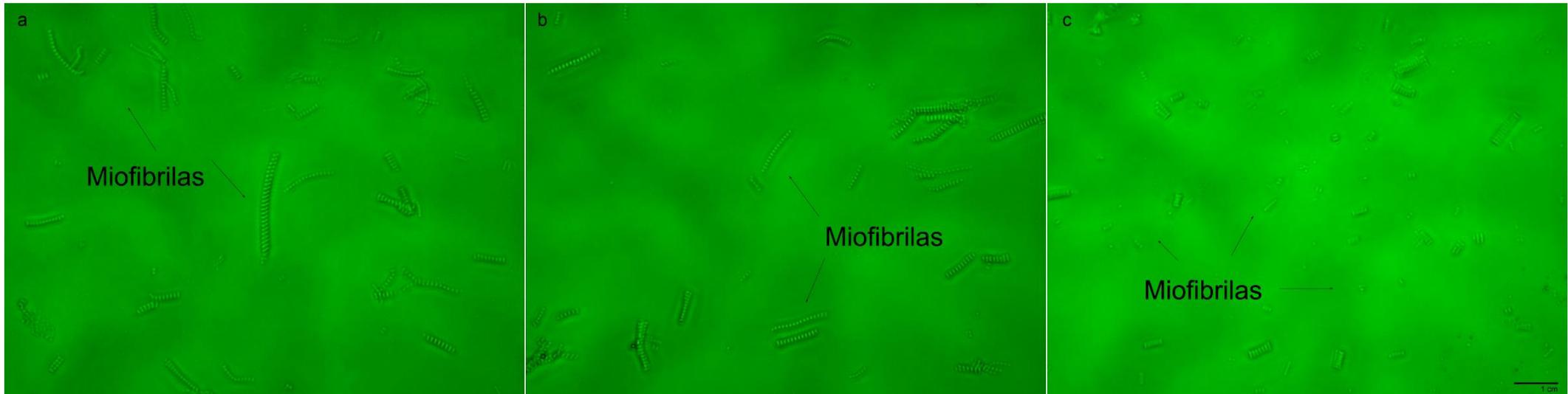


Figura 6: Microscopia de contraste de fase de extrações miofibrilares de peito de frango (Controle) (a), tratadas com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1) (b) e tratadas com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2). Barra = 1 cm.

As capturas apresentadas na Figura 6 demonstram com maior clareza o aumento da fragmentação miofibrilar e a redução do MFL. Na captura (a), referente ao peito de frango (Controle), podem ser observadas miofibrilas extensas com maior comprimento de fragmentos miofibrilares (MFL) e uma média de  $8,8 \pm 3,36$  sarcômeros em sequência. Resultado semelhante pode ser observado na captura (b), referente ao peito de frango tratado com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1) com uma média de  $8,9 \pm 2,55$  sarcômeros em sequência. Já na captura (c), referente ao peito de frango tratado com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2), pode-se observar uma redução no comprimento das miofibrilas (MFL) e um número médio de sarcômeros em sequência igual a  $3,3 \pm 1,72$ .

Olson et al (1976) associa a redução de valores de MFL a uma ruptura na banda I dos sarcômeros, o que leva à separação das miofibrilas em fragmentos menores e, conseqüentemente, a redução do número de sarcômeros em sequência. Portanto, os resultados de MFL juntamente aos das análises de comprimento de sarcômero auxiliam no entendimento do mecanismo de degradação das proteínas miofibrilares pelo extrato enzimático bruto de gengibre.

No presente trabalho, apesar dos resultados encontrados nas análises de comprimento de sarcômero dos peitos de frango ( $1,33 \mu\text{m}$ ), dos peitos de frango tratados com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) ( $1,29 \mu\text{m}$ ) e dos peitos de frango tratados com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre ( $1,35 \mu\text{m}$ ) não diferirem significativamente pelo teste F ( $p \geq 0,05$ ) (Tabela 3), a degradação das miofibrilas pode ser comprovada pelos valores de IFM e MFL (Tabela 3).

De acordo com Lee et al. (1989) a degradação das miofibrilas pelo extrato de gengibre inicia na banda I de cada sarcômero, podendo progredir até a banda M, o que sugere que a protease de gengibre apresenta maior afinidade pelas proteínas citoesqueléticas, também chamadas de proteínas estruturais, presentes na linha Z em relação ao complexo actomiosina.

Horowitz et al. (1986) ao irradiar cortes de carne de coelho e avaliarem seus efeitos em SDS-PAGE, observaram que a titina e a nebulina, que são proteínas estruturais presentes no sarcômero, são essenciais para o alinhamento dos filamentos finos e que sua hidrólise resulta na perda de força miofibrilar de maneira geral, afrouxando o tecido como um todo.

A degradação da titina associada à alteração da textura da carne foi observada no *post-mortem* de músculos bovinos (HUFF-LONERGAN et al., 1995), músculo de suíno por Melody et al. (2004) e de aves (frangos de corte, galinhas poedeiras e galinhas tailandesas) por Chou et al. (1994).

No estudo realizado por Tsai et al. (2011), o efeito da marinação com extrato enzimático bruto de gengibre em peito de pato *Muscovy* pós-abate analisados por eletroforese SDS-PAGE e por *western blot*, indicaram que as proteínas titina, desmina, miosina (cabeça), desmina e  $\alpha$ -actina foram degradadas 14 dias antes nas amostras marinadas com extrato de gengibre quando comparadas ao controle. Neste estudo, os autores relataram que, dado que a titina é a maior proteína dos músculos estriados, sua degradação de forma acelerada pode levar a alteração da integridade das células musculares reduzindo a força miofibrilar, resultando no aumento da maciez da carne.

Os resultados de textura instrumental do presente estudo (Tabela 3) confirmam a associação feita por Culler et al. (1978) e Maggioni et al. (2012), que relataram que o índice de fragmentação miofibrilar é responsável por 50% da variação de textura da carne. Os valores de textura instrumental obtidos no presente estudo foram de 2,66 Kgf para o peito de frango (Controle), 2,53 Kgf para o peito de frango tratado com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) (Amostra 1) e de 1,63 para o peito de frango tratado com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre (Amostra 2) (Tabela 3). Os resultados das amostras Controle e Amostra 1 não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Porém, o tratamento com adição de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre resultou em uma redução na força de cisalhamento de aproximadamente 37,7% em relação aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ), o que indica uma melhoria na textura das amostras. Uma menor força de cisalhamento necessária para romper a amostra, é indicativo de carnes com menor resistência ao corte (WHEELER et al., 1995).

He et al. (2015) avaliaram o efeito de marinados de peito de pato adicionados de extrato enzimático bruto de gengibre nas concentrações de 0%, 15% e 30% com e sem ácido cítrico 0,3 M. Os autores observaram que após 72 horas de marinação a 4 °C apenas as amostras que foram tratadas com o extrato enzimático bruto de gengibre sofreram alterações no índice de fragmentação miofibrilar. O tratamento contendo 30% de extrato enzimático bruto de gengibre apresentou o maior IFM dentre todos os

tratamentos com um aumento de 23% no valor do IFM em relação ao tratamento sem a adição de extrato enzimático bruto de gengibre. O aumento na concentração de extrato reduziu a força de cisalhamento, sendo que nas amostras marinadas com 30% de extrato os valores reduziram em aproximadamente 26% quando comparadas às amostras marinadas sem a adição do extrato.

Shin et al. (2008) analisaram músculos bovinos *longissimus dorsi* marinados com 0,5%, 1% e 2% de extrato desidratado de *Sarcodon aspratus*, 0,2 % de papaína comercial e água destilada (controle). A adição do extrato de *S. aspratus* nos marinados elevou o índice de fragmentação miofibrilar, correspondendo a um aumento de 36,6% no tratamento marinado com adição de 2% de extrato de *S. aspratus* em relação ao controle, assim como aumentou a solubilidade das proteínas totais. De acordo com os autores, as alterações no IFM e na solubilidade de proteínas totais ocorrem devido à fragmentação de proteínas miofibrilares. Em análises pelo método *Western blot*, os autores constataram que, assim como a papaína, o extrato de *S. aspratus* causou a fragmentação da miosina (cabeça). O extrato *S. aspratus* induziu maior fragmentação das proteínas miofibrilares, o que levou a uma carne mais macia. Semelhante ao índice de fragmentação miofibrilar, foi observada uma redução de 38% nos valores de força de cisalhamento no tratamento marinado com adição de 2% de extrato de *S. aspratus* em relação ao controle.

Olson et al. (1976) demonstraram uma correlação entre um maior IFM e a melhora da textura instrumental em carnes quando estudaram a maturação *post mortem* em carnes bovinas. Esta correlação também pode ser observada em trabalhos realizados com proteases aplicadas em carnes, como o estudo realizado por Zhao et al. (2012) que obteve valores de IFM de bifes bovinos obtidos do músculo *Pectoralis major* tratados com protease extracelular purificada secretada por bactérias marinhas *Pseudoalteromonas* (MCP-01) por 20 horas a 4 °C apresentaram redução de 23% a força de cisalhamento e aumentaram o índice de fragmentação miofibrilar (IFM) em 91,7% em relação à carne tratada apenas com água destilada (controle), mantendo sua cor e umidade. No mesmo estudo, bifes tratados com bromelina comercial por 20 horas a 4 °C apresentaram um aumento de 53,7% no IFM comparado ao bife tratado apenas com água destilada, além de uma redução de 21,43% da força de cisalhamento em relação ao controle.

Gerelt et al. (2000) também encontraram reduções nos valores de textura instrumental, que foram associadas ao aumento do índice de fragmentação miofibrilar (IFM) ao estudarem o efeito do tratamento com 0,1% de papaína comercial e 1% de proteases de *Aspergillus sojae* e *Aspergillus oryzae*, também comerciais, em carnes bovinas desidratadas. Houve uma redução de aproximadamente 30%, 40% e 60% nos valores de textura instrumental para os tratamentos com proteases *A. sojae*, *A. oryzae* e papaína, respectivamente, em relação ao controle. Além disso, todas as amostras tratadas apresentaram maiores notas na escala hedônica sensorial no atributo maciez em relação ao controle. Em relação ao controle o aumento dos valores de índice de fragmentação miofibrilar nos tratamentos com proteases forma de 240, 200 e 190%, para *A. sojae*, papaína e *A. oryzae* respectivamente, em apenas 24 horas de armazenamento.

Os trabalhos de Naveena et al. (2001) e Naveena et al. (2004) associaram a redução de 46% nos valores de força de cisalhamento ao aumento da extractabilidade das proteínas miofibrilares e à evidente redução no número de bandas proteicas no perfil eletroforético de proteínas extraídas (miofibrilares e sarcoplasmáticas), devido à aplicação de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre por aspensão em carne de galinhas poedeiras e carne de búfalo.

A correlação entre os valores de IFM e de textura instrumental pelo teste de correlação de Pearson é apresentada na Figura 7. Observou-se uma correlação negativa significativa ( $p < 0,01$ ) entre as variáveis testadas, sendo o coeficiente de correlação igual a 0,64 ( $r = -0,64$ ), indicando que um aumento no valor de IFM resulta na redução do valor da textura instrumental (Figura 7).

Culler et al. (1978) e Battaglia (2016) também encontraram valores de coeficientes de correlação negativos entre as variáveis IFM e textura instrumental. Os valores encontrados foram de  $r = -0,72$  (CULLER et al., 1978) e  $r = -0,45$  (BATTAGLIA, 2016).

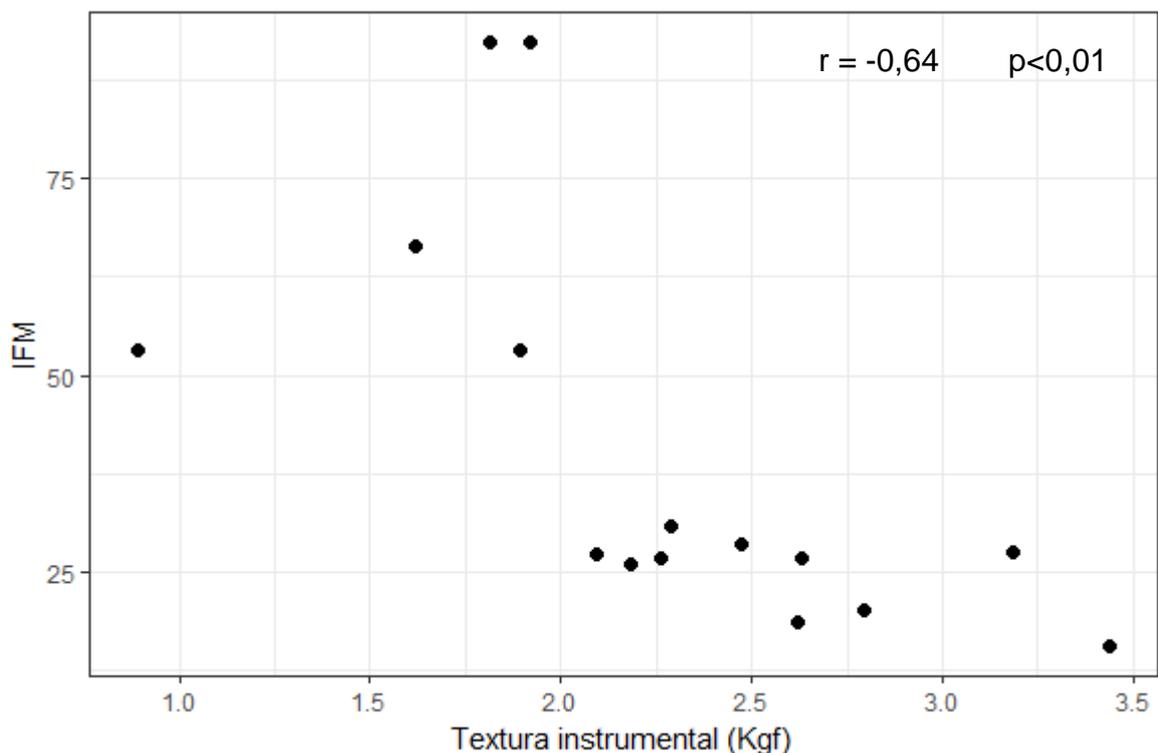


Figura 7: Gráfico de correlação de Pearson entre a textura instrumental (Kgf) e o índice de fragmentação miofibrilar (IFM).

Outro fator que pode ser considerado de grande importância tanto do ponto de vista da indústria quanto para os consumidores é a perda de peso pós-cozimento. A perda de líquido pela carne após cozimento pode ser relacionada à diminuição da capacidade de retenção de água da carne e interferir no rendimento industrial e em atributos sensoriais como a maciez da carne (EUCLIDES FILHO, 2003).

Em relação à perda pós cozimento, foram obtidos os valores de 30,94% para o peito de frango, 31,20% para o peito de frango tratado com 5% de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e 31,41% para o peito de frango tratado com 5% de extrato enzimático bruto de gengibre. Não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste F (Tabela 3). Este resultado pode ser considerado positivo uma vez que indica a aplicação do extrato não interferiu no rendimento da carne apesar de promover maior fragmentação das miofibrilas.

Resultados semelhantes foram encontrados em carne de galinhas poedeiras adicionadas de extrato enzimático bruto de gengibre por Naveena e Mendiratta (2001). Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (1%, 3% e 5% de extrato de gengibre) na perda de peso pós cozimento. Contudo, foi observado um

aumento na suculência sensorial e um aumento na capacidade de retenção de água das carnes tratadas com extrato de gengibre. Os autores relataram que o aumento da capacidade de retenção de água dos cortes de carne de galinhas poedeiras adicionados de extrato em relação ao tratamento controle (sem adição de extrato de gengibre) pode ser explicado devido ao surgimento de espaços intracelulares causados pela degradação das proteínas que promove um afrouxamento da estrutura miofibrilar, dada pela maior fragmentação miofibrilar, como observado no presente estudo. Com esse afrouxamento, segundo Naveena et al. (2004), há liberação dos miofilamentos finos e grossos e formação de monômeros de actina e miosina, favorecendo a retenção da água na carne e, conseqüentemente, promovendo a melhora de sua textura.

Já no estudo realizado por Abdel-Naem et al. (2016) com a adição de 7% de extrato de gengibre em hambúrgueres de camelo foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de perda de rendimento pós cocção em relação ao controle (sem adição de extrato de gengibre), demonstrando que concentrações maiores de extrato de gengibre podem gerar perdas excessivas de água na carne.

No presente estudo, resultados de testes preliminares em que foram comparadas as concentrações de 3%, 5%, 10% com tratamento controle sem adição de extrato enzimático bruto de gengibre como descrito no item 4.5.1, indicaram que o tratamento com a concentração de 10% de extrato apresentou maior capacidade de retenção de água e maior solubilidade de proteínas totais e miofibrilares comparada aos outros tratamentos. Contudo, este tratamento apresentou menor perda de peso pós-cocção (Controle: 18% e amostra com adição de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre aproximadamente 21,78% de perda de peso pós cocção). A escolha da concentração de 5% de extrato enzimático bruto de gengibre no presente estudo foi baseada nesses resultados, por apresentar menor perda no rendimento (2,78% em relação ao controle) e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para capacidade de retenção de água e solubilidade de proteínas totais e miofibrilares em relação ao controle e ao tratamento com 3% de extrato enzimático bruto de gengibre.

## 6. CONCLUSÃO

O extrato enzimático bruto de gengibre apresentou atividade máxima em temperatura de 60 °C e pH de 5,5. Apresentou também atividade significativa em ampla faixa de temperatura e pH, sendo sua atividade residual a 70 °C igual a 55,4% e de manter mais de 55% em pH variando de 6 a 8. O extrato enzimático apresentou maior especificidade pela azocaseína do que pelo extrato de proteínas miofibrilares.

A aplicação do extrato enzimático bruto de gengibre utilizando o músculo *Pectoralis major* como sistema modelo foi importante, permitindo verificar que a sua baixa especificidade pelo extrato miofibrilar, promoveu a fragmentação das miofibrilas e a redução da força de cisalhamento sem alterar excessivamente a textura da carne e sem que houvesse perdas no rendimento pós-cocção, sendo uma alternativa para melhoria da qualidade de cortes de carne de frango e produtos cárneos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDELDAIEM, A.M.; JIN, Q.; LIU, R.; WANG, X. Effect of Calcium Chloride on the Preparation of Low-fat Spreads from Buffalo and Cow Butter. **Tropical Journal of Phamaceutical Research**, n. 13(4), p. 519-526, 2014.

ABDEL-NAEM, H.H.S.; MOHAMED, H.M.H. Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. **Meat Science**, 2016.

ADULYATHAM, P.; APENTEN-OWUSU, R. Stabilization and partial purification of a protease from Ginger Rhizome (*Zingiber officinale Roscoe*). **Food Chemistry and Toxicology**, v. 70, n. 3, 2005.

ANANDH, M.A.; LAKSHMANAN, V. Storage stability of smoked buffalo rumen meat product treated with ginger extract. **Journal of Food Science and Technology**, n. 51(6), p. 1191-1196, 2014.

AQUINO, M.T.S. **Efeito da utilização de ácido láctico na qualidade de filés de peito de frango de corte**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 2016.

ASHIE, I.N.A.; SORENSEN, T.L; NIELSEN, P.M. Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2138-2142, 2002.

ASTRUC, T. **Carcass, composition, muscle structure, and contraction**, in Encyclopedia of Meat Sciences, C. D. M. Dikeman, Ed., pp. 148–166, Elsevier, Oxford, UK, 2nd edition, 2014.

ASTRUC, T. **Connective tissue: structure, function and influence on meat quality**, in Encyclopedia of Meat Science, C. D. M. Dikeman, Ed., pp. 321–328, Elsevier, Oxford, UK, 2nd edition, 2014.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N.D. **Connective Tissue in Meat and Meat Products**. Elsevier Science Publishers, Ltd., Essex, U.K, 1989.

BATTAGLIA, C. T. **Comparação de métodos para determinação da maciez instrumental e do comprimento do sarcômero de carne bovina**. 2016.68 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BEKHIT, A.E.A.; HOPKINS, D.L.; GEESINK, G.; BEKHIT, A.A.; FRANKS, P. Exogenous proteases for meat tenderization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54(8), p. 1012-1031, 2013.

BEYNON, R.; BOND, S. **Proteolytic enzymes: A practical approach**. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, p. 259, 1989.

BHASKAR, N.; SACHINDRA, N.; MODI, V.; SAKHARE, P.; MAHENDRAKAR, N. Preparation of proteolytic activity rich ginger powder and evaluation of its tenderizing effect on spent-hen muscles. **Journal of Muscle Food**, v. 17, p. 174–184, 2006.

BRASIL. **Presidência da República**. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007 Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. 2007.

BRASIL. **ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e bebidas embalados, constante do anexo desta Resolução. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de março de 2001.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. In: nº 007/MAPA de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre normas para produção de produtos orgânicos vegetais e animais. 1999.

BRASIL. SVS/MS - **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998. 1998.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Pescados e Derivados, C.7, seção 1. Brasília, 1952.

BRIDI, A.M.; da SILVA, C.A. **Avaliação da Carne Suína**. Londrina: Midiograf, 2009. 120p.

CANAN, C.: **Quantificação de proteína de soja em frangos marinados através dos métodos indiretos do ácido fítico e ELISA**. Dissertação (Mestrado em Ciência em Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2004.

CHALABI, M.; KHADEMI, F.; YARANI, R.; MOSTAFAIE, A. Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: a comparative study of actinidin with papain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172(8), p. 4023-4037, 2014.

CHEN, J.; ENGELEN, L. **Food Oral Processing: Fundamentals of Eating and Sensory Perception**. Wiley, New York, NY. 2012.

CHEN, X.; TUME, R.K.; XU, X.; ZHOU, G. Solubilization of Myofibrillar Proteins in Water or Low Ionic Strength Media: Classical Techniques, Basic Principles and Novel Functionalities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015.

CHOI, K.H.; LAURSEN, R.A. Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome (*Zingiber. officinale*). **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 1516–1526, 2000.

CHOU, R.G.R.; TSENG, T.F.; LIN, K.J.; YANG, J.H. *Post-mortem* changes in myofibrillar proteins of breast and leg muscles from broilers, spent hens and Taiwanese Country Chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.65, p. 297-302, 1994.

CRONLUND, A.L.; WOYCHIK, J.H. Solubilization of collagen in restructured beef with collagenases and  $\alpha$ -amylase. **Journal of Food Science**, v. 52(4), p. 857-860, 1987.

CROSS, H.R.; WEST, R. L.; DUNTSON T. R. Comparison of methods for measuring sarcomere length in beef semitendinosus muscle. **Meat Science**, v. 5, p. 261-266, 1980.

CULLER, R.D.; PARRISH, F.C.; SMITH, G.C.; CROSS, H.R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, n. 43, p. 1177-1180, 1978.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p.

DAVEY. C.L.; GILBERT, K.V. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. **Journal of Food Science**, n. 34, p. 69, 1969.

DESLANDES, F. **Produtor de gengibre quer de volta o mercado**. 2010. Disponível em:

<<http://www.paranaonline.com.br/editoria/economica/news/458685/?noticia=PRODUTOR+DE+GENGIBRE+QUER+DE+VOLTA+O+MERCADO>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

DEVAKATE, R.V.; PATIL, V.V.; WAJE, S.S.; THORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 259-264, 2009.

DRANSFIELD, E.; ETHERINGTON, D. **Enzymes in the tenderization of meat**. In Enzymes and food processing, p. 177-194, London: Applied Science Publishers, 1981.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B. Zingiber officinale Roscoe: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

EMBRAPA. 2001. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100657/1/Folder-gengibre.pdf>>. Acesso em: 09/01/2018.

ERTBJERG, P.; HENCKEL, P.; KARLSSON, A. H.; LARSEN, L. M.; MOLLER, A. J. Combined effect of epinephrine and exercise on calpain/calpastatin and cathepsin B and L activity in porcine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2428-2436, 1999.

ERTBJERG, P.; PUOLANNE, E. Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. **Meat Science**, 2017.

EUCLIDES FILHO, K.; FIGUEIREDO, G.R.; EUCLIDES, V.P.B. Desempenho de diferentes grupos genéticos de bovinos de corte em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1114-1122, 2003.

FAES; **SENAR**. Informativo da federação da agricultura e pecuária do estado do Espírito Santo e do serviço nacional de aprendizagem rural-ES. Ano XVI. Nº 279. Agosto 2015.

FASMAN, D.G. **Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**, Ed. CRC Press, Boston, 1992.

FDA. **Code of Federal Regulations**. Título 21, volume 3, capítulo 1, parte 182, seção 182.10. Revisado em abril de 2009. Disponível em: Acesso em: 25 out. 2009.

FISHELL, V.K.; ABERLE, E.D.; JUDGE, M.D.; PERRY, T. Palatability and muscle properties of beef as influenced by preslaughter growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 1, p. 151-157, 1985.

FLANNERY, A.V.; BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolysis of proteins for sequence analysis and peptide mapping**. In: Beynon, R.J.; BOND, J.S. (eds) Proteolytic enzymes – a practical approach. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, p. 145-161.

FRACETO, L. F. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. **Química Nova na Escola**, n. 28, São Paulo, 2008.

GARG, V.; MENDIRATTA, S.K. Studies on tenderization and preparation of enrobed pork chunk in microwave oven. **Meat Science**, v. 74, p. 718–726, 2006.

GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI, A. H.; KOOHMARAIE, M. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2834–2840, 2006.

GERELT, B.; IKEUCHI, Y.; SUZUKI, A. Meat Tenderization by Proteolytic Enzymes after Osmotic Dehydration. **Meat Science**, v. 56, n. 3, p. 311-318, 2000.

GONZAGA, D. S. O. M.; RODRIGUES, V. G. Gengibre – Zingiber officinale Roscoe. Porto Velho, **Rondônia: EMBRAPA** Folder 12 – Série “Plantas Mediciniais”, dez. 2001.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M. Determination of serum protein by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p.751-766, 1949.

GOT, F. et al. Effects of high-intensity high frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physic-chemical properties of beef. **Meat Science**, v.51, n.1, p.35-42, 1999.

GOUINGUENÉ, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, 129, 1296-1307, 2002.

GRZONKA, Z.; KASPRZYKOWSKI, F.; WICZK, W. **Cysteine proteases**. In: Industrial Enzymes: Structure Function and Applications, ed: J. Ploaina; A.P. MacCabe, p; 181-195, Springer, Dordrecht, the Netherlands.

HA, M.; BEKHIT, A.E.A.; CARNE, A.; HOPKINS, D.L. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, n. 134, p. 95-105, 2012.

HA, M.; BEKHIT, A.E.A.; CARNE, A.; HOPKINS, D.L. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, n. 136, p. 989-998, 2013.

HARPER, G. S. Trends in skeletal muscle biology and the understanding of toughness in beef. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 1105-1129, 1999.

HE, F.Y.; KIM, H.W.; HWANG, K.E.; SONG, D.H.; KIM, Y.J.; HAM, Y.K.; KIM, S.Y.; YEO, I.J.; JUNG, T.J.; KIM, C.J. Effect of ginger extract and citric acid on the tenderness of duck breast muscles. **Korean Journal Food of Science Animal Resources**, v. 35(6), p. 721-730, 2015.

HOPKINS, D.L.; TAYLOR, R.G. **Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderisation**. Muscle development of livestock animals. p. 363–389. Cambridge, MA, USA: CAB International. 2002.

HOROWITS, R.; KEMPNER, E.S.; BISHOP, M.E.; PODOLSKY, R.J. A physiological role of titin and nebulin in skeletal muscle. **Nature**, v. 323, p. 160-162, 1986.

HUFF-LONERGAN, E.; PARRISH, F.C.J.; ROBSON, R.M. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1064-1073.

HUFF-LONERGAN, E.; MITSUHASHI, T.; BEEKMAN, D.D.; PARRISH, F.C.J.; OLSON, D.G.; ROBSON, R.M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74(5), p. 993-1008, 1996.

HUNTER, R.S.; HAROLD, R.W. **The Measurement of Appearance**, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, USA, 1987.

ICHIKAWA, Y.; SASA, H.; MICHI, K. Purification of ginger protease. **Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences**, v. 26, p. 377–383, 1973.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4<sup>a</sup> ed. (1<sup>a</sup> Edição digital), 2008. 1020 p.

JANSEN, P.H., PEEK, K., MORGAN, H.W. Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 40, p. 400-406, 1994.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, n. 37, p. 139-144, 2001.

JOO, S.T., KIM, G.D., HWANG, Y.H., RYU, Y.C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. **Meat Science**, v. 95, p. 828–836, 2013.

KIJOWSKI, J.; NIEWIAROWICZ, A. Emulsifying properties of proteins end meat from broiler breast muscles as affect by their initial pH values. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.13, n.5, p.451-459, 1978.

KIM, M.; HAMILTON, S.E.; GUDDAT, L.W.; OVERALL, C.M. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. **Bba-Gen. Subjects**, v. 1770, p. 1627–1635, 2007.

KOOLMEES, P. A.; KORTEKNIE, F.; SMULDERS, F.J.M. Accuracy and utility of sarcomere length assessment by laser diffraction. **Food Microscopy**, v. 5, 71-76, 1986.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, v. 74, p. 34-43, 2006.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHACKEIFORD, S.D. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v.62, p.345-352, 2002.

LANA, A.; ZOLLA, L. Apoptosis or autophagy, that is the question: two ways for muscle sacrifice towards meat, **Trends in Food Science and Technology**, v. 46 (2A), p. 231–241, 2015.

LANA, A.; ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 85-97, 2016.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices**. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany. 2010

LAWRIE, R.A; LEDWARD, D.A. **Lawrie's Meat Science**. 6th Edition, Woodhead, Cambridge, p. 11-30, 2006.

LEE, S.H., JOO, S.T., RYU, Y.C. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. **Meat Science**, v. 86, p. 166–170, 2010.

LINWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of American Chemical Society**, v. 56, p. 658, 1934.

LISTRAT, A.; LEBRET, B.; LOUVEAU, I.; ASTRUC, T.; BONNET, M.; LEFAUCHEUR, L.; PICARD, B.; BUGEON, J. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. **The Scientific World Journal**, v. 2016(2016), p. 1 – 14, 2016.

LONG-LI TSAI, NAI-JIA YEN, RONG-GHI R CHOU. Changes in Muscovy duck breast muscle marinated with ginger extract. **Food Chemistry**, n. 130, p. 316–320, 2011.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265-75, 1951.

LUCIO, I.B. **Caracterização da inflorescência de gengibre orgânico (Zingiber officinale Roscoe) e sua utilização como alimento** / Isadora Balsini Lucio – Curitiba, 126 f.: il., tabs, grafs. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. 2010.

LYON, B.G.; LYON, C.E. Assessment of three devices used in shear tests of cooked breast meat. **Poultry Science**, v.77(10), p. 1585-1590, 1998.

MAGGIONI, D.; PRADO, I.; N., ZAWADZKI, F.; VALERO, M.V.; MARQUES, J.A.; BRIDI, A.M.; ABRAHÃO, J.J.S. Grupos genéticos e graus de acabamento sobre qualidade da carne de bovinos. Semina: **Ciências Agrárias**, 33 (1), 391-402, 2012.

MARSH, B.B.; LEET, N.G. Meat tenderness 3. **Journal of Food Science**, v. 31, p. 450-460, 1966.

MAURER, K.H. Detergent Proteases. **Curr Opin Biotenchnology**, n. 15(4), p. 330-334, 2004.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; VILLANI, F. Proteolytic activity of *Staphylococcus xylosum* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the production of 'Naples type' salami. **Journal of applied Microbiology**, n. 92, p. 482-490, 2002.

MELODY, J.L.; LONERGAN, S.M.; ROWE, L.J.; HUIATT, T. W.; MAYES, M.S.; HUFF-LONERGAN, E. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1195–1205, 2004.

MENEZES, L.D. **LEVANTAMENTO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BARU (*Dipteryx alata* Vogel)**. Trabalho de conclusão de curso. Anápolis, GO, Brasil, 2011. CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L.; **Biochemistry**, v. 49, p. 333, 1913.

MILLER, A.J.; STRANGE, E.D.; WHITING, R.C. Improved tenderness of restructured beef steaks by a microbial collagenase derived from *Vibrio* B-30. **Journal of Food Science**, v. 54(4), p. 855-857, 1989.

NAFI, A.; FOO, H.L.; JAMILAH, B.; GHAZALI, H.M. Properties of proteolytic enzyme from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Food Research Journal**, n. 20, p. 363–368, 2013.

NAFI, A.; LING, F.H.; BAKAR, J.; GHAZALI, H.M. Partial Characterization of an Enzymatic Extract from Bentong Ginger (*Zingiber officinale* var. Bentong). **Molecules**, v. 19, p. 12336-12348, 2014.

NAVEENA, B.M.; MENDIRATTA, S.K. Tenderisation of spent hen meat using ginger extract. **British Poultry Science**, v. 42(3), p. 344-349, 2001.

NAVEENA, B.M.; MENDIRATTA, S.K. The tenderization of buffalo meat using ginger extract. **Journal of Muscle Foods**, v. 15(4), p. 235-244, 2004.

NAVEENA, B.M.; MENDIRATTA, S.K.; ANJANEYULU, A.S. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus* Roxb (Kachri) and *Zingiber officinale* roscoe (Ginger rhizome). **Meat Science**, v. 68(3), p. 363-369, 2004.

NISHIMURA, T. Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. **Meat Science**, v. 109, p. 48-55, 2015.

NIYONZIMA, F.N.; MORE, S.S. Coproduction of detergent compatible bacterial enzymes and stain removal evaluation. **Journal of basic Microbiology**, n. 55(10), p. 1149-1158, 2015.

NOVELLO, D.; MARQUES, A.; TONETO, E. R. L.; POLLONIO, M. A. R. Atributos da qualidade funcional de peito de frango injetado com cloreto de sódio e cálcio. **Alimentos e nutrição**, v.20, n.3, 2009.

OECD/FAO, 2017. Agricultural Outlook 2009–2018. Disponível em: <[http://www.agri-outlook.org/document/12/0,3343,en\\_36774715\\_36775671\\_45444620\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.agri-outlook.org/document/12/0,3343,en_36774715_36775671_45444620_1_1_1_1,00.html)>. Acesso em: 15/12/2017.

OHTSUKI, K.; TAGUCHI, K.; SATO, K.; KAWABATA, M. Purification of ginger proteases by DEAE-Sepharose and isoelectric focusing. **Biochemistry and Biophysics Acta** v. 1243, p. 181–184, 1995.

OLSON, G.D.; PARRISH, F.C.J.; STROMER, M.H. Myofibril fragmentarion and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, v. 41, 1976.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M.A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v. 74(1), p. 44-58, 2006.

PEARSON, A.M.; YOUNG, R.B. Muscle and Meat Biochemistry. Academic Press, Michigan University, p. 457, 1989.

PICARD, B.; DURIS, M.; JURIE, C. Classification of bovine muscle fiber by different histochemical techniques. **The Histochemical Journal**, v. 30(7), p. 473-477, 1998.

PINTO, F.M.; PONSANO, E.H.G.; ALMEIDA, A.P.S. Espessura da lâmina de cisalhamento na avaliação instrumental da textura da carne. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1405-1410, 2010.

PIZATO, S.; CORTEZ-VEGA, W. R., FEDDERN, V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; Avaliação da cor e textura de filés de frango in natura embalados em atmosfera modificada gasosa. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em carnes, 2017.

PRAXEDES, C. I. S.; Exsudação de gel no cozimento em carne de peito de frango normal, "PSE" e "DSD". Tese (Dissertação). Niterói, Rio de Janeiro, 2007.

PURSLOW, P. P. The structural basis of meat toughness: What role does the collagenous compartment play? Proceedings International Congress of Meat Science and Technology, The Hague, Netherlands, v. 40, p. 27-34. 1994.

PURSLOW, P. P.; OISETH, S.; HUGHES, J.; WARNER, R. D. The structural basis of cooking loss in beef: Variations with temperature and ageing. **Food Research International**, v. 89(1), p. 731-748, 2016.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 62, p. 597-635, 1998.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **Plos One**, n. 10(12), 2015.

ROBERT, N.; BRIAND, M.; TAYLOR, R.; BRIAND, Y. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle, **Meat Science**, v. 51, p. 149–153, 1999.

RSTUDIO TEAM, RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>, Acesso em: 09/01/2018.

SABOTIČ, S.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors--current and potential applications. **Appl Microbiol Biotechnology**, n. 93(4), p. 1351-1375, 2012.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SANFELICE, C.; MENDES, A.A.; KOMIYAMA, C.M.; CAÑIZARES, M.C.; RODRIGUES, L.; CAÑIZARES, G.I.; ROÇA, R.O.; ALMEIDA, I.C.L.P.; BALOG, A.; MILBRADT, E.L.; CARDOSO, K.F.G. Avaliação e caracterização da qualidade da carne de peito (*Pectoralis major*) de matrizes pesadas em final de ciclo produtivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, 2010.

SARANYA, S.; SANTHI, D.; KALAIKANNAN, A.; Ginger as a tenderizing agent for tough meats –A review. **Journal of Livestock Science**, v. 7, p. 54-61, 2016.

SEN, U.; SIRIN, E.; ULUTAS, Z.; KURAN, M. Fattening performance, slaughter, carcass and meat quality. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, p. 409-416, 2011.

SHIN, H.; CHOI, Y.; KIM, H.; RYU, Y.; LEE, S.; KIM, B. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine *longissimus dorsi* muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1389-1395, 2008.

SILVESTRINI, A.; LOTÉRIO, A. F.; FUMANÉRIO, E.; SIMÃO, F.; CARVALHO, H. F.; THIEME, H. J. H.; HAMMERSCHMIDT, I.; CORDONI, J. A.; COSTA, J. C.; MULLER, J. J. V.; SILVA, L. A. F.; CHISTÓFORO, P. R.; LISSA, S. L. A cultura do gengibre. **Curitiba: EMATER/PR**, 1996.

SIRIN, E.; AKSO, Y.; UGURLU, M.; ÇICEK, U.; ÖNENC, A.; ULUTAS, Z.; UGUR, S.; KURANG, M. The relationship between muscle fiber characteristics and some meat quality parameters in Turkish native sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 150, p. 46–51, 2017.

STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z.J. Influence of sonication on Warner-Bratzler shear force, colour and myoglobin of beef (*M.semimembranosus*). **European Food Research Technology**, v.233, p.553-559, 2011.

STRYDOM, P.E.; FRYLINCK, L.; MONTGOMERY, J.L.; SMITH, M.F. The comparison of three  $\beta$ -agonists for growth performance, carcass, characteristics and meat quality of feedlot cattle. **Meat Science**, v. 81, p. 557-564, 2009.

SUFANG, S.; YANG, G.; LIU, H.; SUN, H.; LIU, C. A new method to immobilize enzyme and its application to the papain. **Chemical Journal on Internet**, v.4, n.10, p.48, 2002.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology**, n. 44(2), p. 211-220, 2006.

TAVEIRA MAGALHÃES, M.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; DUARTE, F. R.; CORNEJO, F. E. P.; MARQUES, L. M. R. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) Brasileiro: Aspectos Gerais, Óleo Essencial e Oleoresina. Parte 2 – Secagem, Óleo Essencial e Oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.1, p.132-136, 1997.

THOMPSON, E.H.; WOLF, I.D.; ALLEN, C.E. Ginger rhizome: A new source of proteolytic enzyme. **Journal of Food Science**, v. 38, p. 652–655, 1973.

THOMPSON, J. M.; PERRY, D.; DALY, B.; GARDNER, G. E.; JOHNSTON, D. J.; PETHICK, D. W. Genetic and environmental effects on the muscle structure response postmortem. **Meat Science**, v. 74, p. 59-65, 2006.

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

TSAI, Y.C.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO-SUZUKI, Y.; TAMURA, G. A new alkaline elastase of an alkalophilic Bacillus. **Biochemistry International**, n. 7, p. 577-583, 1983.

TSAI, L.; YEN, N.Y.; CHOU, R.R. Changes in Muscovy duck breast muscle marinated with ginger extract. **Food Chemistry**, v. 130, p. 316-320, 2012.

WAN, H.L.; ZHANG, L.P.; BROWN, M.A.; WU, X.J.; WANG, J.H.; YANG, L.; DENG, Z.; WU, J.P. Influence of aging days and age at harvest on meat quality of Gannan Black yak. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 10(9), p. 1089–1096, 2011.

WARNER R. D.; GREENWOOD P. L.; PETHICK D. W.; FERGUSON D. M. Genetic and environmental effects on meat quality. **Meat Science**, v. 86(1), p. 171-183, 2010.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. **Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement**. Clay Center: Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA, 1995. 7p.

WICKHAM, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. **Springer-Verlag**, 2009.

WICKHAM, H.; CHANG, W. devtools: Tools to Make Developing R Packages Easier. R package version 1.13.3. Disponível em : <<https://CRAN.R-project.org/package=devtools>>. Acesso em: 09/01/2018.

YUSOP, S.M.; O'SULLIVAN, M.G.; KERRY, J.F.; KERRY, J.P. Influence of processing method and holding time on the physical and sensory qualities of cooked marinated chicken breast fillets. **LWT-Food Science and Technology**, n. 46, p. 363-370, 2012.

ZHAO, G.; ZHOU, M. ZHAO, H.; CHEN, X.; XIE, B.; ZHANG, X.; HE, H.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1738-1744, 2012.

ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A.; **Supercrit Fluids**, 2002.

ZEOLA, N.M.B.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.S.; SOBRINHO, A.G.S. Parâmetros qualitativos da carne ovina: um enfoque à maturação e marinação. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 563-564, 2007.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura: Relatório anual 2012. <Disponível em [www.ubabef.com.br](http://www.ubabef.com.br)>, Acesso em: 09/01/2018

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 09/01/2018