



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DENIS FABRÍCIO MARCHI

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRUTURAIS EM FILÉS  
PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) DE FRANGOS DURANTE O  
ARMAZENAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE  
DA CARNE**

---

Londrina  
2012

DENIS FABRÍCIO MARCHI

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRUTURAIS EM FILÉS  
PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) DE FRANGOS DURANTE O  
ARMAZENAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE  
DA CARNE**

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:** Massami Shimokomaki, PhD

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Lourenço Soares

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M317ab	<p>Marchi, Denis Fabrício. Alterações bioquímicas e estruturais em filés PSE (pale, soft, exudative) de frangos durante o armazenamento e sua relação com a qualidade da carne/ Denis Fabrício Marchi. – Londrina, 2012. 79 f.: il.</p> <p>Orientador: Massami Shimokomaki. Coorientador: Adriana Lourenço Soares. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2012. Inclui bibliografia</p> <p>1. Carne – Qualidade – Teses. 2. Enzimas proteolíticas – Teses. 3. Carne de ave – Teses. 4. Carne – Conservação – Teses. 5. Indústria avícola – Teses. I. Shimokomaki, Massami. II. Soares, Adriana Lourenço. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.</p> <p>CDU 664.91</p>
--------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

DENIS FABRÍCIO MARCHI

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRUTURAIS EM FILÉS PSE  
(PALE, SOFT, EXUDATIVE) DE FRANGOS DURANTE O  
ARMAZENAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE DA  
CARNE**

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**

---

Orientadora. Prof. Dr. Massami Shimokomaki  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. José Fernando Machado Menten  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício  
Universidade Estadual de Campinas –  
UNICAMP

---

Prof. Dr. Pedro Veiga Rodrigues Paulino  
Universidade Federal de Viçosa – UFV

---

Profa. Dra. Ana Paula F. R. Loureiro  
Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 03 de setembro de 2012.

## **DEDICO**

*Aos meus pais, Toninho e Fátima,  
Elementos essenciais na minha vida.  
Meus exemplos de vida e amor.  
Obrigado por sonharem os meus sonhos!*

*Ao meu irmão Kadu,  
Meu Amigo e Parceiro.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Massami Shimokomaki, o qual me ensinou e ainda me ensina os caminhos da ciência e da vida. Foram dez anos de convivência com esse admirável Pesquisador e exemplo de amor à ciência que me proporcionaram tanto o crescimento profissional quanto pessoal. Agradeço os conselhos, a amizade e principalmente a confiança atribuída no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares, pela amizade, conselhos, dedicada orientação e por estar sempre presente quando mais precisei durante estes dez anos de caminhada. Exemplo de pessoa e profissional que admiro muito e fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa e auxílio financeiro deste trabalho.

À Fundação Araucária e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro destinado à esta pesquisa.

Aos Professores Dra. Elza Louko Ida e Dr. Alexandre Oba pela amizade e conselhos dispensados para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Ana Paula Bracarense do Departamento de Medicina Veterinária pelos auxílios e espaço cedidos para a realização dos testes iniciais de análise microscópica.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernández Blazquez da Universidade de São Paulo pela valiosa colaboração nas análises de microscopia eletrônica.

À empresa Copacol, pela atenção, amostras e espaço dispensados para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta instituição pelos ensinamentos e atenção dispensada.

À Gleice Rocha dos Santos, pela amizade, atenção e pelas constantes colaborações nesta caminhada de quatro anos. Muito obrigado por tudo.

Aos alunos de Mestrado e Doutorado e Pós-Doutorado do Grupo de Carnes desta instituição, em especial: Fernanda Paião, Cassiana Kissel, Letícia Murate, Lara Ferracin e Gislaine Simões, pela colaboração, amizade e convivência durante estes anos.

Aos estagiários do Grupo de Carnes desta instituição, em especial à Flávia Maria Beteto pelos auxílios destinados à elaboração deste trabalho.

Aos Funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta instituição, em especial à Neusa, pela ajuda e atenção sempre dispensadas.

Aos meus grandes amigos: Fabrício Simões, Melícia Galdeano, Cleusa Weber, Luciana Bernd e Eduardo Hatada pelo incentivo, amizade e por estarem sempre presentes no decorrer destes 4 anos de trabalho, muito obrigado pela amizade, consideração e companheirismo.

Ao Instituto Federal do Paraná – Câmpus Paranavaí, pelo apoio e liberação para o término do Doutorado, em especial à Suellen Jensen e ao Carlos Barão pela ajuda e principalmente pela amizade.

Aos colegas do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, em especial: Michele Rosset, Luciana Fontinelle, Camila Moura, Fernanda Fiorda, Thiago Montagner e Caroline Caliari pela convivência, amizade e parceria.

A Deus, pela vida e por todos os momentos dela, inclusive os difíceis.

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!

(Mahatma Gandhi)

MARCHI, Denis Fabrício. **Alterações bioquímicas e estruturais em filés PSE (Pale, Soft, Exudative) de frangos durante o armazenamento e sua relação com a qualidade da carne.** 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações bioquímicas e estruturais em filés PSE de frangos durante o armazenamento e sua relação com a qualidade da carne. As aves avaliadas neste estudo foram abatidas em um frigorífico da região Oeste do Paraná e o seu filé classificado como PSE ou Controle, baseado no seu valor de pH 3 h (pH3h) *post mortem*. Filés com pH3h  $\leq 5,80$  foram classificados como PSE, enquanto que pH3h  $> 5,90$  como Controle (Normal). No período de 24 h *post mortem*, os filés foram novamente submetidos à medida de pH e também à análise dos parâmetros de cor L\*, a\*, b\*. As amostras permaneceram armazenadas a  $0 \pm 1$  °C por 4, 24, 72 e 120 h *post mortem* para a realização das análises de Perda de Peso por Cozimento (PPC), Força de Cisalhamento (FC), Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM), Proteínas Miofibrilares (PM), Colágeno Solúvel (CS) e Total (CT), Eletroforese (SDS-PAGE), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Atividade proteolítica das catepsinas. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de Tukey e *t-student* utilizando o programa STATISTICA 7.0, com exceção dos resultados de SDS-PAGE e MET. Após 24 h, o pH das amostras PSE sofreu um drástico declínio e o valor de L\* apresentou valores superiores ( $p \leq 0,05$ ) aos observados nos filés Controle. No período de 24 h *post mortem*, a PPC foi superior na carne PSE, enquanto a FC24h mostrou-se inferior a dos filés Controle, provavelmente devido à ação proteolítica precoce das calpaínas sobre a estrutura miofibrilar, observada também por IFM, PM e MET. Além disso, fragmentos originados da degradação da troponina T foram visualizados 4 h *post mortem* por SDS-PAGE nas carnes PSE, enquanto que no Controle surgiram apenas 24 h *post mortem* demonstrando a ativação precoce das calpaínas. Os teores de colágeno solúvel e total mostraram-se inferiores nos filés PSE até o período de 72 h *post mortem*, o que se deve à ação mais prolongada das catepsinas B + L e L, as quais mostraram-se constantes por um intervalo de tempo superior nas carnes PSE, enquanto que nos filés Controle foi reduzida pela metade 24 h *post mortem*. A degradação do endomísio, composto principalmente de colágeno foi facilmente visualizada por MET em filés PSE, enquanto que nas carnes Controle não houve uma modificação marcante. Isto provavelmente se deve à atividade prolongada das catepsinas B + L, as quais podem ter fragmentado esta região e também a estrutura miofibrilar dos filés PSE durante o seu armazenamento, conforme visualizado por MET. Portanto, carnes PSE apresentam suas propriedades funcionais melhoradas nas primeiras horas *post mortem* devido à degradação proteica. Entretanto, durante o armazenamento, a ação proteolítica prolongada afeta a integridade da estrutura muscular prejudicando as propriedades funcionais da carne.

**Palavras-chave:** Calpaínas. Catepsinas. Colágeno. Propriedades funcionais.

MARCHI, Denis Fabrício. **Biochemical and structural changes in broiler chickens PSE (*Pale, Soft, Exudative*) breast fillets during meat ageing and their relationship to meat quality**. 2012. 79 p. Thesis (Doctorate in Food Science) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the biochemical and structural changes in broiler chickens PSE (Pale, Soft, Exudative) breast fillets during meat ageing and their relationship to meat quality. These birds were slaughtered in a commercial plant located in the Parana west region state and the breast fillets meat classified as PSE and Control (Normal) samples based on the pH values at 3 h (pH3h) post mortem. Samples under pH3h  $\leq 5.80$  values were classified as PSE meat while samples under values of pH  $> 5.90$  were considered as Control samples. After 24 h post mortem, meat samples were again submitted to pH values evaluation and also to the color parameters measuring L\*, a\*, b\* values. Meat samples were stored at  $0 \pm 1$  °C for 4, 24, 72 and 120 h post mortem for Cooking Loss (CL), Shear Force (SF) values, Myofibril Fragmentation Index (MFI) was determined as the indirect measurement of calpains enzymes activity, Myofibrils Proteins (MP), Soluble and Total Collagen and cathepsins activities. Those proteins fractions were evaluated by electrophoresis in SDS/PAGE technique. Finally, the samples conditioning were monitored by transmission electron microscopy (TEM). The obtained results were submitted to the Tukey and t-student tests using a STATISTICA 7.0 Program but the results of SDS/PAGE and of course, TEM. A dramatically PSE meat sample pH values decrease was observed and the L\* values were higher than the control samples. At 24 h conditioning period although CL24h values were higher in PSE meat conversely the SF24h values were lower that control samples probably because of precocious calpains enzymes activities over sarcomere components structure. These results were corroborated by the MFI, MP and TEM results. In addition peptides fragments probably originated from the troponin T degradation were observed at 4 h post mortem by SDS/PAGE in PSE meat samples while in control meat samples these fragments were only observed after 24 h post mortem suggesting an earlier calpain system activation in the former samples. Up to 72 h, quantitatively soluble and total collagen fractions showed to be lower in PSE meat samples indicating the extended B + L and L cathepsins enzymes activities while in control samples these activities presented at least half values at 24 h post mortem. The collagen present at the endomysium suffered degradation as seen by TEM in PSE meat samples not observed so easily in control samples. These facts were the indication of extended B + L cathepsins enzymes activities in PSE meat throughout conditioning. Lastly, PSE meat samples presented a better functional properties at the conditioning first hours probably because of enzymatically protein degradation. Thereafter at the later stage of conditioning the extended proteases activities would affect the muscle structure integrity jeopardizing the meat functional properties.

**Key-words:** Calpains. Cathepsins. Collagen. Functional Properties.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura do músculo esquelético .....	17
<b>Figura 2</b> – Estrutura do Sarcômero .....	18
<b>Figura 3</b> – Esquema representativo do sarcômero e algumas de suas proteínas estruturais (nebulina, titana e desmina).....	18
<b>Figura 4</b> – Representação de uma fibra colágena.....	19
<b>Figura 5</b> – Sistema muscular e o mecanismo de contração muscular, o qual depende do estímulo nervoso que se propaga pelo sistema T fazendo com que o retículo sarcoplasmático libere íons $Ca^{2+}$ , iniciando o processo de contração (b).....	21
<b>Figura 6</b> – Esquema representativo do provável mecanismo de relação entre atividade das calpaínas e o prejuízo das propriedades funcionais da carne de frango PSE .....	34

### Artigo Científico 1

<b>Fig. 1</b> – Cooking Loss of Control and PSE meat samples of broiler breast stored at $0 \pm 1$ °C for 24, 72 and 120 hours post mortem .....	60
<b>Fig. 2</b> – Shear Force of Control and PSE meat samples of broiler breast stored at $0 \pm 1$ °C for 24, 72 and 120 hours post mortem .....	61
<b>Fig. 3</b> – Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) of Control and PSE samples of broiler breast stored at $0 \pm 1$ °C for 24, 72 and 120 hours post mortem .....	61
<b>Fig. 4</b> – Total Collagen Content (A) and Soluble Collagen (B) of Control and PSE samples of broiler breast stored at $0 \pm 1$ °C for 24, 72 and 120 hours post mortem.....	62
<b>Fig. 5</b> – Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of myofibrillar proteins of chicken pectoralis muscle at different times post mortem. a: Standard; b: PSE 4 hours; c: PSE 24 hours; d: PSE 72 hours; e: PSE 120 hours; f: Standard; g: Control 4 hours; h: Control 24 hours; i: Control 72 hours; j: Control 120 hours .....	63

## Artigo Científico 2

- Fig. 1** – Microscopia Eletrônica de Transmissão de filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C em diferentes tempos: **a, b, c, d**: Controle 4, 24, 72 e 120 horas *post mortem*, respectivamente; **e, f, g, h**: PSE 4, 24, 72 e 120 horas *post mortem*, respectivamente. **S**: Sarcômero; **A**: Banda A; **I**: Banda I; **H**: Zona H; **Z**: Linha Z .....78
- Fig. 2** – Microscopia Eletrônica de Transmissão de filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C em diferentes tempos: **a, b, c**: Controle 4, 24 e 120 horas *post mortem*, respectivamente; **d, e,f**: PSE 4, 24 e 120 horas *post mortem*, respectivamente.....78

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Científico 1

**Table 1** – Comparison of physicochemical parameters between Control and PSE broiler breast meat (*Pectoralis major* m.) samples .....60

### Artigo Científico 2

**Tabela 1** – Concentração das proteínas miofibrilares de filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C por 24, 72 e 120 horas *post mortem*.....77

**Tabela 2** – Atividade das Catepsinas B + L, B, L e H em filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C por 4, 24 e 72 horas *post mortem*.....77

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1	ESTRUTURA MUSCULAR.....	17
3.2	TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE .....	19
3.2.1	Modificações Químicas.....	20
3.2.2	Modificações Estruturais.....	20
3.3	PARÂMETROS DE QUALIDADE DA CARNE .....	22
3.3.1	PH e Cor .....	23
3.3.2	Capacidade de Retenção de Água (CRA) .....	24
3.3.3	Maciez .....	26
3.4	PROTEASES.....	27
3.4.1	Calpaínas.....	27
3.4.2	Catepsinas.....	28
3.5	TECIDO CONJUNTIVO E COLÁGENO.....	30
3.6	CARNES PSE E MACIEZ.....	31
	REFERÊNCIAS.....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1: CHANGES IN PROTEINS FRACTIONS DURING AGEING OF BROILER CHICKEN PSE (PALE, SOFT, EXUDATIVE) AND ITS RELATIONSHIP TO MEAT QUALITY .....	45
4.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2: ATIVIDADE DAS CATEPSINAS E ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA MIOFIBRILAR E CONJUNTIVA DE FILÉS PSE ( <i>PALE, SOFT, EXUDATIVE</i> ) DE FRANGOS DURANTE O ARMAZENAMENTO .....	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79

## 1 INTRODUÇÃO

O setor avícola está entre as cadeias agropecuárias mais importantes do país. Segundo dados preliminares da União Brasileira de Avicultura (UBABEF), a produção brasileira da carne de frango chegou a 12,230 milhões de toneladas em 2010, em um crescimento de 11,38 % em relação a 2009, o que torna o Brasil o terceiro maior produtor e o maior exportador da carne de frango (UBABEF, 2012). Paralelamente, a busca por qualidade vem exigindo que as indústrias processadoras de aves invistam em soluções para os principais problemas relacionados com a qualidade da carne de frango.

A cor da carne e sua maciez são os atributos mais importantes relacionados com qualidade, visto que normalmente o consumidor utiliza-os para avaliação da qualidade do produto como um todo (ANADÓN, 2002; PELICANO e PRATA, 2007). A maciez é decorrente do processo de degradação, por enzimas endógenas de algumas proteínas estruturais, sendo que o grau de maciez está relacionado, principalmente, com as proteínas miofibrilares e o tecido conjuntivo, em especial o colágeno (LAWRIE, 2005; KOOHMARAIE *et al.*, 2002; KEMP *et al.*, 2010).

Estima-se que o processo de amaciamento da carne inicia-se logo após o abate, podendo variar entre diferentes espécies (VEISETH *et al.*, 2001). Atualmente, evidências sugerem que a proteólise das proteínas miofibrilares é a causa do amaciamento da carne (LEE *et al.*, 2008; KRIESE *et al.*, 2009; WILHELM, 2009). Neste aspecto, as enzimas mais importantes são as calpaínas e as catepsinas (JIANG, 2000).

As calpaínas, cisteína proteases intracelulares neutras, são dependentes de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (cálcio) e do pH. O seu sistema consiste de dois grupos de enzimas denominadas de  $\mu$ -calpaína e m-calpaína, as quais diferem em sua sensibilidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  para sua ativação (MELLONI *et al.*, 1992; KEMP *et al.*, 2010; LONERGAN *et al.*, 2010). Ambas estão localizadas no sarcoplasma e nas miofibrilas, sendo que o músculo esquelético de frangos contém tanto a  $\mu$ -quanto a m-calpaínas (BIRKHOOLD e SAMS, 1994).

As catepsinas são um grupo de enzimas compostas tanto por exo quanto endopeptidases e são categorizadas nas seguintes famílias: cisteína (catepsinas B, H, L e X), aspártica (D e E) e serina (G) proteases (SANTANDREU *et*

*al.*, 2002). Existem controvérsias quanto à ação destas enzimas no processo de amaciamento da carne (KOOHMARAIE *et al.*, 1991; O'HALLORAN *et al.*, 1997). Entretanto, estudos demonstraram que a atividade das catepsinas B e L em 8 h *post mortem* foi positivamente correlacionada com a maciez do músculo *Longissimus dorsi* (LD) (O'HALLORAN *et al.*, 1997). Além disso, algumas catepsinas, especificamente as isoformas B e L, também atuam sobre moléculas de colágeno e apresentam um pH ótimo próximo de 5,5. Pesquisas têm demonstrado que estas isoformas podem agir sobre o colágeno na sua forma nativa induzindo a despolimerização das ligações cruzadas de suas fibras (KIRSCHKE *et al.*, 1982; KIRSCHKE *et al.*, 1995). Estudos histoquímicos demonstraram que na carne armazenada há uma progressiva ruptura dos lisossomos, de modo que, após 14 dias de estocagem, a quebra dos lisossomos é quase que completa (ZEECE *et al.*, 1992). Isto pode ser explicado pela diminuição do pH enquanto a temperatura da carcaça do animal ainda está elevada (MOELLER *et al.*, 1977), principalmente em carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*).

Carnes PSE são decorrentes de uma taxa de glicólise *post mortem* elevada, ocasionando uma drástica queda do pH muscular, ainda com a carcaça do animal relativamente quente ( $\pm 35$  °C). O declínio acelerado do pH em temperaturas elevadas causa a desnaturação das proteínas da carne, especialmente as miofibrilares (BENDAL e WISMER-PERDERSEN, 1962). Como consequência, a carne apresenta-se com superfície pálida, flácida e exsudativa e suas propriedades funcionais comprometidas, inapropriadas para o processamento (CANDEK-POTOKAR, 1998; BREWER e MCKEITH, 1999) causando um sério problema para as indústrias do ramo (BARBUT *et al.*, 2008).

Em relação à ação das proteases em carnes PSE, algumas pesquisas foram realizadas em relação à degradação miofibrilar de filés PSE. Os autores atribuíram os resultados apenas às calpaínas e propuseram que estas podem atuar precocemente sobre a estrutura da carne (SANTOS *et al.*, 2008; WILHELM *et al.*, 2010), relacionando-a com o comprometimento da funcionalidade das proteínas da carne, bem como sua maciez (WILHELM *et al.*, 2009). Porém, os autores não observaram nada conclusivo quanto ao mecanismo de ação das proteases.

Assim, estudos mais abrangentes e objetivos sobre os impactos da anomalia PSE na textura da carne de frango pela caracterização da ação das

proteases, bem como as modificações de colágeno no período *post mortem*, são de suma importância para promover soluções visando à melhoria da qualidade da carne de frango.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as alterações bioquímicas e estruturais ocorridas em filés PSE de frangos durante o seu armazenamento e relacioná-las com a qualidade da carne.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar as mudanças na fração proteica de carnes PSE durante o armazenamento e a sua relação com a qualidade da carne.

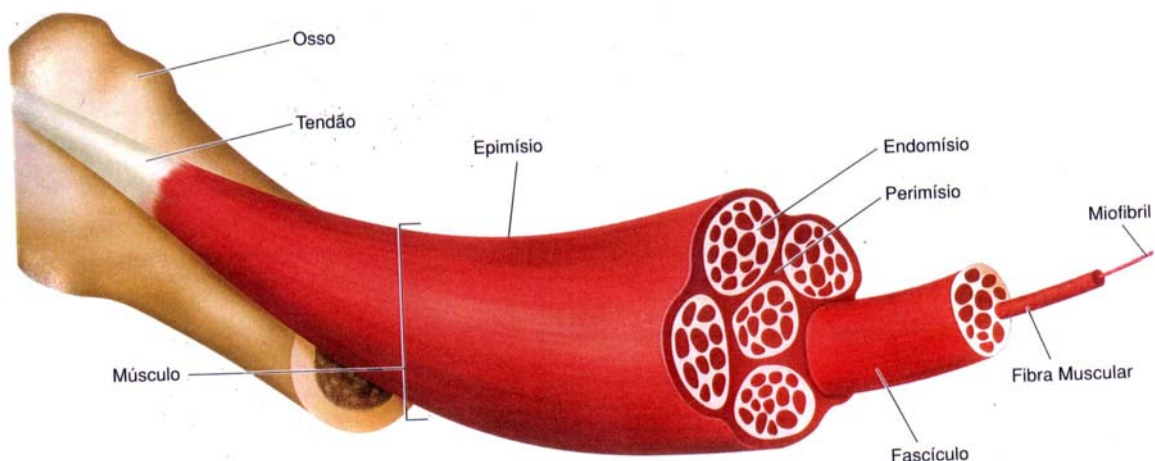
Investigar a ação das catepsinas sobre a estrutura miofibrilar e conjuntiva em filés PSE durante o seu armazenamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ESTRUTURA MUSCULAR

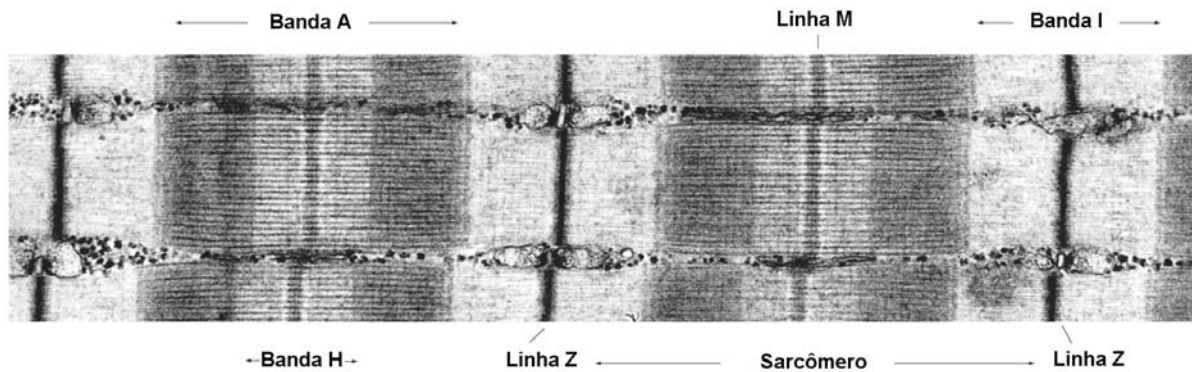
O músculo esquelético é composto por uma estrutura complexa e hierárquica, como representado na Figura 1. Ao nível macroscópico consiste de feixes (fascículos) de fibras celulares alongadas e multinucleadas (miofibras) que contribuem para o aspecto estriado do músculo esquelético. O sarcoplasma das fibras musculares contém organelas específicas e feixes de miofibrilas, que são compostas de proteínas miofilamentosas.

**Figura 1** – Estrutura do músculo esquelético (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).



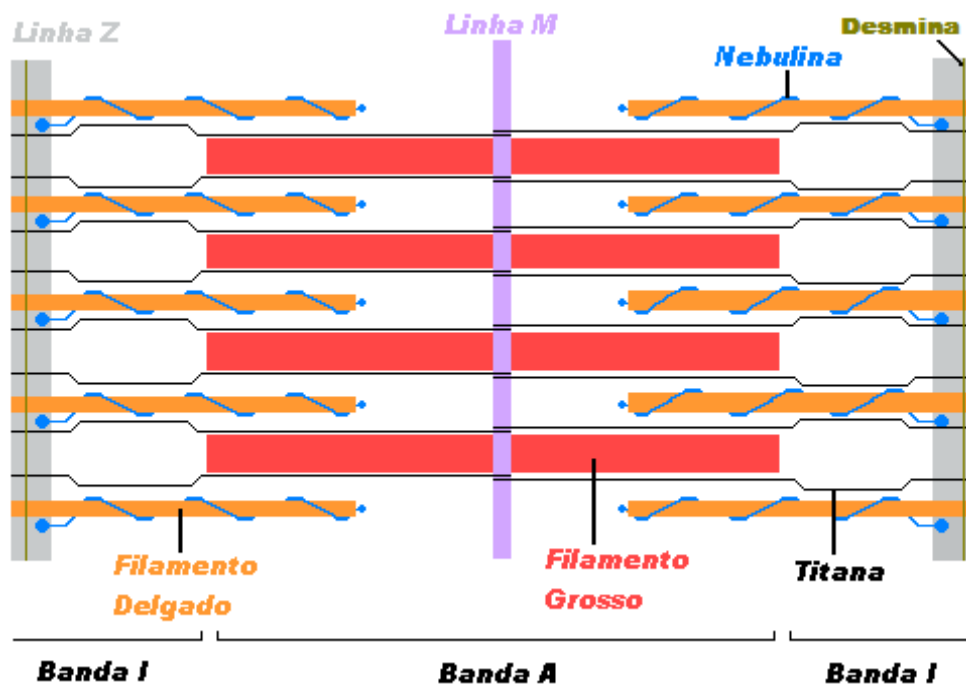
O sistema miofibrilar é composto por diversas proteínas, onde ocorrem as alterações que conduzem ao amaciamento pós-abate. A miofibrila possui um arranjo bem ordenado de pontos chamados de miofilamentos, os filamentos grossos denominados de miosina e os finos denominados de actina. Assim, a miofibrila apresenta-se na forma estriada composta pela banda I, formada por filamentos finos não invadidos por filamentos grossos, e pela banda A, formada principalmente por filamentos grossos. A banda H localiza-se no centro da banda A e é formada somente pelos filamentos grossos. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura denominada linha Z. A distância entre duas linhas Z é a menor unidade estrutural do músculo e é conhecida como sarcômero (Figura 2) (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

**Figura 2** – Estrutura do Sarcômero (CRAIG, 2008. Adaptado)



Além da miosina, os filamentos grossos contêm outras proteínas como as proteínas C, M, I e F, enquanto que os filamentos finos são compostos também pela tropomiosina, troponina e  $\alpha$ -actinina. Nas linhas Z estão localizadas outras proteínas como  $\alpha$ -actinina, desmina, filamina, vimentina e sinemina. A nebulina é encontrada principalmente na região da banda I, enquanto que a titana está distribuída ao longo dos filamentos grossos e finos, como pode ser observado na Figura 3 (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

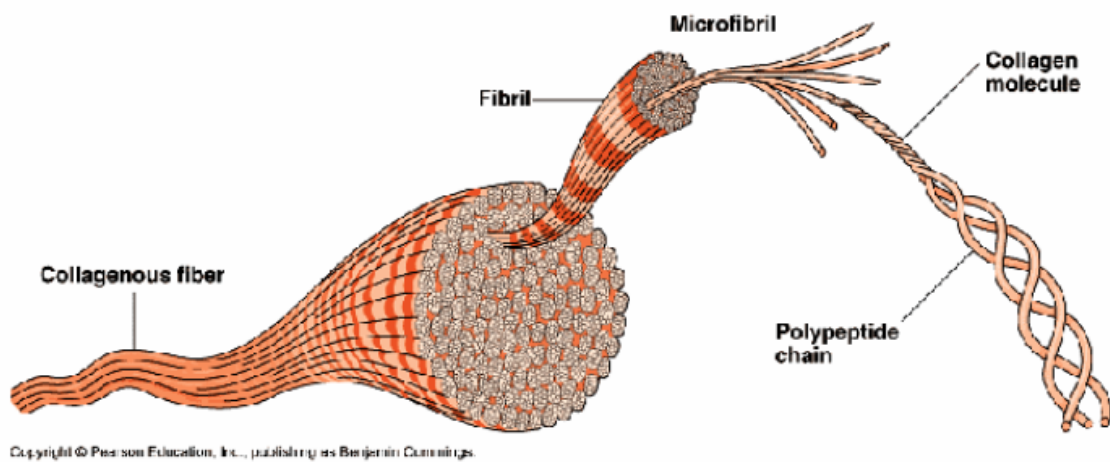
**Figura 3** – Esquema representativo do sarcômero e algumas de suas proteínas estruturais (nebulina, titana e desmina) (SHIMOKOMAKI et al., 2006)



As fibras musculares são envoltas por tecidos conjuntivos de revestimento denominados endomísio, enquanto que os fascículos são revestidos pelo perimísio e o músculo como um todo pelo epimísio (BAYNES e DOMINICZACK, 2000). Estes tecidos conjuntivos têm como função unir e ao mesmo tempo sustentar os tecidos, sendo o colágeno o seu constituinte principal (BAILEY e LIGHT, 1989).

O colágeno pode ser definido como uma proteína com as principais propriedades: 1) contém três cadeias polipeptídicas helicoidais, possuindo seqüências repetidas de Gli-X-Y onde Gli é glicina, X é frequentemente a prolina e Y a hidroxiprolina, organizadas em uma estrutura de tripla hélice estável; 2) um terço dos seus aminoácidos são moléculas de glicina; 3) contém hidroxiprolina e hidroxilisina, que são encontrados quase que unicamente em moléculas de colágeno (PEARSON *et al.*, 1985). A Figura 4 representa fibras colágenas. O colágeno é de suma importância na área de carnes e produtos cárneos, pois esta molécula afeta a estrutura do músculo, sendo inversamente proporcional à maciez da carne (BAILEY, 1989).

**Figura 4** – Representação de fibras colágenas



### 3.2 TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE

No abate de um animal, com o término de fluxo de sangue do músculo e a consequente interrupção do suprimento de oxigênio, ocorrem intensas modificações químicas e físicas (estruturais) que levam à transformação do músculo em carne ou à mudança *post mortem* do músculo (KUBOTA *et al.*, 1993). A forma

com que estes eventos físicos e químicos ocorrem, bem como sua intensidade, determinam a qualidade da carne.

### 3.2.1 Modificações Químicas

O animal recém abatido, após um período de repouso, apresenta em seu músculo, ATP e fosfocreatina, bem como um pH em torno de 6,9 a 7,2. No músculo vivo, o ATP circula continuamente para a manutenção do metabolismo, porém quando o suprimento de oxigênio cessa, em decorrência da sangria do animal, o músculo torna-se anaeróbico. Neste estado há formação de ácido láctico e apenas 8% de ATP, em relação ao metabolismo na presença de oxigênio. Assim, o nível de ATP é mantido por conversão de ADP a ATP (Fosfocreatina + ADP  $\leftrightarrow$  Creatina + ATP) e também pela glicólise, que disponibilizam energia na forma de ATP para o processo de contração e relaxamento muscular (PEARSON e YOUNG, 1992; LAWRIE, 2005).

Inicialmente são degradadas as reservas de fosfocreatina, seguidas pelas reservas de glicogênio, originando ácido pirúvico pela via glicolítica. Como o músculo está em anaerobiose, o ácido pirúvico não entra no ciclo de Krebs, sendo transformado em ácido láctico, reação esta catalisada pela lactato desidrogenase e responsável pelo declínio do pH muscular (HONIKEL e HAMM, 1974, 1980, 1985). Portanto, o acúmulo de ácido láctico e a conseqüente queda do pH muscular no *post mortem* dependem fundamentalmente da quantidade de glicogênio no momento do sacrifício do animal (PEARSON, 1994).

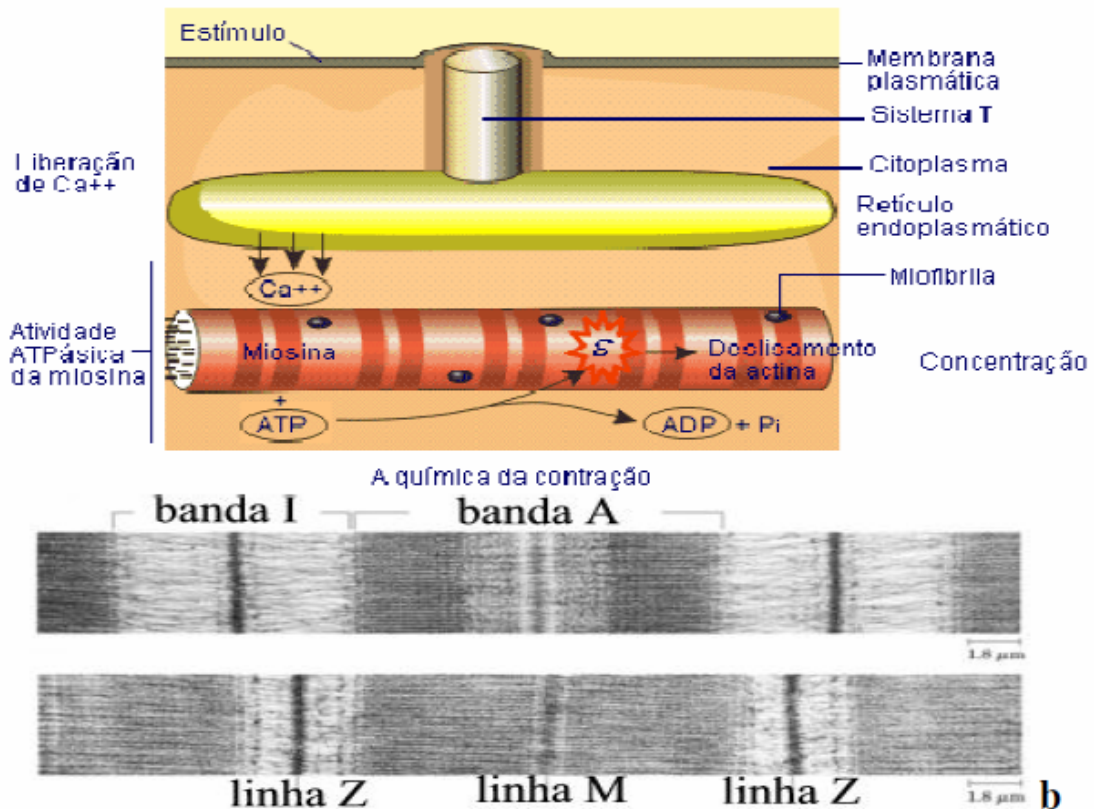
### 3.2.2 Modificações Estruturais

As mudanças estruturais mais importantes a nível muscular *post mortem* são a contração e o *rigor mortis* que podem ser considerados dois processos distintos (LAWRIE, 2005).

No músculo vivo, a contração muscular ocorre devido a uma neuroestimulação através da placa motora terminal, que libera íons  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma. Estes íons inativam o sistema troponina tropomiosina por ligação do cálcio à troponina C e, conseqüentemente, ocorre a reação entre actina e miosina, levando a contração do músculo, o que faz com que o

comprimento do sarcômero diminua, como pode ser observado na Figura 5 (LAWRIE, 2005).

**Figura 5** – Sistema muscular e o mecanismo de contração muscular, o qual depende do estímulo nervoso que se propaga pelo sistema T fazendo com que o retículo sarcoplasmático (endoplasmático) libere íons  $\text{Ca}^{2+}$ , iniciando o processo de contração (b).



A presença de ATP é necessária para a descontração, porque a energia utilizada para o processo de deslizamento é derivada da desfosforilação do ATP em ADP. Quando o estímulo nervoso é finalizado, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são transportados novamente para o retículo sarcoplasmático através de uma bomba iônica denominada “bomba de cálcio”, que requer energia na forma de ATP (HONIKEL e HAMM, 1985).

Logo após a morte do animal, em temperaturas próximas a 38 °C, ainda há ATP, ocorrendo assim, o transporte dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático pelo sistema bomba de cálcio-ATP. Nas mitocôndrias também há cálcio armazenado, proveniente do sarcoplasma na presença de oxigênio. Com o declínio do pH, ATP, temperatura e ausência de oxigênio, as mitocôndrias liberam

íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o sarcoplasma ao mesmo tempo em que a atividade da bomba de cálcio diminui. A concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nas miofibrilas aumenta, o que dá início ao processo de contração, similar à estimulação nervosa que induz a contração do músculo vivo. Na contração muscular *post mortem*, enquanto a reserva energética na forma de ATP for suficiente, os miofilamentos mantêm-se móveis e por esta razão o músculo é elástico. Quando o nível de ATP é reduzido, ou seja, quando a quantidade de energia não for mais suficiente para o processo de deslizamento dos miofilamentos, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  não retornam mais para o retículo sarcoplasmático e inicia-se a formação de enlaces ou pontes permanentes entre actina e miosina, o músculo perde a elasticidade e entra em *rigor mortis* (SWATLAND, 1994).

Em seguida, inicia-se a dissipação do *rigor mortis* em um processo, no qual ligações de actina e miosina não serão desfeitas, formando um complexo denominado actomiosina. Porém, as proteínas titana, nebulina e desmina, responsáveis pela união entre moléculas de actina e a linha Z, são degradadas (SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006). Dessa forma, ocorre o desprendimento da actina e da linha Z. Paralelamente, ocorre a degradação das linhas Z, o que enfraquece o sarcômero e leva ao amaciamento da carne. As principais enzimas atuantes nesta fase são as calpaínas e proteases lisossômicas, como as catepsinas D, B, H e L (GOLL *et al.*, 1989, 2003).

### 3.3 PARÂMETROS DE QUALIDADE DA CARNE

A qualidade da carne é determinada por interações complexas de fatores biológicos e ambientais, mas é frequentemente classificada de acordo com a aparência do material cru, como textura, cor e capacidade de retenção de água (BENDIXEN, 2005). Ressalta-se ainda, que a associação entre as medidas de cor e pH da carne, em linhas de produção, fornecem significativas informações em relação à qualidade do produto comercializado (KISSEL *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2003). Tais propriedades estão intimamente correlacionadas com questões sensoriais e não necessariamente de ordem nutricional, possuindo aplicações importantes, como por exemplo, a atração pelo consumidor e a adequação para o processamento posterior, que podem ser avaliadas tanto subjetivamente quanto instrumentalmente (PELICANO e PRATA, 2007).

### 3.3.1 PH e Cor

As medidas de pH final e cor da carne estão intimamente relacionadas entre si (SOARES *et al.*, 2002). Estudos têm demonstrado que o estresse pré-abate é um dos fatores mais importantes que influenciam o pH final e a maciez da carne.

Este estresse resulta do transporte, manejo do animal, temperaturas baixas ou elevadas, como também do tempo prolongado de jejum, podendo haver neste caso o consumo das reservas de glicogênio antes do abate do animal (LARA *et al.*, 2002; MUCHENJE *et al.*, 2009; OBA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2009).

A cor da carne é um dos atributos mais importantes em relação a qualidade, visto que normalmente o consumidor relaciona a cor com o frescor e a qualidade do produto como um todo (ANADÓN, 2002). Este parâmetro pode ser influenciado por diversos fatores como, enzimas, dieta, idade do animal, condições pré e pós abate (LARA *et al.*, 2002; MUCHENJE *et al.*, 2009; OBA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2009). As medidas de cor são rotineiramente realizadas utilizando o sistema da Comissão Internacional de Iluminação (Commission International de l'Eclairage – CIE) (COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE, 1976). As três coordenadas fundamentais são L\*, a\* e b\*. O valor de L\* mede a luminosidade e é a medida da luz refletida (branco = 100; preto = 0); a\* mede a variação entre verde (valores negativos) ao vermelho (valores positivos) e b\* a variação entre azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos).

Segundo Olivo *et al.* (2001), a carne é um sistema ótico complexo, sendo que a mioglobina é considerada o seu principal componente de cor, em que a intensidade da coloração avermelhada da carne é diretamente relacionada com o teor de mioglobina, embora de acordo com Le Bihan-Duval *et al.* (1999), a mioglobina esteja em pequena quantidade em fibras glicolíticas, predominantes no músculo de peito de frangos.

Um dos principais problemas encontrados nas indústrias e relacionado com a variação da cor e do pH da carne suína e de aves, refere-se à anomalia PSE. As carnes PSE são decorrentes de uma glicólise *post mortem* extremamente acelerada, ocasionando uma diminuição drástica do pH muscular ainda quando a carcaça do animal está quente ( $\pm 35$  °C). Como consequência, as proteínas musculares, principalmente as miofibrilares são desnaturadas, ocorrendo

assim uma grande perda de água (BENDAL e WISMER-PERDERSEN, 1962), o que torna a superfície da carne pálida, flácida e exsudativa, comprometendo as suas propriedades funcionais (CANDEK-POTOKAR *et al.*, 1998; BREWER e McKEITH, 1999).

As condições de manejo pré-abate a que são submetidas às aves, como transporte, temperatura e umidade relativa do ambiente são fatores que conduzem ao estresse, comprometendo a qualidade da carne, principalmente pela maior ocorrência de carnes PSE (SAMS, 1999; SIMÕES *et al.*, 2009; OBA *et al.*, 2009). Em aves, a incidência destas carnes no Brasil pode chegar a 22% conforme verificada por Soares *et al.* (2003) levando a um prejuízo em torno de 10 milhões de dólares para as indústrias brasileiras (ODA *et al.*, 2003).

A determinação de carnes PSE pode ser obtida pela combinação do pH e cor ( $L^*$ ) da carne. Entretanto, Soares *et al.* (2002), avaliando o pH da carne de frango, estabeleceram que o valor de  $L^*$  seria um bom parâmetro para identificar carnes com características PSE. Segundo estes autores, filés com valores de  $L^* > 53,00$  podem ser classificados como carnes PSE e  $L^*$  entre 44 e 53 são atribuídos aos filés com características normais. Barbut (1997) encontrou correlações significativas ( $p < 0,01$ ) entre o valor de  $L^*$  e a capacidade de retenção de água da carne ( $r = -0,71$ ) e também entre o pH. Dessa forma, o valor de  $L^*$  permitiria às indústrias processadoras determinar a melhor aplicação para a matéria-prima disponível, dentro dos requerimentos de qualidade dos seus produtos.

### 3.3.2 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A CRA é definida como a capacidade em que a carne tem de reter sua umidade ou água durante a aplicação de forças externas, como corte, aquecimento, trituração e prensagem (ZHANG *et al.*, 2005). Entretanto, durante a aplicação suave de qualquer um destes tratamentos, há certa perda de umidade, em razão de uma parte da água da carne encontrar-se na forma livre. A CRA é uma propriedade de suma importância, afetando, positiva ou negativamente, tanto a qualidade da carne consumida *in natura* quanto àquela destinada à industrialização (OLIVO *et al.*, 2001).

O músculo magro contém cerca de 75% de água. Os outros principais componentes incluem proteínas ( $\pm 20\%$ ), lipídios ( $< 5\%$ ), carboidratos ( $\pm$

1%) e vitaminas e minerais (aproximadamente 1%). Grande parte da água encontra-se associada com as miofibrilas e entre a membrana celular (sarcolema) e as miofibrilas (OFFER e COUSINS, 1992).

A água é uma molécula dipolar e como tal é atraída por algumas proteínas. Esta interação dificulta a sua mobilidade, não sendo fácil o seu movimento para outros compartimentos. Esta água é mais resistente ao congelamento e ao aquecimento convencional (FENEMA, 1985). No músculo, cerca de 0,5 g de água por grama de proteína é estimada ser fortemente vinculada às proteínas. Como a concentração total de proteína no músculo é de aproximadamente 200 mg/g, apenas um décimo do total da água do músculo está neste estado (OFFER e KNIGHT, 1988).

Durante a conversão do músculo em carne, o ácido láctico acumula-se no tecido e leva a redução do seu pH. Quando o pH atinge o ponto isoelétrico (pI) da maioria das proteínas, em especial da miosina (pI = 5,4), a carga líquida das proteínas torna-se igual a zero, significando que o número de cargas positivas e negativas é equivalente. Estes grupos positivos e negativos das proteínas são atraídos um pelo outro, fazendo com que as proteínas agreguem-se mais, resultando em uma redução da interação entre a água e as proteínas. (OFFER, 1991). No caso das carnes PSE, como ocorre desnaturação das proteínas, principalmente das miofibrilares, há maior perda de água, o que prejudica a qualidade da carne e reflete-se no comprometimento da sua textura (BENDAL e WISSMER-PEDERSEN, 1962; OFFER, 1991).

Em aves, pesquisas têm demonstrado que carnes com maior palidez estão associadas com menores CRA (BARBUT, 1993; 1997; LE-BIHAN-DUVAL *et al.*, 2001). Segundo estes autores, a seleção genética de aves com filés de menor luminosidade poderia diminuir as perdas de água por exsudação da carne. De acordo com Le-Bihan-Duval *et al.* (2001), a luminosidade esteve relacionada às perdas de água por exsudação da carne e também mostrou correlação com o pH aferido em 24h *post mortem*. Assim, a medida da CRA vem sendo utilizada para averiguar os efeitos causados pelas carnes PSE.

### 3.3.3 Maciez

Os consumidores consideram a maciez como a característica sensorial de maior influência no julgamento da qualidade da carne (PELICANO e PRATA, 2007). A maciez é decorrente do processo de degradação de algumas proteínas estruturais por enzimas endógenas. O grau de maciez está relacionado com três tipos de proteínas do tecido muscular: miofibrilares (solúveis em soluções salinas), do tecido conjuntivo (solúveis em meio ácido) e as sarcoplasmáticas que são solúveis em água (LAWRIE, 2005; KOOHMARAIE *et al.*, 2002).

Estima-se que o processo de amaciamento da carne inicia-se logo após o abate, podendo variar entre diferentes espécies (VEISETH *et al.*, 2001). Atualmente, evidências sugerem que a proteólise das proteínas miofibrilares é a causa do amaciamento da carne (BEE *et al.*, 2007; KRIESE *et al.*, 2007; WILHELM *et al.*, 2009). Estas proteínas estão envolvidas em: 1) ligações intermiofibrilares (desmina e vinculina); 2) ligações intramiofibrilares (titana, nebulina e possivelmente a troponina T); 3) ligações das miofibrilas ao sarcolema por costâmeros (vinculina e distrofina) e 4) ligações de células musculares com a lâmina basal (laminina e fibronectina). A função destas proteínas é manter a integridade estrutural das miofibrilas (PRICE, 1991). A degradação proteolítica destas proteínas causaria o enfraquecimento das miofibrilas e, conseqüentemente, o amaciamento da carne.

O comprimento do sarcômero, o conteúdo do tecido conjuntivo e sua solubilidade e a proteólise das proteínas miofibrilares são importantes para explicar a variação do amaciamento observada na carne. Entretanto, a contribuição relativa de cada um destes componentes é dependente do músculo. Por exemplo, enquanto o comprimento do sarcômero é o maior determinante do amaciamento do músculo *Psoas major*, a proteólise é prioritária no amaciamento do músculo *Longissimus*, eo conteúdo de tecido conjuntivo é o maior interferente do amaciamento de músculos tais como *Biceps femoris* e *Semimembranosus* (KOOHMARAIE *et al.*, 2002).

Com relação às proteases, que apresentam potencial para dar início ao processo de degradação protéica e, conseqüentemente, promover o amaciamento da carne, as mais importantes são as calpaínas e as catepsinas. Estas proteínas têm regiões de ação distintas e sua atividade é dependente do pH muscular (JIANG, 2000).

### 3.4 PROTEASES

#### 3.4.1 Calpaínas

As calpaínas (EC 3.4.22.17), cisteína proteases intracelulares neutras, são cálcio-dependentes e ativadas por esse íon. O seu sistema consiste de dois grupos de enzimas, os quais diferem em sua sensibilidade ao cálcio. Calpaína 1 ou  $\mu$ -calpaína requer íons  $\text{Ca}^{2+}$  em micromolares de concentração para sua ativação, enquanto que a calpaína 2 ou m-calpaína requer milimolares deste íon (MELLONI *et al.*, 1992). Ambas as calpaínas estão localizadas no sarcoplasma e nas miofibrilas (KINSMAN *et al.*, 1994), sendo que o músculo esquelético de frangos contém tanto a  $\mu$ -quanto a m-calpaínas (BIRKHOLD e SAMS. 1994).

A organização macromolecular das  $\mu$ -e m-calpaínas é praticamente idêntica. No estado inativo, ambas isoformas existem como heterodímeros, consistindo de uma grande (80 kDa) e pequena (28 kDa) subunidades. A maior subunidade contém sítios de ligação de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , fragmentos hidrofóbicos e proteínas com sítios de ligação específicos. A subunidade menor pode iniciar um papel regulatório ou agir como uma chaperona, que é uma classe de proteínas responsável em auxiliar no enovelamento protéico (SUZUKI *et al.*, 1986). Mesmo o sítio ativo estando localizado na maior subunidade, a presença da menor subunidade é necessária para a completa atividade desta enzima (TSUJI e IMAHORI, 1981). A atividade da calpaína é inibida pela calpastatina, conhecida como um inibidor específico endógeno desta enzima (DUBIN, 2005).

Uma importante característica da  $\mu$ -e m-calpaína é que elas sofrem autólise na presença de cálcio, o que as transformam em moléculas consideravelmente menos estáveis. A autólise reduz a necessidade de cálcio para a ativação da  $\mu$ -e m-calpaína e pode ser usada como indicador da atividade proteolítica na célula (DAYTON, 1982; GOLL *et al.*, 2003).

Pesquisas demonstraram que as calpaínas apresentam um papel primário na degradação de proteínas miofibrilares (BARNOY *et al.*, 2000; GOLL *et al.*, 1992). O principal mecanismo de ativação da calpaína é pelo aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . A interação Ca-calpaína é acompanhada por autoproteólise, a qual elimina um pequeno fragmento das subunidades grande e

pequena, gerando assim uma forma ativa desta enzima (MELLONI *et al.*, 1996; BAKI *et al.*, 1996).

As calpaínas estão envolvidas na fragmentação das linhas Z das miofibrilas e na degradação das troponinas T, I e C do músculo esquelético (SUZUKI *et al.*, 1996). Desmina, talina, fibronectina e actinina também servem como substratos para as calpaínas (DOURDIN *et al.*, 1999).

Segundo Hopkins *et al.* (2004) e Taylor *et al.* (1995), maiores atividades das calpaínas contribuem para o aumento do Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM) pela ruptura das ligações intermiofibrilares, bem como pela ação sobre a titana e a nebulina, o que enfraquece a ligação dos filamentos finos com a linha Z. Por esta razão, o IFM tem sido utilizado como medida indireta da atividade proteolítica das calpaínas.

As calpaínas não degradam as duas principais proteínas miofibrilares, actina e miosina, mas ambas as calpaínas causam remoção da linha Z e liberam  $\alpha$ actina não degradada (GOLL *et al.*, 1991b). A  $\mu$ -calpaína degrada importantes proteínas constituintes das estruturas costaméricas e miofibrilares, conduzindo a um enfraquecimento da miofibrila com conseqüente amaciamento (GOLL *et al.*, 1991a). A ligação calpaína-miofibrila pode ser responsável pela degradação da desmina, troponina T, titana, nebulina (DELGADO *et al.*, 2001), sendo necessário que as calpaínas primeiramente dissociem estas proteínas das miofibrilas para que então, as mesmas possam ser degradadas por proteases lisossomais ou proteassoma (GOLL *et al.*, 2003).

#### 3.4.2 Catepsinas

As catepsinas foram as primeiras enzimas consideradas nos estudos envolvendo os mecanismos de amaciamento da carne. Posteriormente, as calpaínas receberam maior atenção, principalmente devido à sua habilidade em alterar a densidade das linhas Z, uma modificação frequentemente observada no *post mortem* (TAYLOR *et al.*, 1995).

Catepsinas são um grupo de enzimas compostas tanto por exo quanto endopeptidases e são categorizadas nas seguintes famílias: cisteína (catepsinas B, H, L e X), aspártica (D e E) e serina (G) proteases (SANTANDREU *et al.*, 2002). Existem controvérsias quanto à ação destas enzimas no processo de

amaciamento da carne com base nas seguintes informações: 1) não há grande escala de degradação da miosina e da actina no período *post mortem*, pois estes são os substratos primários das catepsinas (KOOHMARAIE *et al.*, 1991); 2) as catepsinas estão localizadas nos lisossomos e devem, portanto, serem liberadas para então terem acesso às proteínas miofibrilares e contribuir para o amaciamento da carne (O'HALLORAN *et al.*, 1997). Entretanto, as atividades das catepsinas B e L em 8 h *post mortem* foi positivamente correlacionada com a maciez do músculo *Longissimus dorsi* (LD) (O'HALLORAN *et al.*, 1997).

Estudos histoquímicos têm demonstrado que na carne armazenada há uma progressiva ruptura dos lisossomos, de modo que, após 14 dias de estocagem, a quebra dos lisossomos é quase que completa (ZEECE *et al.*, 1992). Isto pode ser explicado pela diminuição do pH enquanto a carcaça do animal ainda está elevada (MOELLER *et al.*, 1977). A miosina e actina parecem ser parcialmente degradadas, mas esta degradação ocorre provavelmente após um mínimo de 7 a 10 dias *post mortem* (TAYLOR *et al.*, 1995). Por outro lado, alguns estudos relatam também que a atividade das catepsinas, especialmente das catepsinas B, H e L, estão correlacionadas com a maciez da carne suína desde um dia *post mortem* até o período de estocagem (CALKINS e SEIDMAN, 1988; JOHNSON *et al.*, 1990; O'HALLORAN *et al.*, 1997). Alguns pesquisadores supõem que, enquanto as calpaínas podem ser responsáveis pelas mudanças, principalmente nas primeiras 24 h *post mortem*, uma relevante contribuição das catepsinas para a maciez da carne poderia ser esperada nos demais períodos de armazenamento (CALKINS e SEIDMAN, 1988, ZEECE *et al.*, 1992).

As catepsinas degradam muitas outras estruturas protéicas, sendo possível que elas mostrem maior afinidade para estas proteínas do que para os filamentos de actina e miosina no músculo. Assim, torna-se difícil explicar todas as modificações estruturais que podem ocorrer pela ação destes sistemas proteolíticos e uma possível ação sinérgica de catepsinas e calpaínas deve ser considerada (OUALI, 1992).

Thomas *et al.* (2004), verificaram que as catepsinas B, L, H e D apresentam papel importante sobre a degradação da estrutura da carne de avestruz, promovendo o seu amaciamento. As catepsinas L hidrolisam um grande número de proteínas miofibrilares, incluindo a troponina T, I e C, nebulina, titana e tropomiosina,

as quais são degradadas durante as condições *post mortem* bem como miosina e actina em carnes de coelho, bovina e de frango (MIKAMI *et al.*, 1987).

Avaliando a degradação da desmina em carne suína, Baron *et al.* (2004) sugeriram que as calpaínas atuam sobre a desmina nas primeiras horas *post mortem*, enquanto que a catepsina B seria responsável pela degradação posterior. Segundo os mesmos autores, o primeiro passo na proteólise da desmina consiste na despolimerização dos seus filamentos com perda da integridade celular, a qual é observada no período *post mortem* precoce. Em seguida, a catepsina B seria responsável por futuras degradações.

Algumas catepsinas, especificamente as catepsinas B e L, também atuam sobre moléculas de colágeno e apresentam um pH ótimo próximo a 5,5. Pesquisas têm demonstrado que estas isoformas podem agir sobre o colágeno na sua forma nativa induzindo a despolimerização das ligações cruzadas de suas fibras (KIRSCHKE *et al.*, 1982; KIRSCHKE *et al.*, 1995). Apesar do mecanismo de ação das catepsinas sobre o colágeno não ser bem entendido, Kirschke *et al.* (1982) sugeriram que estas proteases agem principalmente sobre os telopeptídeos. Baseados em estudos com calorimetria diferencial de varredura, Beltran *et al.* (1992) concluíram que a catepsina B e colagenase bacteriana apresentam mecanismos similares, agindo sobre o colágeno insolúvel.

### 3.5 TECIDO CONJUNTIVO E COLÁGENO

A estrutura base e a composição do tecido conjuntivo têm sido estudadas por diversos pesquisadores (BAILEY e LIGTH, 1989; PURSLOW e DUANCE, 1990; PURSLOW, 2002). O perimísio e o endomísio constituem o tecido conjuntivo intramuscular (IMC), enquanto que o epimísio compõe o tecido intermuscular. O perimísio tem uma participação em torno de 90% no IMC e geralmente é considerado o principal contribuinte relacionado com a dureza da carne (LIGTH *et al.*, 1985). Este tecido é basicamente composto de fibras de colágeno e elastina, envoltas por proteoglicanas. O conteúdo total de colágeno no músculo pode variar de 1 a 15% da matéria seca, enquanto que a elastina, presente em menor quantidade, varia de 0,6 a 3,7% (BENDALL, 1967). Colágenos do tipo I, III, IV, V, VI, XII e XIV tem sido identificados no tecido conjuntivo. Porém, a concentração relativa destes tipos de colágeno pode variar durante o desenvolvimento embrionário de

músculos bovinos (LISTRAT *et al.*, 1999, 2000) e de aves (LAWSON e PURSLOW, 2001).

Cada tipo de colágeno apresenta uma sequência primária única, o que confere forma e propriedades específicas (BAILEY, 1992). Dentre os 20 tipos de colágeno encontrados nos tecidos animais (REHN e PIHLAJANIEMI, 1996), pode-se distinguir quatro tipos principais em músculos: I, III, IV e V (BAILEY e LIGHT, 1989; LIGHT e CHAMPION, 1984). No músculo, o epimísio é formado predominantemente por colágeno do tipo I, o perimísio pela mistura dos tipos I e III, enquanto que o endomísio é composto de lamina basal fina composta pelo tipo IV, associado com fibras finas do tipo I, III e colágeno tipo V (BAILEY e LIGHT, 1989; LIGHT e CHAMPION, 1984).

A elevada força mecânica das fibras de colágeno deve-se à formação de ligações cruzadas destas moléculas, que podem ser intra ou intermoleculares. Estas ligações químicas são de natureza covalente, formadas em sítios específicos das cadeias de colágeno, dentro e entre moléculas individuais, aumentando com a idade do animal, o que prejudica a maciez e conseqüentemente a qualidade da carne (BAILEY, 1992).

As ligações cruzadas intermoleculares são determinantes para a estabilidade mecânica das fibras de colágeno (BAILEY, 1982). Sem estas ligações, a matriz do colágeno teria pouca força (BAILEY e LIGHT, 1989).

As características do colágeno, principalmente o seu teor e solubilidade, determinam a relação entre o tecido conjuntivo e a dureza da carne (HARRIS e SHORTHOSE, 1988).

### 3.6 CARNES PSE E MACIEZ

Algumas comparações entre suínos e aves, com relação as suas estruturas musculares, fisiologia e conversão do músculo em carne, devem ser observadas cuidadosamente (SMITH e NORTHCUTT, 2009). Devido a estas diferenças, alguns mecanismos que podem comprometer a qualidade da carne de frango ainda não estão totalmente elucidados. Um dos principais problemas é referente à ocorrência de carnes PSE em frangos. Em suínos esta anomalia vêm sendo estudada há mais de 40 anos, porém em aves ganhou relevância apenas nos últimos 10-15 anos, em decorrência da comercialização da carne em partes e

também por problemas verificados pelas indústrias, durante o processamento de sua carne (BARBUT *et al.*, 2008). Assim como em suínos, a ocorrência de carnes PSE em aves é decorrente de uma glicólise *post mortem* elevada, com declínio acelerado do pH muscular em decorrência da formação de ácido lático, sendo que em aves este fenômeno pode ser observado em aproximadamente 15 minutos da morte do animal, enquanto que em suínos isto ocorre em mais ou menos 45 minutos *post mortem* (BENDAL e WISMER-PERDENSEN, 1962, CHIANG *et al.*, 2008).

A ocorrência de carnes PSE em frangos, bem como as suas possíveis causas e consequências, vêm sendo largamente estudadas pelo grupo de pesquisa em carnes da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Verificou-se que fatores que antecedem o abate, bem como o tempo de transporte e espera no abatedouro, manejo e temperaturas elevadas são os principais fatores que levam à ocorrência desta anomalia em aves (OLIVO *et al.*, 2001; GUARNIERI *et al.*, 2002; LARA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2002; LANGER *et al.*, 2009; OBA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2009). Estes interferentes levam ao estresse das aves, acelerando o seu metabolismo momentos antes do abate e como consequência têm-se desenvolvimento das carnes PSE.

Em relação às modificações estruturais o que se sabe até o momento é que em suínos, o acúmulo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e também o declínio do pH nas carnes PSE favorecem a ativação das calpaínas precocemente (GOLL *et al.*, 2003). Isto poderia explicar a diferença entre as atividades de  $\mu$ -calpaína e m-calpaína em estudo realizado em suínos por Melody *et al.* (2004), que verificaram ativação prematura da  $\mu$ -calpaína em músculo suíno que apresentava rápida queda de pH e degradação mais rápida da desmina.

Segundo Claeys *et al.* (2001), um rápido declínio de pH da carne suína, acompanhado de um aumento na concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , pode resultar na ativação e autólise prematura da  $\mu$ -calpaína, com subsequente diminuição da sua atividade durante o período *post mortem*. Resultados similares foram observados por Bee *et al.* (2007) que verificaram menores degradações da desmina e talina, sugerindo um perda prematura da atividade proteolítica da  $\mu$ -calpaína com o rápido declínio do pH da carne suína. Boles *et al.* (1992) observaram que a taxa de degradação *post mortem* da titina foi notavelmente reduzida no músculo PSE de suínos em comparação ao normal. Paralelamente, menor degradação *post mortem* da linha Z também foi observada no músculo *Longissimus dorsi* PSE.

Avaliando as atividades das calpaínas e catepsinas em carnes normal (N) e PSE de suínos, Gill *et al.* (1998) evidenciaram diferenças entre a degradação das proteínas miofibrilares de carnes N e PSE, sugerindo que embora as calpaínas apresentassem maior efeito sobre a maciez da carne suína, a contribuição das catepsinas, especialmente a L, para este processo não poderia ser ignorada. Tal resultado condiz com o observado por Taylor *et al.* (1995), que demonstraram que as catepsinas podem agir principalmente a partir do sexto dia *post mortem* quando o pH da carne é mais baixo. Assim, segundo Toldrá e Flores (2000), as atividades de ambas, calpaínas e catepsinas, poderiam ser utilizadas para prever a qualidade da carne suína, assim como também sugerido por López-Bote *et al.* (1989) e Murray e Johnson (1994).

Em relação ao colágeno, principalmente a sua degradação e solubilidade, podem contribuir para o amaciamento da carne pela atuação das catepsinas e pelo declínio do pH muscular (HARRIS e SHORTHOSE, 1988).

Em aves, especificamente em frangos, pesquisas sobre os mecanismos de atuação das proteases, bem como o comportamento do colágeno sobre a textura de carnes PSE são escassas.

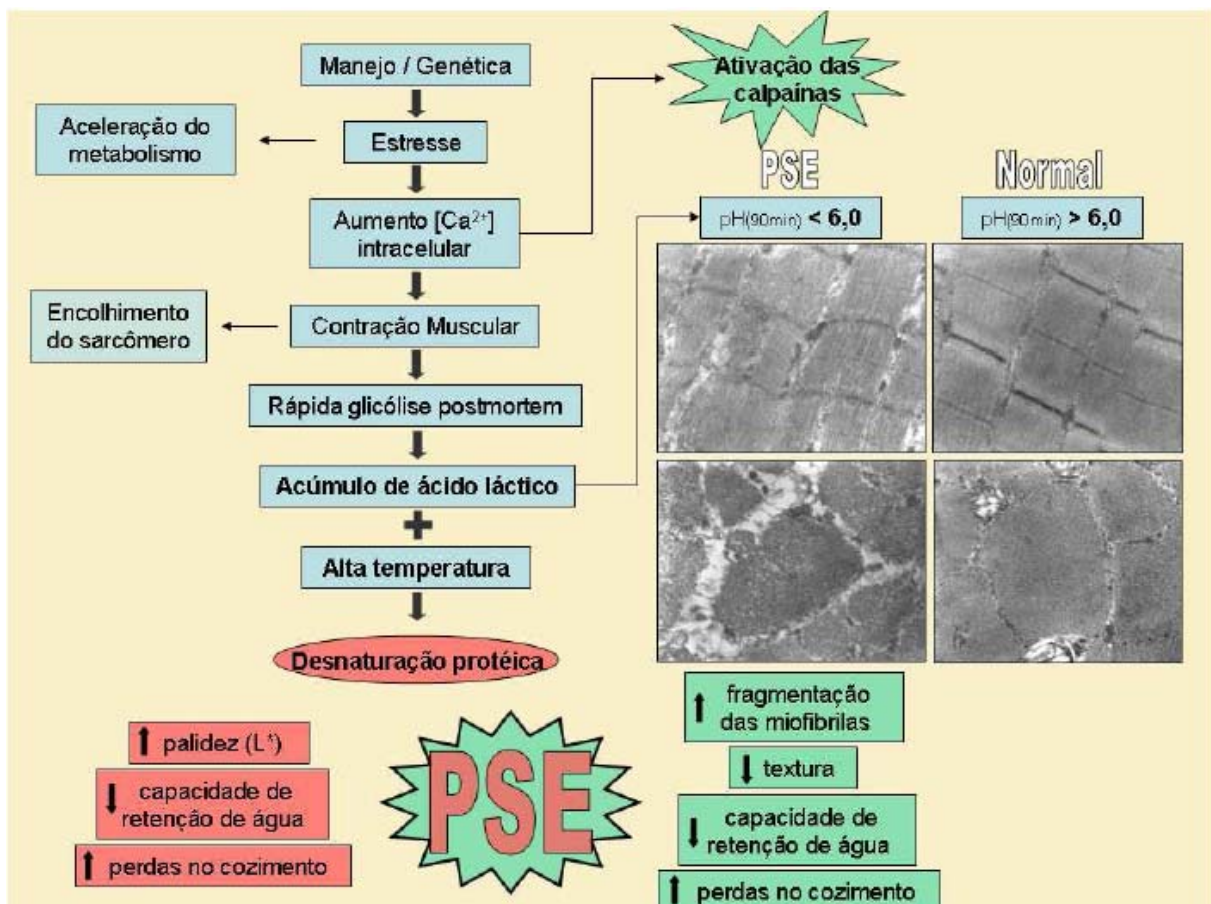
Soares (2003) estudou a ultraestrutura de filés de frango PSE 72 h *post mortem*, e verificou algumas modificações quanto ao espessamento das linhas Z, desaparecimento da banda I e diminuição do tamanho do sarcômero. Guarnieri *et al.* (2004), constataram que em frangos tratados com nebulização de água antes do abate com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de carnes PSE, o sarcômero apresentou estrutura organizada e a linha Z estava enfraquecida devido à atividade das proteases. Porém, no grupo não tratado a estrutura do sarcômero apresentou-se desorganizada e a linha Z mais pronunciada. Recentemente, Santos *et al.* (2008) avaliaram as mudanças das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas causadas pelo estresse térmico em frangos. Os autores verificaram alterações significativas na fragmentação das proteínas miofibrilares e observaram modificações na fração sarcoplasmática de carnes pálidas.

Wilhelm *et al.* (2010), que avaliaram filés PSE de frangos, encontraram diferenças na degradação da sua ultraestrutura em relação aos filés normais, sugerindo que as calpaínas seriam responsáveis por estas diferenças. Os autores propuseram um mecanismo para a degradação da ultraestrutura dos filés PSE, conforme demonstrado na Figura 6, e hipotetizaram que após a ativação, as

calpaínas poderiam sofrer autólise e perder sua atividade, podendo influenciar negativamente no processo de maturação e na maciez em relação à carne normal no prolongamento do período *post mortem*. A diminuição da CRA implicaria no aumento das perdas de peso por cozimento, devido à desnaturação proteica como também em decorrência da rápida perda de atividade da  $\mu$ -calpaína na carne PSE. Assim, estas enzimas deixariam de atuar sobre proteínas que fazem a ligação das miofibrilas ao sarcolema, como desmina, talina e vinculina no decorrer do período *post mortem* (BEE *et al.*, 2007; BOLES *et al.*, 1992), o que contribuiria para a saída de água da célula (HUFF-LONERGAN, 2005).

Ainda, Wilhelm (2009) concluiu que provavelmente pode ter ocorrido aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante a instalação do *rigor mortis* na carne de frango PSE ativando precocemente as proteases, o que afetou a integridade da estrutura da fibra muscular e, portanto, prejudicou a funcionalidade das proteínas da carne.

**Figura 6** – Esquema representativo do provável mecanismo de relação entre a atividade das calpaínas e o prejuízo das propriedades funcionais da carne de frango PSE (WILHELM, 2009).



Embora algumas pesquisas evidenciem ações proteolíticas diferenciadas em carnes PSE de frango, nada se sabe sobre os mecanismos de ação das proteases, bem como o comportamento do colágeno sobre a textura de filés PSE de frangos. Assim, estudos mais abrangentes e objetivos sobre os impactos da anomalia PSE na textura da carne de frango são de suma importância para promover soluções visando à melhoria da sua qualidade.

#### REFERÊNCIAS

<http://www.abef.com.br> União Brasileira de Avicultura (UBABEF). Acesso em 28 de junho de 2012.

ANADÓN, H. L. S. **Biological, nutritional and processing factors affecting breast meat quality of broilers**. 2002. Tese (Doutorado). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2002.

BAILEY, A.J. The chemistry of collagen cross-links and their role in meat texture. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, Bristol, v.42, p.127-135, 1989.

BAILEY, A. J. Procter memorial lecture collagen – nature’s framework in the medical, food collagen and leather industries. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, Rebourne, v.76, p.111-127, 1992.

BAILEY, A. J., LIGHT, N. D. *Connective tissue in meat and meat products*. Barking, England: Elsevier Applied Science, 1989.

BAKI A., TOMPA P., ALEXA A., MOLNAR O., FRIEDRICH, P. Autolysis parallels activation of m-calpain, **Biochemical Journal**, v.318, p.897–901, 1996.

BARBUT, S. Colour measurements for evaluating the pale, soft, exudative (PSE) occurrence in turkey meat. **Food Research International**, Toronto, v.26, p.39-43, 1993.

BARBUT, S. Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.38, p.355-358, 1997.

BARBUT, S., SOSNICKI, A. A., LONERGAN, S. M., KNAPP, T., CIOBANU, D. C., GATCLIFFE, 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, p.46-63, 2008.

BARON, C. B., JACOBSEN, S., PURSLOW, P. P. Cleavage of desmin by cysteine proteases: Calpains and cathepsin B. **Meat Science**, v.8, p.447–456, 2004.

BAYNES, J., DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 1 ed. São Paulo: Manole, 2000. 566p.

BEE, G., ANDERSON, A. L., LONERGAN, S. M., HUFF-LONERGAN, E. Rate and extent of pH decline affect proteolysis of cytoskeletal proteins and water-holding capacity in pork. **Meat Science**, v.76, p.359-365, 2007.

BELTRAN, J. A., BONNET, M., OUALI, A. Comparative action of cathepsins B and L on intramuscular collagen as assessed by differential scanning calorimetry. **Meat Science**, v.32, p.299-306, 1992.

BENDALL, J. R. The elastin content of various muscles of beef animals. **Journal of Science Food Agriculture**, v.18, p.553–558, 1967.

BENDALL, J. R., WISMER-PEDERSEN, J. Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v.24, p.144457, 1962.

BIRKHOOD, S. G., SAMS, A. R. Concurrent identification of calpains I and II from chicken skeletal muscle. *Biochemistry Physiology*, v.107b, p.519-523, 1994.

BOLES, J. A., PARRISH, F. C., HUIATT, T. W., ROBSON, R. M. Effect of Porcine Stress Syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar/cytoskeletal proteins. **Journal of Animal Science**, v.70, p.454-464, 1992.

BREWER, M. S. & McKEITH, F. K. Consumer-rated quality characteristics as related to purchase intent of fresh pork. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.1, p. 171-174, 1999.

CALKINS, C. R. & SEIDMAN, S. C. Relationship among calcium-dependent protease, cathepsin B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging. **Journal of Animal Science**, v.66, p.1186–1193, 1988.

CANDEK-POTOKAR, M. Effects of age and/or weight at slaughter on *longissimus dorsi* muscle: biochemical traits and sensory quality in pigs. **Meat Science**, v.48, n.3/4, p. 287-300, 1998.

CHIANG, W., BOOREN, A., STRASBURG, G. The effect of heat stress on thyroid hormone response and meat quality in turkeys of two genetic lines. **Meat Science**, artigo aceito para publicação, 2008.

CLAEYS, E., DE SMET, S., DEMEYER, D., GEERS, R., BUYS, N. Effect of rate of pH decline on muscle enzymes activities in two pig lines. **Meat Science**, v.57, p.257-263, 2001.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE (1976). *Colorimetry*. 2 ed. Vienna, Switzerland: CIE.

CRAIG, R. Disponível em <http://www.ks.uiuc.edu/Research/z1z2/>. Acesso em 18/06/2012.

DAYTON, W. R. Comparison of low-and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autolytic breakdown products. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.709, p.166-172, 1982.

DELGADO, E. F., GEESINK, G. H., MARCHELLO, J. A., GOLL, D. E., KOOHMARAIE, M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2097-2107, 2001.

DOURDIN, N., BALCERZAK, D., BRUSTIS, J., POUSSARD, S., COTTIN, P., DUCASTAING, A. Potential m-calpain substrates during myoblast fusion, **Experimental Cell Research**, v.246 p.433–442, 1999.

DUBIN, G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.653–669, 2005.

FENNEMA, O. R. Water and ice. In O. R. Fennema (Ed.), **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc., 1985.

GIL, M., HODS, M., SDRRAGA, C. Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of *longissimus* porcine muscle from normal and PSE meat. **Food Chemistry**, v.63, n.3, p.385-390, 1998.

GOLL, D. E., TAYLOR, R. G., CHRISTIANSEN, J. A., THOMPSON, V. F. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, v.44, p.25-33, 1991a.

GOLL, D. E., DAYTON, W. R., SINGH, I., ROBSON, R. M. Studies of the  $\alpha$ actin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.8501-8513, 1991b.

GOLL, D. E., KLEESE, W. C., SZPACENKO, A. Skeletal muscle proteases and protein turn over. In D. R. Campion, G., 1989.

GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., CONG, J. The Calpain System. **Physiological Reviews**, v.83, p.731-801, 2003.

GUARNIERI, P. D., OLIVO, R., SOARES, A. L., IDA, E. I., LARA, J. A. F., SHIMOKOMAKI, M. Bem-estar animal e qualidade da carne das aves: uma exigência dos consumidores. **Revista Nacional da Carne**, ano XXVI, n.301, p.3644, 2002.

GUARNIERI, P. D., 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 a commercial plant. Biochemical and ultrastructural observations. **Journal of Food Biochemistry**, v.28, p.269-277, 2004.

HARRIS, P. V., SHORTHOUSE, W. R. Meat texture. *Developments in Meat Science*. 4. ed. London, p.245-246, 1981.

HONIKEL, K.O., HAMM, R. Über die ursachen der abnahme des pH-wertes immm fleisch nach dem schlachaten. **Fleischwirtsch.**, Frankfurt, v.54, n.3, p.557-560, 1974.

HONIKEL, K.O., HAMM, R. La influencia del refrigerado sobre las cualidades de la carne vacuna recién faenada. **Fleischwirtsch.**, espan·l, Frankfurt, v.2, p.16-24, 1980.

HONIKEL, K.O., HAMM, R. Enfriado, congelado y descongelado. Aspectos coloidoquímicos de la calidad de la carne. **Fleischwirtsch.**, espan·l, Frankfurt, v.1, p.46-53, 1985.

HOPKINS, D. L., MARTIN, L., GILMOUR, A. R. The impact of homogenizer type and speed on the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v.67, p.705-710, 2004.

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

JOHNSON, M. H., CALKINS, C. R., HUFFMAN, R. D., JOHNSON, D. D., HARGROVE, D. D. Differences in cathepsin B+L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. **Journal of Animal Science**, 68, 2371–2379, 1990.

KEMP, C. M., SENSKY, P. L., BARDSLEY, R. G., BUTTERY, P. J. PARR, T. Tenderness – An enzymatic view. **Meat Science**, v.84, p.248-256, 2010.

KIRSCHKE, H., KEMBHAVI, A. A., BOHLEY, P., BARRETT, A. J. **Biochemical Journal** v. 201, p.367, 1982.

KIRSCHKE, H., BARRETT, A. J., RAWLINGS, N.D.: Proteinases I: lysosomal cysteine proteinases. **Protein Profile**, v.2, p.1587-1620, 1995.

KISSEL, C., SOARES, A. L., ROSSA, A., SHIMOKOMAKI, M. Functional properties of PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler meat in the production of mortadella. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.213–217, 2009.

KOOHMARAIE, M., WHIPPLE, G., KRETCHMAR, D. H., CROUSE, J. D., MERSMANN, H. J. Post mortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. **Journal of Animal Science**, 69, 617–624, 1991.

KOOHMARAIE, M., KENT, M. P., SHACKELFORD, S. D., VEISETH, E., WHEELER T. Meat Tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v.62, p.345–352, 2002.

KRIESE, P. R., SOARES, A. L., GUARNIERI, P. D., PRUDENCIO, S. H., IDA, E. I., SHIMOKOMAKI, M. Biochemical and sensory evaluation of intact and boned broiler breast meat during ageing. **Food Chemistry**, v.104, p.1618-1621, 2007.

KUBOTA, E. H., OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. Maturação da carne. Um processo enzimático. **Revista nacional da carne**, v.18, n.200, p.12-14, 1993.

JIANG, S. T. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. **Food Science and Agricultural Biology**, v.2, p.55–74, 2000.

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.52, p.213-217, 2009.

LARA, J. A. F., SHIMOKOMAKI, M. Estresse térmico e carne PSE em frangos. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, 2002, Campinas. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.3. p.19-19, 2002.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. Porto Alegre: Artmed Editora. 2005. 384p.

LAWSON, M. A., PURSLOW, P. P. Development of components of the extracellular matrix, basal lamina and sarcomere in chick quadriceps and pectoralis muscles. **British Poultry Science**, v.42, p.315–320, 2001.

LE BIHAN-DUVAL, E., MILLET, N., REMIGNON, H. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. **Poultry Science**, v.78, p.822-826, 1999.

LE BIHAN-DUVAL, E., BERRI, C., BAEZA, E., MILLET, N., BEAUMONT, C. Estimation of the genetic parameters of meat characteristics and their genetic correlations with grow and body composition in a experimental broiler line. **Poultry Science**, v.80, n.7, p.839-843, 2001.

LEE, H.L., SANTÉ-LHOUTELLIER, V., VIGOUROUX, S., BRIAND, Y., BRIAND, M. Role of calpains in *post mortem* proteolysis in chicken muscle. **Poultry Science**, v. 87, p.2126-2132, 2008.

LIGHT, N.D., CHAMPION, A.E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. **Journal of Biochemistry**, Kunkyoku, v.219, p.1017-1023, 1984.

LIGHT, N.D., CHAMPION, A.E., VOYLE, C., BAILEY, A.J. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. **Meat Science**, Barking, v.13, p.137-149, 1985.

LISTRAT, A., PICARD, B., GEAY, Y. Age-related changes and location of type I, III, IV. V and VI collagens during development of four foetal skeletal muscles of double-muscles and normal bovine muscles. **Tissue Cell**, v.31, p.17–27, 1999.

LISTRAT, A., LETHIAS, C., HOCQUETTE, J. F., RENAND, G., ME´NISSIER, F., GEAY, Y., et al. Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. **Histochemical Journal**, v.32, p.349–356, 2000.

LOPEZ-BOTE, C., WARRISS, P. D. AND BROWN, S. N. The use of muscle protein solubility measurements to assess pig lean meat quality. **Meat Science**, v.26, p.167-175, 1989.

- LONERGAN, E. H., ZHANG, W., LONERGAN, S. M. Biochemistry of post mortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v.86, p.184-195, 2010.
- MELLONI, E., SALAMINO, F., SPARATORE, B. The calpain-calpastatin system in mammalian cells properties and possible functions, **Biochimie**, v.74, p.217–223, 1992.
- MELLONI, E., MICHETTI, M., SALAMINO, F., MINAFRA, R., PONTREMOLI, S. Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.229, p.193–197, 1996.
- MELODY, J. L., LONERGAN, S. M., ROWE, L. J., HUIATT, T. W., MAYES, M. S., HUFF-LONERGAN, E. Early *post mortem* biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. **Journal of Animal Science**, v.82, p.1195-1205, 2004.
- MIKAMI, M., WHITING, A. H., TAYLOR, M. A. J., MACIEWICZ, R. A., ETHERINGTON, D. J. Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. **Meat Science**, v.21, p.81-87, 1987.
- MOELLER, P. W., FIELD, P. A., DUTSON, T. R., LANDMANN, W. A., CARPENTER, Z. L. High temperature effects on lysosomal enzymes distribution and fragmentation of bovine muscle. **Journal of Food Science**, v.42, p.510–512, 1977.
- MUCHENJE, V., DZAMA, K., CHIMONYO, M., STRYDOM, P. E., RAATS, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food Chemistry**, v.112, p.279–289, 2009.
- MURRAY, A. C. & JOHNSON, C. P. The protein solubility method as an indicator of pork quality. *40th International Congress Meat Science Technology*. 1994. S-IVB.21. The Hague, The Netherlands.
- OBA, A., ALMEIDA, M., PINHEIRO, J. W., IDA, E. I., MARCHI, D. F., SOARES, A. L. SHIMOKOMAKI, M. The Effect of Management of Transport and Lairage Conditions on Broiler Chicken Breast Meat Quality and DOA (Death On Arrival). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.52, p.205-211, 2009.
- ODA, S. H. I., SHIMOKOMAKI, M. Detecção de cor em filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**. v.28, n.321, p.30-34, 2003.
- OFFER, G. Modeling of the formation of pale, soft and exudative meat – effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. **Meat Science**, v.30, p.157–184, 1991.
- OFFER, G., COUSINS, T. The mechanism of drip production – formation of 2 compartments of extracellular-space in muscle post mortem. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p.58, p.107–116, 1992.
- OFFER, G., KNIGHT, P. The structural basis of water-holding capacity in meat. Part 1: general principles and water uptake in meat processing. In R. Lawrie (Ed.).

**Developments in meat science** (Vol. 4, pp. 61–171). New York: Elsevier Applied Science, 1988.

O'HALLORAN, G. R., TROY, D.R., BUCLEY, D.J., REVILLE, W.J. The role of endogenous proteases in the tenderization of fast glycolysing muscle. **Meat Science**, v.47, p.187-200, 1997.

OLIVO, R., GUARNIERI, P. D., SHIMOKOMAKI, M. Fatores que influenciam na cor de filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, v.25, n. 289, p.44-49, 2001.

OUALI, A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. **Biochimie**, v.74, p.251–265, 1992.

PEARSON, A.M., DUTSON, T. R., BAILEY, A.J. **Advances in Meat Research**. v.4 (Collagen and Food) p.2, 1985.

PEARSON, A. M., YOUNG, R.B. **Muscle and meat biochemistry**. Academic Press, 1992. 457p.

PEARSON, A. M. La función muscular y los cambios post mortem. In: PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. Zaragoza: Acríbia, p.139-174, 1994.

PELICANO, E. R. L., PRATA, L. F. Propriedade da carne e medidas instrumentais de qualidade. **Revista Nacional da Carne**, n.364, p.22-34, 2007.

PRICE, M. G. Striated muscle endosarcomeric and exosarcomeric lattices. **Advances in Structural Biology**, v.1, p.175–207, 1991.

PURSLOW, P. P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochememistry and Physiology**, Part A, v.133, p.947–966, 2002.

PURSLOW, P. P, DUANCE, V. C. The structure and function of intramuscular connective tissue. In D. W. L. Hukins (Ed.). *Connective tissue matrix* (vol. 2, p.127–166). MacMillan, 1990.

REHN, M., PIHLAJANIEMI, T. Type XV and XVIII collagens, a new subgroup within the family of collagens. **Cell and Developmental Biology**, London, v.7, p.673-679, 1996.

ROÇA R.O. & SERRANO A.M., Abate de bovinos: Conversão do músculo em carne. **Revista Nacional da Carne**. p.87, 1994.

SANTANDREU M. A., COULIS, G., OUALI, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. **Trends in Food Science and Technology**, v.13, p.400–421, 2002.

SANTOS, C. C., DELGADO, E. F., MENTEN, J. F. M., PEDREIRA, A. C. M., CASTILHO, C. J. C., MOURÃO, G. B., BROSSI, C., SILVA, I. J. O. Sarcoplasmatic and myofibrillar protein changes caused by acute heat stress in broiler chicken. **Scientia Agricola**, v.65, n.5, p.453-458, 2008.

SAMS, A. R. Meat quality during processing. **Poultry Science**, v.78, n.4, p.798-803, 1999.

SHIMOKOMAKI, M.; SOARES, A. L.; KRIESE, P.R.; IDA, E. I. Calpaínas e Calpastatinas. In: **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. Editora Varela, São Paulo, 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 of Biology and Technology**, v.52, p.195-204, 2009.

SMITH, D. P.; NORTHCUTT, J. K. Pale poultry muscle syndrome. **Poultry Science**, v.88, p.1493–1496, 2009.

SOARES, A. L., LARA, J. A. F., IDA, E. I., GUARNIERI, P. D., OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. Variation in the color of Brazilian broiler breast fillet. **Proceedings of International Congress of Meat Science and Technology**, Roma, v.48, p.540-541, 2002.

SOARES, A. L., LARA, J. A. F., IDA, E. I., GUARNIERI, P. D., OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. Influence of preslaughter handling practices on broiler meat color in a commercial plant. **IFT Annual Meeting Book of Abstracts**, Chicago, p.201, 2003.

SUZUKI, K., EMORI, E., OHNO, S., IMAHORI, S., KAWASAKI, H., MIYAKE, S. Structure and function of the small (30 K) subunit of calcium-activated neutral protease (CANP). **Biomedica Biochimica Acta**, v.45, p.1487–1491, 1986.

SWATLAND, H. J. **Structure and Development of Meat Animals and Poultry**. Boca Raton: CRC Press, 1994, 606p.

TAYLOR, R.G., GEESINK, G.H., THOMPSON, V.F., KOOHMARAIE, M., GOLL, D.E. Is Z-disk responsible for *post mortem* muscle tenderization? **Journal of Animal Science**, v.73, p.1351-1367, 1995.

THOMAS, A.R., GONDOZA, H, HOFFMAN, L.C., OOSTHUIZEN, V., NAUD, R. J. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. **Meat Science**, v.67, p.113–120, 2004.

TOLDRÁ, F., FLORES, M. The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality. **Food Chemistry**, v.69, p.387–395, 2000.

TSUJI, S., IMAHORI, K. Studies on Ca<sup>2+</sup>-activated neutral proteinase rabbit skeletal muscle. I. The characterization of 80 K and the 30 K subunits. **Journal of Biochemistry**, v.90, p.233–240, 1981.

VEISETH, E., SHACKELFORD, S. D., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M. Effect of post mortem storage on m-calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1502–1508, 2001.

WILHELM, A. E. **Atividade proteolítica e ultraestrutura do filé PSE (Pale, Soft, Exudative)de frango**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

WILHELM, A. E., MAGANHINI, M. B., HERNÁNDEZ-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, p.1201–1204, 2010.

ZHANG, S. X., FAROUK, M. M., YOUNG, O. A., WIELICZKO, K. J., PODMORE, C. Functional stability of frozen normal and high pH beef. **Meat Science**, v.69, p.765–772, 2005.

ZEECE, M. G., WOODS, T. L., KEEN, M. A., REVILLE, W. J. Role of proteinases and inhibitors in post mortem muscle protein degradation. **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, Colorado State University, v.45, p.51–61, 1992.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os Resultados e Discussão desta Tese foram redigidos na forma de dois Artigos Científicos, os quais estão apresentados a seguir.

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: CHANGES IN PROTEINS FRACTIONS DURING AGEING OF BROILER PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) MEAT AND ITS RELATIONSHIP TO MEAT QUALITY

O artigo apresentado a seguir foi elaborado de acordo com as normas do periódico *Food Chemistry*, ao qual será submetido.

## Research Article

**Title:** Changes in proteins fractions during ageing of broiler PSE (*Pale, Soft, Exudative*) meat and its relationship to meat quality

**Authors:** Denis F. Marchi<sup>a</sup>, Flávia M. Beteto<sup>a</sup>, Gleice R. Santos<sup>a</sup>, Adriana L. Soares<sup>a</sup>, Elza I. Ida<sup>a</sup>, Massami Shimokomaki<sup>a, b, \*</sup>

**ABSTRACT:** Twelve *Pectoralis major* m. from PSE and Control group were evaluated for Myofibrillar Fragmentation Index (MFI), Cooking Loss (CL), Shear Force (SF), Total (TC) and Soluble Collagen (SC) content for 24, 72 and 120h post mortem. SDS-PAGE was performed in samples stored at 4, 24, 72 and 120h post mortem. CL<sub>24h</sub> of PSE samples was 15.7% higher and at 120h increased by 17.6% in relation to control samples. SF<sub>24h</sub> was 18% lower in PSE samples. At 120h this value doubled in relation to control samples. There was no difference for MFI<sub>24h</sub> between both samples, however, MFI<sub>72h</sub> of PSE meat was higher. TC<sub>24h</sub> and SC<sub>24h</sub> were 14.6% and 25.6% lower in PSE meat, respectively, whereas at 72h there was no difference. The 28-32 kDa proteins appeared 4h post mortem in PSE fillets due to earlier activation of calpain. PSE meat had accelerated protein degradation possibly because of the premature proteases activities. Finally, during ageing, PSE meat showed higher CL and SF, thus compromising its quality.

**Key words:** Cooking loss. Tenderness. Collagen content. Myofibrillar fragmentation index.

---

<sup>a</sup> Department of Food Science and Technology, Londrina State University, Londrina, P.O. Box 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> Federal Technological University of Paraná, Londrina Campus, Pioneiros Avenue, 3131, CEP 86036370, Londrina, PR, Brazil

\* **Corresponding author.** Tel.: +55-43-91017787; Fax: +55-43-33714080 *E-mail address:* [mshimo@uel.br](mailto:mshimo@uel.br) (Massami Shimokomaki)

## 1 INTRODUCTION

Meat tenderness is one of the most important factors to consumers. From the physical standpoint, the development of tenderness is dependent on the meat architecture, the integrity of the skeletal muscle cell, the activity of endogenous proteases (calpains and cathepsins) and calpain's inhibitor (calpastatins) within the cell and the extracellular matrix proteins (McCormick, 2009). Recently, in the case of poultry and pigs, the development of tenderness is dependent also on the fast decrease in pH post mortem, such as PSE meat (Wilhelm, Maganhini, Hernández-Blazquez, Ida & Shimokomaki, 2010; Pomponio, Ertbjerg, Karlsson, Costa & Lametsch, 2010).

PSE meat originates from a rapid decline in pH, while the carcass of the animal still warm, leading to the denaturation of myofibril proteins jeopardizing their functional properties (Olivo, Soares, Ida & Shimokomaki, 2001). There are controversies as to the tenderness of PSE meat and its relation to the possible protease activity performance. Wilhelm et al. (2010) reported that chicken PSE meat had lower shear force and higher myofibrillar fragmentation index attributing these results to the calpain enzymatic activity as the consequence of the surplus of  $\text{Ca}^{2+}$  within the muscle cell milieu promoted by PSE development conditions. Similar results were obtained by Smuder, Kavazis, Hudson, Nelson and Powers (2010) an enhancement of these activities under muscle abnormal conditions. According to Claeys, De Smet, Demeyer, Geers and Buys (2001), a fast decrease in pH values followed by an increase in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  can result in a premature activation of calpains and subsequently this activity decreased by the calpains autolysis during post mortem conditions. In skeletal muscle, the calpain system consists of several proteases, and two types of them,  $\mu$ -and m-calpain and their inhibitor calpastatin, are thought to be involved in the proteolytic meat tenderization. Both  $\mu$ -and m-calpains are calcium dependent and are composed of a 80 and 28 kDa subunits, and both suffer autolyzes in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Goll, Thompson, Li, Wei & Cong, 2003).

Furthermore, several reports have shown that collagen properties such as fiber sizes, genetic type, total content and solubility are important for determining the contribution of this protein for meat texture (Bailey, 1985). There is evidence that post mortem changes occur in the connective tissue due to the action

of lysosomal proteases (cathepsins), which act on the degradation of collagen during ageing (Dutson, 1983). Cathepsins are a group of enzymes comprised of both exo- and endo-peptidases (Sentandreu, Coulis & Ouali, 2002). Studies have indicated that cathepsins B and L activities at 8 h post mortem have been found positively correlated with tenderness in beef and can act on collagen molecules (Kirschke, Barret & Rawlings, 1995; O'Halloran, Troy, Buckley & Reville, 1997). Cathepsins are located in the lysosomes and must be released in order to have access to myofibril and connective tissue proteins, thus providing meat tenderness (Hopkins & Thompson, 2002). However, low pH levels and high carcass temperature can enhance the disruption of the lysosome membrane (O'Halloran et al., 1997), as it seems to happen in PSE meat (Soares, Ida, Myiamoto, Hernández-Blazquez, Olivo, Pinheiro et al., 2003).

Several studies indicated that protease activity may be associated with fast decrease in pH post mortem (Santos, Delgado, Menten, Pedreira, Castilho, Mourão et al., 2008; Wilhelm et al., 2010; Pomponio et al., 2010), but the extent of these changes, as well as changes in PSE meat quality during ageing is unknown. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the proteins fractions changes during ageing of broiler chicken PSE meat and its relationship to meat quality.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 SAMPLES PREPARATION**

Fillet meat (*Pectoralis major* m.) samples were obtained from 42-day old broilers from a commercial plant located in the South of Brazil. The animals were slaughtered according to the standard industrial practice and essentially consisted of electrical stunning, bleeding, defeathering, evisceration, water-cooling the carcass, deboning and refrigeration (Wilhelm et al., 2010). The length of time from slaughtering to samples collection was about 3 hours.

### **2.2 BIOCHEMICAL AND PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS**

pH was measured 3 hours post-mortem (pH3h) by inserting electrodes into the meat samples using a contact pH meter system (Testo 205), as

reported in Olivo et al. (2001). Thirty-six samples were classified as PSE meat (pH<sub>3h</sub> ≤5.8) and thirty-six samples as control (pH<sub>3h</sub> >5.9). A Minolta CR400 colorimeter was used to evaluate the color (L\*, a\*, b\*) of the posterior surface of intact skinless breast muscle at 24 h post mortem. The L\*, a\* and b\* values were measured at three different sites on the same sample: the proximal extremity of muscle, the distal extremity of the muscle and the medial side half-way between the proximal and distal extremities (Soares et al., 2003). Twelve fillets meat from each group were vacuum packed in plastic bags and aged for 0 ± 1 °C for 24, 72 and 120 h post mortem. Samples were taken for Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) determination, Cooking Loss, Shear Force Measurement, Total and Soluble Collagen content at 24, 72 and 120 h post mortem.

### 2.2.2 Myofibrillar Fragmentation Index (MFI)

MFI was determined as an indirect measurement of calpain activity, according to Culler, Parrish, Smith and Cross (1978). Two grams of muscle samples, free of external fat and visible connective tissue, were homogenized for 30 s in 10 mL of MFI buffer (100 mM KCl, 20 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM NaN<sub>3</sub> at pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 2 °C, the supernatant discarded and the pellet resuspended in 10 mL of the MFI buffer and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 2 °C. The supernatant was discarded and the pellet suspended in 5 mL of the same MFI buffer. The myofibril suspension was poured through a filter paper to remove connective tissue, and then assayed for protein concentration using the Biuret method. Aliquots of the suspensions were diluted in the MFI buffer to a final protein concentration of 0.5 mg/mL. The diluted protein suspension was poured into a cuvette and the absorbance at 540 nm was immediately measured with a spectrophotometer. The MFI was expressed as A<sub>540nm</sub> x 200.

### 2.2.3 Cooking Loss (CL)

CL was measured according to Honikel (1998). Samples were packed in plastic bags and submitted to cooking in a water bath for 30 min. until

internal temperature reached 75 °C. CL was expressed as the weight difference before and after cooking.

#### 2.2.4 Shear Force Measurement (SF)

The samples were the same as the CL analysis. Samples were cut into 1x1x2 cm, and analyzed on a texturometer TATX-2i. The results were expressed in Newtons (N).

#### 2.2.5 Collagen Content

##### 2.2.5.1 Total collagen content (TC)

The total collagen content in samples was determined after 15 h of hydrolysis of 1.0 g of meat with 15 mL 6 M HCl at 105 °C, as reported by Woessner (1961). The hydrolysate was filtered and its pH adjusted between 6.0 and 7.0 with 33 % (w/v) NaOH, and diluted with distilled water to 250 mL. An aliquot of 2 mL of hydrolyzed sample and 1 mL of chloramine T solution were mixed in a test tube and left for 20 min at room temperature and 1 mL of 3.15 M HClO<sub>4</sub> was added and left for 5 min at room temperature. Then, 1 mL of 4-dimethyl-aminobenzaldehyde was added and solutions were shaken and heated at 60 °C for 20 min. The samples were cooled down for 5 min in water tap and the absorbance measured at 560 nm. The amount of hydroxyproline was determined from a standard curve. The collagen content was calculated from hydroxyproline content using the coefficient 8.0 (Woessner, 1961).

##### 2.2.5.2 Soluble collagen content (SC)

Soluble collagen was extracted according to the modified method of Oliveira, Soares and Antunes (1998). Samples (2.5 g) were mixed for 1 min with 20 mL of deionized water and it was heated for 60 min at 80 °C. Next, samples were homogenized at 22,000 rpm in Ultra Turrax and centrifuged for 15 min at 4,000 rpm. Supernatant was filtered and 30 mL of 6 M HCl added for hydrolysis as described previously. Soluble collagen was determined as described in section 2.2.5.1.

## 2.2.6 Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed in broiler breast samples stored for 4, 24, 72 and 120 h post mortem.

### 2.2.6.1 Sample preparation

Proteins were extracted from 0.3 g of minced Pectoralis major m., free of external fat and visible connective tissue, as described by Toldrá, Miralles and Flores (1992). The samples were homogenized for 0.5 min in 4 mL of 50 mM Tris buffer, pH 6.8 (8 M urea, 2 M thiourea, 75 mM dithiothreitol, 3 % (w/v) SDS and 0.05 % (w/v) bromo-phenol blue). The extract was centrifuged for 20 min at 10,000 rpm. Supernatant was filtered in glass wool. The samples were kept frozen at -18 °C prior to further analysis.

### 2.2.6.2 Electrophoresis conditions

Electrophoresis was performed at constant current of 25 mA in Foccus eletrophoretic apparatus with power supply, set at 100 V and 10 W. The cooling equipment was set at 17 °C. After electrophoresis, gel staining and destaining was carried out with Coomassie Blue (R-250) (Toldrá et al., 1992).

## 2.3 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was carried out using Statistic software, version 7.0. Student t-test was used to determine significant difference among two samples of PSE and control meat at the same storage time. Tukey's test was used to determine significant difference among storage periods of time for PSE or control meat samples. Pearson correlations coefficients were used for testing correlations between pH3h, pH24h, L\* values, MFI, CL, SF, TC and SC.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS

pH and L\* values were significantly different between groups and they were typical for control and PSE meats, as previously reported (Olivo et al., 2001; Soares et al., 2003, Wilhelm et al., 2010). From the control group pH value decreased gradually throughout the post mortem periods evaluated, while the pH in PSE meat samples did not decline significantly ( $p = 0.27$ ), due to rapid glycolysis (Table 1). As result of the faster pH decrease, PSE meat was paler, showing higher L\* and b\* (yellowness) values (Table 1). The a\* value was higher for the control samples, showing higher red value (Table 1).

#### 3.2 COOKING LOSS (CL)

There was no difference ( $p \geq 0.05$ ) between CL 24 h and CL 72 h in both groups (Fig. 1). After 72 h, there was a increase, so that the CL 120 h post mortem value increased significantly ( $p \leq 0.05$ ) approximately 9.2 % for PSE and 6.5 % control samples. The CL was higher for PSE fillets throughout the experiment. The CL is a combination of liquid and soluble components lost from the meat during cooking being the water fraction quantitatively the main loss as reported previously by Heymann, Hedrick, Karrasch, Eggeman and Eilersieck (1990). The highest CL value as observed in the PSE fillets samples is a consequence of rapid post mortem glycolysis leading to the denaturation of myofibrillar proteins that reduces their ability to retain water (Olivo et al., 2001). Therefore the CL amount was inversely proportional to the water holding capacity (WHC) (Wilhelm et al., 2010). The use of chicken PSE meat within the industries generates a product with low WHC and poor cut when compared to normal meat (Kissel, Soares, Rossa & Shimokomaki, 2009). Thus, these problems are expected to increase during ageing, especially in PSE meat due to the higher CL 120 h post mortem.

### 3.3 BREAST MEAT TENDERNESS MEASUREMENT

Fig. 2 shows the Shear Force (SF) values for PSE and control meat samples. It was observed that at 24 h post mortem, the SF showed lower values for PSE samples (20.50 N) comparing to control samples (24.99 N) ( $p \leq 0.05$ ) corroborating the results observed previously by Wilhelm et al. (2010) stating that the lower SF value was due to the earlier activation of calpain in PSE meat samples in a pre rigor conditions. The same authors suggested that the increased protease activity in PSE meat samples might be due to the higher concentration of intracellular  $Ca^{2+}$ . After 72 h of the broiler chicken slaughter time it was found that SF values of PSE meat samples were higher than the control samples ( $p \leq 0.05$ ). Whilst in the control samples, SF was not affected during storage, significant changes were observed in PSE fillets meat samples ( $p \leq 0.05$ ). Kriese, Soares, Guarnieri, Prudencio, Ida and Shimokomaki (2007) observed that tenderness of normal fillets improved up to 24 h post mortem. After this time the texture was not affected during storage under refrigeration. However, in our experiment, in PSE meat samples there was a gradual increase of SF values during storage occurring a 2.5-fold after 120 h post mortem in relation to 24 h and approximately 2-fold than the control samples ( $p \leq 0.01$ ) (Figure 2). One explanation for these results lies on the excessive water loss during storage leading to the protein aggregation as observed in cooking loss of PSE meat at 120 h post mortem (Fig. 1). In addition, some authors have reported that inactivation of calpains was due to its early autolysis (Goll et al., 2003; Wilhelm et al., 2010), which probably contributed to the increase of SF 120 h post mortem value (Fig. 2).

### 3.4 MYOFIBRILLAR FRAGMENTATION INDEX (MFI)

Fig. 3 shows the results of MFI evaluation for control and PSE broiler breast meat samples stored at  $0 \pm 1$  °C for 120 h. There was no significant difference ( $p \geq 0.05$ ) for MFI in sample kept for 24 h between both samples. PSE meat samples did not change significantly in the MFI values during storage, however from 72 h post mortem onwards the MFI of PSE meat was higher ( $p \leq 0.05$ ) than control group probably due to earlier activation of calpain. Increased protease activity in PSE

samples might be due to the higher concentration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . This higher ion concentration should primarily enhance the  $\mu$ -calpain activity when, according to Lee, Santé-Lhoutellier, Vigouroux, Briand and Briand (2008), the activity of this enzyme ceases, due to autolysis.

Wilhelm et al. (2010) found a higher MFI values in PSE meat samples. These authors observed that after 72 h post mortem the ultrastructure of the fillets from PSE meat was more fragmented than the control samples, indicating higher proteolytic activities, similar to the results reported herein. Santos et al. (2008) noted that in acute stressed chicken, MFI changed, although these results were not enough to influence SF values.

### 3.5 COLLAGEN CONTENT

Collagen content in PSE meat was 14.6 % lower ( $p \leq 0.05$ ) than in control group at 24 h post mortem (Fig. 4 A). This result is probably related to the accelerated decline in pH values while the carcass temperature stills warm and under these conditions would lead to lysosomes rupture thus liberating cathepsins which in turn acted enzymatically on the collagen molecules (Moeller, Field, Dutson, Landmann & Carpenter, 1977). B and L cathepsins are probably the cathepsin types which showed this activity because they have an activity of pH optimum about 5.5. Other reports have shown that these isoforms enzymes may affect the collagen molecules in its native form inducing the fibers cross-linking depolymerization (Kirschke, Kembhavi, Bohley & Barrett, 1982; Kirschke et al., 1995). Considering that pH<sub>3h</sub> value of the PSE meat samples was 5.64, may have contributed to the actions of these enzymes on collagen. Although the mechanism of action of cathepsin on collagen is not well understood, Kirschke et al. (1982) suggested that these proteases act mainly on the collagen telopeptides digesting the crosslinkages regions. Based on studies with differential scanning calorimetry, Beltrán, Bonnet and Ouali (1992) concluded that bacterial collagenase and cathepsin B have similar mechanisms acting on the insoluble collagen.

In addition to the probable role of calpain, the lower collagen content in PSE meat probably contributes to the lowest SF observed in this 24 h post mortem group. Furthermore, the soluble collagen content of PSE meat was about 25 %

higher ( $p \leq 0.05$ ) than the control samples 24 h post mortem (Fig. 4B), collaborating with the tenderness of PSE meat. This fact demonstrates that cathepsins may also act earlier in PSE meat improving meat tenderness.

At 72 and 120 h post mortem, the collagen content of fillets was similar ( $p \geq 0.05$ ) for both control and PSE meat samples (Fig. 4A). The soluble collagen (SC) content increased in the control samples, similarly to the PSE meat kept for 72 h post mortem (Fig. 4B). Histochemical studies in beef have shown that in refrigerated stored meat a progressive rupture of lysosomes happened and after 14 days of storage, its breakdown is almost complete (Zeece, Woods, Keen & Reville, 1992).

Therefore, in our experiment, probably in the control meat, samples may have undergone a gradual rupture of lysosomes throughout the storage period thus releasing cathepsins. As the pH values of the fillets already was at in the ideal range of the enzymes activity thus possibly there were suitable conditions for breaking down collagen molecules and consequently promoting their degradation.

### 3.6 PEARSON CORRELATION

Correlations between the different measurements, such as pH3h, pH24h,  $L^*$ , SF, CL, TC, MFI and SC were evaluated. A significant negative Pearson correlation is observed between pH3h and CL ( $-0.76$ ,  $p \leq 0.01$ ) and  $L^*$  ( $-0.83$ ,  $p \leq 0.01$ ) indicating that, the lower the pH3h, the higher is the impairment of the functional properties of the meat proteins. Similar behavior was also observed for  $L^*$  values in relation to CL ( $0.79$ ,  $p \leq 0.01$ ), suggesting that, as meat becomes paler, the CL increases. MFI values correlated positively with  $L^*$  ( $0.53$ ,  $p \leq 0.05$ ) and CL ( $0.56$ ,  $p \leq 0.01$ ), indicating that a higher proteolysis is correlated with higher impairment of the functional properties of meat. TC content correlated with pH3h ( $0.64$ ,  $p \leq 0.01$ ) and pH24h indicating that PSE meat influences on the collagen content reduction.

### 3.7 ELETROPHORESIS

There were two important changes observed on the eletrophoretic patterns of the myofibrillar proteins of PSE and Control chicken breast meat samples (Fig. 5). One protein of molecular weight approximately of 105 kDa almost

disappeared in PSE meat at 120 h post mortem, whereas two protein of approximately 25-30 kDa appeared at 24 h post mortem. The 105 kDa protein could be  $\alpha$ -actinin, which is known to be a substrate of calpains (Lee et al., 2008). The 25-30 kDa proteins appeared 4 h post mortem in PSE fillets, whereas its appeared 24 h post mortem in control samples. These results are probably due to the earlier activation of calpain due to a rapid accumulation of calcium ions in PSE meat, which fragmented troponin T in 25-30 kDa proteins. These proteins have been observed post mortem in mammals and results from the partial hydrolysis of troponin T, probably by calpain (Negishi, Yamamoto & Kuwata, 1996). This particular condition was considered to be a good marker of post mortem ageing in cattle (Muroya, Nakajima, Oe & Chikuni, 2006) and has also been found in chicken breast (Lee et al., 2008).

#### **4 CONCLUSION**

PSE meat samples presented an accelerated protein degradation in relation to the control samples due to the premature proteases activity thus contributing initially to their relative higher tenderness. However, during ageing PSE meat showed higher Cooking Loss and Shear Force compromising its quality.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are thankful to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for funding this research (Proc# 475503/2009-0). DFM is a graduate student under CAPES scholarship. MS and EII are CNPq Research Fellows.

#### **REFERENCES**

- Bailey, A. J. (1985). The role of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. *Journal of Animal Science*, 60, 1580–1587.
- Beltrán, J. A. , Bonnet, M., & Ouali, A. (1992). Comparative action of cathepsin B and L on intramuscular collagen as assessed by differential scanning colorimetry. *Meat Science*, 32, 299–306.

Claeys, E., De Smet, S., Demeyer, D., Geers, R., & Buys, N. (2001). Effect of rate of pH decline on muscle enzymes activities in two pig lines. *Meat Science*, *57*, 257-263.

Culler, R. D., Parrish, F. C., Smith, G. C., & Cross, H. R. (1978). Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical, and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *Journal of Food Science*, *43*, 1177-1180.

Dutson, T. R. (1983). Relationship of pH and temperature to disruption of specific muscle proteins and activity of lysosomal protease. *Journal of Food Biochemistry*, *7*, 223-230.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The Calpain System. *Physiological Reviews*, *83*, 731-801.

Heymann, H., Hedrick, H. B., Karrasch, M. A., Eggeman, M. K., & Ellersieck, M. R. (1990). Sensory and chemical characteristics of fresh pork roasts cooked to different centre temperatures. *Journal of Food Science*, *55*, 613-617.

Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, *49*, 447-457.

Hopkins, D. L., & Thompson, J. M. (2002). The degradation of myofibrillar proteins in beef and lamb using denaturing electrophoresis – An overview. *Journal of Muscle Foods*, *13*, 81-102.

Kirschke, H., Kumbhani, A. A., Bohley, P., & Barrett, A. J. (1982). Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochemical Journal*, *201*, 367-374.

Kirschke, H., Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (1995). Proteinases I: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile*, *2*, 1587-1620.

Kissel, C., Soares, A. L., Rossa, A., & Shimokomaki, M. (2009). Functional properties of PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler meat in the production of mortadella. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *52*, 213-217.

Kriese, P. R., Soares, A. L., Guarnieri, P. D., Prudencio, S. H., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2007). Biochemical and sensorial evaluation of intact and boned broiler breast meat tenderness during ageing. *Food Chemistry*, *104*, 1618-1621.

Lee, H. L., Santé-Lhoutellier, V., Vigouroux, S., Briand, Y., & Briand, M. (2008). Role of calpains in post mortem proteolysis in chicken muscle. *Poultry Science*, *87*, 2126-2132.

McCormick, R. J. (2009). *Collagen Applied muscle biology and meat science*, Boca Raton, pp. 129-148.

Moeller, P. W., Field, P. A., Dutson, T. R., Landmann, W. A., & Carpenter, Z. L. (1977). High temperature effects on lysosomal enzymes distribution and fragmentation of bovine muscle. *Journal of Food Science*, *42*, 510-512.

- Muroya, S., Nakajima, I., Oe, M., & Chikuni, K., (2006). Difference in post mortem degradation pattern among troponin T isoform expressed in bovine longissimus, diaphragm, and masseter muscles. *Meat Science*, 72, 245-251.
- Negishi, H., Yamamoto, E., & Kuwata, T. (1996). The origin of the 30 kDa component appearing during post mortem ageing of bovine muscle. *Meat Science*, 42, 289–303.
- O'Halloran, G. R., Troy, D. J., Buckley, D. J., & Reville, W.J. (1997). The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science*, 47, 187–210.
- Oliveira, L. B., Soares, G. J. D., & Antunes, P. L. (1998). Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. *Revista Brasileira de Agrociência*, 4, 166–171.
- Olivo, R., Soares, A. L., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2001). Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. *Journal of Food Biochemistry*, 25, 271–283.
- Pomponio, L., Ertbjerg, P., Karlsson, A. H., Costa, L. N., & Lamestsch, R. (2010). Influence of early pH decline on calpain activity in porcine muscle. *Meat Science*, 85, 110-114.
- Santos, C. C., Delgado, E. F., Menten, J. F. M., Pedreira, A. C. M., Castilho, C. J. C., Mourão, G. B., Brossi, C., & Silva, I. J. O. (2008). Sarcoplasmatic and myofibrillar protein changes caused by acute heat stress in broiler chicken. *Scientia Agricola*, 65, 453-458.
- Sentandreu M. A., Coulis, G., & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 400–421.
- Soares, A. L., Ida, E. I., Myiamoto, S., Hernández-Blazquez, F. J., Olivo, R., Pinheiro, J., & Shimokomaki, M. (2003). Phospholipase A2 activity in poultry PSE, pale, soft, exudative, meat. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 309–320.
- Smuder, A. J., Kavazis, A. N., Hudson, M. B., Nelson, B., & Powers, S. K. (2010). Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 1152-1160.
- Toldrá, F., Miralles, M. C., & Flores, J. (1992). Protein extractability in dry-cured ham. *Food Chemistry*, 44, 391-394.
- Wilhelm, A. E., Maganhini, M. B., Hernández-Blazquez, F. J., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2010). Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Food Chemistry*, 119, 1201–1204.
- Woessner Jr., J. F. (1961). The determination of hidroxiprolina in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440–447.

Zeece, M. G., Woods, T. L., Keen, M. A., & Reville, W. J. (1992). Role of proteinases and inhibitors in post mortem muscle protein degradation. Proc. of the Reciprocal Meat Conference vol. 45, Colorado State University, Colorado, U.S.A., pp 51–61.

## Figure Captions

**Fig. 1** –Cooking Loss of Control and PSE meat samples of broiler breast stored at  $0 \pm 1$  °C for 24, 72 and 120 hours post mortem.

a-b: significantly different in the same group ( $p \leq 0.05$ ).

A-B: significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 2** –Shear Force of Control and PSE meat samples of broiler breast stored at  $0 \pm 1$  °C for 24, 72 and 120 hours post mortem.

a-b-c: significantly different in the same group ( $p \leq 0.05$ ).

A-B: significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 3** –Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) of Control and PSE samples of broiler breast stored at  $0 \pm 1$  °C for 24, 72 and 120 hours post mortem.

a-b: significantly different in the same group ( $p \leq 0.05$ ).

A-B: significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 4** –Total Collagen Content (A) and Soluble Collagen (B) of Control and PSE samples of broiler breast stored at  $0 \pm 1$  °C for 24, 72 and 120 hours post mortem.

a-b: significantly different in the same group ( $p \leq 0.05$ ).

A-B: significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 5** –Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of myofibrillar proteins of chicken pectoralis muscle at different times post mortem. a: Standard; b: PSE 4 hours; c: PSE 24 hours; d: PSE 72 hours; e: PSE 120 hours; f: Standard; g: Control 4 hours; h: Control 24 hours; i: Control 72 hours; j: Control 120 hours.

**Table 1** – Comparison of physicochemical parameters between Control and PSE broiler breast meat (*Pectoralis major m.*) samples.

Groups	PSE	Control
pH <sub>3h</sub>	5.64 <sup>bA</sup> ±0.051	6.05 <sup>aA</sup> ±0.053
pH <sub>24h</sub>	5.67 <sup>bA</sup> ±0.086	5.98 <sup>aB</sup> ± 0.063
L*	60.21 <sup>a</sup> ±1.279	52.10 <sup>b</sup> ±3.776
a*	0.19 <sup>b</sup> ±0.485	2.27 <sup>a</sup> ±0.619
b*	6.46 <sup>x</sup> ±2.195	4.97 <sup>y</sup> ± 0.990

pH<sub>3h</sub>: pH 3 hours post mortem; pH<sub>24h</sub>: pH 24 hours post mortem; L\*: lightness; a\*: green-red component; b\*: yellow-blue component. <sup>a-b</sup> Means within each line with different superscripts are different ( $p \leq 0.01$ ). <sup>x-y</sup> Means within each line with different superscripts are significantly different ( $p \leq 0.05$ ). <sup>A-B</sup> Means within each column with different superscripts are different ( $p \leq 0.01$ ). ± Standard Deviation

**Fig. 1**

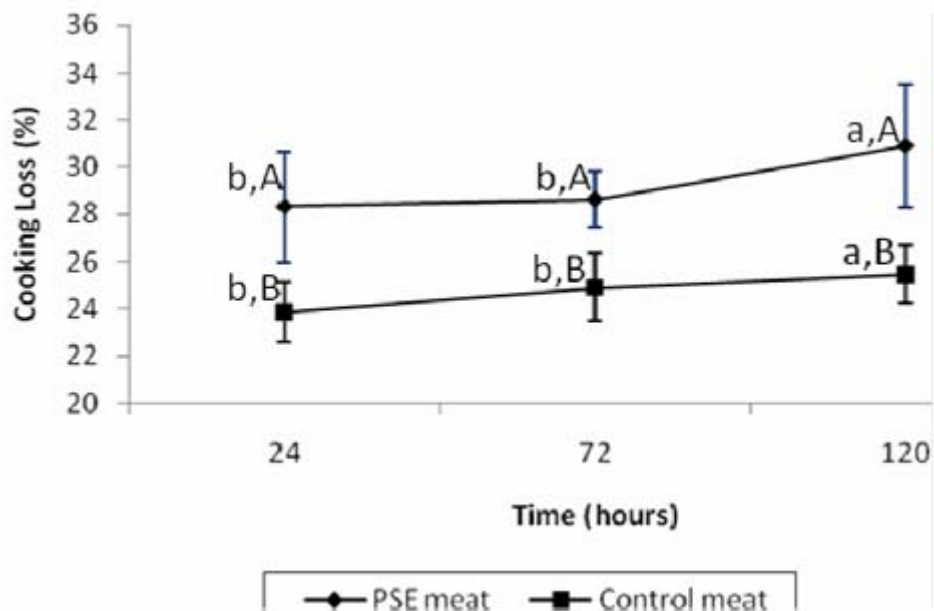


Fig. 2

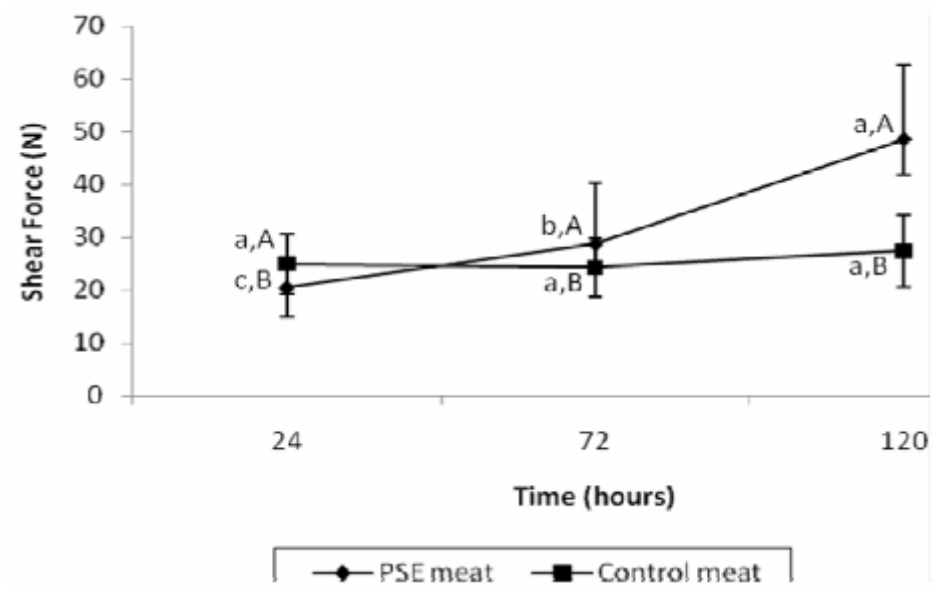


Fig. 3

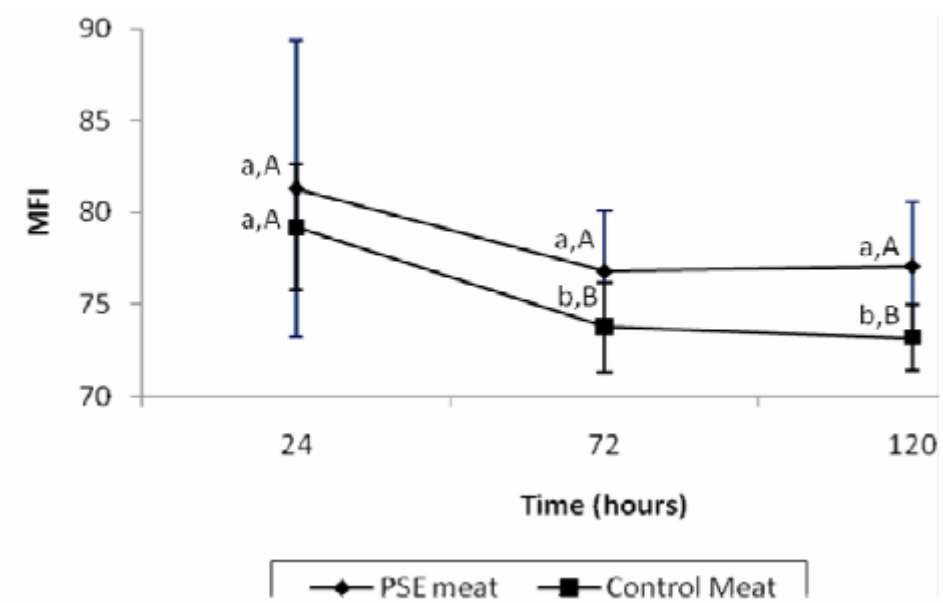


Fig. 4

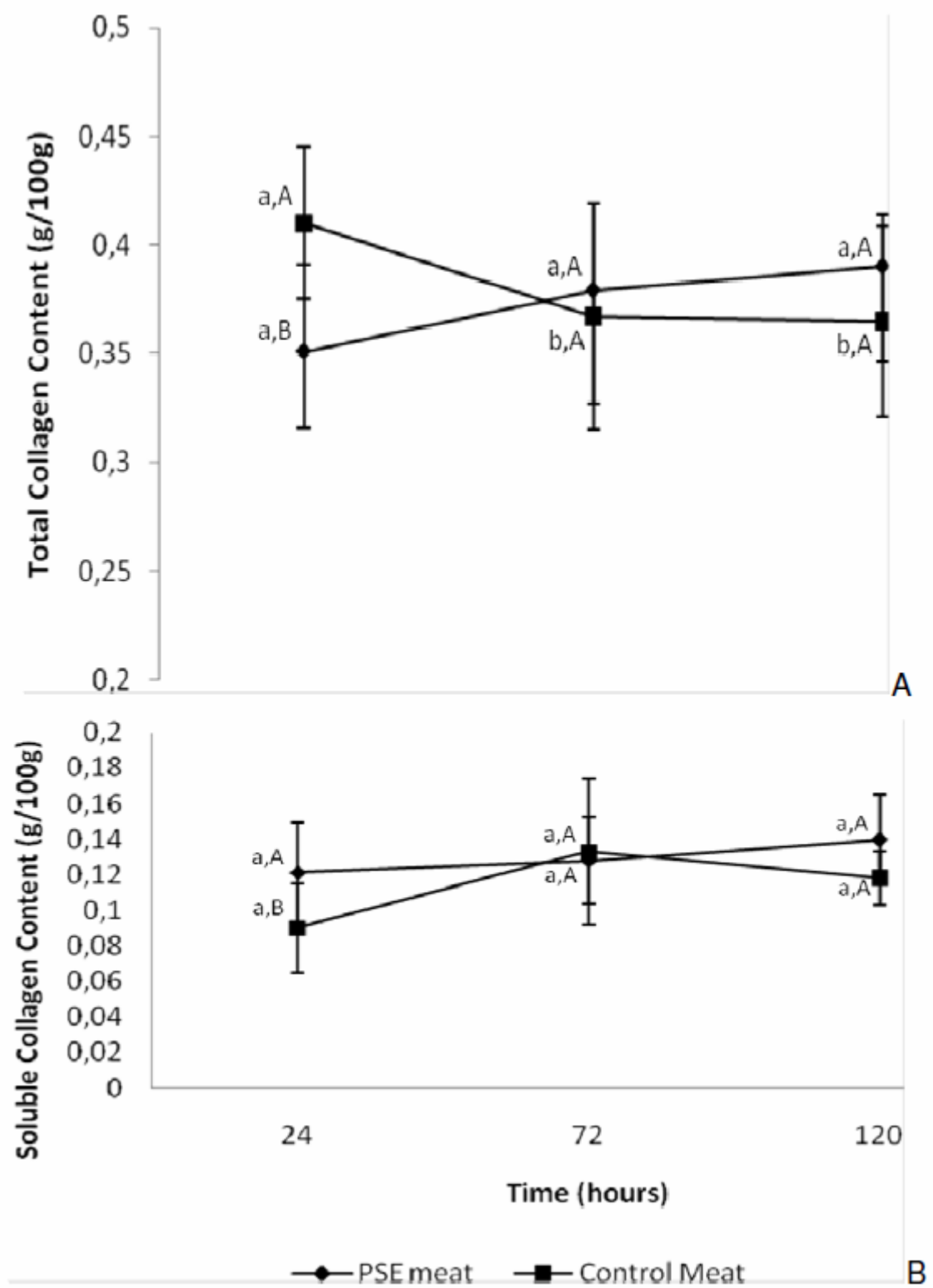
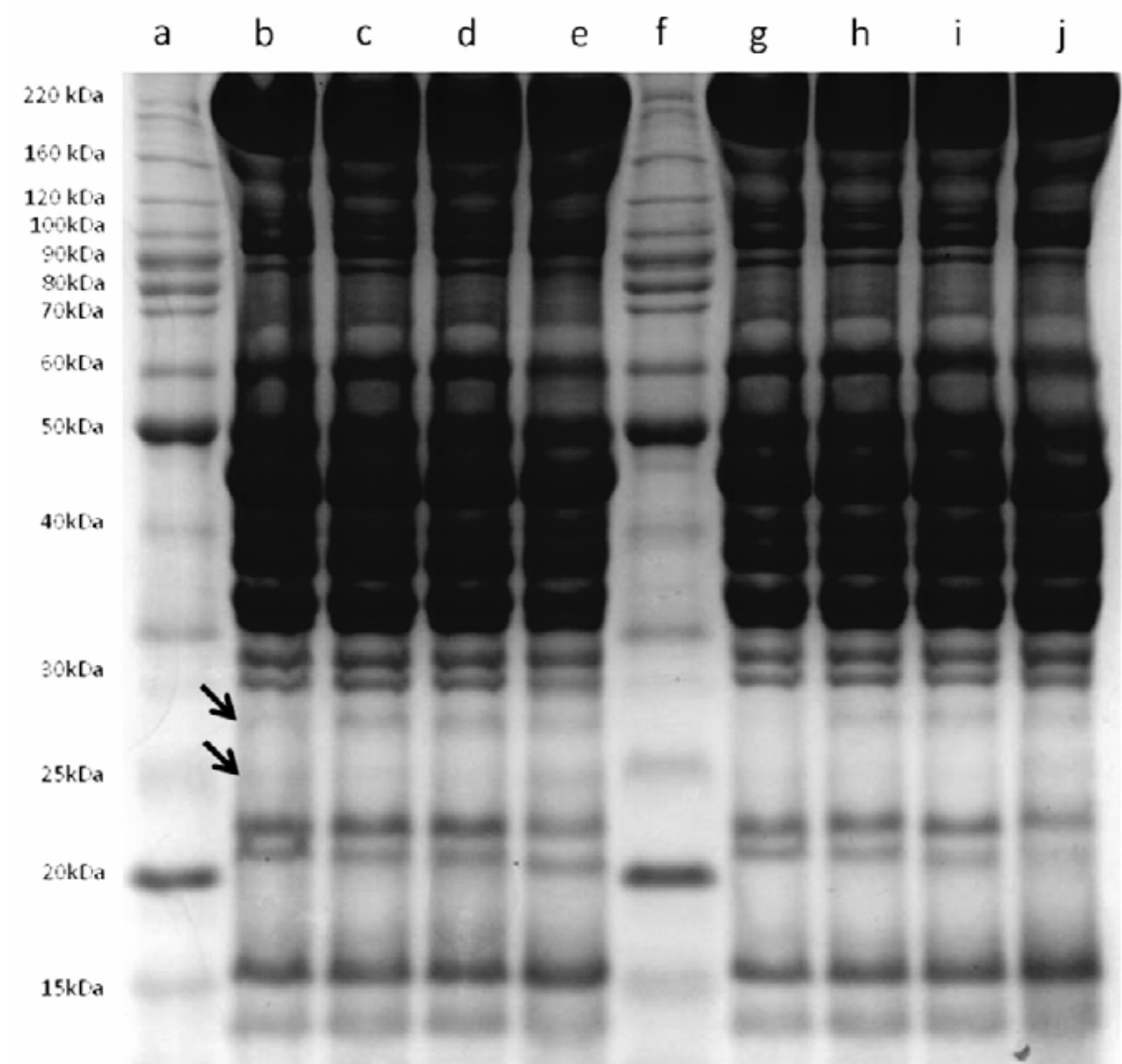


Fig. 5



4.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: ATIVIDADE DAS CATEPSINAS E ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA MIOFIBRILAR E CONJUNTIVA DE FILÉS PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) DE FRANGOS DURANTE O ARMAZENAMENTO

O artigo apresentado a seguir foi elaborado de acordo com as normas do periódico *Food Chemistry*, ao qual será submetido.

## Artigo Científico

**Título:** Atividade das catepsinas e alterações na estrutura miofibrilar e conjuntiva de filés PSE (*Pale, Soft, Exudative*) de frangos durante o armazenamento

**Autores:** Denis F. Marchi<sup>a</sup>, Gleice R. Santos<sup>a</sup>, Flávia M. Beteto<sup>a</sup>, Adriana L. Soares<sup>a</sup>, Francisco Hernández-Blazquez<sup>b</sup>, Elza I. Ida<sup>a</sup>, Massami Shimokomaki<sup>a, c, \*</sup>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação proteolítica das catepsinas e alterações estruturais em filés PSE de frangos. Para isso, as atividades das catepsinas B + L, B, L e H, concentração das proteínas miofibrilares e características ultraestruturais foram avaliadas em filés Controle e PSE durante o seu armazenamento a  $0 \pm 1$  °C por 4, 24, 72 e 120 h *post mortem*. As carnes PSE apresentaram teor de proteínas miofibrilares inferiores ( $p \leq 0,05$ ) ao de filés Controle durante todo o período de armazenamento. A atividade das catepsinas B + L dos filés PSE manteve-se constante por um intervalo de tempo maior, enquanto que nos filés Controle foi reduzida pela metade 24 h *post mortem*. Carnes PSE apresentaram maior fragmentação da sua estrutura miofibrilar e colágena durante o armazenamento e ação proteolítica prolongada das catepsinas B + L e L.

**Palavras-chave:** Proteases. Proteínas miofibrilares. Colágeno.

---

<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, PR, Brasil.

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, Avenida dos Pioneiros, 3131, CEP 86036-370, Londrina, PR, Brasil.

\* **Autor Correspondente:** Tel.: +55-43-91017787; Fax: +55-43-33714080 *E-mail:* [mshimo@uel.br](mailto:mshimo@uel.br) (Massami Shimokomaki)

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção mundial de frango e a sua comercialização aumentaram rapidamente e, em muitas partes do mundo, o consumo per capita desta carne continua a se elevar (Petracci, Bianchi; Cavani, 2009). Paralelamente, as aves têm sido submetidas a uma intensa seleção genética para rápido crescimento muscular, o que acentuou os problemas com a qualidade da carne de frango. Estes problemas são normalmente causados por alterações na bioquímica e morfologia dos músculos, bem como por eventos *post mortem* anormais (Barbut, Sosnicki, Lonergan, Knapp, Ciobanu, Gatcliffe *et al.*, 2008). Entre as modificações, o acelerado crescimento muscular resultou em uma baixa capacidade de retenção de água (CRA) durante o processamento e armazenamento, o que compromete as propriedades funcionais da carne de frango (Dransfield; Sosnicki, 1999). Este fato é frequentemente associado a um aumento da palidez da carne, sendo esta condição referida como pálida, flácida e exsudativa (PSE), semelhante à síndrome em suínos, conhecida por gerar uma carne com características inadequadas para o processamento (Petracci *et al.*, 2009).

Além de uma baixa CRA, carnes PSE apresentam sua textura comprometida (Wilhelm, Maganhini, Hernández-Blazquez, Ida; Shimokomaki, 2010; Marchi, Beteto, Santos, Soares, Ida; Shimokomaki, 2012). Segundo Marchi *et al.* (2012), filés com esta anomalia apresentam alterações na atividade de proteases, responsáveis pela maciez ou maturação da carne. Destacam-se as calpaínas, as quais vêm sendo estudadas por diversos autores (Mohammad, Ilian, Alaa El-Din Bekhit; Roy Bickerstaffe, 2004; Kristensen, Christensen; Erbjerg, 2006; Wilhelm *et al.*, 2010).

Outro sistema proteolítico também atuante na maturação da carne e pouco abordado em aves é composto pelas enzimas catepsinas (Chéret, Delbarre-Ladrat, Lamballerie-Anton; Verrez Bagnis, 2007; Godiksen, Morzel, Hyldig; Jessen, 2009). Catepsinas são um grupo de proteases compostas por exo e endopeptidases, categorizadas nas seguintes famílias: cisteína (catepsinas B, H, L e X), aspártica (D e E) e serina (G) proteases (Santandreu, Coulis; Ouali, 2002). Existem controvérsias quanto à ação destas enzimas no processo de amaciamento (Koochmaraie, Whipple, Kretchmar, Crouse; Mersmann, 1991; O'Halloran, Troy, Buckley; Reville, 1997). Entretanto, as atividades das catepsinas B e L em 8 h *post mortem* foram

positivamente correlacionadas com a maciez do músculo *Longissimus dorsi* (LD) pela ação em proteínas miofibrilares (O'Halloran *et al.*, 1997) e por atuarem sobre moléculas de colágeno, com um pH ótimo próximo a 5,5 (Kirschke, Kembhavi, Bohley; Barrett, 1982; Kirschke, Barret; Rawlings, 1995). A ação destas proteases em filés PSE ainda não está elucidada. Marchi *et al.* (2012) verificaram que a concentração de colágeno é menor em carnes PSE 24 horas *post mortem*, atribuindo estes resultados à ativação precoce das catepsinas nestas amostras. Os mesmos autores observaram que no período de 72 horas *post mortem*, o colágeno de filés controle é degradado atingindo o teor observado nas carnes PSE, provavelmente devido à ação das catepsinas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação proteolítica das catepsinas e alterações estruturais em filés PSE de frangos armazenados sob refrigeração.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Amostras de filé de peito de frango foram obtidas de aves com 42 dias de idade em um frigorífico da região Oeste do Paraná. Os animais foram abatidos de acordo com as práticas convencionais do frigorífico: insensibilização, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração, *chiller*, desossa e refrigeração (Wilhelm *et al.*, 2010). O tempo decorrido entre o abate e a coleta de amostras foi de aproximadamente 3 horas.

### 2.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FÍSICO-QUÍMICOS

As amostras foram inicialmente classificadas com base no seu pH inicial, 3 horas *post mortem*, medido pela inserção de eletrodos diretamente no filé usando um potenciômetro de contato Texto 205 (Olivo, Soares, Ida; Shimokomaki, 2001). Trinta filés com  $\text{pH}_{3\text{h}} \leq 5,80$  foram classificados como PSE, enquanto que a mesma quantidade de amostras com  $\text{pH}_{3\text{h}} > 5,90$  foram classificados como Controle (Normais). Para as demais análises, as amostras permaneceram à temperatura de 0

± 1°C por 4, 24, 72 e 120 horas *post mortem*, sendo analisados 10 filés PSE e Controle em cada tempo.

### 2.2.1 Medida da Concentração de Proteínas Miofibrilares

A extração das miofibrilas e determinação de proteínas miofibrilares foram realizadas em filés PSE e Controle nos intervalos de 24, 72 e 120 horas *post mortem*, de acordo com o método descrito por Culler, Parrish, Smith e Cross (1978), conforme segue.

Foram utilizados 4 g do filé do músculo *Pectoralis major* livre de gordura e tecido conjuntivo. As amostras foram homogeneizadas em Ultra turrax a 13500 rpm em 20 mL de tampão MFI (100 mM de KCl, 20 mM de fosfato de potássio pH 7,0, 1 mM de EDTA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 mM de azida sódica) a 2 °C duas vezes por 30 segundos com mesmo intervalo em gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos a 2 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 20 mL de tampão MFI a 2 °C. As amostras foram mais uma vez centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos a 2 °C e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi então ressuspenso em 10 mL de tampão MFI a 2 °C e submetido a um agitador de tubos até a amostra tornar-se homogênea para ser filtrada em peneira com malha de polietileno de 1,0 mm<sup>2</sup> (mesh 18) para remover o tecido conjuntivo. Foram adicionados mais 10 mL de tampão MFI a 2 °C para lavagem do tubo da centrifuga e auxiliar na filtragem. A extração foi conduzida em duplicata.

A quantificação de proteínas miofibrilares totais foi realizada conforme o método de Biureto (Gornall, Bardwill; David, 1949) utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/mL. Em tubos de ensaio colocou-se 1 mL da amostra e em seguida adicionou-se 4 mL de reagente de Biureto. Os tubos foram colocados em ambiente escuro por 30 minutos para completar a reação. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Cintra 20 a 540 nm e o teor de proteína foi expresso em g/100 g de filé.

### 2.2.2 Medida da Atividade das Catepsinas

A medida da atividade das catepsinas B + L, B e H foi realizada conforme metodologia descrita por Toldrá e Etherington (1988). Para a realização da extração das proteases, 2,0 g de filé foram coletados nos intervalos de 4, 24 e 72 horas *post mortem*. Em seguida, foram homogeneizados em 20 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH = 5,0) contendo 1 mM de EDTA e 0,2 % de Triton X-100. O extrato foi homogeneizado três vezes (27000 rpm/10 s sobre banho de gelo e posteriormente centrifugado a 8000 rpm a 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e utilizado para a determinação da atividade das catepsinas. Para cada medida, 50 µL de extrato foi diluído com 250 µL de tampão fosfato 40 mM (pH = 6,0) contendo 0,4 mM de EDTA, 10 mM de cisteína e 0,05 mM de substrato. Os substratos utilizados para a medida das atividades das catepsinas B + L, B e H foram Z-PheArg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride, Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride e L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride, respectivamente.

A atividade das proteases foi avaliada em um espectrofluorímetro com excitação a 355 nm e emissão a 460 nm. O resultado foi expresso em UF (Unidade de Fluorescência) capaz de hidrolisar 1 µmol de substrato em 1 hora a 37 °C.

A atividade da isoforma L foi obtida pela diferença entre as atividades das catepsinas B + L e B.

### 2.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a classificação dos filés de frango em Controle e PSE, as amostras foram coletadas nos tempos de 4, 24, 72 e 120 horas *post mortem* e cortadas seguindo o eixo longitudinal e transversal da fibra e fixadas em solução (4 °C) de glutaraldeído 2 % tamponada com cacodilato de sódio 0,14 M pH 7,4 contendo sacarose a 180 mM. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M a pH 7,2, lavadas em ósmio-cacodilato (um volume de tetróxido de ósmio 2% em água destilada 0,1 M pH 7,2 e sacarose na concentração de 10,56 g por 100 mL) e permaneceram nesta solução por duas horas a 4 °C, sofrendo agitação contínua por rotação. Após, foram lavadas rapidamente em solução de

cloreto de sódio 0,9 % com sacarose na concentração de 504,0 g/L. Em seguida os fragmentos foram deixados por 24 horas em solução de acetato de uranila 0,5 % em água destilada e sacarose na concentração de 10,56 g por 100 mL a 4 °C. A seguir, as peças foram desidratadas em uma série de soluções de etanol com concentrações crescentes, seguindo-se de duas passagens em óxido de propileno puro por 20 min. cada. Posteriormente, foi realizada a infiltração com óxido de propileno mais resina em partes iguais por 12 horas, seguidas por uma passagem em resina pura por 1 hora a 37 °C e inclusão em resina Spurr (SEM, Hatfiel) em moldes de silicone por 2 dias. Após a polimerização os blocos foram cortados em ultramicrótomo Porter Blum MT2, com obtenção de cortes de 0,5 µm de espessura corados com mistura de azul de metileno 1 % e azur II 1 % em solução de bórax 1 % e observados ao microscópio óptico. Após a seleção da região de interesse, foram levados ao ultramicrótomo e obtidos cortes de 70 nm, colhidos em telas de cobre de 200 malhas e contrastados pelo acetato de uranila 2 % por 1 hora, seguindo-se coloração por citrato de chumbo 0,5 % por 30 minutos após lavagem. O exame dos cortes ultrafinos e as eletronicografias foram realizados no microscópio eletrônico JEOL 100CX II (Guarnieri, Soares, Olivo, Schneider, Macedo, Ida *et al.*, 2004).

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa STATISTICA 7.0 foi utilizado para análise dos resultados. O teste *t-student* foi aplicado para avaliar diferenças a 5 % de probabilidade entre amostras PSE e Controle no mesmo tempo de estocagem. O teste de *Tukey* foi aplicado para avaliar diferenças a 5 % de probabilidade entre os períodos de estocagem de amostras PSE e Controle.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Observou-se que durante todo o período de estocagem a concentração das proteínas miofibrilares na carne PSE foi inferior ( $p \leq 0,05$ ) a de filés Controle (Tabela 1). Este resultado evidencia a ação das proteases, conforme já relatado por Wilhelm *et al.* (2010) e Marchi *et al.* (2012). Estes autores observaram

que a carne PSE tem seu índice de fragmentação miofibrilar superior ao de filés Controle, atribuindo estes resultados à ação proteolítica precoce na carne PSE. Com o acelerado declínio do pH em filés de animais com esta anomalia, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  acumulam-se rapidamente no citoplasma, os quais são responsáveis pela ativação precoce das calpaínas (Clayes, Smet, Demeyer, Geers; Buys, 2001). Estas proteases iniciam a degradação das proteínas miofibrilares, diminuindo a sua concentração e tornando a carne mais macia nas primeiras horas *post mortem* (Pomponio, Ertbjerg, Karlsson, Costa; Lamestsch, 2010; Wilhelm *et al.*, 2010; Marchi *et al.*, 2012). No período de 72 horas *post mortem* houve uma diminuição do teor de proteínas miofibrilares nas carnes PSE, o qual manteve-se constante após este período, enquanto que nos filés controle permaneceu constante (Tabela 1). Esta diminuição provavelmente se deve à prolongada ação proteolítica em filés de animais com esta anomalia.

### 3.3 ATIVIDADE DAS CATEPSINAS

No período de 4 horas *post mortem* apenas as atividades das isoformas L e H foram superiores nos filés controle ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos PSE (Tabela 2). Provavelmente, este pequeno aumento não foi suficiente para promover maior degradação das proteínas miofibrilares, como pode ser observado pela maior concentração destas nos filés Controle no mesmo intervalo de tempo (Tabela 1). Entretanto, no tempo de 24 horas *post mortem* houve um declínio drástico da atividade das catepsinas B + L e L nas amostras Controle, enquanto que nas carnes PSE não houve alteração significativa na atividade destas proteases, demonstrando uma ação prolongada das catepsinas nos filés PSE. Dessa forma, no período de 24 horas *post mortem*, as atividades das catepsinas B + L e L mostraram-se 28 % e 30 % superiores ao dos filés Controle, respectivamente. A ação destas isoformas nas carnes PSE provavelmente deve-se ao menor pH observado nas mesmas (5,64) em comparação ao evidenciado nos filés Controle (5,98). Como as catepsinas B e L apresentam suas atividades ótimas em torno do pH igual a 5,5 (Kirschke *et al.*, 1982; Kirschke *et al.*, 1995) é bem provável que houve melhores condições para ação destas enzimas por mais tempo nos filés PSE que nos controle. O fato evidencia que a ação proteolítica destas enzimas é prolongada por um período de tempo maior em

filés PSE, os quais podem sofrer maior degradação de suas proteínas miofibrilares, conforme observado na Tabela 1.

A isoforma B não apresentou alteração durante o armazenamento dos filés. Além disso, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na sua atividade entre as amostras controle e PSE (Tabela 2), demonstrando a prevalência da ação das catepsinas L nas carnes PSE ou possivelmente um efeito sinérgico da ação das isoformas B e L. No intervalo de 72 horas após abate dos animais, houve um declínio das atividades das catepsinas B + L e L, as quais se igualaram às observadas nas amostras controle (Tabela 2).

### 3.4 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL

Nota-se em 4 horas *post mortem*, que os filés Controle apresentam uma estrutura dos miofilamentos típica de músculo de carne *post mortem* (Figura 1), sem mudanças destrutivas aparentes (Figura 1 A) e observa-se que as bandas I e A, zona H e linha Z são evidentes. Na amostra PSE (Figura 1 E) verifica-se algumas fragmentações, principalmente entre os sarcômeros o que provavelmente deve-se à ação precoce das calpaínas. Além disso, os sarcômeros dos filés PSE são aparentemente menores que os da amostra controle, com as bandas I pouco evidentes em toda a estrutura o que pode ser explicado pelo acelerado metabolismo nas carnes PSE, promovendo a formação precoce do complexo actomiosina (*rigor mortis*). Isto provavelmente favorece o destacamento dos sarcômeros adjacentes e separa as miofibrilas originando a abertura de espaços para passagem de água (Figura 1 E). No período de 24 horas *post mortem* (Figura 1 B) também não foram observadas alterações na ultraestrutura da amostra controle, a qual permaneceu semelhante ao visualizado no tempo 4 horas *post mortem* (Figura 1 A). Entretanto, na amostra PSE 24 horas *post mortem* (Figura 1 F) observa-se uma elevada desorganização do sarcômero, onde as típicas regiões claras e escuras da estrutura quase desapareceram, além de diminuição da densidade das linhas Z, onde encontram-se os principais substratos das calpaínas (Banks, 1991; Lawrie, 2005). Visualizam-se também inúmeras lacunas no interior do sarcômero, onde predominam as proteínas actina e miosina, as quais são substratos para as catepsinas, responsáveis também por modificações *post mortem* que contribuem com a maciez da carne (O'Halloran *et al.*, 1997).

As catepsinas são proteases presentes nos lisossomos e necessitam ser liberadas desta região para que possam atuar (Hopkins; Thompson, 2002). Após a morte do animal, inicia-se uma progressiva degradação da membrana lisossomal, o que permite a saída das catepsinas (O'Halloran *et al.*, 1997). O pH favorável dos filés PSE permite que estas proteases atuem melhor sobre a estrutura miofibrilar das carnes com esta anomalia, degradando-as mais rapidamente, conforme observado na Figura 1 E. Isto demonstra que além das calpaínas, as catepsinas tem uma importante participação durante o armazenamento das carnes PSE. Desta forma, as modificações no interior do sarcômero observadas nas amostras PSE no período de 24 horas *post mortem* devem-se às catepsinas B + L e L, as quais apresentaram suas atividades superiores ( $p \leq 0,05$ ) as dos filés controle no mesmo intervalo de tempo (Tabela 2). Além da fragmentação da miosina e actina, estas isoformas podem ter contribuído com a degradação de outras proteínas como por exemplo a troponina T, substrato destas proteases. Estudos realizados através da proteólise *in vitro* de proteínas miofibrilares derivadas de filé de robalo demonstraram que a troponina T foi degradada pelas catepsinas B e L, com concomitante aparecimento de um peptídeo com 30 kDa e resistentes à ação da isoforma D (Ladrat, Verrez-Bagnis, Noel; Fleurence, 2003). O efeito das catepsinas L e D sobre as proteínas miofibrilares derivadas de carne bovina, suína, de coelho e frango foi estudado por alguns autores. Zeece, Katoh, Robson, e Parrish (1986) incubaram a isoforma D com proteínas miofibrilares da carne bovina e, contrariamente aos resultados obtidos por Ladrat *et al.* (2003) observaram a degradação de pequenas quantidades de troponina T. Por outro lado, Mukami, Whiting, Taylor, Maciewicz, e Etherington (1987) estudaram a degradação das proteínas miofibrilares da carne de coelho, frango e boi pelas catepsinas L, observando o desaparecimento da troponina T após 15 minutos de incubação.

Diversas lacunas, algumas marcadas por setas, são claramente observadas na região do endomísio nos filés PSE já no período de 4 horas *post mortem* em cortes transversais do músculo (Figura 2). Esta região é composta principalmente por fibras de colágeno, as quais podem ser degradadas pelas catepsinas. É bem provável que o prolongamento das elevadas atividades das catepsinas B + L e L tenham sido as principais causas por estas lacunas verificadas na região do endomísio nos filés PSE durante todo o seu armazenamento. Além disso, evidencia-se um aparente encolhimento da célula muscular nas amostras PSE

no período de 4 horas *post mortem*, o que provavelmente aumentou o espaço entre as células. Este encolhimento ocorre devido ao rápido declínio do pH e condições de temperatura relativamente elevadas, as quais desnaturam as proteínas musculares e prejudicam as suas propriedades funcionais, impedindo assim a retenção de água (Wilhelm *et al.*, 2010). É provável que a água comece a mover-se do compartimento intracelular para o endomísio e, finalmente, para a superfície da carne, como normalmente ocorre com as carnes PSE. Obviamente, as amostras controle apresentaram redes endomisiais com fibras colágenas visíveis durante praticamente todo o período de armazenamento.

#### **4 CONCLUSÃO**

Carnes PSE apresentam maior fragmentação da sua estrutura miofibrilar e colagenosa durante o armazenamento e prolongada ação proteolítica das catepsinas B + L e L.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento desta pesquisa (Proc# 475503/2009-0). DFM é bolsista de Doutorado da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). MS e EII são bolsistas produtividade do CNPq.

#### **REFERÊNCIAS**

- Banks, W. J. (1991). *Histologia Veterinária Aplicada*. 2ed. São Paulo: Manole, p.215-236.
- 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*, v.79, 46-63.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton M., & Verrez Bagnis. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscle. *Food Chemistry*, 101, 1474-1479.

Claeys, E., De Smet, S., Demeyer, D., Geers, R., & Buys, N. (2001). Effect of rate of pH decline on muscle enzymes activities in two pig lines. *Meat Science*, 57, 257-263.

Culler, R. D., Parrish, F. C., Smith, G. C., & Cross, H. R. (1978). Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical, and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *Journal of Food Science*, 43, 1177-1180.

Dransfield, E., & Sosnicki. (1999). Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Science*, 78, 743-746.

Godiksen, H., Morzel, M., Hyldig, G., & Jessen, F. (2009). Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 113, 889-896.

Gordall, A. G., Bardwill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766.

Guarnieri, P. D., 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. *Journal of Biochemistry*, 28, 269-277.

Hopkins, D. L., & Thompson, J. M. (2002). The degradation of myofibrillar proteins in beef and lamb using denaturing electrophoresis – An overview. *Journal of Muscle Foods*, 13, 81–102.

Kirschke, H., Kembhavi, A. A., Bohley, P., & Barrett, A. J. (1982). Action rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochemical Journal*, 201, 367–374.

Kirschke, H., Barret, A. J., & Rawlings, N. D. (1995). Proteinases I: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile*, 2, 1587–1620.

Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D., & Mersmann, H. J. (1991). Post mortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 69, 617–624.

Kristensen, L., Christensen, M., & Erbjerg, P. (2006). Activities of calpastatin, I-calpain and m-calpain are stable during frozen storage of meat. *Meat Science*, 72, 116-120.

Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J., & Fleurence, J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): Effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry*, 81, 517-525.

Lawrie, R. A. *Ciência da carne*. Porto Alegre: Artmed Editora. 2005. 384p. Marchi, D., Beteto, F. M., Santos, G. R., Soares, A. L., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2012). Proteins fractions changes during ageing of broiler chicken PSE (*Pale*,

*Soft*, *Exudative*) and its relationship to meat quality, *Food Chemistry*. (a ser submetido)

Mohammad A. Ilian, Alaa El-Din Bekhit, Roy Bickerstaffe. (2004). The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem ageing. *Meat Science*, 66, 387-397.

Mukami, M., Whiting, A. H., Taylor, M. A. J., Maciewicz, R. A., & Etherington, D. J. (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. *Meat Science*, 21, 81-97.

O'Halloran, G. R., Troy, D. J., Buckley, D. J., & Reville, W.J. (1997). The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science*, 47, 187–210.

Olivo, R., Soares, A. L., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2001). Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. *Journal of Food Biochemistry*, 25, 271–283.

Petracci, M., Bianchi, M., & Cavani, C. (2009). The European perspective on Pale, Soft, Exudative conditions in poultry. *Poultry Science*, 88, 1518-1523.

Pomponio, L., Ertbjerg, P., Karlsson, A. H., Costa, L. N., & Lamestsch, R. (2010). Influence of early pH decline on calpain activity in porcine muscle. *Meat Science*, 85, 110-114.

Santandreu M. A., Coulis, G., Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 400–421.

Soares, A. L., Ida, E. I., Myiamoto, S., Hernández-Blazquez, F. J., Olivo, R., Pinheiro, J., & Shimokomaki, M. (2003). Phospholipase A2 activity in poultry PSE, pale, soft, exudative, meat. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 309–320.

Toldrá F., & Etherington D. J. (1988). Examination of cathepsins B, D, H and L activities in dry-cured hams. *Meat Science*, 23, 1-7.

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

Zeece, M. G., Katoh, K., Robson, R. M., & Parrish, F. C. (1986). Effect of cathepsin D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *Journal of Food Science*, 51, 769-775.

## Legenda das Figuras

**Fig. 1** – Microscopia Eletrônica de Transmissão de filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C em diferentes tempos: **a, b, c, d**: Controle 4, 24, 72 e 120 horas *post mortem*, respectivamente; **e, f, g, h**: PSE 4, 24, 72 e 120 horas *post mortem*, respectivamente. **S**: Sarcômero; **A**: Banda A; **I**: Banda I; **H**: Zona H; **Z**: Linha Z. (escala: 1  $\mu$ m)

**Fig. 2** – Microscopia Eletrônica de Transmissão de filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C em diferentes tempos: **a, b, c**: Controle 4, 24 e 120 horas *post mortem*, respectivamente (escala: 400 nm); **d, e, f**: PSE 4, 24 e 120 horas *post mortem*, respectivamente. [escalas: 600 nm (d), 600 nm (e), 400 nm (f)]

**Tabela 1** – Concentração das proteínas miofibrilares de filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C por 24, 72 e 120 horas *post mortem*.

	PSE	Controle
<b>Tempo <i>post mortem</i></b>	<b>[Proteína Miofibrilar] (g/100g)</b>	
24 h (n = 10)	15,67 <sup>bA</sup> $\pm$ 1,32	17,40 <sup>aA</sup> $\pm$ 2,43
72 h (n = 10)	14,57 <sup>bB</sup> $\pm$ 0,65	15,98 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,55
120 h (n = 10)	15,08 <sup>bAB</sup> $\pm$ 1,12	18,35 <sup>aA</sup> $\pm$ 3,93

<sup>a-b</sup> Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t* de *student* a 5,0% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>A-B</sup> Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5,0% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>±</sup> Desvio-padrão

**Tabela 2** – Atividade das Catepsinas B + L, B, L e H em filés Controle e PSE armazenados a  $0 \pm 1$  °C por 4, 24 e 72 horas *post mortem*.

	PSE	Controle
<b>Tempo <i>post mortem</i></b>	<b>Catepsinas B + L (UF)*</b>	
4 h (n = 10)	869,29 <sup>aA</sup>	935,31 <sup>aA</sup>
24 h (n = 10)	770,03 <sup>aA</sup>	551,21 <sup>bB</sup>
72 h (n = 10)	582,67 <sup>aB</sup>	585,68 <sup>aB</sup>
	<b>Catepsina B (UF)*</b>	
4 h (n = 10)	132,03 <sup>aA</sup>	137,17 <sup>aA</sup>
24 h (n = 10)	115,07 <sup>aA</sup>	115,56 <sup>aA</sup>
72 h (n = 10)	133,59 <sup>aA</sup>	140,05 <sup>aA</sup>
	<b>Catepsina L (UF)*</b>	
4 h (n = 10)	732,26 <sup>bA</sup>	798,14 <sup>aA</sup>
24 h (n = 10)	654,96 <sup>aA</sup>	435,65 <sup>bB</sup>
72 h (n = 10)	449,08 <sup>aB</sup>	445,62 <sup>aB</sup>
	<b>Catepsina H (UF)*</b>	
4 h (n = 10)	113,19 <sup>bA</sup>	147,03 <sup>aA</sup>
24 h (n = 10)	140,27 <sup>aA</sup>	136,74 <sup>aA</sup>
72 h (n = 10)	125,57 <sup>aB</sup>	141,14 <sup>aA</sup>

\* UF: Unidades de Fluorescência

<sup>a-b</sup> Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t* de *student* a 5,0% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>A-B</sup> Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5,0% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

Fig. 1

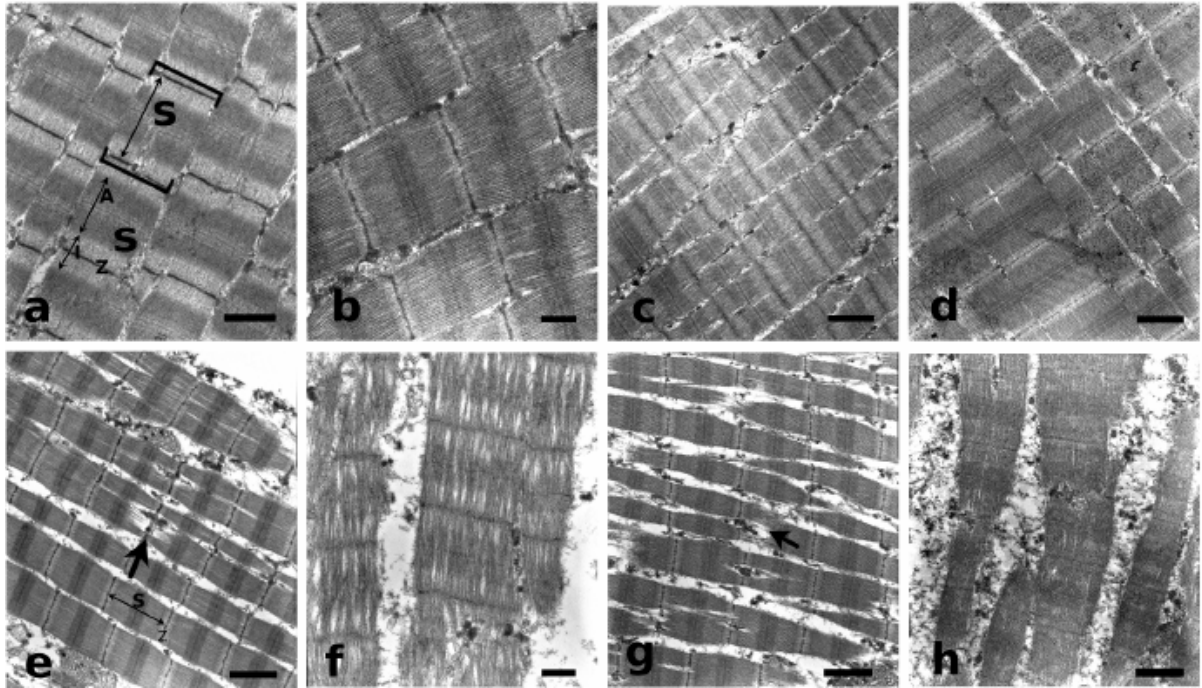
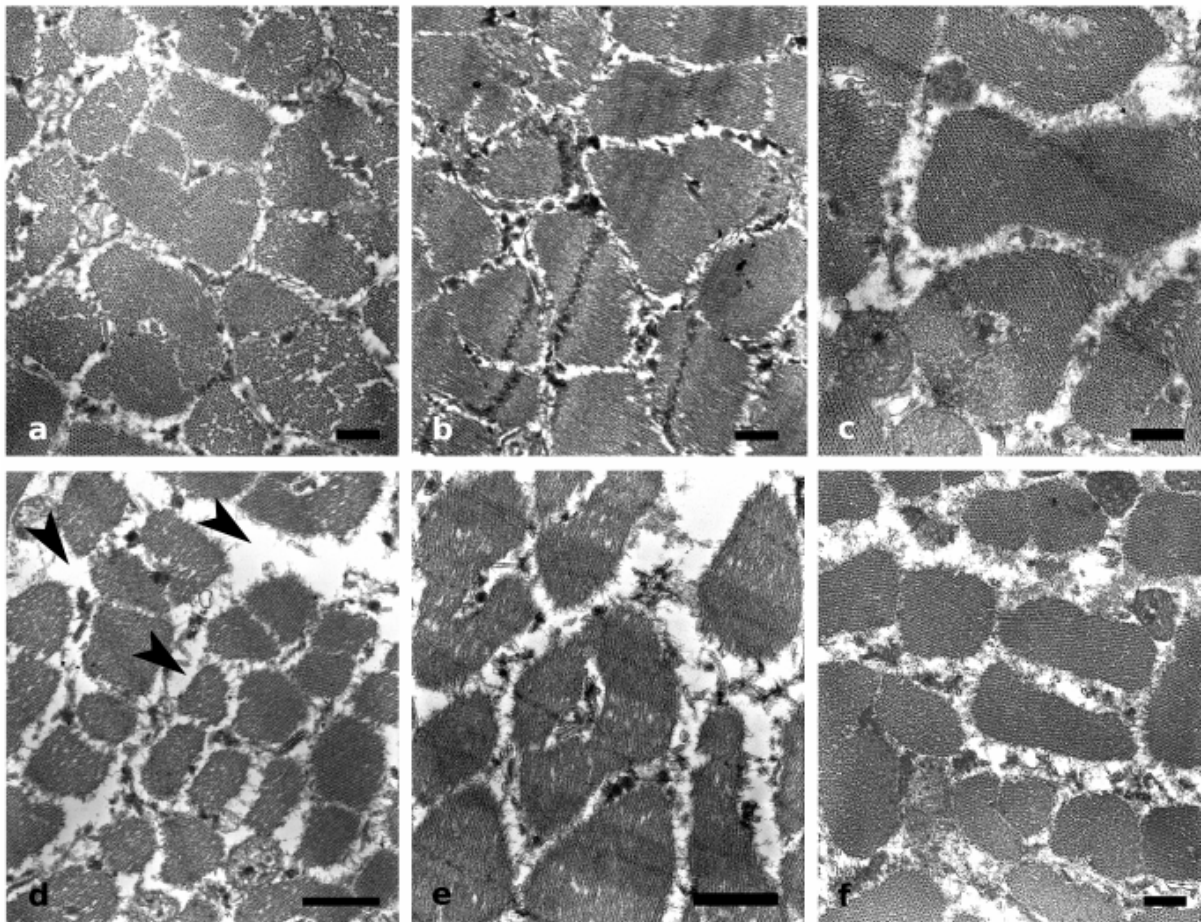


Fig. 2



## 5 CONCLUSÃO

Carnes PSE apresentam perda de peso por cozimento e maciez melhoradas nas primeiras horas *post mortem* devido à ação proteolítica e consequente degradação proteica. Entretanto, durante o armazenamento, a proteólise prolongada afeta a integridade da estrutura muscular prejudicando as propriedades funcionais da carne.