



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARTA ALESSANDRA DE AVILA SOUZA

OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTÉICA EM CARNES

Londrina
2011

MARTA ALESSANDRA DE AVILA SOUZA

OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTÉICA EM CARNES

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como Requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Massami Shimokomaki

Londrina
2011

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729o Souza, Marta Alessandra de Avila.
Oxidação lipídica e protéica em carnes / Marta Alessandra de Avila Souza. – Londrina, 2011.
85f. : il.

Orientador: Massami Shimokomaki.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Compostos carbonila – Atividade da fosfolipase A₂– Teses. 2. Carnes PSE – Metamioglobina – Teses. 3. Nitrito de sódio – Teses. 4. Ácido fítico – Teses. I. Shimokomaki, Massami. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664-91

MARTA ALESSANDRA DE AVILA SOUZA

OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTÉICA EM CARNES

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como Requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Massami Shimokomaki
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra
UFSM – Santa Maria – RS

Profa. Dra. Marta Sueli Madruga
UFPB/ Paraíba – RN

Londrina, 26 de julho de 2011.

AGRADECIMENTOS

A minha estimada amiga Doutoranda Sandra Mayer – pela vida universitária e particular compartilhada, pelo carinho e compreensão, lealdade e sábios conselhos nos períodos difíceis.

Ao Prof. Dr Massami Shimokomaki – pela contribuição científica, de singular relevância para o êxito deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – pelo apoio financeiro.

Ao Abatedouro de Aves Copacol, localizado na cidade de Cafelândia, Paraná – pelas amostras de filés de peito de frango cedidas, disponibilidade de trainers e estagiários, que auxiliaram na coleta.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta Instituição – pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

A aluna de Iniciação Científica Suelen Franco – pela meiguice, pelos momentos agradáveis vividos, pelos bons e sinceros sentimentos compartilhados e, auxílio prestado durante as práticas laboratoriais.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Elza Youssef e Berenice Figueiredo.

Ao laboratório de Cromatografia Gasosa da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial ao funcionário Dirceu Batista de Souza (*in memorian*) – pelo breve, mas agradável convívio, pela prontidão e boa vontade na prestação da análise de ácidos graxos.

À Fundação Araucária/CNPq Pronex (Protocolos 09.277 e 17.347) e à Fundação Araucária/Finep no Programa BioAgroPar pelo apoio financeiro.

“ O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente
é coragem”.

(João Guimarães Rosa)

SOUZA, Marta Alessandra de Avila. **Oxidação lipídica e protéica em carnes**. 2011. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a oxidação lipídica (Lipox) e protéica (Proox) sob duas condições: biológica e química. A primeira, durante a instalação da anormalidade PSE em carnes de peito de frango e na última durante o processamento do charque em condições drásticas de temperatura relativamente alta e elevada concentração salina. A quantidade de produtos da oxidação lipídica (Lipox) e protéica (Proox) formados em amostras frescas e cozidas de carnes de peito de frango análogas ao PSE foi investigada. Na carne fresca, teores consideráveis de TBARS e compostos carbonila, 0,057mg/kg e 0,54nmol/mg proteína, respectivamente, foram obtidos depois de 24h *post mortem*, sugerindo que os radicais livres, ou fundamentalmente, as espécies reativas do oxigênio, ROS, foram sintetizados antes da instalação do *rigor mortis*. Isto implicaria que a atividade da enzima fosfolipase A₂ foi catalizada subsequentemente pela presença em excesso de Ca²⁺ dentro do retículo sarcoplasmático, durante o estresse fisiológico sofrido pelas aves no exato momento, anterior ao seu sacrifício. A tripla concentração de ácido araquidônico (3,59g/100g) encontrada em carnes análogas ao PSE comparando-se ao controle (1,15g/100g) corroborou para esta avaliação. Na carne cozida houve um aumento de aproximadamente 10 vezes nos níveis de compostos carbonila, em relação à carne fresca, e apesar da inativação da atividade da PLA₂ pelo tratamento térmico, as reações químicas continuaram ocorrendo, e neste caso, em razão da elevada concentração de proteínas heme (>60%) presentes na forma de Fe³⁺, intensificando este processo. Na segunda condição de formação de (Lipox) e (Proox), o charque bovino foi utilizado como um modelo e a alta correlação obtida entre a formação de metamioglobina sob a forma de Fe³⁺ e compostos carbonila (R²=0,92; p<0,01) indicou que ROS provavelmente foi originada das reações de Fenton, e esta condição parece ser de fato a mais relevante para os componentes oxidativos promoverem a formação de (Lipox) e (Proox) em carnes salgadas. De fato, depois de 60 dias de armazenamento do charque, TBARS e compostos carbonila determinados foram de 0,25mg/kg e 2,77nmol/mg proteína, respectivamente. O uso de antioxidantes como o ácido fítico inibiu substancialmente o desenvolvimento de TBARS e compostos carbonila em 20% e 17%, respectivamente, enquanto que para o nitrito de sódio, 80% e 61%, respectivamente, provavelmente pelo seqüestro de Fe³⁺ da metamioglobina. Finalmente, nossos resultados demonstram que em paralelo à oxidação lipídica, a oxidação protéica ocorre na carne e em produtos cárneos, e a sua intensidade dependeria das condições de manipulação prévia. Esta reação é inibida pela presença de antioxidantes.

Palavras-chave: Compostos carbonila. Atividade da fosfolipase A₂. Carnes PSE. Metamioglobina. Nitrito de sódio. Ácido fítico.

SOUZA, Marta Alessandra de Avila. **Oxidação lipídica e protéica em carnes**. 2011. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the lipid (Lipox) and protein (Proox) oxidation under two conditions: biological and chemical. Firstly, during the installation of PSE abnormality in breast chicken meat and secondly in beef charqui meat processed under harsh condition of relatively high temperature and elevated salt concentration. The secondary products amount of the Lipox and Proox formed in fresh and cooked samples of PSE-like meat were investigated. In the fresh PSE-like meat considerable amount of TBARS and carbonyl components of 0.057mg/kg and 0.54nmol/mg protein, respectively, was obtained after 24h pos mortem suggesting that free radicals or fundamentally, ROS, reactive oxygen species, were synthesized before the rigor mortis installation. This would imply that PLA₂ enzyme activity was catalyzed further by the surplus of Ca²⁺ presence within the sarcoplasmic reticulum during the physiological stress suffered by the birds at the moment just before their slaughtering. A triple concentration of arachidonic acid (3.59g/100g) found in PSE-like meat samples in relation to control samples (1.15g/100g) corroborated for this assessment. In the cooked meat samples there was an increase of approximately 10-fold of carbonyl components in relation to fresh meat samples, and despite of the inactivation of PLA₂ activity by the heat treatment further chemical oxidative reactions occurred, and in this case because of the elevated presence of heme protein concentration (>60%) under the form of Fe³⁺, enhancing these processing. In the second condition of Lipox and Proox formation, charqui meat was used as a model and the obtained high correlation between the formation of metamyoglobin under Fe³⁺ form and carbonyl substances (R²=0.9, p<0.01) indicated that ROS probably was originated from Fenton reaction, and this condition seemed to be the most relevant for the oxidative components to promote Proox and Lipox formation in salted meat. In fact after 60 days of charqui meat storage, the determined TBARS and carbonyl substances were 0.25mg/kg and 2.77nmol/mg protein, respectively. The use of anti oxidants as phytic acid and inhibited substantially the development of TBARS and carbonyl substances by 20.0% and 17.0% respectively while nitrite by 80.0% and 61.0%, respectively, most probably by sequestering the Fe³⁺ from the charqui metamyoglobin. Finally, our results demonstrated that in parallel to lipid oxidation, protein oxidation does occur in meat and meat products and its intensity would depend on the conditions of their previous manipulation. This oxidative reaction is inhibited by the presence of antioxidants.

Keywords: Carbonyl substances. Phospholipase A₂ activity. PSE meat. Metamyoglobin. Sodium nitrite. Phytic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sítios de ação de fosfolipases sobre glicerofosfolipídios	15
Figura 2 –	Ácido araquidônico em duas vias de metabolização formando eicoisanóides	16
Figura 3 –	Contribuição da PLA ₂ na formação de radicais livres	17
Figura 4 –	Etapas da oxidação protéica	21
Figura 5 –	Aminoácidos alvos da oxidação protéica (a, b)	22
Figura 6 –	Mecanismos envolvidos na formação de Compostos Carbonílicos (a,b)	23
Figura 7 –	As conseqüências mais comuns da oxidação protéica	24
Figura 8 –	Ciclo redox do ferro	25
Figura 9 –	Formação de AAS e GGS na presença de ferro não-heme e peróxido de hidrogênio	27
Figura 10 –	Mecanismo da oxidação catalizada por metais em sítios específicos de proteínas	28
Figura 11 –	O efeito prooxidativo do ascorbato na redução de metais de transição.....	28
Figura 12 –	Ligação entre o ciclo da cor e o da pseudoperoxidase na mioglobina	29
Figura 13 –	Reações em cascata envolvidas no desenvolvimento da oxidação lipídica e protéica em carnes PSE de frango e no charque	33
Figura 14 –	Oxidação de Grupos (SH)	37
Figura 15 –	Modificações oxidativas em Grupos (SH) sob ação de várias substâncias reativas e oxidantes	37
Figura 16 –	Mecanismo de reação proposto para a oxidação da miosina através de proteínas heme a pH fisiológico	39
Figura 17 –	Conformações do ácido fítico	41
Figura 18 –	Curva de calibração (BSA)	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	GERAL	12
2.2	ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	O PSE EM AVES	13
3.1.1	Fosfolipases	15
3.2	O CHARQUE	18
3.3	OXIDAÇÃO PROTÉICA	19
3.3.1	Mecanismo Geral	20
3.3.2	Produção de Compostos Carbonílicos	21
3.4	MECANISMOS ESPECÍFICOS	26
3.4.1	Em proteínas Cárneas: principais efeitos	26
3.4.1.1	Dos sistemas férricos	26
3.4.1.2	Da mioglobina	29
3.4.1.3	Dos lipídios oxidados	30
3.4.1.4	Outros fatores	34
3.5	COMPOSTOS CARBONÍlicos NA CARNE E DERIVADOS	34
3.5.1	No armazenamento Refrigerado	34
3.5.2	Durante o Processamento	35
3.6	IMPACTO DA OXIDAÇÃO PROTÉICA NA QUALIDADE DA CARNE	36
3.6.1	Perda de Grupamentos Sulfidrila	36
3.6.2	Conformação e Funcionalidade Protéica	38
3.6.3	Valor Nutritivo	40
3.6.4	Textura	40
3.7	CONTROLE DA OXIDAÇÃO PROTÉICA EM PROTEÍNAS CÁRNEAS	41
3.7.1	Uso de Antioxidantes	41
3.7.1.1	Ácido fítico	41
3.7.1.2	Nitratos	43

4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL	44
4.2 MÉTODOS	44
4.2.1 Validação da Análise de Compostos Carbonílicos Oriundos da Oxidação Protéica	44
4.2.2 Medida de Cor	45
4.2.3 Medida de pH	46
4.2.4 Medida da Oxidação Lipídica	46
4.2.5 Determinação de Aroma de Requentado (WOF)	46
4.2.6 Ácidos Graxos	47
4.2.7 Oxidação Protéica	47
4.2.8 Metamioglobina	48
4.2.9 Grupos SH livres	49
4.3 Análises Estatísticas	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO A	50
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO B	67
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

No músculo *post mortem* a suscetibilidade à oxidação protéica encontra-se aumentada em consequência das mudanças bioquímicas que acompanham a conversão do músculo em carne e do desequilíbrio entre os fatores pró-oxidativos e o sistema antioxidante natural. Contudo, nas operações de processamento e armazenamento, as variações de pH, temperatura e atividade de água, somadas à ruptura das membranas e as mudanças conformacionais favorecem o contato entre proteínas e enzimas oxidativas, agentes pró-oxidantes e oxidantes. Estes últimos reagem com constituintes de baixo peso molecular como peptídeos e aminoácidos livres produzindo compostos sensorialmente indesejáveis e de elevada toxicidade, que contribuem para o decréscimo na qualidade da carne (DECKER & XU, 1998; MORRISSEY *et al*, 1998; ESTÉVEZ *et al*, 2006; OOIZUMI & XIONG, 2008).

As reações de degradação oxidativa protéica podem relacionar-se com a oxidação de lipídios insaturados, através do efeito oxidante de radicais livres gerados na fase de propagação da oxidação lipídica, e pró-oxidante dos hidroperóxidos, que são decompostos em produtos secundários (aldeídos, cetonas, ácidos) altamente reativos. Os radicais livres produzidos abstraem um átomo de hidrogênio da molécula protéica gerando radicais protéicos, os quais reagem com proteínas adjacentes formando complexos não-covalentes. Os produtos secundários formam dos aminoácidos que são convertidos, essencialmente, em compostos carbonílicos (SAEED *et al*, 2006; VENTANAS *et al*, 2006).

Os compostos carbonílicos são os principais marcadores da existência de constituintes protéicos oxidados na carne, cuja produção engloba uma ampla faixa de aminoácidos. Entretanto, reações específicas como em grupamentos sulfidríla e na tirosina também são importantes alterações oxidativas. Os grupamentos sulfidríla são encontrados como parte integrante do sítio ativo de enzimas, reguladoras de vários mecanismos de manutenção da homeostase celular. A oxidação os torna inoperantes e como alguns destes aminoácidos não são sintetizados pelo organismo humano, a perda da funcionalidade compromete o valor nutritivo da carne (LUND *et al*, 2007a,b).

Os produtos resultantes do desenvolvimento da oxidação protéica promovem modificações indesejáveis nas propriedades funcionais e nutricionais da carne, como a perda na capacidade de retenção de água e de aminoácidos essenciais, desenvolvimento de *off-flavours*, formação de géis inconsistentes ou emulsões instáveis e decréscimo na solubilidade protéica (BATIFOULIER *et al*, 2002; ROWE *et al*, 2004). As reações oxidativas alteram as estruturas secundária e terciária das proteínas, conduzindo a

formação de ligações cruzadas inter ou intra-moleculares entre cisteínas, tirosinas ou de agregados resultantes da complexação entre aldeídos e aminoácidos básicos. Estes compostos não são facilmente degradados pela ação de proteases. Quando acumulados exibem toxicidade em células eucarióticas, influenciando no desencadeamento de patologias derivadas do estresse oxidativo como câncer, doença de Alzheimer, aterosclerose e a doença de Parkinson (ARDESTANI & YAZDANPARAST, 2007; CHELH *et al*, 2007).

No decorrer das últimas décadas, têm ocorrido avanços consideráveis nos estudos da oxidação de proteínas *in vivo* e doenças relacionadas. Entretanto, na carne e derivados, a oxidação protéica constitui-se de uma linha de pesquisa que ainda necessita de uma maior ênfase. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento da oxidação protéica e lipídica em duas condições: biológica e química. Na primeira, durante a instalação da anormalidade PSE em carnes de peito de frango e na última durante o processamento do charque em situações de elevada concentração salina.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o desenvolvimento da oxidação protéica em condições de estresse *in vivo* de frangos, e em produtos cárneos processados em ambientes químicos oxidantes como o charque bovino.

2.2 ESPECÍFICOS

Otimizar uma metodologia para quantificar os produtos da oxidação protéica em carnes e derivados.

Estudar os principais mecanismos envolvidos na ocorrência da oxidação protéica em sistema biológico tendo como modelo as carnes PSE de frango.

Estudar os mecanismos envolvidos na ocorrência da oxidação protéica em ambiente químico oxidativo tendo como modelo o processamento do charque bovino.

Avaliar o efeito do uso de antioxidantes sintéticos e naturais no controle da oxidação protéica em carnes salgadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O PSE EM AVES

Carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) apresentam características de cor pálida, textura macia e baixa capacidade de retenção de água. O PSE é resultante de uma glicólise acelerada *post-mortem* que conduz a valores de pH muscular relativamente baixos ≤ 5.8 , enquanto a temperatura da carcaça ainda permanece elevada (acima de 35°C) aos 45 min *post mortem*. A rápida queda do pH ocasiona a desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, aumentando a suscetibilidade a reações oxidativas, como também, a perda excessiva de exsudato, comprometendo as propriedades funcionais, tecnológicas e sensoriais da carne (OLIVO *et al*, 2001; BARBUT *et al* 2008).

O PSE em aves alcançou relevância recentemente em razão do aumento da importância da cadeia produtiva da carne de frango, das perdas econômicas e na rentabilidade industrial resultantes desta anomalia. Estes fatores motivaram o interesse nas pesquisas relacionadas ao aprofundamento dos parâmetros bioquímicos da carne de frango (BARBUT, 2009; KISSEL *et al*, 2009).

O PSE em suínos (*Porcine Stress Syndrome*) ou Hipertermia Maligna (HM) está condicionado geneticamente e aparece com elevada frequência em determinadas linhagens como *Pietran*, *Landrace* e *Poland China*. Estes animais sofrem uma mutação no gene que codifica a proteína rianodina (RYR1), que controla o fluxo de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Esta mutação está diretamente relacionada com a hipersensibilidade no canal regulador de íons Ca^{2+} , que passa a não responder a baixas concentrações de íons cálcio e magnésio (indutores do seu fechamento), permanecendo aberto (CHEAH *et al*, 1986). A liberação excessiva de cálcio para o citoplasma conduz a contratura muscular, taquicardia, aumento da produção de ácido lático e CO_2 , hipertermia, entre outros (OLIVO *et al*, 2001; STRASSBURG & CHIANG, 2009; WILHELM *et al*, 2010).

Todavia, FUJII *et al* (1991) demonstrou que 95% dos suínos sensíveis ao anestésico halotano eram portadores da mutação na RYR1. Deste modo, o teste halotano passou a ser utilizado como uma ferramenta para selecionar animais com predisposição ao desenvolvimento de carnes PSE. Posteriormente, um teste molecular não-invasivo baseado em PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase – polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição) foi desenvolvido, permitindo a identificação de três genótipos: Hal NN (normal dominante), Hal Nn (heterozigoto) e Hal nn (sensível). Salvo, fatores exógenos como o

estresse ambiental pré-abate também corroboram para o desenvolvimento da PSS (BOLES *et al*, 1992; KUCHENMEISTER *et al*, 2005).

Em aves, os mecanismos que induzem a incidência de carnes PSE ainda não estão totalmente esclarecidos, mas assemelham-se à anomalia suína (ODA *et al*, 2010; ZIOBER *et al*, 2010, DROVAL *et al*, 2011). Nestes animais, esta síndrome também sofre influência do estresse ambiental (temperatura, umidade relativa, transporte, manejo (MITCHELL & KETTEWELL, 1998; SIMÕES *et al*, 2009). OLIVO *et al* (2001) demonstraram que frangos suscetíveis ao estresse térmico desenvolveram carnes PSE, com propriedades funcionais comprometidas. Porém, a suplementação com vitamina E na dieta das aves, inibiu esta anomalia. LANGER *et al* (2010) investigaram o efeito das condições do transporte na ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos, nas condições brasileiras, em uma planta de um frigorífico comercial. Os autores mostraram que o banho dos frangos imediatamente antes da viagem de 3,0km promoveu a ocorrência de 46,0% de PSE, enquanto que frangos sem banho apresentaram 14,7% desta anomalia. Na distância de 68,0km, a ocorrência de carnes PSE foi de 44,0% em aves que sofreram banho e 52,0 % sem banho. O banho ainda na granja foi uma atividade crítica, aumentando as condições desfavoráveis no microambiente do caminhão para curtas distâncias e contrariamente para distâncias longas foi menos estressante influenciando na qualidade da carne. Por outro lado, GUARNIERI *et al* (2004) investigaram a influência da nebulização antes do sacrifício na qualidade do músculo (*Pectoralis major*). Os resultados encontrados para a perda de peso por gotejamento e cozimento, pH e cor depois de 24h *post mortem* demonstraram que a nebulização inibiu o desenvolvimento de carnes PSE, podendo ser usada como um fator anti-estresse. Além disso, estudos histológicos confirmaram que em amostras PSE 72h *post mortem*, houve um encurtamento de aproximadamente 10% no diâmetro das células musculares, alargamento do endomísio e perimísio. Na microscopia eletrônica, a fragmentação da linha Z e a super contração do sarcômero, indica que as proteínas musculares foram adversamente afetadas pelo estresse térmico. SIMÕES *et al* (2009) avaliaram o efeito do microambiente formado durante o transporte por caminhão, no desenvolvimento de carnes PSE em aves comerciais. Os resultados mostraram que em jornadas longas, as aves transportadas nas regiões do meio e do fundo do veículo apresentaram maior incidência de PSE, devido as drásticas condições de temperatura e umidade relativa no microambiente destas regiões. A ventilação diminuiu gradualmente da frente à trazeira do caminhão, e a aplicação do banho de água sobre os frangos após o carregamento na granja foi benéfica em jornadas longas, reduzindo a ocorrência de carnes PSE.

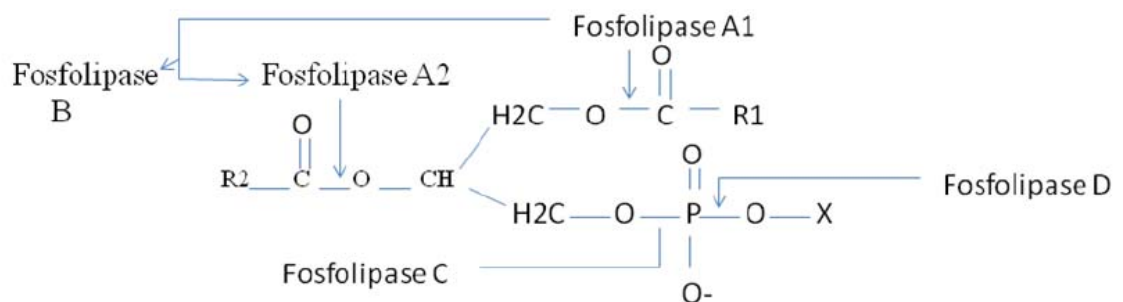
Em estudos recentes ODA *et al* (2009) propuseram a existência de um desequilíbrio quantitativo nas isoformas RYR1 e RYR3 (que em condições normais coexistem em proporções igualitárias), em aves sensíveis ao estresse térmico e/ou ao gen Hal, indicando a possibilidade de ocorrência de mutação nestes receptores. SOARES *et al* (2007) verificaram que 13.6% dos frangos de linhagem comercial demonstraram reação ao halotano, sendo que 42.1% destes animais produziram carnes PSE. ZIOBER *et al* (2009) mostraram que frangos de corte estressados termicamente e sensíveis ao halotano desenvolveram códons sem sentido da α RYP e carnes PSE.

Assim, fatores genéticos e ambientais em aves aumentam a concentração de cálcio citoplasmático, estimulando a atividade de proteases dependentes de cálcio como a enzima fosfolipase A₂.

3.1.1 Fosfolipases

As fosfolipases (PLAs) são enzimas lipolíticas que degradam fosfolipídios, e de uma forma geral podem ser classificadas quanto à ligação clivada em seus substratos, originando cinco grandes famílias: fosfolipase A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B, C e D (Figura 1).

Figura 1 – Sítios de ação de fosfolipases sobre glicerofosfolipídios.



X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol.

R1 e R2: cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos

Fonte: Adaptada de KINI (1997).

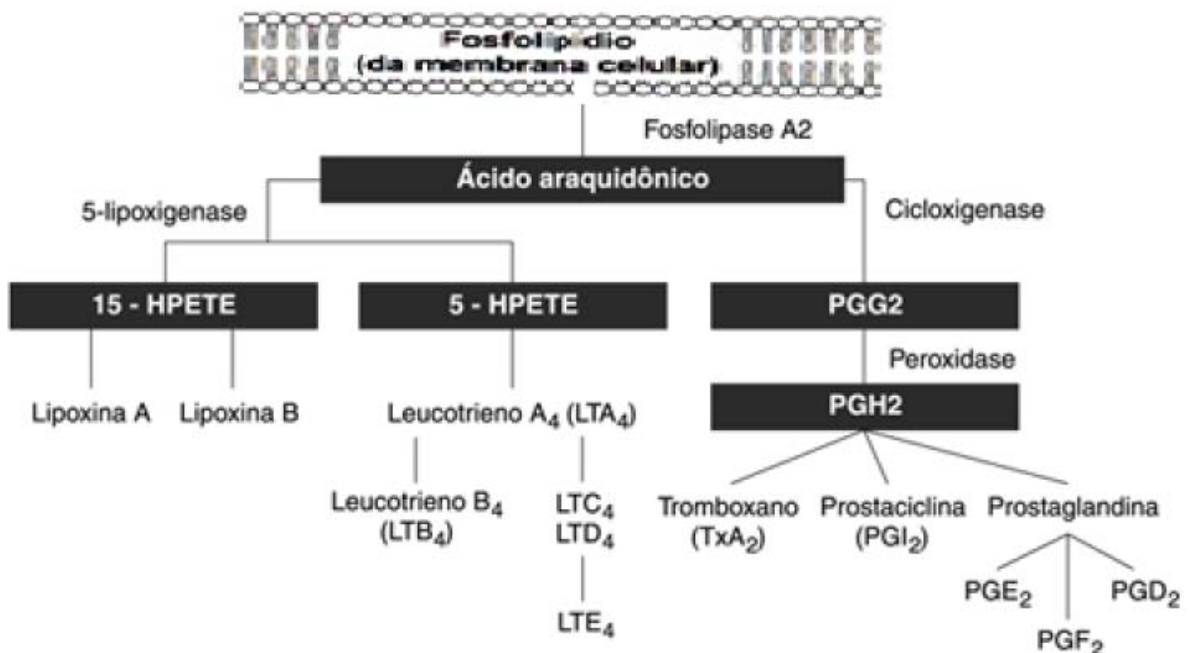
As PLA₁ caracterizam-se pela hidrólise das ligações na posição sn-1 de fosfolipídios, resultando na formação de 2-acil fosfolipídios e de ácidos graxos livres.

Possuem especial importância nas indústrias (farmacêutica e cosmética), devido a produção de 2-acil fosfolípidios de considerável valor comercial (SONG & RHEE, 2001).

As PLA₂ compreendem uma família de esterases que catalizam a hidrólise na posição sn-2 de glicerosfosfolípidios das membranas, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolípidios (POULSEN *et al*, 2007; SOARES *et al*, 2003, 2009; CHEN *et al*, 2010).

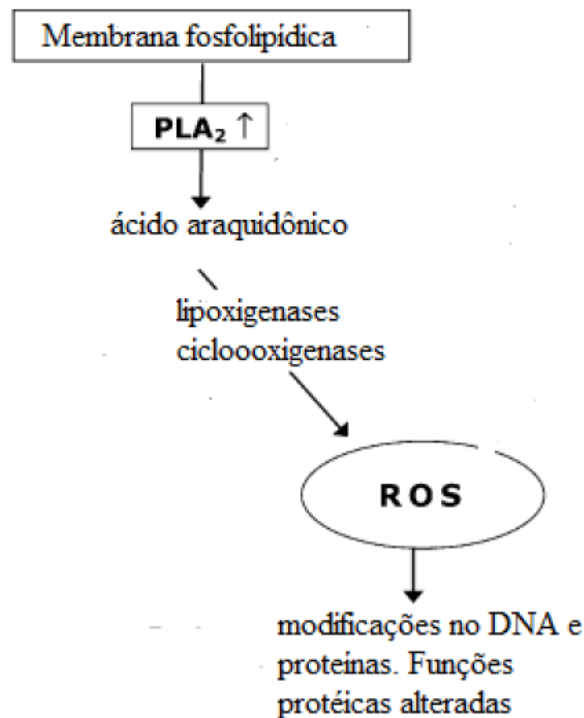
Esta reação é particularmente importante devido à geração de ácido araquidônico, o qual após ser liberado pode ser metabolizado, por vários sistemas enzimáticos intracelulares, como o das ciclooxigenases, lipoxigenases e isoenzimas citocromo P450, em prostaglandinas, leucotrienos e ácidos epoxieicosatrienóico, respectivamente. Demais produtos destas reações como o ácido lisofosfatídico e lisofosfatidilcolina, também são biologicamente ativos, sendo precursores de outros potentes mediadores de processos inflamatórios (Figura 2) como o fator de ativação plaquetária (PAF) (KUDO, 2004). Porém, sob ação de oxidases, o ácido araquidônico (Figura 3) também produz espécies reativas do oxigênio (ROS).

Figura 2 – Ácido araquidônico em duas vias de metabolização formando eicoisanóides.



Fonte: www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003

Figura 3 – Contribuição da PLA₂ na formação de radicais livres.



Fonte: ADIBHATA & HATCHER, 2006.

As PLA₂s podem ser caracterizadas e classificadas bioquimicamente em 4 principais subfamílias: PLA₂s secretada (sPLA₂), PLA₂s citosólica (cPLA₂), PLA₂s independente de Ca⁺² (iPLA₂). As sPLA₂ compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI e XII. São dependentes de cálcio, encontradas em mamíferos, veneno de animais vertebrados, invertebrados e em fluídos extracelulares (SIX & DENNIS, 2000). Estão implicadas na proliferação celular, excitose, geração de mediadores lipídicos e doenças inflamatórias. As cPLA₂ apresentam pesos moleculares elevados (61 a 114kDa) podendo ser encontradas em quaisquer células. Estão envolvidas na modulação da biossíntese do fator de agregação plaquetária (PAF) e de eicoisanóides (RASHA-STEP *et al*, 1997; EVANS *et al*, 2001). As iPLA₂ exibem função central na remodelagem de fosfolipídios. Possuem peso molecular entre 84-90kDa, localização intracelular e não requerem cálcio para a sua ação (MURAKAMI & KUDO, 2002).

As fosfolipases B são capazes de realizar a clivagem de ligações sn-1 e sn-2 de glicerofosfolipídios, apresentando não somente ação fosfolipídica, mas também lisofosfolipídica, desacilando totalmente os seus substratos (GANENDREN *et al*, 2006).

As fosfolipases C compõem uma família de fosfodiesterases de múltiplos domínios. Tem como substrato fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato, gerando 2 produtos

intracelulares: inositol 1,4,5-trifosfato (reconhecido mensageiro mobilizador de cálcio) e diacilglicerol (ativador da quinase C). Desempenham um papel importante no mecanismo de sinalização celular em mamíferos, com funções hormonais e neurotransmissoras, entre outras (REBECCHI & PENTYALA, 2000).

As fosfolipases D têm como função principal a hidrólise de glicerosfosfolipídios produzindo ácido fosfatídico e uma aminoálcool. Podem ser encontradas na maioria das células. Exercem atividade regulatória sobre o citoesqueleto (JENKINS & FROHMAN, 2005).

A PLA₂ exerce um papel preponderante em uma série de reações bioquímicas que ocorrem em suínos com Hipertermia Maligna (HM) e conseqüentemente, a sua atividade está relacionada ao desenvolvimento de carnes PSE (BARBUT *et al*, 2008). CHEAH & CHEAH (1981a,b) observaram que a liberação de ácidos graxos de cadeia longa pela PLA₂ mitocondrial endógena, promoveu uma liberação adicional de cálcio do retículo sarcoplasmático durante a síndrome da Hipertermia Maligna em suínos.

Recentemente, SOARES *et al* (2003) mostrou que a atividade da PLA₂ esteve estreitamente relacionada com os sintomas característicos de carnes PSE em aves estressadas termicamente, através de uma cascata de reações bioquímicas, que promovem a formação de radicais livres, comprometendo as membranas musculares. Em outro estudo (2009) os autores encontraram maior oxidação lipídica em filés de peito de frango PSE comparando-se com o controle, tendo como conseqüência uma maior produção de ácido araquidônico, devido a maior atividade da PLA₂ sobre os lipídios poliinsaturados, iniciando os sintomas que conduzem ao desenvolvimento do PSE. CHEN *et al* (2010) encontraram uma correlação significativa entre TBARS e a PLA₂, confirmando o papel fundamental desta enzima na ocorrência de carnes PSE em suínos. A perda da fluidez e integridade das membranas, como conseqüência da oxidação dos ácidos graxos insaturados, influenciaram na correlação positiva entre TBARS e a perda por gotejamento 48h *post mortem* e negativa entre TBARS e a atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px). Contudo, a relação entre a ação da PLA₂ e a produção de compostos carbonílicos oriundos da oxidação protéica em carnes PSE de frango ainda é desconhecida.

3.2 Charque

O charque é caracterizado como um alimento genuinamente brasileiro, de considerável aceitação entre as distintas classes de consumidores, elevada concentração de

nutrientes, baixo custo de produção e expressiva comercialização. De acordo com a legislação brasileira, o charque deve conter entre 40-50% de umidade, 10-20% de resíduo mineral fixo, tolerando-se uma variabilidade de 5,0% (BRASIL, 1962) e, mais recentemente a comercialização de um produto curado derivado do charque foi normatizado e conhecido como jerked beef (JB). Há diferenças em relação ao charque como as concentrações de umidade até 55%, de resíduo mineral fixo até 18.3%, 50ppm de nitrito de sódio, atividade de água de 0,78 e a embalagem à vácuo (BRASIL, 2000). Nestas condições, esses produtos são considerados como produtos cárneos de umidade intermediária (TORRES *et al*, 1994; SHIMOKOMAKI *et al*, 1998, 2003).

Ambos são produzidos através de um processo de desidratação osmótica em contra fluxo, promovido pela penetração do sal e a saída da água dos compartimentos inter e extrafibrilares para a superfície e, secagem, geralmente ao sol. A associação entre estes processos permite incluí-los na teoria da Tecnologia dos Obstáculos de Leistner, pois o emprego de altas concentrações de cloreto de sódio, juntamente com a exposição das peças a temperaturas elevadas reduzem os níveis de atividade de água. Além disso, a baixa tensão de oxigênio e o decréscimo do pH durante o processamento, favorecem o surgimento de condições desfavoráveis ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, permitindo a sua conservação a temperatura ambiente por longos períodos (TORRES *et al*, 1994; GARCIA *et al*, 2001; PINTO *et al*, 2002; LARA *et al*, 2003).

Entretanto, a desnaturação da miosina em consequência das temperaturas elevadas (35-40°C) utilizadas durante o processamento (BISCONTINI *et al*, 1996) e o aumento no potencial oxidante da metamioglobina, promovido pelo sal, aumentam a suscetibilidade à oxidação protéica. O efeito pró-oxidante do sal na elevação nos níveis TBARS durante o armazenamento do charque é conhecido, mas, poucos estudos relatam a influência do sal na produção de compostos carbonílicos provenientes da oxidação de proteínas cárneas (BISCONTINI *et al*, 1996; SHIMOKOMAKI *et al*, 1998; SHIMOKOMAKI, 2006; YOUSSEF *et al*, 2007).

3.3 OXIDAÇÃO PROTÉICA

Nos anos 90, a descoberta de que proteínas musculares eram suscetíveis às reações oxidativas, as quais ocasionavam efeitos deletérios na qualidade da carne, promoveu o interesse das pesquisas nessa área (MERCIER *et al*, 1995). Atualmente, a oxidação de

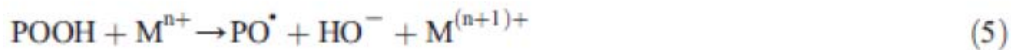
proteínas alimentícias tornou-se um dos tópicos mais inovadores dentro da Ciência dos Alimentos.

A oxidação protéica é um fenômeno complexo. Deste modo, tanto os mecanismos quanto a natureza dos produtos formados são dependentes dos sistemas envolvidos e de como as reações oxidativas são iniciadas (ESTÉVEZ *et al*, 2005).

Na carne e derivados, a formação de compostos carbonílicos tem sido ressaltada como uma das mais importantes alterações em proteínas oxidadas (LUND *et al*, 2007a,b; FUENTES *et al*, 2010). Por outro lado, a quantificação do teor total de carbonila pela técnica da derivação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) é provavelmente o método mais freqüentemente utilizado para mensurar a oxidação protéica em sistemas cárneos e biológicos (ESTEVEZ, 2011, ESTÉVEZ *et al*, 2008a,b; LUND & BARON, 2010; LUND *et al*, 2011).

3.3.1 Mecanismo Geral

A oxidação protéica, similarmente ao que acontece na oxidação lipídica, é descrita como um processo de reações em cadeia mediada por radicais livres. Salvo, devido a elevada complexidade destes mecanismos, uma grande variedade de compostos pode ser formada. De uma forma geral, a abstração de um átomo de hidrogênio da molécula protéica por um radical livre (Figura 4) leva a formação de um radical protéico (1). Pela reação com o oxigênio, este radical é convertido a um radical peroxila (2). Mediante abstração de um átomo de hidrogênio de uma proteína adjacente, o radical peroxila é convertido a um peróxido de alquila (POOH), com a produção de um radical protéico (3). Este radical pode reagir com outro formando um agregado protéico (ligação cruzada), ou com um produto secundário da oxidação lipídica (aldeído) formando compostos carbonílicos. Reações adicionais com ROS como o radical HO₂ ou com formas reduzidas de metais de transição (Mⁿ⁺) como o Fe²⁺ ou Cu⁺ conduzem à formação de um radical alcóxila (4 e 5) e seus derivados (6 e 7).

Figura 4 – Etapas da oxidação protéica.

Fonte: ESTÉVEZ (2011).

3.3.2 Produção de Compostos Carbonílicos

A produção de compostos carbonílicos constitui-se de uma alteração irreversível e não-enzimática em proteínas, induzida pelo estresse oxidativo e outros mecanismos. A maioria dos aminoácidos forma compostos carbonílicos (Tabela 1). Contudo, alguns devido à propriedade de deslocalizar elétrons como os aromáticos (tirosina, triptofano), ou pela presença de grupos altamente reativos na cadeia lateral (lisina, metionina) tornam-se alvos preferenciais de reações oxidativas (Figura 5,a,b). Grupos carbonílicos (aldeídos e cetonas) podem ser introduzidos em proteínas através de 4 mecanismos (Figura 6,a,b): oxidação direta de cadeias laterais (i); glicação não-enzimática na presença de açúcares redutores (ii); clivagem oxidativa de peptídeos via α -amidação ou oxidação da cadeia lateral do glutamyl (iii); ligações covalentes com compostos carbonílicos não-protéicos como o 4, 2-

hidroxilnonenal (HNE) ou malondialdeído (MDA) (iv). Os produtos mais relevantes oriundos da oxidação protéica podem ser visualizados na (Figura 7).

Tabela 1 – Produtos da oxidação de aminoácidos

Aminoácidos	Produtos da oxidação
Arginina	semialdeído glutâmico*, 5-hidroxi-2-ácido amino valérico
Cisteína	pontes dissulfeto, oxiácidos
Histidina	aspartato, asparagina, 2-oxi-histidina*
Lisina	3,4 ou 5-hidroxilisina, 2-amino-adipilsemialdeído*
Metionina	sulfóxido/sulfona
Prolina	3 ou 4 hidroxiprolina, semialdeído glutâmico *
Triptofano	2,4,5,6 ou 7-hidroxitriptofano, kinurenina
Tirosina	ditirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA)

*compostos carbonílicos. Fonte: (STADMAN & BERLETT, 1997).

Figura 5 (a) – Aminoácidos alvos da oxidação protéica

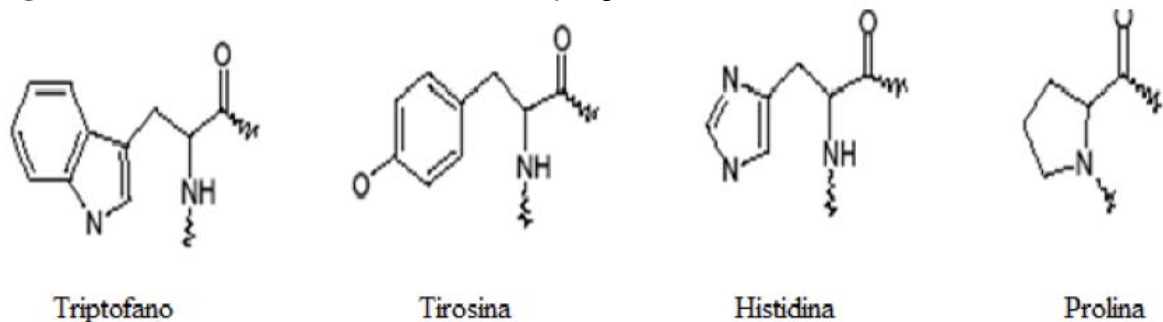


Figura 5 (b) – Aminoácidos alvos da oxidação protéica

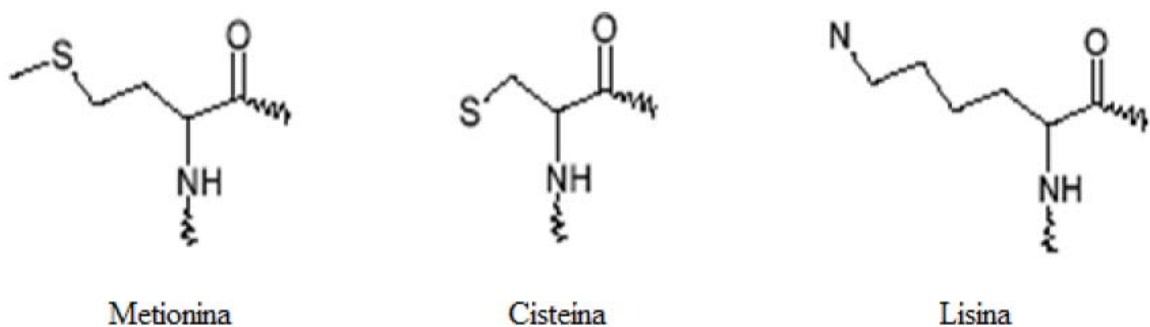
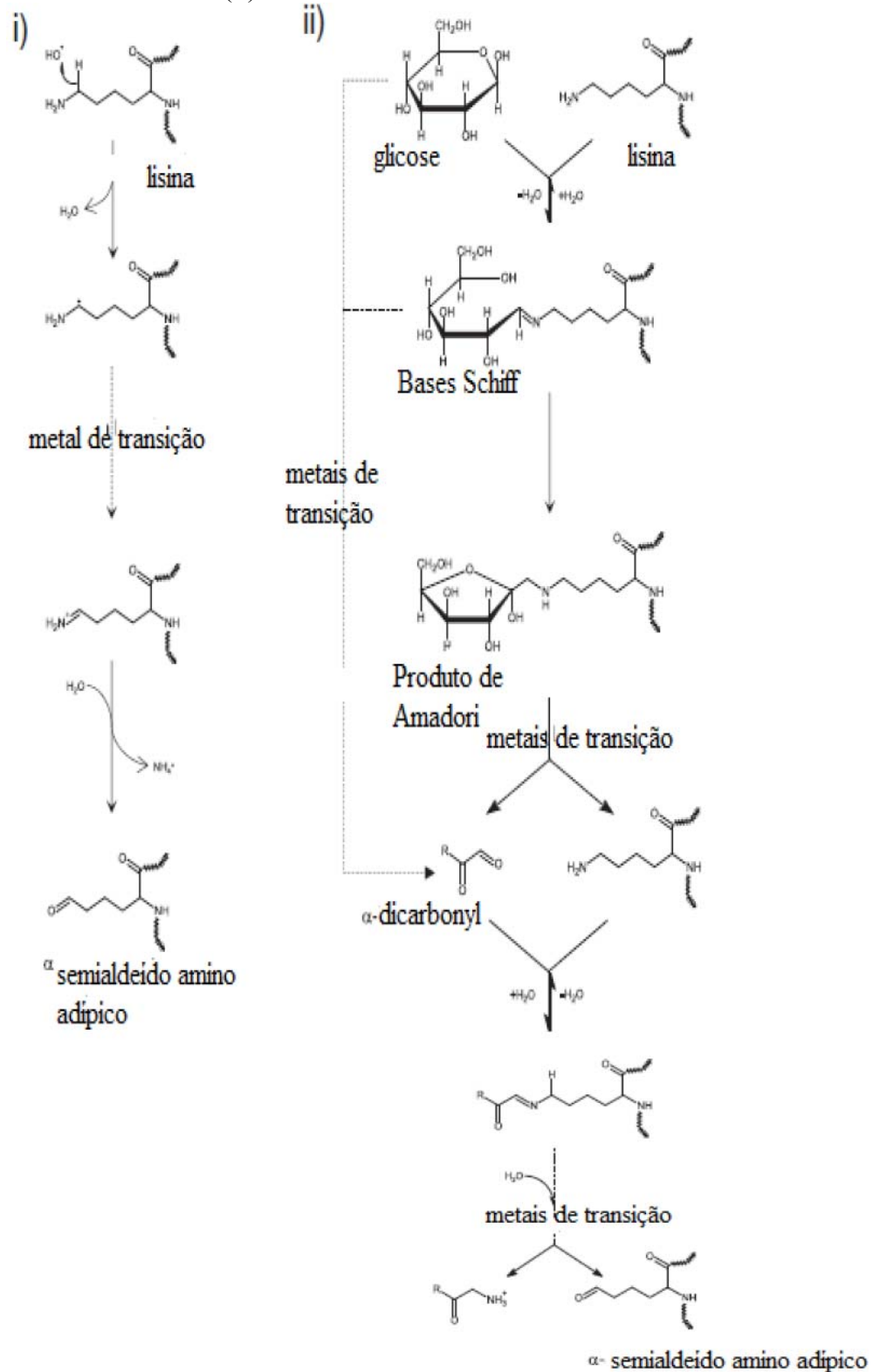


Figura 6 (a) – Mecanismos envolvidos na formação de compostos carbonílicos. Oxidação direta da cadeia lateral de aminoácidos básicos, catalizada por metais (i); glicação não-enzimática na presença de açúcares redutores (ii).



Fonte: REQUENA *et al* (2001); AKAGAWA *et al* (2005).

Figura 6 (b) – Mecanismos envolvidos na formação de compostos carbonílicos. (iii) clivagem oxidativa de peptídeos via α -amidação ou oxidação da cadeia lateral do glutamyl; (iv) ligações covalentes com compostos carbonílicos não-protéicos como o 4, 2-hidroxi nonenal (HNE) ou malondialdeído (MDA).

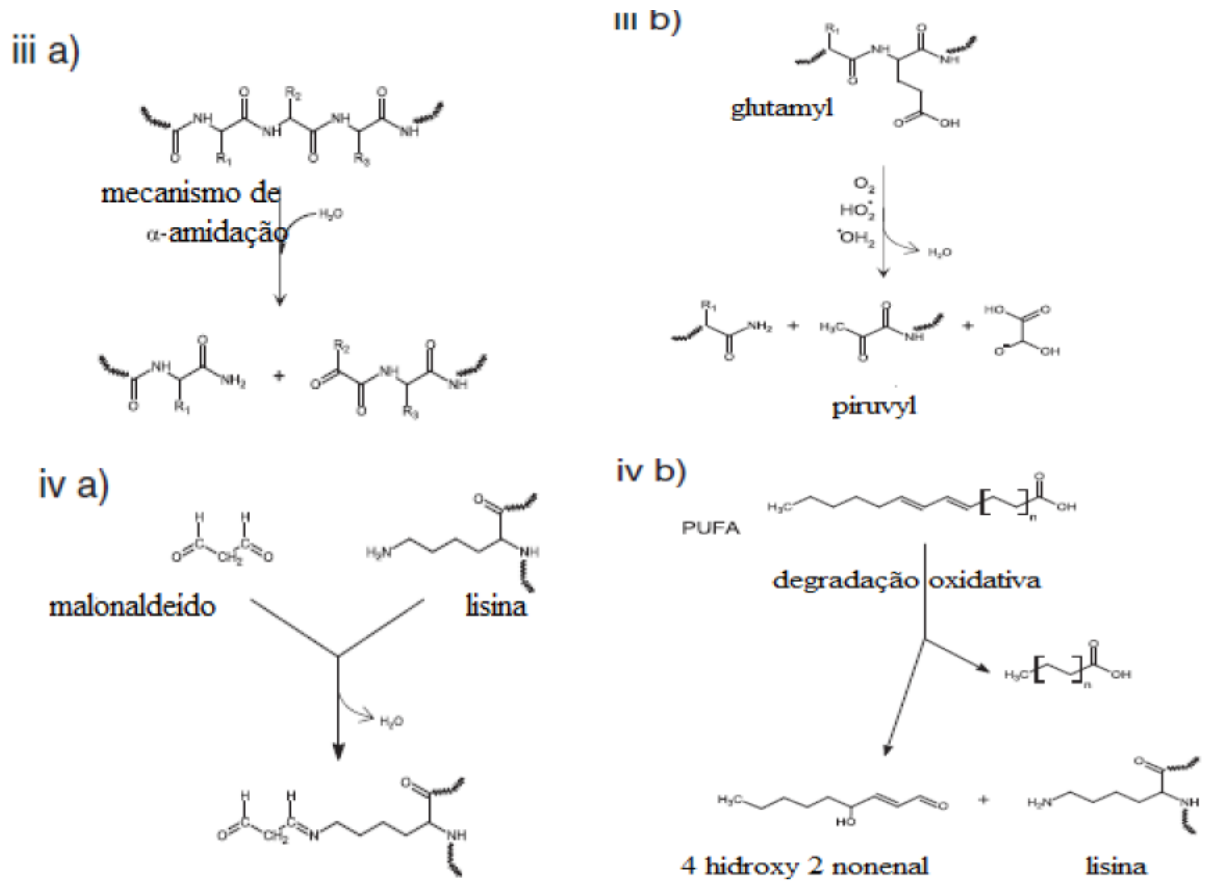
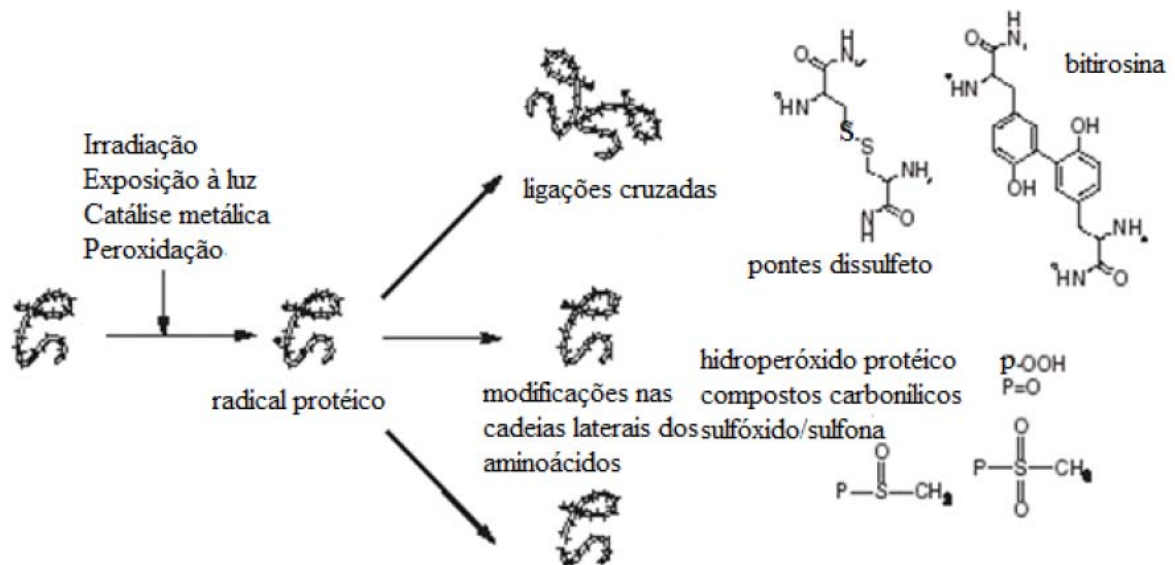


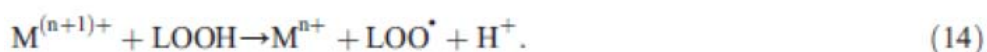
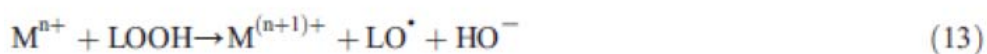
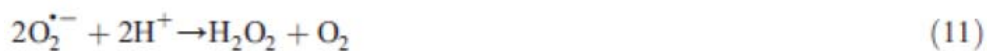
Figura 7 – As conseqüências mais comuns da oxidação protéica.



Fonte: LUND *et al* (2011).

Entre os quatro mecanismos, a oxidação direta da cadeia lateral dos aminoácidos tem sido considerada a principal rota de formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas (ESTÉVEZ *et al*, 2009; ESTÉVEZ & HEINONEN, 2010). A formação de derivados carbonílicos resultantes da lisina, treonina, arginina e prolina em proteínas miofibrilares é usualmente atribuída à oxidação catalizada por metais que é influenciada pela presença de sítios específicos ligantes de metais em proteínas (STADMAN & LEVINE, 2003; ESTÉVEZ *et al*, 2008a,b). De acordo com este mecanismo, proteínas miofibrilares são oxidadas em presença de Fe^{3+} e H_2O_2 gerando produtos específicos (Figura 9) como os semialdeídos α -aminoalípico (AAS) e o γ -glutâmico (GGS). Esta reação pode ser iniciada pelo radical hidroxila (OH.) derivado de reações semelhantes às de Fenton entre o Fe^{3+} e H_2O_2 . A desaminação oxidativa da molécula radicalar intermediária ocorre em presença de Fe^{3+} produzindo o semialdeído. Entretanto, ambas as formas do ferro, reduzida (Fe^{2+}) e oxidada (Fe^{3+}) são hábeis para promover a formação de compostos carbonílicos em proteínas, atuando como doadores de elétrons (Fe^{2+} , Mn^{+}) ou aceptores (Fe^{3+} , Mn^{+1}), através de reações mediadas por espécies reativas do oxigênio (ROS). Este ciclo redox (Figura 8) fornece importantes propriedades catalíticas, incluindo a redução molecular do oxigênio para formar o ânion superóxido (10), que sofre sucessivas reações formando o H_2O_2 (11), radical hidroxila (12) e a clivagem de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) para formar radicais alcóxila (LO.) e peróxila (LOO.) (13 e 14).

Figura 8 – Ciclo redox do ferro.



Fonte: ESTÉVEZ (2011).

Ambos AAS e GGS representam cerca de 70% da quantidade total de compostos carbonílicos formados em proteínas animais oxidadas. AAS e GGS já foram detectados e empregados como indicadores da oxidação protéica em carnes *in natura* e em uma ampla variedade de produtos cárneos como hambúrgueres tratados termicamente, salsichas e produtos curados.

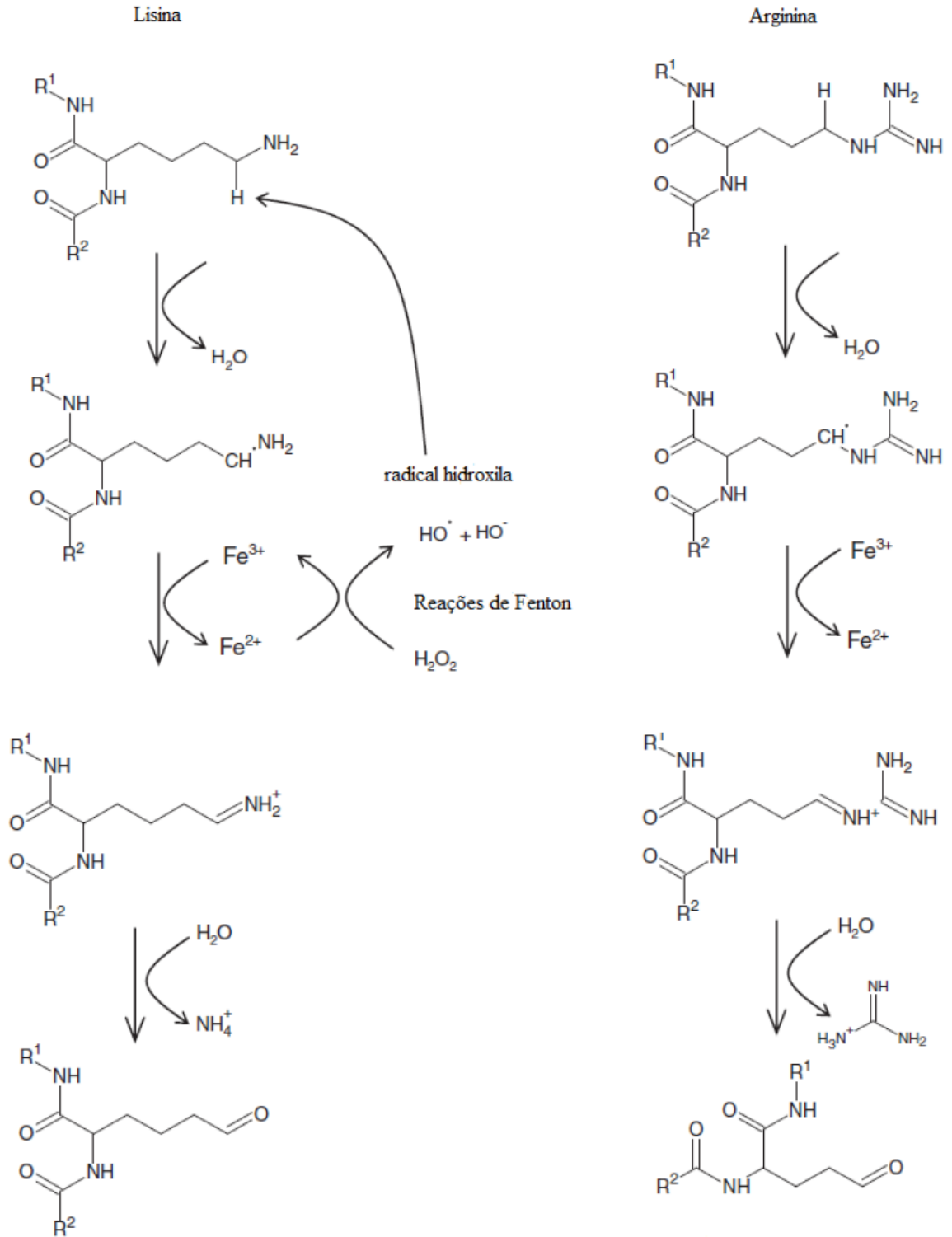
3.4 MECANISMOS ESPECÍFICOS

3.4.1 Em Proteínas Cárneas: Principais Efeitos

3.4.1.1 Dos sistemas férricos

Vários estudos têm comprovado o efeito catalítico de espécies ferrosas ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) na produção de compostos carbonílicos em proteínas cárneas (MARTINAUD *et al*, 1997; MERCIER *et al*, 2004; PARK *et al*, 2006a,b). Esta propriedade é influenciada pela capacidade dos íons ferro, naturalmente presentes no músculo, de se ligarem em sítios específicos de proteínas, em combinação com o H_2O_2 , acumulado no músculo *postmortem* (Figura 10). O Fe^{2+} é oxidado pela reação com o H_2O_2 , liberando o radical (OH). O radical hidroxila ataca a molécula protéica produzindo um radical protéico.

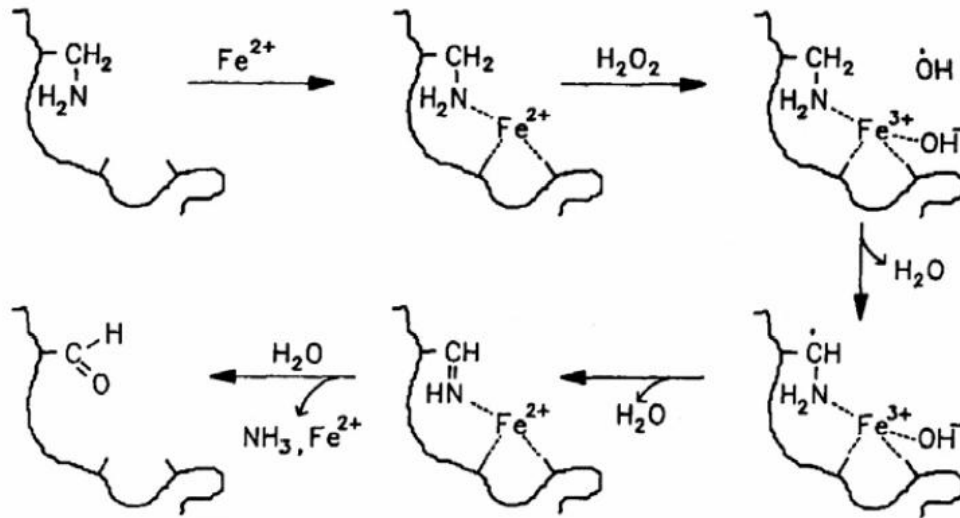
Figura 9 – Formação de AAS e GGS na presença de ferro não-heme e peróxido de hidrogênio



Fonte: Adaptado por ESTÉVEZ & HEINONEN (2010).

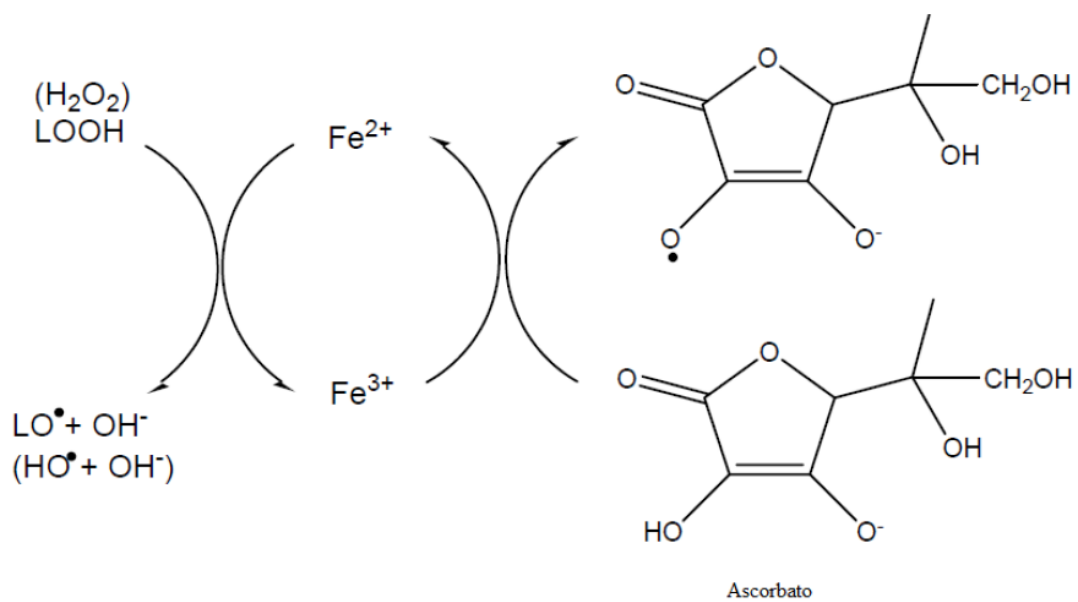
O ferro é reduzido por sistemas doadores de elétrons, como o ácido ascórbico (Figura 11). O radical protéico formado sofre um rearranjo molecular, liberando Fe^{2+} e NH_3 , sendo convertido em um composto carbonílico. O Fe^{2+} sustenta a formação de novos ROS.

Figura 10 – Mecanismo da oxidação catalizada por metais em sítios específicos de proteínas.



Fonte: sugerido por STADMAN (1990).

Figura 11 – O efeito prooxidativo do ascorbato na redução de metais de transição

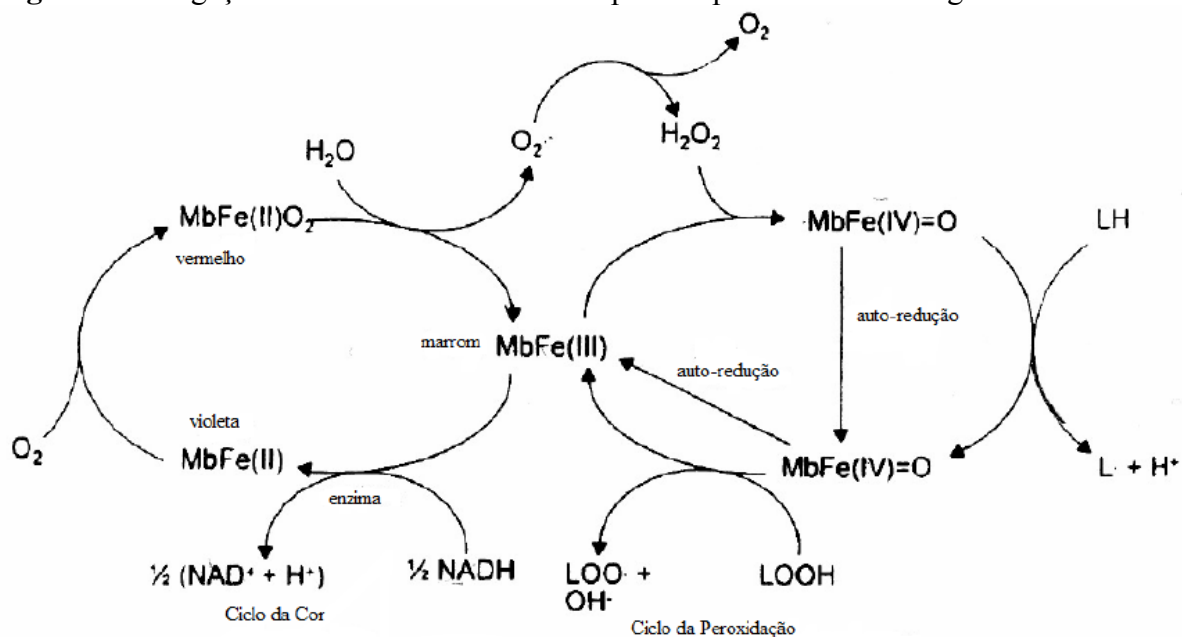


Fonte: BUETTNER & JURKIEWICK (1996).

3.4.1.2 Da mioglobina

A mioglobina é a mais abundante proteína ferro-dependente da carne, podendo catalizar reações oxidativas através de vários mecanismos como, autoxidação da oximioglobina seguida pela redução enzimática da metamioglobina, degradação catalítica de hidroperóxidos lipídicos, atividade de pseudo-peroxidase da mioglobina. A atividade prooxidativa da mioglobina está diretamente ligada ao ciclo da cor na carne (Figura 12).

Figura 12 – Ligação entre o ciclo da cor e o da pseudo-peroxidase na mioglobina.



Fonte: (SKIBSTED *et al*, 1998).

Na presença de O₂ a mioglobina é convertida a oximioglobina MbFe(II)O₂, que em baixas tensões de oxigênio e pH ácido é oxidada à metamioglobina [MbFe(III)]. Enquanto existe atividade enzimática na carne (NAD/NADH) a MbFe(III) será transformada em deoximioglobina MbFe(II), que em presença de O₂ será novamente convertida à MbFe(II)O₂. Mas, no *post mortem* quando as enzimas do músculo estão inativadas, ocorre a acumulação de MbFe(III) que pela reação com H₂O₂ produz espécies hipervalentes da mioglobina representadas pelo radical perferrila (.MbFe(IV)=O) e a ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O). Estas espécies induzem a formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, como a miosina, e a transferência de radical da .MbFe(IV)=O para outras proteínas causa a formação de radicais protéicos de vida longa (aproximadamente

13min a 25°C) (OSTDAL *et al*, 1997). Entretanto a concentração e a habilidade das formas hipervalentes da mioglobina como prooxidantes no desenvolvimento da oxidação lipídica e protéica na carne, ainda permanecem sob investigação. Contudo, durante a oxidação da oximioglobina à metamioglobina ocorre a formação de intermediários reativos como o radical superóxido que sofre dismutação à H₂O₂. Estas substâncias reagem com sistemas férricos (reações de Fenton), produzindo ROS que conduzem a formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas (RHEE *et al*, 1987; CARLSEN *et al*, 2005; PARK *et al*, 2006a,b).

3.4.1.3 Dos lipídios oxidados

A produção de lipídios oxidados inclui a formação inicial de radicais livres, seguida pela geração de produtos primários e subsequentemente secundários, que podem reagir com peptídeos e aminoácidos livres, promovendo a formação de compostos carbonílicos, Bases Schiff e/ou ligações cruzadas, que são marcadores da degradação oxidativa em proteínas miofibrilares (CHELH *et al*, 2007).

Por outro lado, enquanto o sítio inicial da oxidação em lipídios é a dupla ligação de ácidos graxos insaturados, a molécula protéica contém numerosos e distintos grupos funcionais que podem ser afetados pela oxidação, dependendo da sua composição e conformação. Além disso, o meio (matriz cárnea, concentrações: lipídica, protéica, de antioxidantes, pró e oxidantes), as condições de armazenamento e a metodologia usada para avaliar a formação de produtos da oxidação lipídica e protéica, influenciam na ligação entre estes processos (LUND *et al*, 2011). O equilíbrio entre a oxidação lipídica e protéica na carne ainda não está elucidado, havendo a necessidade de estudos específicos a condições relevantes para a carne e derivados (MERCIER *et al*, 1998; BATIFOULIER *et al*, 2002; ESTÉVEZ & CAVAS, 2004). Geralmente, a carne bovina tem se mostrado mais suscetível a ambos, oxidação lipídica e protéica, em comparação com a carne suína, que pode ser devido a elevada concentração de mioglobina presente na primeira em combinação com o decréscimo na concentração de α -tocoferol durante o armazenamento com altos níveis de oxigênio (LUND *et al*, 2007; 2008). Em um estudo com 4 variedades de peixes, o desenvolvimento da oxidação lipídica e protéica foi altamente dependente das espécies, dos sistemas de iniciação da oxidação e das concentrações dos reagentes (PARK *et al*, 2006a,b). A extensão de ligações cruzadas em proteínas miofibrilares de carne de frango tem sido ligada diretamente ao grau de insaturação de ácidos graxos livres (XIONG & DECKER, 1995). Teoricamente, as reações oxidativas podem ser transferidas entre lipídios e proteínas. Mas, o início da oxidação lipídica

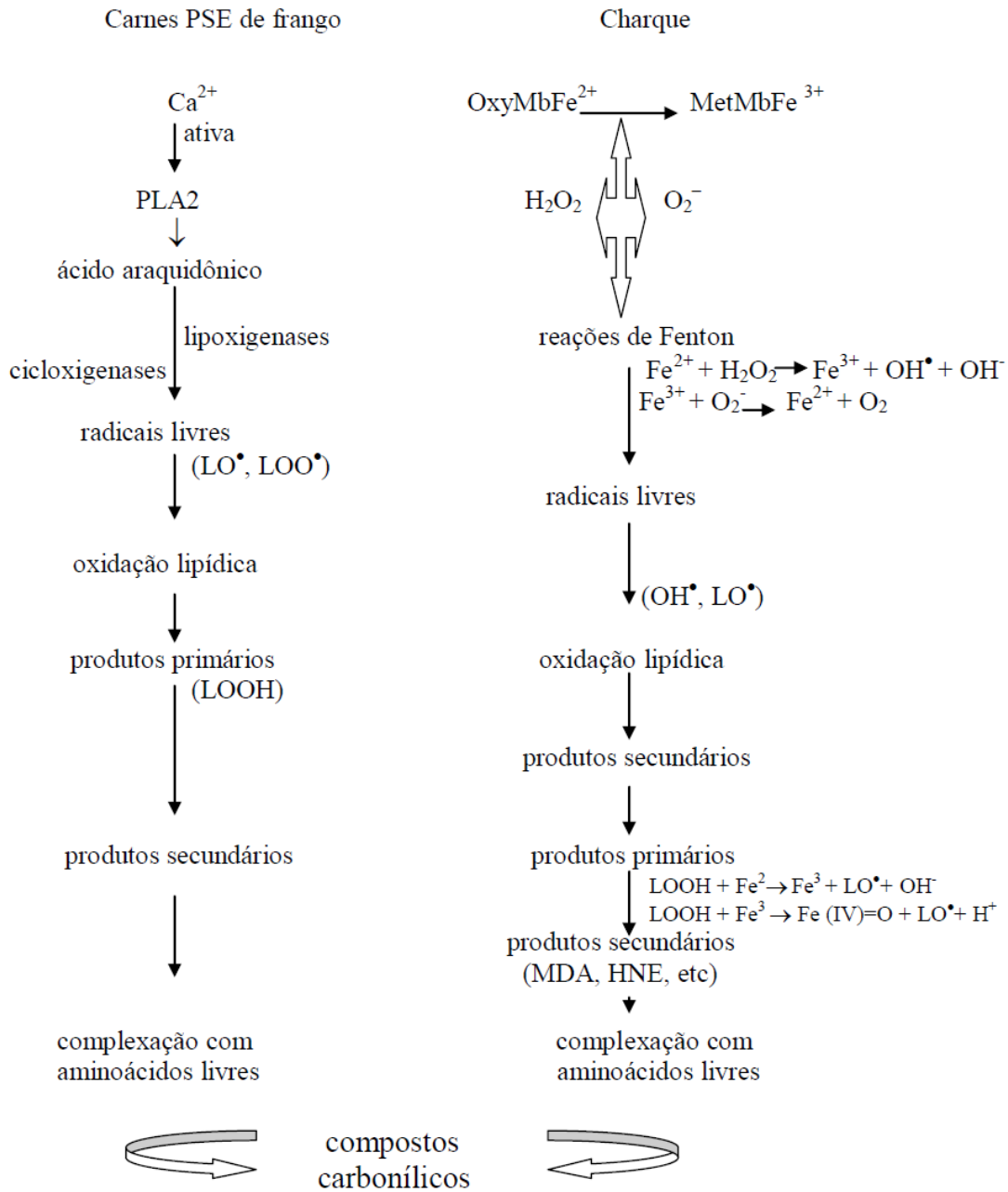
em sistemas cárneos pode ocorrer mais rapidamente do que a degradação oxidativa de proteínas miofibrilares (MERCIER *et al*, 2008), tornando-se mais provável que os radicais lipídicos e hidroperóxidos promovam a oxidação protéica do que o contrário. Radicais peroxila formados durante a oxidação lipídica abstraem um átomo de hidrogênio da molécula protéica levando ao desencadeamento de reações em cadeia mediadas por radicais livres, similarmente ao que acontece na oxidação lipídica (ESTÉVEZ, 2011). Neste estudo, em concordância com alguns autores (SRINIVASAN *et al*, 1996; SOVER & HULTIN, 2000; TOKUR & KORKMAZ, 2007), as reações de degradação oxidativa lipídica e protéica em carnes de peito de frango análogas ao PSE e no charque bovino ocorreram simultaneamente. Entretanto, distintos mecanismos, de natureza biológica e química, regem a formação de radicais livres em carnes PSE e no charque, respectivamente, cujos principais eventos bioquímicos estão resumidos na Figura 13.

Aves sensíveis ao gen HAL e/ou a condições estressantes (temperatura, umidade relativa, transporte) durante o manejo pré-abate desenvolvem carnes PSE (GUARNIERI *et al*, 2004; SIMÕES, 2009; LANGER *et al*, 2010). Nesta condição, logo após o sacrifício ocorre um desequilíbrio geneticamente induzido na proporção dos receptores de rianodina RYR1 e RYR3 ou α -RYR e β -RYR, respectivamente (STRASSBURG & CHIANG, 2003; 2009). As proteínas receptoras de rianodina representam um componente essencial do complexo liberador de cálcio, que controla a contração no músculo esquelético. Nos mamíferos existem três isoformas geneticamente distintas da rianodina: RYR1, predominantemente no tecido muscular esquelético, RYR2 encontrada no tecido cardíaco e a RYR3, no tecido cerebral e em vários outros. A RYR3 pode apresentar-se em concentrações de 20 a 50 vezes menores do que a RYR1, no músculo esquelético de mamíferos (SORRENTINO & VOLPE, 1993; FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997). Em suínos, uma mutação de ponto, na posição 1843 de uma base C (citosina) para uma base T (timina), no gen que codifica a proteína receptora de rianodina (RYR1), promove uma alteração do aminoácido 615, onde um resíduo de arginina cede lugar a um resíduo de cisteína. Esta alteração induz a distúrbios na liberação de íons cálcio, que desencadeiam a PSS (*Porcine Stress Síndrome*) nestes animais (FUJII *et al*, 1991; MICKELSON & LOUIS, 1996). Em aves normais, as isoformas α -RYR e β -RYR do músculo esquelético possuem estrutura primária similar as isoformas RYR1 e RYR3, respectivamente, apresentando um grau de similaridade de 65 a 70% entre as sequências (OTTINI *et al*, 1996). Este fato mostra que existem diferenças nos mecanismos de excitação-contração no músculo esquelético de aves, em relação a mamíferos e suínos. De fato, nas aves a contração é iniciada pela despolarização

dos túbulos-T, que induz a uma alteração de conformação na proteína receptora de dihidropiridina (DHPR). Esta alteração ativa a α -RyR (físicamente presa a DHPR) que passa a liberar íons cálcio. O aumento local na concentração de cálcio resulta na indução e liberação de cálcio pela β -RyR na periferia do retículo sarcoplasmático (STRASSBURG & CHIANG, 2003). Em condições normais, o Ca^{2+} é seqüestrado durante o relaxamento muscular pela bomba de cálcio. Contudo, na instalação da anomalia PSE em aves, a alteração quantitativa das isoformas α -RyR e β -RyR pode influenciar na homeostase muscular de cálcio, levando ao desenvolvimento de carnes análogas ao PSE. (ODA *et al*, 2009; ZIOBER *et al*, 2010). A elevação intramuscular na concentração de íons Ca^{2+} aumenta a atividade de enzimas cálcio-dependentes, como a fosfolipase A_2 (PLA_2). Esta esterase hidrolisa glicerofosfolipídios de membrana liberando o ácido araquidônico, que subsequentemente, sofre ação de oxidases (lipoxigenases, ciclooxigenases). Estas últimas introduzem um átomo de oxigênio na molécula do ácido graxo transformando-o em hidroperóxido, que é rapidamente convertido em radicais livres, os quais promovem a oxidação lipídica (ADIBHATA & HATCHER, 2006). Assim, em paralelo à oxidação lipídica ocorre o desenvolvimento da oxidação protéica devido à possível formação da ROS (SOUZA *et al*, 2011).

No charque, as reações químicas que desencadeiam a (Lipox) e (Proox) iniciam ainda durante o processamento, e são influenciadas por fatores extrínsecos (temperatura, oxigênio, pH, sal, atividade de água) e intrínsecos (matéria mineral, proteínas heme) (BISCONTINI *et al*, 1996; SHIMOKOMAKI *et al*, 1998; TORRES *et al*, 1994; YOUSSEF *et al*, 2007). Deste modo, na salga a baixa tensão de oxigênio na superfície das peças, concomitantemente ao decréscimo no pH favorecem a conversão do Fe (II) a Fe (III) (YOUSSEF *et al*, 2003). Sob estas condições, proteínas heme tornam-se agentes catalíticos na oxidação lipídica mediante a formação de intermediários reativos (peróxido de hidrogênio e ânion superóxido) que produzem radicais livres (CARSLÉN *et al*, 2005). Estes, também são formados pelas reações de espécies ferrosas com hidroperóxidos, e pela ação pró-catalítica do sal, o qual a elevadas concentrações, desloca íons ferro de macromoléculas, que podem interagir com proteínas (STADMAN, 1990; KANNER *et al*, 1991). Salvo, a desnaturação protéica promovida pela temperatura elevada no processamento (BISCONTINI *et al*, 1996) favorece à suscetibilidade a reações oxidativas. Dentro deste contexto, a produção da ROS através das Reações de Fenton, provavelmente é o efeito mais relevante para os componentes oxidativos presentes no charque, promoverem a formação de (Lipox) e (Proox).

Figura 13 – Reações em cascata no desenvolvimento da oxidação lipídica e protéica em carnes PSE de frango e no charque. PLA2=fosfolipase A2; MDA=malonaldeído; HNE=4,2 hidroxinonenal; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; O_2^- = ânion superóxido; OH^\bullet = radical hidroxila; OH^- = radical hidroperoxila; LO^\bullet =radical alcóxila, LOO^\bullet =radical peroxila; LOOH = hidroperóxido; Oxy Mb = oximioglobina; MetMb = metamioglobina



Fonte: Adaptado de SOARES *et al* (2003); CARSLÉN *et al* (2005)

3.4.1.4 Outros fatores

Além da presença de metais de transição, mioglobina e lipídios oxidáveis, a oxidação protéica é afetada por outros fatores como pH, temperatura, atividade de água, inibidores (compostos fenólicos). Luz e irradiação também são hábeis para iniciar a oxidação protéica, mas o conhecimento do impacto de cada fator físico na oxidação de proteínas cárneas ainda é limitado. As proteínas exibem uma suscetibilidade intrínseca para a produção de compostos carbonílicos, que pode ser atribuída a vários fatores exógenos e endógenos, incluindo, entre os últimos, a estrutura terciária, sítios, composição, sequência e distribuição dos aminoácidos. Dentro deste contexto, as proteínas miofibrilares, albumina bovina (BSA) e as proteínas do trigo são mais suscetíveis à oxidação induzida por $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ do que as proteínas da soja (ESTÉVEZ *et al*, 2009; ESTÉVEZ & HEINONEN, 2010).

3.5 COMPOSTOS CARBONÍLICOS NA CARNE E DERIVADOS

3.5.1 No Armazenamento Refrigerado

No *post mortem*, enquanto o mecanismo antioxidante do músculo entra parcialmente em colapso, as mudanças bioquímicas que ocorrem durante a conversão do músculo em carne, favorecem à oxidação (MORRISSEY *et al*, 1998). O declínio do pH de 7.0 para 5.5 e o subsequente armazenamento a 0°C aumenta a oxidação em proteínas miofibrilares bovinas, medida pelo método-DNPH (SRINIVASAN *et al*, 1996). A alta concentração de íons hidrogênio (H^+) propicia o ciclo redox da mioglobina e consequentemente o seu efeito prooxidante. De acordo com estudos recentes, a indução do estresse pré-sacrifício em aves conduz a um pH final baixo (característico de carnes PSE), aumentando a suscetibilidade para a formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas, desnaturação, e decréscimo na solubilidade protéica (WANG *et al*, 2009). Em concordância, ZHANG *et al* (2011) reportou que amostras do músculo (*Pectoralis major*) oriundas de aves estressadas, além de apresentarem pH baixo e aumento na produção de compostos carbonílicos, tiveram uma superior perda por gotejamento em comparação com aves controle. Em contraste, CHAN *et al* (2011) não encontrou efeito do pH a 24h *post mortem* na extensão da oxidação protéica em amostras de peito de peru. Os autores justificaram seus resultados como uma consequência da melhor *performance* do sistema protetor de músculos de peru contra o estresse oxidativo comparando-se com músculos de

frango. Além do declínio do pH, outras mudanças bioquímicas como alterações na compartimentalização celular, liberação de íons ferro, enzimas oxidantes e a propagação das reações oxidativas lipídicas provavelmente favorecem a formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas *post-rigor*. A ocorrência precoce da oxidação protéica no *post mortem* foi primeiramente descrita na carne bovina por MARTINAUD *et al* (1997). De acordo com estes autores, durante 10 dias do armazenamento refrigerado de amostras de *Longissimus lumborum* e *Diaphragma pedialis* houve um aumento no conteúdo de carbonila destes músculos de 3.1 a 5.1nmol/mg de proteína e de 4.8 a 6.9nmol/mg de proteína, respectivamente. Estudos subseqüentes confirmaram a formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas durante a refrigeração da carne suína (HERRING *et al*, 2010; LUND *et al*, 2007a,b; VENTANAS *et al*, 2006), carne de frango (RABABAH *et al*, 2004; WANG *et al*, 2009; ZHANG *et al*, 2011), carne de peru (CHAN *et al*, 2011; MERCIER *et al*, 1998; SANTÉ-LHOUTELLIER *et al*, 2008a,b,c). No entanto, a ampla variabilidade de resultados para teores de carbonila em amostras cárneas similares, dificulta a padronização. Neste estudo, enquanto os níveis de TBARS e carbonila permaneceram constantes no controle, no período de 5 dias de refrigeração a 4°C, houve um aumento de 50% e 49% nos teores de TBARS e carbonila, respectivamente, em amostras de carne de frango análogas ao PSE. Paralelamente, a concentração de ácido araquidônico, medida a 72h *post mortem*, triplicou em amostras PSE comparando-se com o controle. Estes resultados indicam que a elevada atividade da enzima PLA₂, cuja ação provavelmente iniciou antes do *rigor mortis*, tem um papel crucial para o desencadeamento da produção de radicais livres que aumentam a degradação oxidativa lipídica e protéica durante o armazenamento refrigerado de carnes análogas ao PSE.

3.5.2 Durante o Processamento

Numerosas tecnologias de processamento têm sido reportadas por influenciarem na formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas, incluindo a irradiação (RABABAH *et al*, 2010; BADR & MAHMOUD, 2011), tratamento térmico (GANHÃO *et al*, 2010a,b; GATELLIER *et al*, 2010), maturação (VENTANAS *et al*, 2006; VENTANAS *et al*, 2007), fermentação (SUN *et al*, 2011 a,b), e a pressão hidrostática (CAVA *et al*, 2009; FUENTES *et al*, 2010).

O tratamento térmico promove um aumento no teor de carbonila em produtos cárneos e, uma maior suscetibilidade de proteínas cárneas sofrerem futuras

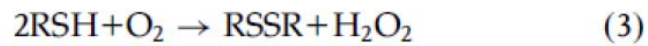
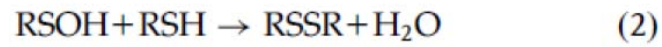
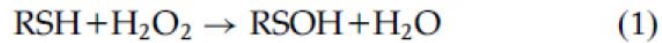
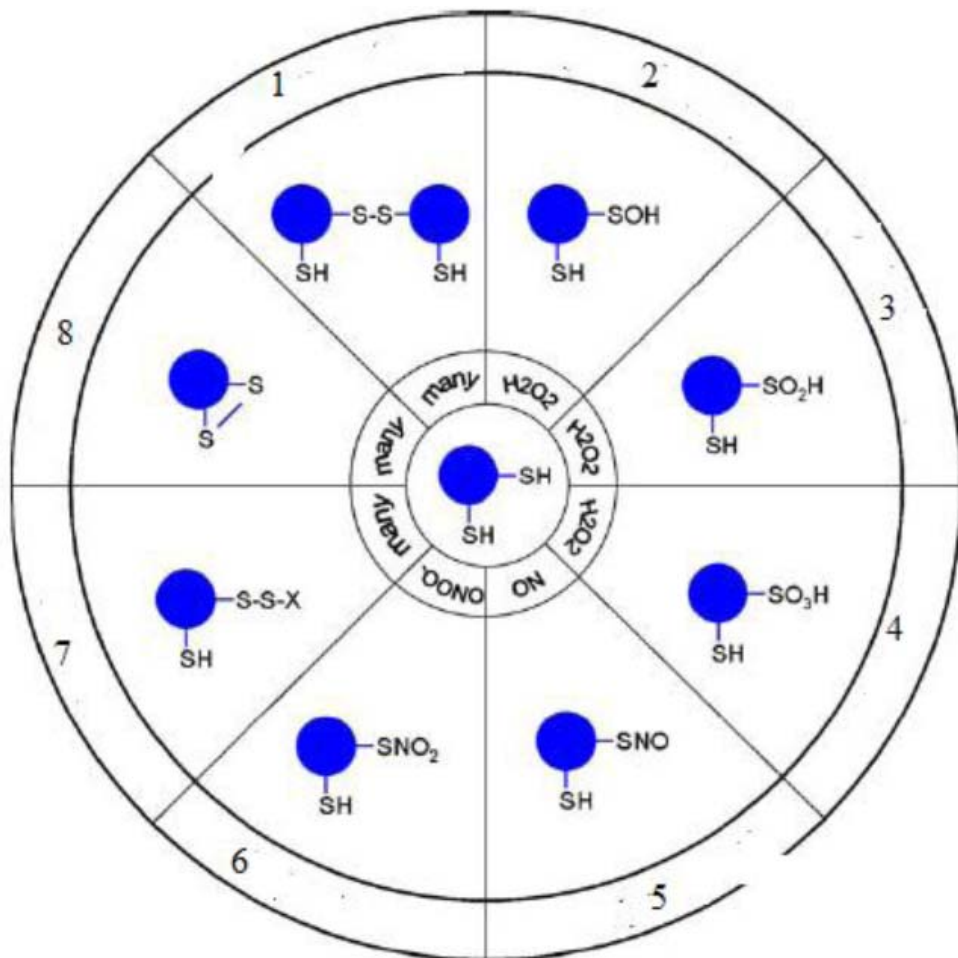
oxidações (GANHÃO *et al*, 2010a,b; SANTÉ-LHOUELLIER *et al*, 2008a,b,c). As alterações físico-químicas induzidas pela temperatura elevada durante o cozimento, como a ruptura da compartimentalização celular e a formação e clivagem de hidroperóxidos, favorecem o desenvolvimento de reações oxidativas no decorrer do armazenamento refrigerado. Além disso, os processos térmicos aumentam a quantidade de ferro não-heme (Fe^{3+}) na carne, e não somente o cozimento, mas a subsequente armazenagem a baixas temperaturas são importantes na sua liberação da mioglobina. Este aumento também é influenciado pelo decréscimo do ferro heme (Fe^{2+}) em consequência da quebra ou degradação oxidativa da molécula de mioglobina, nestas mesmas condições. O somatório destes fatores intensifica a oxidação protéica na carne e derivados, tratados termicamente.

A salga, que é uma operação comum na manufatura de vários produtos, pode influenciar na produção de compostos carbonílicos em proteínas cárneas. A adição de cloreto de sódio altera a força iônica do meio, afetando o grau de associação das proteínas miofibrilares, exposição a prooxidantes e a suscetibilidade à produção de compostos carbonílicos (MONTERO *et al*, 2005). Além disso, alguns autores propuseram que o NaCl poderia aumentar a atividade do Fe^{3+} ou que o Cl- derivado deste sal aumentaria a solubilidade do ferro, estimulando o seu efeito prooxidante (KANNER *et al*, 1991). Mas, os poucos estudos destinados ao estudo do efeito do NaCl na produção de compostos carbonílicos em proteínas cárneas, não fornecem resultados definitivos (MONTEIRO *et al*, 2005; SHIMIZU *et al*, 2009).

3.6 IMPACTO DA OXIDAÇÃO PROTÉICA NA QUALIDADE DA CARNE

3.6.1 Perda de Grupamentos Sulfidrílica

Aminoácidos sulfidrílicos (metionina, cisteína, cistina) são altamente suscetíveis a oxidação mediada por oxidantes e em presença de substâncias reativas, como o H_2O_2 (Figura 15). A oxidação de grupos (SH) conduz a uma série de reações complexas, resultando na formação de vários produtos oxidados (Figura 14) como o ácido sulfênico (RSOH), ácido sulfínico (RSOOH) e ligações cruzadas (pontes dissulfeto). As equações abaixo mostram exemplos de cada reação.

Figura 14 – Oxidação de Grupos (SH)**Figura 15** – Modificações oxidativas em Grupos (SH) sob ação de várias substâncias reativas e oxidantes. 1=inter-dissulfeto; 2=ácido sulfênico; 3=ácido sulfínico; 4=ácido sulfônico; 5=nitrosilado; 6=nitrotiol; 7=tiolato; 8=intra-dissulfeto.

Fonte: EATON (2006).

As perdas reportadas de grupos (SH) na carne e derivados durante o armazenamento variam extensamente. Somente 6% de perda de grupos (SH) foram encontrados em fatias de carne suína armazenadas a altas concentrações de oxigênio durante 1

a 14 dias *post mortem* (LUND *et al.*, 2007a,b). Entretanto, na carne suína cominuída armazenada a altas concentrações de oxigênio durante 7 dias, houve uma perda de 37% (LUND *et al.*, 2008). Vários estudos apresentam altas perdas de grupos (SH) em miofibrilas ou na miosina isolada com diferentes oxidantes e condições. Porém, alguns estudos apontam que perdas similares de grupos (SH) são dependentes do tipo de músculo, condições experimentais e espécies (MARTINAUD *et al.*, 1997; SRINIVASAN & HULTIN, 1997; LIU & XIONG, 2000).

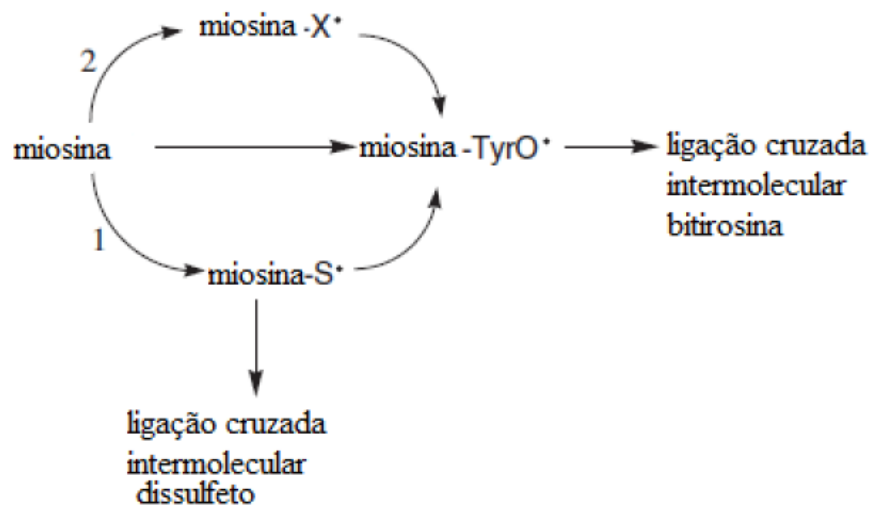
3.6.2 Conformação e Funcionalidade Protéica

As proteínas miofibrilares (actina e miosina) são as mais abundantes do músculo, assumindo um papel chave na função contrátil como componentes das miofibrilas. Elas representam cerca de 82 a 85% do volume celular do músculo e, ao redor de 85% da água na carne está presa fisicamente nesta estrutura. A estrutura nativa (composição, sequência e distribuição das cadeias laterais dos aminoácidos) das proteínas miofibrilares tem um papel essencial para a sua funcionalidade dentro dos sistemas cárneos, determinando a qualidade da carne fresca e o êxito de numerosos processos aplicados durante a manufatura de produtos cárneos. Dentro deste contexto, cadeias laterais polares (hidrofílicas) encontram-se expostas na fase aquosa, enquanto apolares (hidrofóbicas), oclusas na molécula. A interação química entre grupos polares de proteínas miofibrilares com as moléculas de água é essencial para propriedades como a capacidade de retenção de água, geleificante e emulsionante (HUFF-LONERGAN & LONERGAN, 2005; PUOLLANE & HALONEN, 2010). Como grupos polares de aminoácidos (lisina, arginina, histidina, aspartato, treonina, tirosina, cisteína) orientam-se na superfície da molécula, estão mais expostos e acessíveis para promotores da oxidação protéica como íons metálicos. Na presença de íons metálicos, compostos carbonílicos seriam gerados de aminoácidos como lisina, arginina. A perda de grupos amino levaria a uma alteração, na distribuição de cargas elétricas no arranjo global de proteínas miofibrilares, como também, no ponto isoelétrico (STADMAN, 1993). Como uma consequência direta destas modificações químicas, um deslocamento do equilíbrio entre interações intramoleculares proteína-proteína e proteína-água ocorreria, favorecendo a primeira e ocasionando a perda da solubilidade protéica (ESTÉVEZ, 2011). Segundo XIONG (2000), a oxidação induz a alterações na estrutura terciária de proteínas cárneas, causando desdobramento, aumento na hidrofobicidade, formação de agregados e desnaturação irreversível. Assim, a formação de compostos carbonílicos tem um papel relevante nas

mudanças físico-químicas que ocorrem em proteínas oxidadas, promovendo alterações na geleificação, emulsificação, viscosidade e hidratação da carne e derivados (XIONG & DECKER, 1995; BERTRAM *et al*, 2007).

Compostos carbonílicos também contribuem para a perda da funcionalidade protéica através da formação de ligações cruzadas (Figura 16).

Figura 16 – Mecanismo de reação proposto para a oxidação da miosina através de proteínas heme.



Fonte: (LUND *et al*, 2008).

Ligações cruzadas contribuem para a formação e estabilização de agregados protéicos ocasionando o encurtamento de miofibrilas e uma constrição mecânica contra o entumescimento (LIU *et al*, 2009). Várias propriedades funcionais das proteínas miofibrilares são dependentes da associação entre proteínas individuais. Porém, as modificações oxidativas conduzem a polimerização e agregação excessiva, podendo causar significativos efeitos indesejáveis em produtos cárneos (XIONG, 2000). Vários estudos apontam que a formação de pontes dissulfetos e, em menor extensão, de ditirosina são as principais rotas para ligações cruzadas em proteínas cárneas (LUND *et al*, 2011). A condensação de compostos carbonílicos com grupos amino de aminoácidos vizinhos tem sido recorrentemente proposto como um mecanismo adicional para ligações cruzadas em sistemas cárneos (XIONG, 2000; PARK *et al*, 2006a,b), entre muitos outros. Entretanto a exata natureza de cada reação permanece indefinida.

3.6.3 Valor Nutritivo

A oxidação de proteínas cárneas causa mudanças no perfil de aminoácidos e perda de aminoácidos específicos (PARK & XIONG, 2007). Além disso, a influência da oxidação protéica na digestibilidade contribuiria para o decréscimo no valor nutricional de proteínas oxidadas. Segundo GRUNE *et al* (2004) níveis baixos de oxidação induz a mudanças sutis na estrutura protéica, favorecendo o reconhecimento pelas proteases e aumentando a suscetibilidade à proteólise. Em níveis altos, a formação de agregados proteicos, e a degradação oxidativa da cadeia lateral de aminoácidos específicos, alteraria o reconhecimento físico e químico de sítios, conduzindo à diminuição na suscetibilidade proteolítica.

A deficiente assimilação de aminoácidos causada pela agregação protéica e a conseqüente redução na digestão de proteínas, teria uma influência negativa na saúde humana. De acordo com alguns estudos, proteínas não hidrolizadas são fermentadas pela flora do cólon em fenol e p-cresol, que são produtos mutagênicos, aumentando o risco de câncer do cólon (EVENEPOEL *et al*, 1998). O impacto real de proteínas oxidadas na saúde humana permanece desconhecido.

3.6.4 Textura

Estudos recentes têm confirmado a ligação entre a formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas e a diminuição na maciez da carne bovina (ESTÉVEZ, 2011). A oxidação protéica pode influenciar na maciez da carne através de dois mecanismos como o decréscimo na degradação proteolítica durante a maturação e, a indução a ligações cruzadas via pontes dissulfeto. O primeiro influencia em dois efeitos comandados pela oxidação protéica: a inativação de enzimas proteolíticas (μ -calpaína e m-calpaína) envolvidas na resolução do *rigor mortis*, e a alteração oxidativa em proteínas miofibrilares que levaria a redução na suscetibilidade proteolítica (ROWE *et al*, 2004). Alguns autores encontraram uma correlação significativa entre a dureza instrumental em produtos cárneos (salsicha, patê) e a extensão da oxidação protéica medida pelo método-DNPH (ESTÉVEZ & CAVA, 2004; ESTÉVEZ *et al*, 2005). Entretanto, WILHEM *et al* (2010) mostrou bioquímica e ultraestruturalmente que em condições fisiológicas de carnes PSE, em que primordiamente há excesso de Ca^{2+} no reticulo sarcoplasmático catalizando as proteases dependentes, ocorre o amaciamento em peitos de frangos anormais.

3.7 CONTROLE DA OXIDAÇÃO PROTÉICA EM PRODUTOS CÁRNEOS

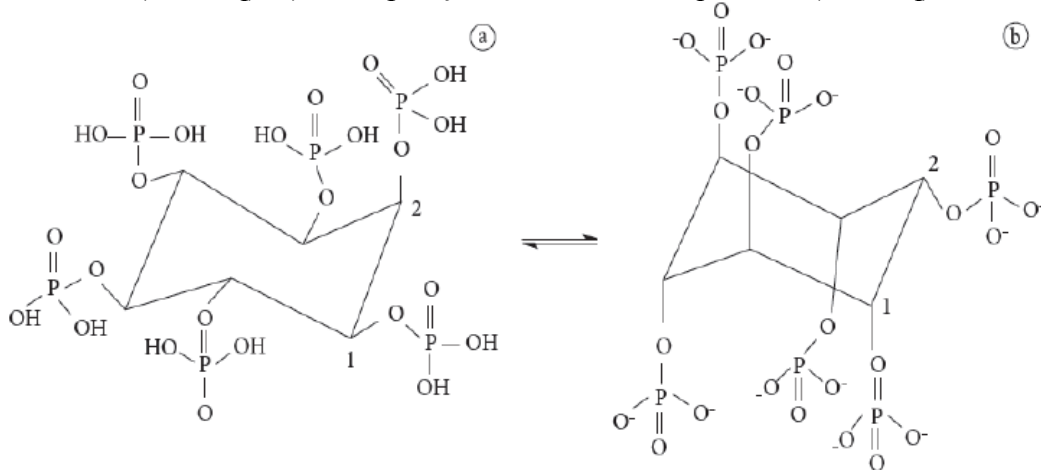
3.7.1 Uso de Antioxidantes

3.7.1.1 Ácido fítico

A nomenclatura utilizada para o ácido fítico é 1,2,3,4,5,6-hexaquis(dihidrogênio) fostato mio-inositol ou ácido fítico para o ácido na forma livre, fitato para a forma de sal livre e fitin para sais com cálcio e magnésio (PLAAMI, 1997).

PATON *et al* (1999), por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo ^{31}P , e de próton, RMN ^1H , revelou que o ácido fítico pode apresentar conformações diferentes. Quando o pH é superior a 11.3, cinco grupos fosfatos encontram-se estabilizados na forma axial e apenas um na posição equatorial, conforme (Figura 17). Em pH menor que 10.0, um grupo localiza-se na posição axial e cinco na posição equatorial. A estabilidade das conformações axial e equatorial está relacionada à minimização de repulsões eletrostáticas, à dependência de pH, e as ligações de hidrogênio.

Figura 17 – Conformações do ácido fítico. a) uma posição axial e cinco equatoriais (1ax/5eq); b) cinco posições axiais e uma equatorial (5ax/1eq).



Nas plantas, o papel fisiológico do ácido fítico consiste na reserva de fósforo e energia. Atua também como um imobilizador de cátions multivalentes, necessários para o controle do processo celular, e como regulador dos níveis de fosfato inorgânico

(COSGROVE, 1963). O ácido fítico encontra-se em altas taxas nos cereais, sementes oleaginosas e legumes, sendo que o fósforo-fitado constitui a principal fração, 60-82% de fósforo-total. Durante a germinação, o fitato é degradado pela ação da enzima fitase a fosfato inorgânico auxiliando no crescimento dos grãos (DOST & TOKUL, 2006). Nas células animais, a função do ácido fítico está relacionada a sinalização da transmembrana e mobilização do cálcio para as reservas intracelulares (KHATTAB *et al*, 2010).

Em razão do seu potencial para quelar ferro, o ácido fítico suprime a catálise deste íon nas reações oxidativas. O ácido fítico em altas concentrações ($\geq 0,25M$) solubiliza o ferro na forma de Fe^{3+} -fitato, deslocando todas as moléculas de água e ocupando os seis sítios de coordenação do metal, como também, mantém um estado exclusivo de oxidação, bloqueando o seu ciclo redox (GRAF & EATON, 1990). Vários autores investigaram o potencial antioxidante do ácido fítico em sistemas alimentares (SOARES, 1998; LEAL, 2000, HARBACH *et al*, 2007). AHN *et al* (2004) avaliou a atividade antioxidante do ácido fítico, em modelos lipídicos irradiados a 0, 10 e 20 kGy, comparando-o com antioxidantes comumente utilizados na indústria de alimentos. O ácido fítico apresentou atividade antioxidante superior, mesmo quando irradiado a 20 kGy, como também, em ausência de radiação durante o armazenamento. A propriedade quelante do ácido fítico pode facilitar a eliminação de metais pesados potencialmente tóxicos para o organismo, auxiliando na quimioprevenção do câncer. SOMASUNDAR *et al* (2005) mostraram que o ácido fítico apresenta efeito inibidor contra dano oxidativo causado ao DNA e tumores pancreáticos.

A interação entre o ácido fítico e alimentos carregados, como proteínas é conhecida. Diferentes mecanismos relacionam interações entre fitatos e proteínas, que dependem dos distintos pHs (pH < 5, pH 5 - 7 e pH > 7). Em pH baixo, a maioria das proteínas possui cargas positivas, enquanto que o ácido fítico apresenta-se carregado negativamente. Conseqüentemente, a interação proteína e ácido fítico é o resultado da forte interação eletrostática. Em pH intermediário, ambos possuem cargas negativas, e o complexo proteína-fitato permanece estável. Em pH elevado, cátions multivalentes, como o cálcio, são essenciais para a formação do complexo proteína-fitato (DEAK & JOHSON, 2007). Entretanto, a ação do ácido fítico na inibição da oxidação protéica nos alimentos carece de investigação. Neste estudo, o ácido fítico mostrou-se eficiente na inibição da formação de compostos carbonílicos em proteínas cárneas do charque bovino, armazenado a temperatura ambiente, por 30 dias. Além disso, o ácido fítico reduziu significativamente a perda de grupos (SH) livres no charque durante 60 dias, como também, a formação de metamioglobina. Estes

efeitos, provavelmente estão atrelados a sua ação quelante de sistemas férricos e sequestrante do radical hidroxila (FILGUEIRAS *et al*, 2009).

3.7.1.2 Nitratos

Os nitratos são ingredientes fundamentais utilizados para o desenvolvimento da cor característica dos produtos cárneos curados. O nitrito (NO_2) após ser reduzido para óxido nítrico (NO) combina-se com a mioglobina, produzindo a cor vermelha de produtos curados (*in natura*) denominada nitrosilmioglobina (NOMb). Quando aquecido, o pigmento NOMb é convertido a nitroso-hemocromo, responsável pela cor rósea de produtos curados e cozidos. O nitrato de sódio atua como fonte de nitrito através da ação redutora de microrganismos. O nitrito de sódio age como bacteriostático, inibindo a produção de toxina pelo *Clostridium botulinum*, e como antioxidante. O nitrito atua como antioxidante quando adicionado em doses iguais ou superiores a 50 ppm (GRAY & PEARSON, 1987, YOUSSEF *et al*, 2003). Neste estudo, o nitrito de sódio adicionado a 200ppm no charque bovino inibiu a oxidação lipídica, protéica e a formação de metamioglobina durante os 60 dias de armazenamento. Estes efeitos podem estar atrelados à sua ação, de complexação com a mioglobina, indisponibilizando o Fe^{3+} para quaisquer reações, sequestrante de radicais lipídicos e, de agregação com produtos secundários da oxidação lipídica. Porém, o nitrito de sódio não minimizou a perda de grupos (SH) no charque, sugerindo que parte do óxido nítrico, responsável pela sua ação antioxidante, foi convertida a peroxinitrito.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras de peito de frango (*Pectoralis major m.*) utilizadas neste trabalho foram adquiridas de um frigorífico localizado na Região Oeste do Paraná.

As amostras de patinho (*Vastus Lateralis*) foram adquiridas de um Estabelecimento Comercial em Londrina.

4.2 MÉTODOS

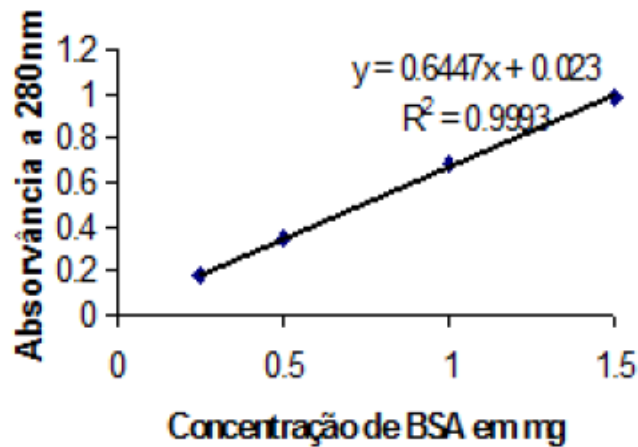
4.2.1 Validação da Análise de Compostos Carbonílicos oriundos da Oxidação Protéica

Para assegurar o processo de obtenção de compostos carbonílicos em proteínas cárneas foram aplicados alguns parâmetros de desempenho da sua quantificação. A exatidão, precisão, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram analisados conforme descrito na Resolução (RE) n° 899, de 29 de maio de 2003, emitida pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), utilizando-se a albumina bovina (BSA) como padrão. Os resultados obtidos são apresentados a seguir:

Quadro 1 – Recuperação do padrão BSA para a determinação da Precisão e Exatidão do Método

Concentração do padrão BSA (mg)	Concentração média experimental (mg)	Coefficiente de Variação (CV%)	Recuperação média de BSA (%)
30	42.44	0.02	141.46
50	74.75	0.004	149.5
70	74.75	0.009	106.78

Figura 18 – Curva de calibração obtida a partir da média de três curvas



$$LD = 0,023 \times 3,3 / 0.6447 = 0,12 \text{ mg de carbonila/ 6ml de amostra}$$

$$LD = 0,02 \text{ mg de carbonila/ ml de amostra}$$

$$LQ = 0,023 \times 10 / 0.6447 = 0,36 / 6 \text{ ml de amostra}$$

$$LQ = 0,06 \text{ mg de carbonila/ ml de amostra}$$

Os excelentes percentuais de recuperação, exatidão, baixos coeficientes de variação, limites de detecção e quantificação encontrados mostraram que o método é eficaz e seguro para quantificar teores de compostos carbonílicos oriundos da oxidação protéica na carne e derivados.

4.2.2 Medida de Cor

As medidas de cor foram realizadas na face ventral dos filés de peito de frango (n=14) similares ao PSE e controle 24h *post mortem*, tomando-se três pontos distintos de leitura por amostra. Utilizou-se o colorímetro Minolta CR 400, e os valores de luminosidade L* foram expressos no sistema de cor CIELAB e usados como parâmetro para classificação das amostras em similares ao PSE e normais. Para a medida de cor na carne fresca usada para a produção do charque utilizou-se o colorímetro da marca (BYK – Gardner GmbH; color-guide 45°/0° 11mm; fonte iluminante: D65). Os componentes a* (vermelho-verde) e b* (amarelo-azul) foram determinados pelo sistema CIELAB. As leituras foram feitas em sextuplicata.

4.2.3 Medida de pH

As medidas de pH em amostras similares ao PSE e controle foram realizadas após 4 e 24h *post mortem* com o auxílio de um potenciômetro de contato da marca Testo 205. O ponto de incisão do eletrodo foi na face cranial ventral do filé segundo (WILHELM *et al*, 2010). A média das leituras nos tempos determinados foi usada como parâmetro para a classificação das amostras em similares ao PSE e normais. Para a análise do pH nas amostras de charque utilizou-se um pHmetro de bancada. Deste modo, 10g de amostra foram homogeneizadas em 100ml de água destilada. Após 5 min de contato entre o eletrodo e a amostra as leituras foram obtidas em triplicata conforme (TERRA & BRUM, 1988).

4.2.4 Oxidação Lipídica

O acompanhamento da oxidação lipídica nos filés de peito de frango e no charque foi avaliado pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) segundo TARLADGIS *et al* (1964) e modificado por SOARES *et al* (2004). Neste procedimento, 10g de amostra, em triplicata, foram homogeneizadas em 98ml de água destilada, 2,5 ml de HCL 4N e 5 gotas de antiespumante (8 partes de Span 80 + 1.3 partes de Tween 20). Esta solução foi destilada a 500°C por 10min e coletados 50ml. Uma alíquota de 5 ml do destilado foi transferida para um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Adicionou-se 5ml de TBA 0.02M e colocou-se em um banho-maria fervente por 35min, juntamente com o branco que continha 5ml de TBA e 5ml de água destilada. Após o resfriamento a temperatura ambiente foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 530nm. Uma curva padrão foi traçada com o uso de uma solução aquosa de 1,1,1,3-tetraetoxipropano (TEP), à qual foi utilizada no cálculo dos teores de TBARS nas amostras. Os resultados foram expressos em mg de TBARS/ kg⁻¹ de amostra.

4.2.5 Determinação de Aroma de Requentado (WOF)

Para a análise de WOF nos filés de peito de frango, 100-110g de amostra foram embaladas a vácuo e tratadas termicamente a 80°C por 30min, segundo Igene e Pearson (1979). Após, as amostras foram embaladas em sacos de polietileno, permeáveis a luz, e armazenadas por 48h a 4°C com luz fluorescente. Em seguida, foram reaquecidas em microondas por 4min e analisadas, em triplicata, quanto a oxidação lipídica em TBARS,

conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em mg de TBARS/ kg⁻¹ de amostra.

4.2.6 Ácidos Graxos

O perfil de ácidos graxos nas amostras (em duplicata) foi determinado através da preparação de ésteres metílicos por transesterificação conforme o método 5509 da ISO (1978), utilizando-se 2 mol/L de KOH em metanol and n-heptano. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados pelo cromatógrafo gasoso Shimadzu 14A (Japão) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida (100m x 0.25mm x 0.25µm de CP 7420, Varian). A temperatura da coluna foi programada a 10°C/min de 80 a 240°C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 200 e 220°C, respectivamente. O gás carreador foi o hidrogênio (1.2 ml/min), o auxiliar, nitrogênio (30 ml/min), e os gases de chama, H₂ e ar sintético (300ml/min). A razão de divisão da amostra (split) foi de 1/100. A identificação dos ácidos graxos foi baseada em padrões autênticos (Sigma). As áreas dos picos foram determinadas pelo CG-300 integrador (CG, Instruments, Brazil). Os resultados foram expressos como percentagens relativas de ácidos graxos identificados (SOARES *et al*, 2009).

4.2.7 Oxidação Protéica

O acompanhamento da oxidação protéica nos filés de peito de frango e no charque foi avaliado por derivação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10mM em HCl 2N) segundo (FAGAN *et al*, 1999). Neste procedimento, 3g de amostra (em quadruplicata) foram solubilizadas em 25ml de tampão (pH=7,4) contendo Na₄P₂O₇ (2,0mM), Tris-maleato (10mM), KCl (100mM), MgCl₂(2,0mM) e EGTA(2,0mM). A mistura foi homogeneizada (em banho de gelo) com o auxílio de um Turrax (duas vezes a 8000g e 9500g por 15s, com intervalo de 15s entre cada homogeneização). Centrifugou-se o homogenato a 800g por 20min a 4°C. Filtrou-se em gaze. Clarificou-se o sobrenadante por centrifugação a 38.720g por 60min a 4°C. Filtrou-se em gaze. Uma alíquota de 1ml do filtrado foi tomada e precipitada com 5ml de HCl/acetona (3:1). Centrifugou-se duas vezes a 800g por 20min a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Tratou-se o precipitado com 5ml de TCA 10%. Centrifugou-se a 800g por 20min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se a amostra em 1ml de tampão (o mesmo utilizado no início do procedimento) e 1ml de solução de DNPH. Para o

branco utilizou-se 1ml de tampão e 1ml de HCl 2N. Deixou-se sob agitação (no escuro) por 60min a 4°C. Adicionou-se 1ml de TCA 30% e acondicionou-se a amostra em banho de gelo por 10min. Centrifugou-se a 800g por 20min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. Tratou-se o precipitado duas vezes com 5ml de TCA 20%, centrifugando-se a 800g por 20min a 4°C e descartando-se o sobrenadante. Sequencialmente, tratou-se o precipitado três vezes com etanol/acetato de etila (1:1) em 10mM de HCl, centrifugando-se a 800g por 20min a 4°C e descartando-se o sobrenadante. Solubilizou-se o precipitado em 1ml de solução de guanidina 6M em tampão fosfato de sódio monobásico (pH=2,3). Centrifugou-se a 800g por 2min a 4°C. Posteriormente, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 280 e 370nm. Uma curva padrão de albumina bovina (BSA) em guanidina 6M (0 - 2mg/ml) foi feita. As leituras a 280nm foram plotadas nesta curva obtendo-se a concentração protéica. O cálculo do teor de compostos carbonílicos oriundos da oxidação protéica foi obtido mediante a seguinte equação (1).

$$\text{nmol carbonil/mg proteína} = \frac{370\text{nm (amostra)} - 370\text{nm (branco)}}{[\text{]} \text{ protéica}} \times 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Onde [] = concentração protéica

Coefficiente de absorção da hidrazona = 22,000M⁻¹cm⁻¹

4.2.8 Metamioglobina

Para a análise da porcentagem de formação de metamioglobina nos filés de peito de frango e no charque, 5g de amostra foram solubilizadas em 25ml de tampão fosfato (40mM) a pH 6.8, segundo KRZYWICKI (1982). A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um Turrax a 13500g por 10s e armazenada por 1 hora a 4°C. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 5000g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatman n°1. A absorvância no filtrado foi lida em espectrofotômetro a 525, 572 e 700nm e os valores de metamioglobina foram obtidos conforme a equação (2).

$$\text{MetMb} = \{1.395 - [(A_{572} - A_{700}) / (A_{525} - A_{700})]\} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: A₅₂₅ é a absorvância do sobrenadante a 525nm

A₅₇₂ é a absorvância do sobrenadante a 572nm

A₇₀₀ é a absorvância do sobrenadante a 700nm

4.2.9 Grupos SH Livres

Para a determinação de grupos (SH) livres em proteínas nas amostras de charque foi utilizado o (DTNB) 5,5'-Ditiobis ácido 2-nitrobenzóico, (ELLMAN, 1959). Neste procedimento 2 g de amostra foram homogeneizadas (em banho de gelo) com 50ml de SDS 5% em 0,10M de tampão Tris (pH=8,0), com o auxílio de um turrax a 13500g por 30s. O homogenato foi colocado em um banho-maria a 80°C por 30min. Após, as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 1200g por 20min. O sobrenadante foi filtrado em filtro Watman nº1. A concentração protéica no filtrado foi determinada pela medida da absorvância a 280nm, usando uma curva padrão de albumina bovina (0 – 3mg/ml). Tomou-se 0.5ml do filtrado, adicionou-se 2ml de tampão Tris (pH=8,0) e 0,5ml de DTNB 10mM em 0,10M de tampão Tris (pH=8,0). A absorvância a 412nm foi lida em espectrofotômetro depois de 30min contra um branco contendo 0.5ml de SDS 5%, 2ml de tampão Tris (pH=8,0) e 0,5ml de DTNB 10mM em 0,10M de tampão Tris (pH=8,0). Os dados obtidos foram plotados em uma curva padrão de L-cisteína segundo (STAPELFELDT *et al*, 1997). Os resultados foram expressos em nmol sulfidrina/mg de proteína.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar o desenvolvimento de reações oxidativas nos filés de peito de frango, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do Teste t (para amostras independentes, por grupos) ao nível de 1 e 5% de significância. O efeito do uso de antioxidantes no charque foi avaliado através da ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Em todas as análises utilizou-se o programa computacional STATISTICA[®] for Windows Versão 5.0, da STATSOFT (1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão descritos na forma de dois artigos científicos, conforme segue

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO A

O artigo a seguir foi encaminhado ao periódico *Food Chemistry*.

Protein and lipid oxidation in commercial PSE-like (*Pale, Soft, Exudative*) meat from broiler chickens

Marta Alessandra de Avila Souza, Gleice Rocha dos Santos,
Jesui V. Visentainer, Nilson E. de Souza, Elza I Ida, Massami Shimokomaki*

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ Programa de Mestrado e Doutorado em
Ciência de Alimentos/ Centro de Ciências Agrárias/ Universidade Estadual de Londrina.
Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445. Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência. E-mail: mshimo@uel.br

Protein and lipid oxidation in commercial PSE-like (*Pale, Soft, Exudative*) meat from broiler chickens

Marta Alessandra de Avila Souza¹, Gleice Rocha dos Santos¹,
Jesui V. Visentainer², Nilson E. de Souza^{2,*}, Elza I Ida¹, Massami Shimokomaki^{1,*}

¹Graduate Program in Food Science, Department of Food Science and Technology, Londrina State University, PO Box 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil

²Chemistry Department, Maringá State University, Maringá, PR, Brazil

*Present address: Parana Technological Federal University - Campus Londrina, Av dos Pioneiros 3131, CEP 86036 – 370 - Londrina, PR, Brazil

1. Abstract

The biochemical reactions that occur during storage of broiler PSE-like meat seem to be related to excessive Ca^{2+} liberation from the muscle sarcoplasmic reticulum similar to pigs promoted by genetic mutation of the ryanodine protein, by the stressful conditions the birds suffer just before slaughter or by a synergistic combination of both situations. The Ca^{2+} surplus initiates a cascade of biochemical and physiological reactions that start with mitochondrial phospholipase A2 activity, which catalyzes the hydrolysis of cell membrane phospholipids and liberates free radicals. These compounds react with lipids and protein amino acid side chains and promote their oxidation. The results showed an increase in both lipid oxidation measured by TBARS index and protein oxidation determined by the carbonyl method over 5 days of broiler breast meat storage at 4°C.

Key words: carbonyl compounds, free radicals, phospholipase A2

2. Introduction

The development of meat color abnormalities is a continuing problem for the poultry industry. The fundamental cause of poultry PSE (Pale, Soft, Exudative)-like meat has not yet been defined, but it seems to originate from multiple factors; therefore, it is difficult to assess the monetary loss, but it has been estimated as US\$200 million a year for the United States poultry industry (Barbut, 2009). Moreover, Brazil is the third largest producer of broiler chicken meat with a predicted production for 2011 of around 13.0 million tons of meat and is the largest exporter with 3.3 million tons (USDA, 2011). The monetary loss in 2003 due to PSE meat was estimated to be around US\$10 to 12 million, and because bird production has increased, this figure has been estimated to be US\$25-30 million in 2008 (Kissel, Soares, Rossa & Shimokomaki, 2009). Research has demonstrated that the formation of pork PSE meat had a genetic basis that was attributed to a mutation in the protein pig ryanodine receptor (Fujii, Otsu, Zorzato, Leon, Khanna, Weiler, O'Brien, & Mac Lennan, (1991), which regulates calcium input within muscle cells. Despite extensive experimentation, this mutation has not yet been identified, and several experiments have indicated that the cause of poultry PSE-like meat is also related to the pre-slaughter management conditions. Strassburg & Chiang (2009) and Oda, Nepomuceno, Ledur, Oliveira, Marin, Ida & Shimokomaki (2009) hypothesized that differences in ryanodine receptor activities in turkeys and broiler chickens, respectively, could alter calcium homeostasis and lead to PSE-like meat development. We have also shown that the expression pattern of ryanodine receptor transcripts in broiler chickens was altered by heat stress and halothane treatment (Ziober, Paião, Marchi, Coutinho, Binneck, Nepomuceno & Shimokomaki, 2010); moreover, equipment was designed to detect the sensitivity of chicken to halothane, and approximately one third of the flock was found to have a positive reaction by contracting their legs (Marchi, Oba, Ziober, Soares, Ida & Shimokomaki, 2009). PSE refers the characteristics of a pale color, soft texture and exudative appearance at the broiler meat surface due to a poor water holding capacity (WHC) as a consequence of accelerated postmortem glycolysis, which promotes a sharp decrease in pH while the muscle is still in the rigor state. The high acidosis observed is related to hyper metabolism caused by the increase in Ca^{2+} concentration within the muscle cells. This condition initiates a cascade of muscle biochemical reactions that jeopardize the functional properties of the meat. Fundamentally, at low pH conditions and at a relatively high carcass temperature, the muscle proteins denature and lose their functionality (Olivo, Soares, Ida & Shimokomaki, 2001, Barbut, Sosnicki, Lonergan, Knapp, Ciobanu, Gatcliffe, Huff-Lonergan, & Wilson, 2008). Several pre-slaughtering factors have been linked to broiler PSE-like meat

formation, including transport, lairage and slaughtering conditions. The conditions during the journey from the farm to the slaughterhouse, such as showering the birds at the farm, heat, vehicle acceleration, vibration, movement, impact, food and water deprivation, social disruption, noise, and particularly high temperatures and relative humidity during transportation, are especially important (Mitchell & Kettewell, 1998, Simões, Oba, Matsuo, Rossa, Shimokomaki & Ida, 2009). Controlling these factors is particularly important for reducing the incidence of PSE-like meat formation. Recently, it has been shown that excess Ca^{2+} at the cell milieu increased the activities of certain muscle enzymes, including proteases (Wilhelm, Maganhini, Hernández-Blazquez, Ida & Shimokomaki, 2010) and mitochondrial membrane phospholipase A2 (PLA2), which hydrolyzes long chain phospholipids and releases free radicals that induce lipid oxidation (Soares, Ida, Miyamoto, Hernández-Blazquez, Olivo, Pinheiro, & Shimokomaki, (2003). Soares, Marchi, Matsushita, Guarnieri, Droval, Ida & Shimokomaki, 2009) demonstrated that there is a direct relationship between the increase in both PLA2 enzyme activity and the WHC in broiler chicken PSE-like meat. Broilers under acute heat stress conditions have been shown to have increased mitochondrial superoxide radical production, which promotes lipid peroxidation (Feng, Zhang, Zheng, Xi & Ma, 2008). Likewise, muscle proteins are constantly under the attack of reactive oxygen species (ROS) produced soon after death, and it seems that excess ROS are produced during the installation of PSE-like meat due to the higher activity of PLA2. The consequences of meat protein oxidation are still a matter of discussion; however, it has been implicated in affecting protein functionality and nutrition (Xiong, 2000, Lund, Heinonen, Baron & Estévez, 2011, Estévez, 2011). The aim of this work was to observe the relationship between lipid peroxidation and protein oxidation induced by ROS in fresh breast meat of commercially heat-stressed broiler chickens kept under refrigeration and after cooking.

2. Material and Methods

2.1. Broiler fillet meat (*Pectoralis major m.*) samples were obtained at a commercial plant located in the south of Brazil from both sexes of 42-day-old chickens, which were slaughtered according to the standard industrial plant practice in the summer. Basically, the slaughtering process consisted of a sequence of electrical stunning, bleeding, defeathering, evisceration, carcass water cooling, deboning and refrigeration (Northcutt, 2001, Wilhelm et al. 2010).

2.2. PSE-like meat sample characterization: pH and color measurement

The pH and color determination was performed as described in Wilhelm et al. (2010). Briefly, the pH was measured by inserting electrodes into the breast muscle using a contact pH meter system (Testo 205). The pH analyses were performed in triplicate at 24 h

postmortem, and a Minolta CR400 colorimeter was used to evaluate the color, L^* (lightness), on the posterior surface of the intact skinless breast muscles at 24 h postmortem. Fourteen samples with values of $44.0 < L^*_{24h} < 53.0$ and $pH > 5.80$ were classified as controls, and fourteen samples with values of $L^*_{24h} \geq 53.0$ and $pH \leq 5.80$ were classified as PSE-like meat.

2.4 Lipid oxidation evaluation

The breast fillets previously classified as controls and PSE-like meat were packed in polyethylene bags and stored at 4°C for 5 days. On days 1, 3 and 5, these samples were analyzed in the fresh and cooked conditions. The term warmed over flavor (WOF) was first introduced by Tims & Watts (1958) to describe the rapid development of an oxidized flavor in refrigerated cooked meat upon subsequent heating. For the analysis of WOF, samples were vacuum packed and subjected to cooking at 80°C for 30 min. The samples were then packed in polyethylene bags and stored at 4°C for 48 hours under a fluorescent light. After reheating in a 800-watt microwave for 4 min, the samples were cooled to room temperature, and the development of WOF was determined as described by Tarladgis, Pearson & Dugan (1964) as adapted in Soares, Olivo, Shimokomaki & Ida (2004). The results are expressed in mg TBARS kg^{-1} of sample.

2.5 Protein oxidation determination

Protein oxidation in fresh and cooked samples was determined by derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (Fagan, Slezka & Sohar, 1999). Protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The carbonyl content was calculated using the absorption coefficient ($22,000 M^{-1} cm^{-1}$). The results are expressed as nmol carbonyl mg^{-1} of protein.

2.6 Metmyoglobin determination (MetMb)

Cooked samples were analyzed for the percentage of metmyoglobin on days 1, 3 and 5 according to a previously described procedure (Krzywicki, 1982).

2.7 Fatty acid evaluation

Three days postmortem, refrigerated samples of both PSE-like meat and control samples were analyzed. The fatty acid profile was determined in duplicate by preparing methyl esters by transesterification according to the method of ISO 5509 (1978) using 2 mol L^{-1} KOH in methanol and n-heptane. The methyl esters of fatty acids were quantified with a Shimadzu 14A gas chromatograph (Japan) equipped with a flame ionization detector and a fused silica capillary column (100 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness, CP-7420 Varian).

The column temperature was increased at $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ from 80 to 240°C . The temperatures of the injector and detector were maintained at 200 and 220°C , respectively. The carrier gas was hydrogen (1.2 mL min^{-1}), nitrogen was the make-up gas (30 mLmin^{-1}), and 30 mL/min and 300 mL.min^{-1} , respectively) were used as the flame gas. The sample split mode was 1/100. The identification of fatty acids was based on authentic standards (Sigma). The peak areas were determined by a CG-300 integrator (CG Instruments, Brazil). The results are expressed as the relative percentages of the identified fatty acids (Soares, et al., 2009).

3. Statistical Analysis

All results were analyzed using the program STATISTICA for Windows version 5.0 (StatSoft, 1995). The Tukey test (5%) was used to assess the significance of the fatty acid profile.

4. Results

4.1 Broiler PSE-like meat characterization

In table 1, the results of pH values and color measurements for the characterization of PSE-like and control meat samples are presented. As expected, these results corroborated our original results because the PSE meat had significantly lower pH values and higher L^* values, which measure meat brightness, indicating a paler color (Barbut, 1993, Wilhem et al., 2010).

4.2. Lipid oxidation evaluation

Figure 1 shows lipid oxidation values as determined through TBARS determination, and values of 0.042 to $0.045 \text{ mg TBARS kg}^{-1}$ of sample were found for the control samples, while the PSE-like meat samples presented values of 0.057 to $0.065 \text{ mg TBARS kg}^{-1}$ of sample in breast fillet samples stored at 4°C for 5 days, indicating that there was a 50.0% increase in TBARS during storage ($p < 0.05$).

4.3. Protein oxidation determination

In Figure 2, the carbonyl concentrations in the breast fillet meat are shown. A significant difference was observed ($p < 0.05$) between the control samples, with values of 0.36 to $0.40 \text{ nmol carbonyl/mg}$ of protein, and the PSE meat samples, with 0.54 to $0.60 \text{ nmol carbonyl/mg}$ of protein, monitored during storage for 5 days at 4°C .

4.4 Fatty acids contents

Table 2 shows the saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid compositions found in the control and PSE meat samples. For the saturated fatty acids, there was an increase of 1.5-fold in stearic acid for the PSE meat compared with the control

samples; however, no significant differences were found for myristic, palmitic, arachidic, and behenic acids. For the monounsaturated acids, the PSE-like samples presented lower values of oleic acid ($p < 0.05$). Differences were observed in the levels of palmitoleic and nervonic acids, but no significant differences were found for the polyunsaturated acids, such as linoleic and alpha-linolenic acids. However, a significant difference in the level of arachidonic acid was observed ($p < 0.05$) because the PSE meat samples presented approximately triple the concentration of the control samples.

4.5. Lipid and protein oxidation after cooking

The results showed increase of 1.1% and 10.5% in the levels of TBARS and carbonyl substances, respectively, as seen in Figs. 3 and 4. These increases were only significantly different on the first day of storage for PSE-like meat compared with control samples both for fresh meat stored at 4°C for 5 days postmortem and cooked meat stored for 5 days ($p < 0.05$).

4.6 Metmyoglobin

Fig. 5 shows that a 3.08% increase in the amount of MetMb was found in PSE-like meat compared with the control samples cooked at 80°C for 30 min.

5. Discussion

Our results showed that there is a close relationship between the TBARS values and carbonyl concentrations throughout the meat sample storage period. As shown in Figs. 1 and 2, there were relatively high levels of TBARS and carbonyl concentrations, respectively, indicating that ROS were already available before the initiation of rigor mortis and suggesting that PLA2 enhanced its activity because of the increase of the Ca^{2+} concentration levels within the sarcoplasm. Although TBARS and carbonyl values remained constant throughout storage, in PSE-like samples had increases of 50 and 49.0%, respectively, compared with the control meat samples stored for 5 days. On the first day postmortem, there was 1.4-fold higher amount of carbonyl compounds in the PSE samples compared with the control group, suggesting that there already was more ROS and other free radicals to oxidize the myofibril proteins before slaughtering. Concomitantly, the higher PLA2 activity in PSE-like meat (Soares et al., 2003) resulted in the increase in free radicals, and this availability would result in the oxidation of both lipids and proteins in a cascading reaction. In fact, in a previous report, there was an indication that protease enhanced its activity in the presence of this excessive Ca^{2+} liberation in birds that were exposed to thermal stress during pre-slaughtering management conditions (Wilhem et al., 2010). Thus, it is becoming clear that the Ca^{2+} surplus within the muscle is the main cause of the symptoms of PSE-like meat, which is similar to that in pork PSE meat as the physiological consequence of the PSS (Pork Stress Syndrome)

(Fujii et al, 1991) although this cause has yet to be established, as the cause for Avian Stress Syndrome for poultry. In our previous study with heat-stressed chickens, there was 1.25-fold higher PLA2 activity in relation to the control group, and we hypothesized that this activity triggered the start of the syndrome concomitantly with the increase in Ca^{2+} within the sarcoplasm (Soares, et al., 2003). Other reports have indicated that the higher activity of this enzyme could also promote mitochondrial membrane disturbances, thereby inducing further excessive Ca^{2+} release (Chen et al., 2010) and weakening the WHC functionality in meat in association with protein denaturation due to the lower pH and higher temperatures of the carcass (Olivo et al., 2001, Wilhem, et al., 2010). Similar conditions of low pH and increased PLA2 enzyme activity have been observed for pork (Cheah, Cheah & Waring, 1986, Poulsen, Young, Theil, Kolko, Oksbjerg, & Lambert, 2007). Evidence that excessive Ca^{2+} is the main cause for the formation of PSE-like meat has been found in several anti-stress experiments applied at the commercial level for broilers, which relieved the stress such as a shower at the farm after loading the trucks and being the harmful environmental conditions located at the back of the truck during transport (Simões, Oba, Matsuo, Rossa, Shimokomaki & Ida., 2009), and nebulization of the birds before commercial slaughtering (Guarnieri, Soares, Olivo, Schneider, Macedo, Ida, & Shimokomaki, 2004), which results in muscle Ca^{2+} homeostasis. It has also been reported that introducing vitamin E into the diet also controls the formation of broiler PSE-like meat (Olivo et al., 2001) by inhibiting PLA2 enzyme activity at the mitochondrial membranes in muscle (Soares et al., 2003). These results demonstrated the relationship between this enzyme activity and the decrease in WHC, which is stimulated by the presence of Ca^{2+} in mitochondrial membrane phospholipids and results in the formation of long chain unsaturated fatty acids and lyso-derivatives (Soares et al., 2009) that liberate arachidonic acid which in turn enzymatically generates free radicals. Table 2 shows the composition of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids found in the control and PSE-like meat samples. An increase of 1.5-fold in the level of stearic acid in PSE-like meat compared with control samples seemed to be generated by the chemical oxidation of oleic acid. The three-fold increase in arachidonic acid observed in the samples from heat-treated birds is worrisome for the welfare of the birds because free arachidonic acid under stressful conditions may be utilized for prostaglandin synthesis, which in turn is involved in a series of illnesses observed in mammals, such as inflammation, pain, swelling, high blood pressure, heart function, gastrointestinal function and secretion, kidney function and fluid balance, blood clotting and platelet aggregation, allergic responses, nerve transmission and steroid production and hormone synthesis (Leslie, 2004).

The ratio of PUFA/SFA was higher in abnormal samples, which confirms the results obtained previously (Soares et al., 2004) in which PLA2 activity on membrane phospholipids gave rise to the formation of arachidonic acid and lysophospholipids (Murakami & Kudo, 2002) and produced the free radicals observed in this work. Moreover, under the harsh conditions of cooking at 80°C for 30 min, a 10.0% increase in the carbonyl content was observed in PSE-like meat ($p < 0.05$), indicating that although the enzymes involved were thermally inactivated, oxidative reactions continued to occur (Fig. 5). In addition, muscle pigments showed changes, and a 3.0% increase in MetMb was found. The Fenton reaction might have occurred based on the changes in the Fe ionic states. Our results indicated that because the relatively higher amount of MetMb (Fe^{3+}) in the PSE-like meat samples increased the effectiveness of protein oxidation reactions that produced carbonyl compounds (Olivo et al., 2001, Park, Xiong & Alderton, 2006). A proportional decrease in the amounts of TBARS and carbonyl was observed at days 5 and 7 of storage, indicating that free radical components were not available because they had reacted with myofibril proteins. These results indicate that PLA2 plays a pivotal role in initiating the biochemical/physiological intramuscular reactions under excessive levels of Ca^{2+} , which are produced by the intense heat stress to which these commercial birds are subjected.

6. Conclusion

During commercial pre-slaughtering and under heat stress management of broiler chickens there was the formation of free radicals due to the increase in PLA2 enzyme activity because of the excess of intramuscular Ca^{2+} developing PSE-like meat. In addition, the presence of ROS would produce higher lipid and protein oxidation levels.

7. Acknowledgments

This research project was supported by Fundação Araucária/CNPq Pronex (Protocols 09.277 and 17.347) and Fundação Araucária/Finep under the BioAgroPar Program. JVV, NES, EII and MS are CNPq Research Fellows.

10. References

- Barbut, S. 1993. Colour measurements for evaluating the pale soft and exudative (PSE) occurrence in turkey meat. *Food Res. Int.* 26:39–43
- Barbut, S., Sosnicki, A.A., Lonergan, S.M., Knapp, T., Ciobanu, D.C., Gatcliffe, L.J., Huff-Lonergan, E & Wilson, E.W. (2008). Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Science*, 79, 46-63.

- Barbut, S. (2009). Pale, soft, and exudative poultry meat. Reviewing ways to manage at the processing plant. *Poultry Science*, 88, 1506-1512.
- Cheah, K.S., Cheah, A.M. & Waring, J.C. (1986) Phospholipase A₂ activity, calmodulin, Ca²⁺ and meat quality in young and adult halothane-sensitive and halothane-insensitive British Landrace pigs. *Meat Science* 17, 37-53.
- Chen, T., Zhou, G-H., Xu, X-L., Zhao, G-M., & Li, C-b. (2010). Phospholipase A₂ and antioxidant enzyme activities in normal and PSE pork. *Meat Science*, 84, 143-146.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, in press.
- Fagan, J.M., Slezka, B.G., & Sohar, I. (1999). Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 751-757.
- Feng, J., Zhang, M., Zheng, S., Xie, P., & Ma, A. (2008). Effects of high temperature on multiple parameters of broilers in vitro and in vivo. *Poultry Science*, 87, 2133-2139.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J., & MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253, 448-451.
- Guarnieri, P.A., Soares, A.L., Olivo, R., Schneider, J.P., Macedo, R.M., Ida, E.I., & Shimokomaki, M. (2004). Preslaughter handling with water shower spray inhibits PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler breast meat in commercial plant. Biochemical and ultrastructural observations. *J. Food Biochemistry*, 28, 269-277.
- Kissel, C., Soares, A. L., Rossa, A., & Shimokomaki, M. (2009). Broiler PSE (*Pale, Soft, Exudative*) meat functional properties in the mortadella production. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 52, 213-21.
- Krzywicki, K. (1982). The determination of haem pigment in meat. *Meat Science*, 7, 29-32.
- Leslie, C.C. (2004). Regulation of Arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem. Cell Biol.* 82, 1-17.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55, 83-95.
- Marchi, D. F., Oba, A., Ziober, I. L., Soares, A. L., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2009). Development of a gas chamber for detecting broiler chicken halothane sensitivity and PSE (Pale, Soft, Exudative) meat formation. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 52, 189-194.
- Mitchell, M.A., & Kettlewell, P.J. (1998). Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problem. *Poultry Science*, 77, 1803-1814.

- Murakami, M. & Kudo, I. (2002). Phospholipase A₂. *J. Biochemistry (Japan)*, 131, 285-292.
- Northcutt, J.K. (2001). Preslaughter factors affecting poultry meat quality. *Poultry Meat Processing*, (5-18), Boca Raton: CRC Press.
- Poulsen, K.A., Young, J. F., Theil, P., Kolko, M., Oksbjerg, N. & Lambert, I.H., 2007. Role of phospholipase A₂ in the induction of Drip loss in Porcine muscle. *J. Agric. Food Chem*, 55, 1970-1976.
- Oda, S.H.I., Nepomuceno, A.L., Ledur, M.C., Oliveira, M.C.N., Marin, S.R.R., Ida, E.I & Shimokomaki, M. (2009). Quantitative differential expression of alpha and beta ryanodine receptor genes in PSE (Pale, Soft, Exudative) meat from two chicken lines: broiler and layer. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, 52, 1519-1525.
- Olivo, Soares, Ida, & Shimokomaki, M. (2001). Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. *J. Food Biochemistry*. 25, 271-283.
- Park, D., Xiong, Y.L., & Alderton, A.L. (2006). Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 101, 1239-1246.
- Simões, G.S, Oba, A., Matsuo, T., Rossa, A., Shimokomaki, M., & Ida, E.I. (2009). Vehicle thermal microclimate evaluation during Brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 52, 195-204.
- Soares, Ida, Miyamoto, Hernández-Blazquez, Olivo, Pinheiro, & Shimokomaki, (2003). Phospholipase A₂ activity in poultry PSE, pale, soft, exudative, meat. *J. Food Biochemistry*, 27, 309-320.
- Soares, A.L., Marchi, D.F., Matsushita, M., Guarnieri, P.D., Droval, A., Ida, E.I. & Shimokomaki, M. (2009). Lipid oxidation and changes in fatty acids profile related to broiler breast meat colour abnormalities. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 52, 1513-1518.
- Strassburg, G.M., & Chiang, W. (2009). Pale, soft, exudative turkey – The role of ryanodine receptor variation in meat quality. *Poultry Science*, 88, 1497-1505.
- Tarladgis, B.G., Pearson, A.M., & Dugan, L.R. Jr. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *J. Food Sci. Agric.*, 19645, 602-604.
- Tims, M. J. & Watts, B. M. (1958), Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technol*. 12, 240-243.

USDA (2011) Foreign Agricultural Service, Brazil: Poultry and products, semi-annual poultry report, *GAIN* Report No. BR 0703 at <http://www.fas.usda.gov>

Xiong, Y, L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In. E.A. Decker., C. Faustman., & C.J.Lopez-Bote (Eds). *Antioxidants in muscle foods*. New York: Wiley, 85-111.

Ziober, I.L., Paião, F.G., Marchi, D.F., Coutinho, L.L., Binneck, E., Nepomuceno, A.L., & Shimokomaki, M. (2010). Heat and chemical stress modulate the expression of the α -RZR gene in broiler chickens. *Genetic and Molecular Research*, 9, 1258-1266.

Wilhelm, A.E., Magalhães, M.B., Hernández-Blázquez., Ida, E.I., & Shimokomaki, M. (2010). Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Food Chemistry*, 119, 1201-1204.

HIGHLIGHTS

- Protein and lipid oxidation occurs during storage of PSE-like meat in broiler chickens.
- Excess intramuscular Ca^{2+} concentrations play an important role in lipid and protein oxidation.
- PLA2 enzyme activity seems to enhance the oxidation of both lipids and proteins.
- Protein and lipid oxidation are more pronounced in cooked samples of PSE-like meat.
- The presence of higher amounts of free arachidonic acid in PSE-like meat could further affect the poultry quality.
- The stressful conditions of broiler chickens during slaughtering need to be controlled to decrease the level of oxidation.

Table 1. pH and color values (L*) for PSE and control broiler breast meat samples

Samples	Control (n=14)	PSE (n=14)
pH	5.99 ^a	5.77 ^b
L* ^{24h}	54.67 ^b	58.50 ^a

Means with different letters in the same row differ significantly ($p < 0.01$)

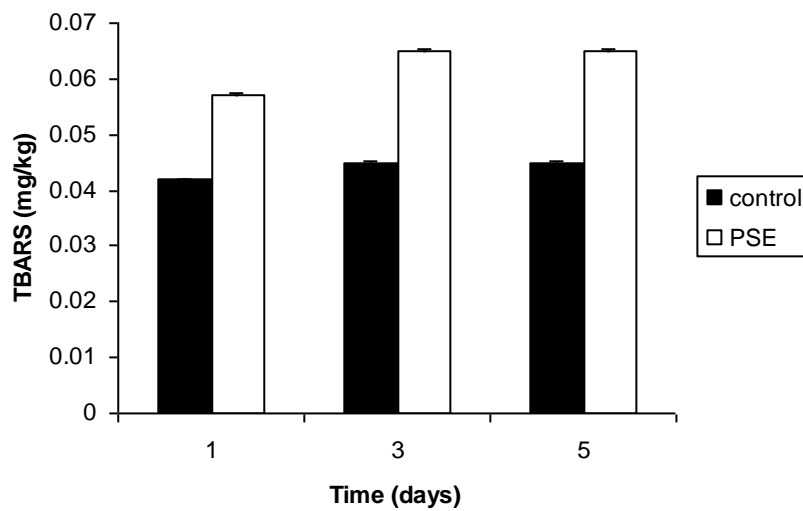


Figure 1. Levels of TBARS found in control and PSE chicken breast fillets stored at 4°C for 5 days.

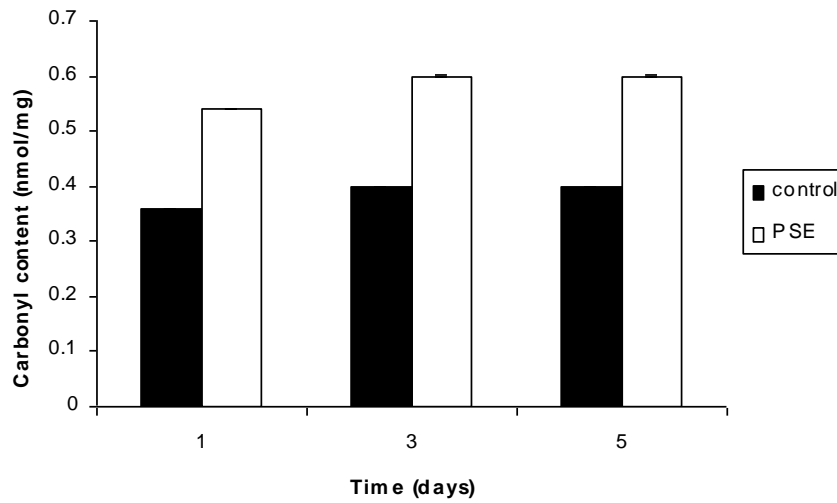


Figure 2. Levels of carbonyl found in control and PSE chicken breast fillets stored at 4°C for 5 days.

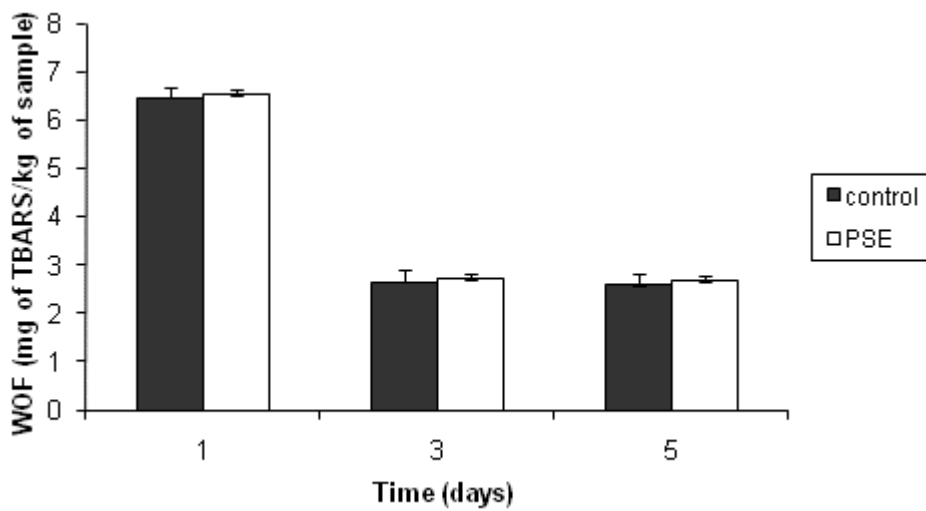


Figure 3. Levels of TBARS found in control and PSE chicken breast fillets cooked at 80°C for 30 min.

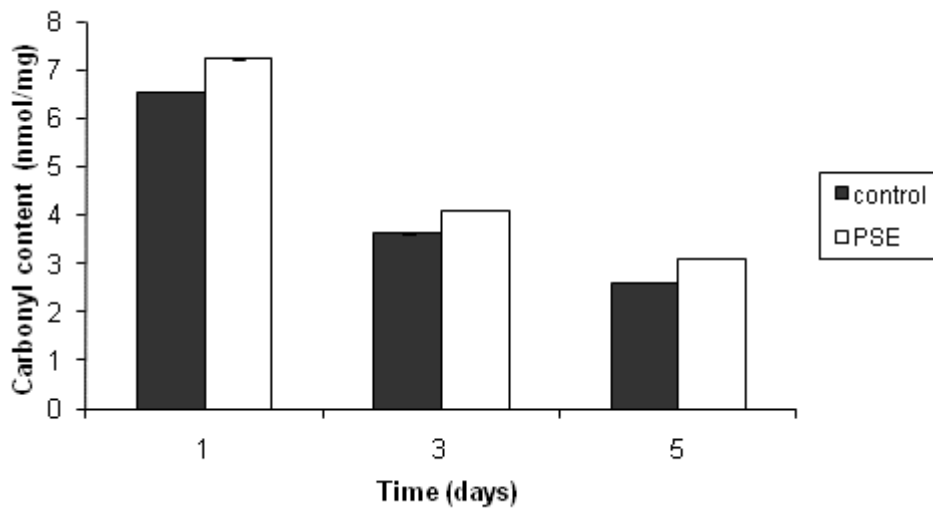


Figure 4. Levels of carbonyl found in control and PSE chicken breast fillets cooked at 80°C for 30 min.

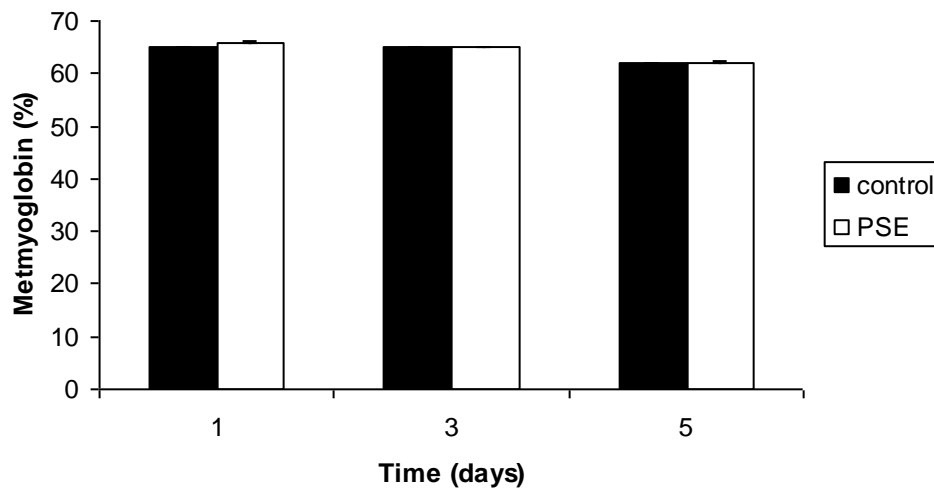


Figure 5. Levels of metmyoglobin found in control and PSE chicken breast fillets cooked at 80°C for 30 min.

Table 2. Fatty acid composition of control and PSE-like broiler breast meat samples stored for 3 days at 4°C

Fatty acids	Control sample	PSE-like meat sample
Myristic (14:0)	0.44 ^a	0.36 ^a
Palmitic (16:0)	20.91 ^a	20.62 ^a
Palmitoleic (16:1n-7)	4.43 ^a	3.12 ^b
Stearic (18:0)	5.68 ^a	8.82 ^b
Oleic (18:1n-9)	34.96 ^a	30.44 ^b
Vaccenic (18:1n-7)	1.91 ^a	2.04 ^a
Linoleic (18:2n-6)	27.47 ^a	26.90 ^a
Alpha-linolenic (18:3n-3)	1.89 ^a	1.47 ^b
Arachidic (20:0)	0.28 ^a	0.45 ^a
Arachidonic (20:4n-6)	1.15 ^a	3.59 ^b
Behenic (22:0)	0.26 ^a	0.40 ^a
Lignoceric (24:0)	0.30 ^a	1.33 ^b
Nervonic (24:1n-9)	0.32 ^a	0.46 ^a
*SFA	27.87 ^a	31.98 ^a
*MUFA	41.62 ^a	36.06 ^b
*PUFA	30.51 ^a	31.96 ^b
PUFA/SFA	1.09 ^a	0.99 ^b

Means within rows with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

*SFA - Saturated fatty acid = (16:0 + 18:0 + 20:0 + 22:0 + 24:0)

*MUFA - Monounsaturated fatty acid = (16:1n-7 + 18:1n-9 + 18:1n-7 + 24:1n-9)

*PUFA - Polyunsaturated fatty acid (18:2n-6 + 18:3n-3 + 20:4n-6)

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO B

O artigo a seguir foi encaminhado ao periódico *Brazilian Archives Biology and Technology*.

Protein Oxidation in Charqui Meat and Jerked Beef

Marta A. de Avila Souza¹, Jesui V. Visentainer², Rafael H Carvalho¹, Fabianne A Garcia³, Elza I Ida¹, Massami Shimokomaki^{1,4}

¹Department of Food Science and Technology, Londrina State University, PO Box 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil

²Chemistry Department, Maringá State University, Maringá, PR, Brazil

³Rua Borba Gato, 564, apt 401, CEP 86010-615, Londrina, PR, Brazil

⁴Present address: Paraná Technological Federal University - Campus Londrina, Av dos Pioneiros 3131, CEP 86036 – 370, Londrina, PR, Brazil. e-mail: mshimo@uel.br.

ABSTRACT

Food protein oxidation (Proox) is the resultant of an imbalance of pro-oxidant/antioxidant equilibrium that arises from the elevation of Reactive Oxygen Species (ROS) production. In this experiment, the changes in the Proox were measured quantitatively by carbonyl method throughout salting and drying conditions of charqui meat and jerked beef preparation and its storage for 60 days. The experiment was carried out in charqui meat samples containing brine (20.0%) and jerked beef with this brine solution added with sodium nitrite (0.02%). After 60 days of storage, the determined carbonyl substances in charqui meat were 2.77nmol mg⁻¹ and in the jerked beef samples there were 61.0% oxidation inhibition. These results indicated that the sodium nitrite inhibited the occurrence of Fenton reaction in the metmyoglobin molecule and the Fe kept in the Fe²⁺ state in jerked beef samples whereas in charqui meat the Fe³⁺ catalyzed more efficiently leading to the higher development of Proox.

Key words: lipid oxidation, sodium nitrite, reactive oxygen species

INTRODUCTION

Protein oxidation (Proox) is the resultant of an imbalance of pro-oxidant/antioxidant contents therefore it is necessary to reach the oxidation homeostasis conditions in food system in order to avoid it. By its composition and because of the harsh conditions to produce it charqui meat seems to be an excellent model to examine further these oxidative reactions. According to the Brazilian legislation, Charqui meat (CH) should contain 40-50% moisture and 10-20% salt (Brasil 1962) and 0.75 is the final value of its water activity ranking it as an intermediate moisture meat product (Torres et al., 1994, Shimokomaki *et al.*, 1998). On the other hand, a derivative cured meat product commercially known as *Jerked beef* (JB) was officially characterized by Brazilian legislation by having maximum moisture value of 55%, sodium nitrite 50 ppm, salt concentration of 18%, final aw value of 0.78 and should be vacuum packed (Brasil 2000) and somehow technologically it is an improvement from charqui meat and (Shimokomaki *et al.*, 2003). These products are the application of the so-called hurdle technology in its processing (Leistner 1987, Torres *et al.*, 1994). The conditions of charqui meat preparation were discussed elsewhere (Shimokomaki *et al.*, 1998, Shimokomaki *et al.*, *in press*). The addition of NaCl in meat preparation under these conditions changes the meat functional properties and in particular altered the iron state from ferrous (Fe²⁺) of oxymyoglobin for ferric (Fe³⁺) of metmyoglobin through Fenton reactions as originally reported thus becoming higher meat pro-oxidant (Youssef *et al.*, 2003). Under these conditions NaCl is capable of enhancing the production of ROS catalyzing, in a cascade reactions, the meat lipid and protein oxidation measured by TBARS and carbonyl substances, respectively (Youssef *et al.*, 2003, Montero *et al.*, 2005; Souza *et al.*, submitted). Considerable reports have been dealing with the application of antioxidants in order to minimizing these undesirable reactions in food systems (Park *et al.*, 2006, Ooizumi & Xiong 2006, 2008, Lund *et al.*, 2007). Cured salts are essential ingredients to meat processing and nitrite plays a strong antioxidant role as originally reported by Pearson groups (Pearson *et al.*, 1977). Furthermore nitrite was able to act as

lipid antioxidant in mechanical deboning chicken meat (Trindade *et al.*, 2008) and also in charqui meat and jerked beef (Youssef *et al.*, 2003, 2011).

The objective of this work was to determine quantitatively the amount of Proox through the carbonyl determination and its inhibition by adding sodium nitrite throughout beef charqui meat processing and storage for 60 days.

MATERIALS AND METHODS

Charqui meat processing

The charqui processing steps followed the techniques described elsewhere (Shimokomaki *et al.* 1998, Shimokomaki *et al.*, *in press*). Essentially, in *Vastus lateralis* m., brine of 20% NaCl (w/v) was automatically injected followed by dry salting on a concrete floor for five days. Subsequently, after washing to remove the excess of meat surface salt, samples were submitted to the drying stage directly in the sun and wind in stainless steel rails under the temperature of maximum of 40-45°C in the summer. The salted products were finally vacuum packed. In this experiment the salting processing consisted of brine (20.0% salt) for CH and brine + sodium nitrite (0.2%) for JB.

Metmyoglobin determination (MMb)

The BYK - Gardner GmbH colorimeter evaluated the color of charqui meat samples stored at 1, 8, 30, 60 days, through the C luminant integration sphere representing incandescent light without methamerism calibrated with CIELAB color system. The L* and a* b* values were recorded the average of 6 measurements. The assay was carried out in both charqui and jerked beef samples. The a*/b* ratio was used to determine the metmyoglobin concentration (Krzywicki 1982, Wanous *et al.*, 1989, Youssef *et al.*, 2003).

Samples preparation for analysis

All samples were dialyzed against distilled water in order to remove the salt residue and freeze dried for further analysis.

Lipid oxidation determination

Lipid oxidation was evaluated using the known Tarladgis *et al.* (1964) method as described in Soares *et al.* (2004). Results were expressed in mg TBARS kg⁻¹ of sample

Protein oxidation determination

Protein oxidation was determined by derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (Fagan *et al.*, 1999). Protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm using bovine serum albumin (BSA) as standard. The carbonyl content was calculated using the absorption of 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ at 370nm. The results were expressed as nmol carbonyl mg⁻¹ of protein.

Statistical Analysis

All results were analyzed using the program STATISTICA for Windows version 5.0 (StatSoft, 1995). The Tukey test (5%) was used to assess the significance of the fatty acid profile.

RESULTS

Metmyoglobin (MMb)

Table 1 shows the metmyoglobin amount found throughout processing and storage of CH and JB. As it can be seen, there was an increase of approximately 3-fold (p<0.05) in the amount of MMb in CH in relation to JB samples indicating that the nitrite in fact inhibited the formation of MMb.

Table 1. Metmyoglobin level (%) found in charqui meat and in jerked beef throughout processing and storage of 60 days.

Days	Charqui meat	Jerked beef
1	20.27 ^a	5.41 ^b
8	68.50 ^a	20.46 ^b
30	72.05 ^a	25.56 ^c
60	71.86 ^a	25.84 ^c

Mean with different letters on the same line differs significantly ($p < 0.05$) by the Tukey test.

Lipid oxidation

Table 2 shows the TBARS found in the CH samples and in JB samples. In CH meat samples, TBARS amounts varied from 0.057 to 0.25 mg kg⁻¹ of sample whereas in JB samples these amounts were from 0.023 to 0.05 mg kg⁻¹ of sample. There were 4-fold of lipid oxidation in CH in relation to JB showing the nitrite inhibited the lipid oxidation reactions in samples stored for 60 days ($p < 0.05$).

Table 2. Levels of TBARS (mg kg⁻¹) found in charqui meat and jerked beef throughout processing and storage for 60 days.

Days	Charqui meat	Jerked beef
1	0.057 ^a	0.023 ^a
8	0.11 ^b	0.04 ^a
30	0.11 ^a	0.045 ^b
60	0.25 ^a	0.05 ^c

Mean with different letters on the same line differs significantly ($p < 0.05$) by the Tukey test.

Protein oxidation

Table 3 shows the carbonyl substances found in samples in CH from 0.32-2.77 nmol mg⁻¹ of protein whereas in cured JB these results were from 0.28 to 1.08 nmol mg⁻¹ of protein throughout 60 days of storage. There were 2-to 3-fold increase of Proox throughout storage of CH ($p < 0.05$).

Table 3. Levels of carbonyl substances (nmol mg⁻¹) of charqui meat and jerked beef stored for 60 days.

Days	Charqui meat	Jerked beef
1	0.32 ^a	0.28 ^a
8	0.70 ^a	0.54 ^a
30	1.07 ^a	0.76 ^b
60	2.77 ^a	1.08 ^b

Mean with different letters on the same line differs significantly ($p < 0.05$) by the Tukey test.

DISCUSSION

Our results corroborated clearly that under the harsh conditions of CH and JB processing the oxidative reactions occurred not only for the lipid oxidation as reported previously (Torres *et al.*, 1989, Youssef *et al.*, 2003) and also for the protein oxidation. However there was difference in time after processing for these reactions to initiate since lipid oxidation only showed up to occur after 8 days (Table 2) as previously reported (Youssef *et al.*, 2003) and protein after 30 days after initiation of salting (Table 3). This experiment also confirmed that the pigment myoglobin was the first meat protein component to suffer changes under high salt concentration. The MMb amount was 2 to 3-fold in CH showing the deleterious role of NaCl over myoglobin from the starting of salting and the nitrite protected this oxidation to occur in JB (Table 1). It was clear that from the starting to approx. 8 days of processing the ROS components were chemically synthesizing and making them available for the further oxidation first by lipid and finally by protein. Previously we found that free radicals were formed as hexanal was detected at first days under salting processing (Torres *et al.*, 1988) and it is not ruled out the possibility during lipid oxidation further free radicals were formed enhancing further the later protein oxidation. Several authors reported the existence of straight relationship between the disruption of heme molecule during heat treatment and the free iron would increase its concentration having as consequence the gradative development of oxidative degradation in cooked meat (Miller *et al.*, 1994). Estévez and his group (Estévez & Cava, 2004, Estévez *et al.*, 2005) reported a significant correlation between the concomitant increase of free iron and TBARS content. The results reported herein also showed there was a direct relationship between the concentration level of MMb and TBARS suggesting that Fe³⁺ formation was induced by the oxidative environment promoted by the salting processing catalyzing ROS synthesis as previously observed (Youssef *et al.*, 2003). Therefore the higher availability of ROS increases potentially the oxidative reactions for both cases as lipid oxidation (Table 2) and Proox (Table 3) to occur. The inhibition of both lipid and protein oxidation in JB, surely was devoted to the presence of sodium nitrite packed under vacuum. This fact was observed previously JB for the lipid oxidation and in this experiment also for the Proox. At least two possibilities existed in order to explain this nitrite role: it chelated the free Fe³⁺ formed because of the high salt concentration and thus its pro oxidant was inhibited and/or reacted with meat proteins thus forming nitrosylmyoglobin-Fe³⁺ thus enhancing the oxidation while CH –free nitrite would form MMb-Fe²⁺ inhibiting these oxidation reactions. Apart from the fact of oxidative reactions occurring due to the Fe molecule state transitions, the conditions of CH processing firstly under high concentration of salt and secondly by drying under the sun app temperature of 40-45°C for several days would denature myofibrils proteins (Shimokomaki *et al.*, 1998) and collagen (Biscontini *et al.*, 1996) thus the gradative protein denaturation was positively correlated with lipid oxidation as demonstrated that in dark chicken (Jing Li & King, 1996).

CONCLUSIONS

A retarded protein oxidation did occur during storage of charqui meat and the sodium nitrite under vacuum in jerked beef was capable of partially inhibit these undesirable reactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to JFZ Indústrias e Comércio de Alimentos Ltda, Londrina, PR, Brazil for providing meat products samples. This research project was supported by Fundação Araucária/CNPq Pronex (Protocols 09.277 and 17.347) and Fundação Araucária/Finep under the BioAgroPar Program. MAAS was under CAPES/MEC doctoral scholarship, RHC was under CNPq Scientific Initiation scholarship and JVV, EII and MS are CNPq Research Fellows.

RESUMO

A oxidação protéica (Proox) em alimentos é o resultado do desequilíbrio entre pro oxidante/antioxidante que surge do aumento da produção das Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS). Neste trabalho, as alterações da Proox foram mensuradas quantitativamente pelo método da carbonila durante a salga, secagem e armazenamento do charque e *jerked beef* por 60 dias. O experimento foi conduzido em amostras de charque contendo solução salina (20,0%) e *jerked beef* contendo essa solução salina acrescida de nitrito de sódio (0,02%). Após 60 dias de armazenamento, a quantidade das substâncias carbonilas foi de 2,77nmol mg⁻¹ de charque e nas de *jerked beef*, essa oxidação foi inibida em 61,0%. Esses resultados indicaram que o nitrito de sódio inibiu a ocorrência da reação de Fenton permanecendo o Fe no estado de Fe²⁺ enquanto que no charque o estado de Fe³⁺ catalisou mais eficientemente a formação do Proox.

REFERENCES

- Biscontin, T.M.B., Shimokomaki, M., Oliveira, S.F. and Zorn, T.M.T. (1996). An ultrastructural observation on charquis salted and intermediate moisture meat products. *Meat Sci.* **43**, 351-358.
- Brasil. Ministério da Agricultura. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Rio, 1962. p.174.
- Brasil. Portaria n. 3, de 17 de Janeiro de 2000. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Seção 1, n. 16, p. 16 -27.
- Estévez, M. and Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated in liver paté. *Meat Sci.* **68**, 551-558.
- Estévez, M., Ventanas, S. and Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect of colour and texture deterioration. *J. Food Sci.* **70**, 427-432.
- Fagan, J.M., Slezka, B.G. and Sohar, I. (1999). Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 751-757.
- Jing Li, S. and King, A. J. (1996). Lipid oxidation and myosin denaturation in dark chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3080–3084.
- Krzywicki, K. (1982). The determination of haem pigment in meat. *Meat Sci.* **7**, 29-32.
- Leistner, L. (1987). Shelf stable product and intermediate moisture foods based on meat. Rockland, L and Beuchat, L. B. (eds.) *Water activity theory and application to food*, Marcel Dekker Inc., New York, pp.295-328.
- Lund, M.N., Hviid, M.S. and Skibsted, L.H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Sci.* **76**, 226-233.
- Miller, D.K., Gómez-Basauri, J.V., Smith, V.L., Kanner, J. and Miller, D.D. (1994). Dietary iron in swine rations affects non-heme iron and TBARS in pork skeletal muscles. *J. Food Sci.* **59**, 747-750.
- Montero, P., Giménez, B., Pérez-Mateos, M. and Gomez-Guillén, M.C. (2005). Oxidation stability os muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *Food Chem.*, **93**, 17-23.
- Oozumi, T. and Xiong, Y.L. (2006). Identification of cross-linking site(s) of myosin heavy chains in oxidatively stressed chicken myofibrils. *J. Food Sci.* **71**, 196-199.
- Ooizumi, T. and Xiong, Y.L. (2008). Hydroxyl radical oxidation destabilizes subfragment-1 but not the rod of myosin in chicken myofibrils. *Food Chem.* **106**, 661-668.
- Park, D., Xiong, Y.L. and Alderton, A.L. (2006). Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chem.* **101**, 1239-1246.
- Pearson, A. M., Love, J.D., Shorland, F.B. (1977). Warmed-over flavor in meat, poultry and fish. *Adv. Food Res.* **23**, 1-74.
- Soares, A.L., Olivo, R., Shimokomaki, M. and Ida, E.I. (2004). Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed over flavor development in chicken *Pectoralis major*. *Braz. Arch. Bio. Technol.* **47**, 57-62.

- Shimokomaki, M., Franco, B.D.G.M., Biscontini, T.M., Pinto, M.F., Terra, N.N. and Zorn, T.M.T. (1998). Charqui meat are hurdle technology meat products. *Food Rev. Int.* **14**, 339-349.
- Shimokomaki, M., Yousef, E.Y. and Terra, N.N. (2003). Curing. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2nd edition, Academic Press, New York, 1702-1707.
- Shimokomaki, M., Rocha Garcia, C.E., Pedrão, M.R., Coró, F.A.G. and Souza, N.E. Charqui meats: past, present and future. *Modernization of Traditional Food Processes and Products*. Anna McElhatton, Paulo Sobral, Mustapha Missbah El Idrissi and Ferruh Erdogdu, eds. Springer Publishing Company, New York, Second volume, *in press*.
- Souza, M.A.A., Santos, G.R., Visentainer, J.V., Souza, N.E., Ida, E.I., Shimokomaki, M. Protein and lipid oxidation in commercial pale, soft, and exudative (PSE)-like meat from broiler chickens. *Submitted*
- Tarladgis, B.G., Pearson, A.M. and Dugan, L.R. Jr. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *J. Food Sci. Agr.* **5**, 602-604.
- Torres, E., Pearson, A. M., Gray, J.I., Booren, A.M. and Masami Shimokomaki. (1988) Effect of salt on oxidative changes in pre- and post-rigor ground beef. *Meat Sci.* **23**, 151-163.
- Torres, E., Pearson, A.M., Gray, J.I., Ku, P.K. and Shimokomaki, M. (1989). Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). *Food Chem.* **32**, 257-268.
- Torres, E.A.F.S., Simokomaki, M., Franco, B.D.G.M., Landgraf, M., Carvalho, J.B.C.C. and Santos, J.C. (1994). Parameters determining the quality of charqui, an intermediate moisture meat product. *Meat Sci.* **38**, 229-234.
- Trindade, M.A., Nunes, T.P., Contreras-Castillo, C.J. and Felício, P.E. (2008). Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18°C. *Ciênc. Tecnol. Alim.* **28**, 160-168.
- Youssef, E.Y., Garcia, C.E.R. and Shimokomaki, M. (2003). Effect of salt and color and warmed over flavor in charqui meat processing. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **46**, 595-600.
- Youssef, E.Y., Rocha Garcia, C.E., Figueiredo, B. and Shimokomaki, M. (2011). Residual levels of curing salts and its antioxidant effect in Jerked beef. *SEMINA: Ciênc. Agrár.* **32**, 645-650.
- Wanous, M.P., Olson, D.G. and Kraft, A.A. (1989). Pallet location and freezing rate effects on the oxidation and myoglobin in commercial fresh pork sausage. *J Food Sci.*, **54**, 549-552.

REFERÊNCIAS

- ADIBHATA, R.M., & HATCHER, J.F. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, 376-387, 2006.
- ANH, H.; KIM, J.; JO, C.; KIM, M & BYUN, M. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.88, 173-178, 2004.
- AKAGAWA, K.; SASAKI, D.; KUROTA, Y.; & SUYAMA, K. Formation of α -aminoadipic and γ -glutamic semialdehydes in proteins by the Maillard reaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1043, 129–134, 2005.
- ARDESTANI, N.; & YAZDANPARAST, V.O. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, 2402-2411, 2007.
- BADR, H. M.; & MAHMOUD, K. A. Antioxidant activity of carrot juice in gamma irradiated beef sausage during refrigerated and frozen storage. **Food Chemistry**, v.127, 1119-1130, 2011.
- BARBUT, S.; SOSNICKI, A. A.; LONERGAN, S. M.; KNAPP, T.; CIOBANU, D. C.; GATGLIFFE, L. J.; HUFF-LONERGAN, E.; & WILSON, E.W. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. **Meat Science**, v.79, 46-63, 2008.
- BARBUT, S. Pale, soft, and exudative poultry meat. Reviewings ways to manage at the processing plant. **Poultry Science**, v.88, 1506-1512, 2009.
- BATIFOULIER, F.; MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; & RENERRE, M. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. **Meat Science**, v.61, 389-395, 2002.
- BERTRAM, H. C.; KRISTENSEN, M.; ØSTDAL, H.; BARON, C. P.; YOUNG, J. F.; & ANDERSEN, H.J. Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins?. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, 2342-2348, 2007.
- BISCONTINI, T. M. B.; SHIMOKOMAKI, M.; OLIVEIRA S. F.; & ZORN, T. M. T. An ultrastructural observation on charquis salted and intermediate moisture meat products. **Meat Science**, v.43, 351-358, 1996.
- BOLES, J.A.; PARRISCH, F.C.; HUIATT, J.W.; & ROBSON, R.M. Effect of porcine stress syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar/cytoskeletal protein. **Journal of Animal Science**, v.70, 454-464. 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento de inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Rio de Janeiro. (1962).

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000). Regulamento técnico de identidade e qualidade de carne bovina salgada curada dessecada ou jerked beef. Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000).
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. (2003). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.
- BUETTNER, G.R.; & JURKIWICZ, B.A. Chemistry and Biochemistry of ascorbic acid. **Handbook of Antioxidants**. (pp.91-115).; 1996. New York: Marcel Decker.
- CARSLÉN, C.U.; MOLLER, J.K.S.; & SKIBSTED, L.H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v.245, 485-498, 2005.
- CAVA, R.; LADERO, L.; GONZÁLEZ, S.; CARRASCO, A.; & RAMÍREZ, M. R. Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, 76-81, 2009.
- CHAN, J. T. Y.; OMANA, D. A.; & BETTI, M. Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat. **Food Chemistry**, v.127, 109-117, 2011.
- CHEAH, K. S.; & CHEAH, A. M. Mitochondrial calcium transport and calcium-activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.674, 70-84, 1981a.
- CHEAH, K. S.; & CHEAH, A. M. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A2 and the interaction of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.638, 40-49, 1981b.
- CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M.; & WARING, J. C. Phospholipase A₂ activity, calmodulin, Ca²⁺ and meat quality in young and adult halothane-sensitive and halothane-insensitive British Landrace pigs. **Meat Science** v.17, 37-53, 1986.
- CHELH, I.; GATELLIER, P.; & SANTÉ-LHOUTELLIER, V. Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. **Meat Science**. v.76, 210-215, 2007.
- CHEN, T.; ZHOU, G-H.; XU, X.; ZHAO, G.; & LI, C. Phospholipase A₂ and antioxidant enzyme activities in normal and PSE pork. **Meat Science**, v.84, 143-146, 2010.
- COSGROVE, D. J. The isolation of myoinositol pentaphosphates from hydrolysates of phytic acid. **Biochemical Journal**, v.89, 172-175, 1963.
- DEAK, N. A.; & JOHNSON, L. A. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.84, 369-376, 2007.
- DECKER, E. A.; & XU, Z. Minimizing rancidity in muscle. **Food Technology**, v.52, 54-59, 1998.

- DROVAL, A.A., BINNECK, E., MARIN, S.R., PAIÃO, F.G., OBA, A., NEPOMUCENO, A.L., SHIMOKOMAKI, M. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism in Chicken Skeletal Muscle Ryanodine. *Gene*. **Genetical Molecular Research**, 2011. Aceito para publicação.
- DOST, K.; & TOKUL, O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica**, v.558, 22-27, 2006.
- EATON, P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. (Review). **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, 1889-1899, 2006.
- ESTÉVEZ, M.; & CAVA, R. Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated in liver paté. **Meat Science**, v.68, 551-558, 2004.
- ESTEVEZ, M.; VENTANAS, S., & CAVA, R. Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect of colour and texture deterioration. **Journal of Food Science**, v.70, 427-432, 2005.
- ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S., & CAVA, R. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver paté. **Meat Science**, v.74, 396-403, 2006.
- ESTÉVEZ, M.; KYLLI, P.; PUOLANNE, E.; KIVIKARI, R.; & HEINONEN, M. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsion. **Meat Science**, v.80, 1290-1296, 2008a.
- ESTÉVEZ, M.; MORCUENDE, D.; & VENTANAS, S. Determination of oxidation. In L. M.L. Mollet, & F. Toldrá (Eds.), **Handbook of processed meat and poultry analysis** (pp. 141–162). Boca Raton FL, USA: CRC Press, 2008b.
- ESTÉVEZ, M.; OLLILAINEN, V.; & HEINONEN, M. Analysis of protein oxidation markers – α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes – in food proteins by using LC–ESI multi-stage tandem MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, 3901–3910, 2009.
- ESTÉVEZ, M.; & HEINONEN, M. Effect of phenolic compounds on the formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes from myofibrillar protein oxidized by copper, iron and myoglobin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, 4448-4455, 2010.
- ESTEVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems. A review. *Meat Science*, v. 89, n. 3, 259-279, 2011.
- EVANS, J.M., SPENCER, D.M., ZWEIFACH, A., & LESLIE, C.C. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, 30150-30160, 2001.

- EVENEPOEL, P.; CLAUS, D.; GEYPENS, B.; MAER, B.; HIELE, M.; & RUTGEERTS, P. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein related to gastric acid suppression therapy. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.12, 10-11, 1998.
- FAGAN, J. M.; SLESKA, B. G.; & SOHAR, I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.31, 751-757, 1999.
- FENG, J.; ZHANG, M.; ZHENG, S.; XIE, P.; & MA, A. Effects of high temperature on multiple parameters of broilers in vitro and in vivo. **Poultry Science**, v.87, 2133-2139, 2008.
- FUENTES, V.; VENTANAS, J.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M.; & VENTANAS, S. Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. **Meat Science**, v. 85, 506–514, 2010.
- FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; LEON, S.; KHANNA, V. K.; WEILER, J. E.; O'BRIEN, P. J.; & LENAN, D. H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, v.253, 448-451, 1991.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C & PROTASI, F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. **Physiology Review**, 77, 699-729, 1997.
- GANENDEN, R., CARTER, E., SOVELL, T., WILMER, F & WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes and Infection**, v.8, 1006-1015, 2006.
- GANHÃO, R.; MORCUENDE, D.; & ESTÉVEZ, M. Tryptophan depletion and formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in porcine burger patties with added phenolic-rich fruit extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 3541–3548, 2010a.
- GANHÃO, R.; MORCUENDE, D.; & ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. **Meat Science**, v.85, 402–409, 2010b.
- GARCIA, F.A.; MIZUBUTI, I.Y.; KANASHIRO, M.Y.; SHIMOKOMAKI, M. Intermediate moisture meat product: biological evaluation of charqui meat protein quality. **Food Chemistry**, v.75, 405-409, 2001.
- GATELLIER, P.; KONDOYAN, A.; PORTANGUEN, S.; & SANTÉ-LHOUELIER, V. Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. **Meat Science**, v.85, 645–650, 2010.
- GRAF, E.; & EMPSON, K. L. Phytic acid. A natural antioxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, 11647-11650, 1987.
- GRAF, E.; & EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, 61-69, 1990.
- GRAY, J.I., & PEARSON, A.M. (1987). Rancidity and warmed over flavor in meat. **Advances in Meat Research**, 3, AVI Book, New York.

GRUNE, T.; JUNG, T.; MERKER, K.; & DAVIES, K. J. A. Decreased proteolysis caused by protein aggregation inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid and “aggresomes” during oxidative stress, aging and disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, 2519-2530, 2004.

GUARNIERI, P. A.; SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SCHNEIDER, J. P.; MACEDO, R. M.; IDA, E. I.; & SHIMOKOMAKI, M. Preslaughter handling with water shower spray inhibits PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler breast meat in commercial plant. Biochemical and ultrastructural observations. **Journal of Food Biochemistry**, v.28, 269-277, 2004.

HARBACH, A P., COSTA, M.C.R., SOARES, A L., BRIDI, A M., SHIMOKOMAKI. M., SILVA, C.A., & IDA, E.I. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**,100, 1630-1633, 2007.

HERRING, J. L.; JONNALONGADDA, S. C.; NARAYANAN, V. C.; & COLEMAN, S. M. Oxidative stability of gelatin coated pork at refrigerated storage. **Meat Science**, v. 85, 651-666, 2010.

HUFF-LONERGAN, E.; & LONERGAN, S. M. Mechanisms of water holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, v.71, 194-204, 2005.

JENKINS, G.M., & FROHMAN, M.A. Phospholipase D: a lipid centric review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, 2305-2316, 2005.

KANNER, J.; SALAN, M. A.; HAREL, S.; & SHEGALOVICH, H. Lipid peroxidation of muscle food: The role of the cytosolic fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, 242–246, 1991.

KINI, R.M. Phospholipase A₂: A complex multifunctional protein puzzle. In: R.M (Ed) Venon phospholipases A₂ enzymes: structure, function and mechanism. (pp.1-28). 1997. Wiley:Chichester.

KISSEL, C.; SOARES, A. L.; ROSSA, A.; & SHIMOKOMAKI, M. Broiler PSE (*Pale, Soft, Exudative*) meat functional properties in the mortadella production. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.52, 213-21, 2009.

KUDO, I. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: foreword. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, 1157, 2004.

KHATTAB, R.; GOLDBERG, E.; & THIYAN, L. U. Quantitative analyses and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid and condensed tannis in canola. **Food Chemistry**, v.122, 1266-1272, 2010.

KUCHENMEISTER, U.; KUHN, G.; & ENDER, K. Pré-slaughter handling of pigs and the effect of heart rate, meat quality, including tenderness and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. **Meat Science**, v.71, 690-695, 2005.

KRZYWICKI, K. The determination of haem pigment in meat. **Meat Science**, v.7, 29-32, 1982.

LANGER, R.O.S., SIMÕES, G.S., SOARES, A.L., OBA, A., ROSSA, A., SHIMOKOMAKI, M., & IDA, E.I. Broiler transportation conditions in a Brazilian commercial line and the occurrence of breast PSE (*Pale, Soft, Exudative*) meat and DFD-like (*Dark, Firm, Dry*) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, 1161-1167, 2010.

LARA, J. N. F.; SENIGALIA, S. W. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; DUTRA, I. S.; PINTO, M. F.; & SHIMOKOMAKI, M. Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meats. **Meat Science**, v.65, 609-613, 2003.

LEAL, E, S. **Extração, obtenção e caracterização parcial de ácido fítico do germe grosso de milho e aplicação como antioxidante**. 86p., 2000. (Tese de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil).

LIU, G.; & XIONG, Y.L. Thermal transitions and dynamic gelling properties of oxidatively modified myosin, β -lactoglobulin, soy 7S globulin and their mixtures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, 1728-1734, 2000.

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

LUND, M. N.; HVIID, M. S.; SKIBSTED, L. H. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Science**, v.76, 226-233, 2007b.

LUND, M. N.; LUXFORD, C.; SKIBSTED, L. H.; & DAVIES, M. J. Oxidation of myosin by heme protein generates myosin radicals and protein cross-links. **Biochemistry Journal**, v. 410, 565-574, 2008.

LUND, M. N.; & BARON, C. P. Protein oxidation in foods and food quality. In L. H. Skibsted, J. Risbo, & M. L. Andersen (Eds.), **Chemical deterioration and physical instability of food and beverages** (pp. 36–69), 2010. Cambridge: Woodhead Publishing Ltda.

LUND, M. N.; HEINONEN, M.; BARON, C. P.; & ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular Nutrition Food Research**, v.55, 83-95, 2011.

LYNCH, M. P.; FAUSTMAN, C.; SILBART, L. K.; ROOD, D.; & FURR, H. Detection of lipid-derived aldehydes and aldehyde: protein adducts in vivo in beef. **Journal of Food Science**, v.66, 1093-1099, 2001.

MARTINAUD, A.; MERCIER, Y.; MARINOVA, P.; TASSY, C.; GATELLIER, P.; & RENERRE, M. Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, 2481–2487, 1997.

MERCIER, Y.; GATELLIER, Ph.; & RENERRE, M. Relationships between lipid and protein oxidation in different beef muscles. **Proceedings 41st international congress of meat science and technology** (pp. 562–564), 1995. San Antonio, USA.

MERCIER, Y.; GATELLIER, Ph.; & RENERRE, M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. **Meat Science**, v.66, 467–473, 2004.

MICKELSON, J.R & LOUIS, C.F. Malignant hyperthermia excitation-contraction coupling, Ca^{2+} regulation defects. **Physiological Review**, 76, 537-592, 1996.

MITCHELL, M. A.; & KETTLEWELL, P. J. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problem. **Poultry Science**, v.77, 1803-1814, 1998.

MONTERO, P.; GIMÉNEZ, B.; PÉREZ-MATEOS, M.; & GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. **Food Chemistry**, v.93, 17–23, 2005.

MORRISEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GALVIN, K., KERRY, J. P.; & BUCKLEY, D. J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v.49, S73–S86, 1998.

MURAKAMI, M., & KUDO, I. Phospholipase A₂. **Journal of Biochemistry**, v.131, 285-292, 2002.

ODA, S. H. I.; NEPOMUCENO, A. L.; LEDUR, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; IDA, E. I.; & SHIMOKOMAKI, M. Quantitative differential expression of alpha and beta ryanodine receptor genes in PSE (Pale, Soft, Exudative) meat from two chicken lines: broiler and layer. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.52, 1519-1525, 2009.

OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; & SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal Food Biochemistry**. v.25, 271-283, 2001.

OOZIMU, T.; & XIONG, Y. L. Identification of cross-linking site(s) of myosin heavy chains in oxidatively stressed chicken myofibrils. **Journal of Food Science**, v.71, 196-199, 2006.

OOZIMU, T.; & XIONG, Y. L. Hydroxyl radical oxidation destabilizes subfragment-1 but not the rod of myosin in chicken myofibrils. **Food Chemistry**, v.106, 661-668, 2008.

ØSTDAL, H.; SKIBSTED, L. H.; ANDERSEN, H. J. Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H₂O₂-activated metmyoglobin and other proteins. **Free Radical Biology Medicine**, v.23, 754–761, 1997.

OTTINI, L., MARZIALI, G., CONTI, A., CHARLESWORTH, A.E., & SOVENTINO, V. Alpha and beta isoforms of ryanodine receptors from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian RyR1 and RyR3. **Journal of Biochemistry**, v.315, 207-216, 1996.

- PARK, D.; XIONG, Y. L.; & ALDERTON, A. L. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. **Food Chemistry**, v.101, 1239-1246, 2006a.
- PARK, D.; XIONG, Y. L.; ALDERTON, A. L.; & OOZUMI, T. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. **Food Chemistry**, v.101, 1239–1246, 2006b.
- PARK, D.; & XIONG, Y. L. Oxidative modifications of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. **Food Chemistry**, v.103, 607-616, 2007.
- PATON, G.; NOAILLY, M.; & MOSSOYAN, J.C. Conformational preferences and intramolecular interactions of myo-inositol hexakisphosphoric acid by ¹H and ³¹P NMR studies. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v.12, 401-407, 1999.
- PINTO, M. F.; PONSANO, E. M. G.; FRANCO, B. D. G. M.; & SHIMOKOMAKI, M. Charqui meat as fermented meat products: role of bacteria for some sensorial properties development. **Meat Science**, v.61, 187-191, 2002.
- POULSEN, K. A.; YOUNG, J. F.; THEIL, P.; KOLKO, M.; OKSBJERG, N.; & LAMBERT, I.H. Role of phospholipase A₂ in the induction of Drip loss in Porcine muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, 1970-1976, 2007.
- PUOLANNE, E.; & HALONEN, M. Theoretical aspects of water holding in meat. **Meat Science**, v.86, 151-165, 2010.
- PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition. **Libensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.30, 630-647, 1997.
- RABABAH, T.; HETTIARACHCHY, N.S.; HORAX, R.; ESWARANANDAN, S.; MAUROMOUSTAKOS, A.; & DICKSON, J. Effect of electron beam irradiation and storage at 5 °C on thiobarbituric acid reactive substances and carbonyl content in chicken breast meat infused with antioxidants and selected plant extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, 8236-8241, 2004.
- RABABAH, T.; OVER, K.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAN, S.; & DAVIES, B. Infusion of plant extracts during processing to preserve quality attributes of irradiated chicken breasts over months storage at -20°C. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.34, 287-307, 2010.
- RASHA-STEP, J., TATOYAN, A., DUNCAN, R., ANN, D., PUSHPA-REHKA, T.R., & SEVANI, A. Phospholipid peroxidation induces cytosolic phospholipase A₂ activity: membrane effects versus enzyme phosphorylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.434, 44-54, 1997.
- REBECCHI, M.J & PENTYALA, S.N. Structure, function and control of phosphoinositide – specific phospholipase C. **Physiological Reviews**, 80, 1291-1335, 2000.

REQUENA, J. R.; CHAO, C. C.; LEVINE, R. L.; & STADMAN, E. R. Glutamic a aminoacidic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.98, 69–74, 2001.

ROWE, L. J.; MADDOCK, K. R.; LONERGAN, S. M.; & HUFF-LONERGAN, E. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**, v.82,785–793, 2004.

RHEE, K. S.; ZIPRIN, Y. A.; & ORDONEZ, G. Catalysis of lipid oxidation in raw and cooked beef by metmyoglobin-H₂O₂, nonheme iron and enzyme systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, 1013-1107, 1987.

SAEED, S.; GILLIES, D.; WAGNER, G.; & HOWELL, N.K. ESR and NMR spectroscopy studies on protein oxidation and formation of dityrosine in emulsions containing oxidised methyl linoleate. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, 1385-1392, 2006.

SANTÉ-LHOUELIER, V.; THÉRON, L.; CEPEDA, M.; GRAJALES, A.; & GATELLIER, P. Comparison of proteolysis in native, heat-treated and aged proteins from turkey meat. **British Poultry Science**, v.49, 308–314, 2008a.

SANTÉ-LHOUELIER, V.; ENGEL, E.; AUBRY, L.; & GATELLIER, P. Effect of animal diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and *in vitro* digestibility. **Meat Science**, v.79, 777-783, 2008b.

SANTÉ-LHOUELIER, V.; ASTRUC, T.; MARINOVA, P.; GRÉVE, E.; & GATELLIER, P. Effect of meat cooking on physicochemical state and *in vitro* digestibility of myofibrillar proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, 1488–1494, 2008c.

SHIMIZU, Y.; KIRIAKE, S.; OHTUBO, S.; & SAKAI, T. Effect of NaCl on protein and lipid oxidation in frozen yellowtail meat. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, 923–925, 2009.

SHIMOKOMAKI, M.; FRANCO, B. D. G. M.; BISCONTINI, T. M.; PINTO, M. F.; TERRA, N. N.; & ZORN, T. M. T. Charqui meat are hurdle technology meat products. **Food Reviews International**, v.14, 339-349, 1998.

SHIMOKOMAKI, M., YOUSSEF, E.Y., TERRA, N.N. Curing. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P.M. **Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition**. 2nd ed. London: Elsevier, p. 1702-1708. 2003.

SHIMOKOMAKI, M. Charque, jerked beef e carne de sol. In: Shimokomaki et al. ed., **Atualidades em Ciência e Tecnologia de carnes**. Varela, São Paulo, p.47-62. 2006.

SIMÕES, G. S.; OBA, A.; MATSUO, T.; ROSSA, A.; SHIMOKOMAKI, M.; & IDA, E. I. Vehicle thermal microclimate evaluation during Brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.52, 195-204, 2009.

SKIBSTED, L. H.; MIKKELSEN, A.; BERTELSEN, G.; in: SHAHIDI, F. **Flavour of Meat, Meat Products and Seafoods** (pp. 217–256), 1998. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

SIX, D.A., & DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1547, 370-378, 2001.

SOARES, A. L. **Ação do ácido fítico e vitamina E na oxidação lipídica e aroma de requeijado em files de peito de frango**. 105p.; 1998. (Tese de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil).

SOARES, A. L.; IDA, E. I.; MIYAMOTO, S.; BLAZQUEZ, F. J. H.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.W.; & SHIMOKOMAKI. Phospholipase A₂ activity in poultry PSE, pale, soft, exudative, meat. **Journal Food Biochemistry**, v.27, 309-320, 2003.

SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; & IDA, E. I. Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed over flavor development in chicken *Pectoralis major*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.47, 57-62, 2004.

SOARES, A. L.; MARCHI, D. F.; MATSUSHITA, M.; GUARNIERI, P. D.; DROVAL, A.; IDA, E. I.; & SHIMOKOMAKI, M. Lipid oxidation and changes in fatty acids profile related to broiler breast meat colour abnormalities. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.52, 1513-1518, 2009.

SOMASUNDAR, P.; RIGGS, P.; JACKSON, B.J.; CUNNINGHAM, C.; DAVIS, L & FADDEN, D.W. Inositol hexaphosphate (IP₆): A novel treatment for pancreatic cancer. **Journal of Surgical Research**, v.126, 199-203, 2005.

SONG, J.K., & RHEE, J.S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochemical et Biophysica Acta**, v.1547, 370-378, 2001.

SORENTINO, V & VOLPE, P. Ryanodine receptors: how many, where and why? **Trends in Pharmacology Science**, 14, 98-103, 1993.

SOVER, A.; & HULTIN, H.O. Kinetics of oxidation of the lipids and proteins of cod sarcoplasmic reticulum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, 2127-2134, 2000.

SOUZA, M.A.A., SANTOS, G.R., VISENTAINER, J.V., SOUZA, N.E., IDA, E.I & SHIMOKOMAKI, M. Protein and lipid oxidation in commercial PSE-like (pale, soft, exudative) meat from broiler chickens. Enviado para a **Food Chemistry** em 25 de julho de 2011.

SRINIVASAN, S.; XIONG, Y. L.; & DECKER, C. A. Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi-like material by antioxidants and combination of pH, NaCl and buffer type in the washing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, 119-125, 1996.

SRINIVASAN, S.; & HULTIN, H. O. Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymatic free-radical-generating systems. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, 310-320, 1997.

STADMAN, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, 315-325, 1990.

STADMAN, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalysed reactions. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.62, 797-821, 1993.

STADMAN, E. R.; & BERLLET, B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. **Chemical Research Toxicology**, v.10, 485-494, 1997.

STADMAN, E. R.; & LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in protein. **Amino Acids**, v.25, 207-218, 2003.

STAPELFELDT, H.; BJERRUM, K.; & SKIBSTED, L.H. Ellman's reagent for determination of the heat treatment of milk powder. Improved analytical procedure based on a stopped-flow kinetic study. **Milchwissenschaft**, v.52, 145-149, 1997.

STRASSBURG, G.M & CHIANG, W. Genetic basis for Pale, Soft and Exudative Turkey meat. Proceedings of the 56th. **American Meat Science**. Association Reciprocal Meat Conference. 15-18 de junho, Colúmbia, Missouri, 2003.

STRASSBURG, G. M.; & CHIANG, W. Pale, soft, exudative turkey – The role of ryanodine receptor variation in meat quality. **Poultry Science**, v.88, 1497-1505, 2009.

SUN, W.; ZHAO, M.; YANG, B.; ZHAO, H.; & CUI, C. Oxidation of sarcoplasmic proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility. **Meat Science**, v.88, 462-467, 2011a.

SUN, W.; CUI, C.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; & YANG, B. Effects of composition and oxidation of proteins on their solubility, aggregation and proteolytic susceptibility during processing of Cantonese sausage. **Food Chemistry**, v.124, 336-341, 2011b.

TARLADGIS, B. G., PEARSON, A. M., & DUGAN, L.R.Jr. Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.19645, 602-604, 1964.

TERRA, N.N & BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados: técnicas de controle de qualidade**. 121p.; 1988. SP:Nobel.

TOKUR, B.; & KORKMAZ, K. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. **Food Chemistry**, v.104, 754-760, 2007.

TORRES, E. A. F. S.; SHIMOKOMAI, M.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; CARVALHO, J. B. C. C.; & SANTOS, J.C. Parameters determining the quality of charqui, an intermediate moisture meat product. **Meat Science**, v.38, 229-234, 1994.

VENTANAS, S.; ESTÉVEZ, M.; TEJEDA, J. F.; & RUIZ, J. Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. **Meat Science**, v.72, 647-655, 2006.

VENTANAS, S.; VENTANAS, J.; TOVAR, J.; GARCIA, C.; & ESTÉVEZ, M. Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. **Meat Science**, v.77, 246–256, 2007.

XIONG, Y. L.; & DECKER, E. A. Alteration of muscle proteins functionality by oxidative and antioxidative processes. **Journal of Muscle Foods**, v. 6, 139-160, 1995.

XIONG, Y. L. Protein oxidation and implications for muscle foods quality. **Antioxidants in muscle foods**. (pp. 85-111)., 2000, New York: Wiley.

ZHANG, W.; XIAO, S.; LEE, E. J.; & AHN, D. U. Consumption of oxidized oil increases oxidative stress in broilers and affects the quality of breast meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, 969–974, 2011.

ZIOBER, I. L.; PAIÃO, F. G.; MARIN, S. R. R.; MARCHI, D. F.; COUTINHO, L. L.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L.; & SHIMOKOMAKI, M. Molecular cloning of α R_{YR} hotspot region 1 from broiler chicken. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, 225-231, 2009.

ZIOBER, I. L.; PAIÃO, F. G.; MARCHI, D. F.; COUTINHO, L. L.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L.; & SHIMOKOMAKI, M. Heat and chemical stress modulate the expression of the α -R_{YR} gene in broiler chickens. **Genetic and Molecular Research**, v.9, 1258-1266, 2010.

YOUSSEF, E.Y., GARCIA, C.E.R., & SHIMOKOMAKI, M. Effect of salt and color and warmed over flavor in charqui meat processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, 595-600, 2003.

YOUSSEF, E. Y.; GARCIA, C. E. R.; YAMASHITA, F.; & SHIMOKOMAKI, M. Chemical basis for beef charqui meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, 719-724, 2007.

WANG, R. R.; PAN, X. J.; & PENG, Z. Q. Effects of heat exposure on muscle oxidation and protein functionalities of *Pectoralis major* in broilers. **Poultry Science**, v.88, 1078-1084, 2009.

WILHELM, A. E.; MAGANHINI, M. B.; BLAZQUEZ, F. J.; IDA, E. I.; & SHIMOKOMAKI, M. Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. **Food Chemistry**, v.119, 1201-1204, 2010.