



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DENIS FABRÍCIO MARCHI

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE FRANGOS AO
HALOTANO E AO ESTRESSE TÉRMICO E SUA RELAÇÃO
COM A QUALIDADE DA CARNE**

Londrina
2008

DENIS FABRÍCIO MARCHI

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE FRANGOS AO
HALOTANO E AO ESTRESSE TÉRMICO E SUA RELAÇÃO
COM A QUALIDADE DA CARNE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Massami Shimokomaki, PhD

Londrina
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M317a Marchi, Denis Fabrício.

Avaliação da sensibilidade de frangos ao halotano e sua relação com a qualidade da carne / Denis Fabrício Marchi. – Londrina, 2009. 94 f. : il.

Orientador: Massami Shimokomaki.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Teste do Halotano – Teses. 2. Carnes PSE. 3. Estresse térmico I. Shimokomaki, Massami. II. Universidade Estadual de Londrina. II. Título.

CDU 54:577.4

DENIS FABRÍCIO MARCHI

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE FRANGOS
AO HALOTANO E AO ESTRESSE TÉRMICO E SUA RELAÇÃO COM
A QUALIDADE DA CARNE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Massami Shimokomaki
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Alice Eiko Murakami
UEM – Maringá - PR

Profa. Dra. Sandra Helena Prudêncio
UEL – Londrina - PR

Londrina, 16 de maio de 2008.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Toninho e Fátima,
Elementos essenciais na minha vida.*

Meus exemplos de vida e amor.

*Ao meu irmão Kadu, Amigo e parceiro em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Massami Shimokomaki, o qual considero como um Pai Científico. Muito obrigado pelos conselhos, contribuições para o meu crescimento profissional, amizade e principalmente pela sábia orientação e confiança atribuída no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares, pela amizade, pelos conselhos e dedicada orientação, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Alexandre Oba, pelos conselhos, amizade, constantes auxílios práticos e teóricos, indispensáveis no decorrer do mestrado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), pela concessão da bolsa e auxílio financeiro deste trabalho.

À Fundação Araucária pelo auxílio financeiro destinado à esta pesquisa.

À Profa. Dra. Elza Louko Ida, pela amizade e conselhos dispensados para o meu crescimento profissional.

Aos Prof. Dr. Marco Antônio Trindade, Prof. Dr. José Bento Ferraz e ao Tércio Michelin Filho, que nos receberam em seu grupo de pesquisas na Universidade de São Paulo – FZEA, abrindo as portas para uma das etapas deste experimento.

Ao Dr. João Cláudio, pelo apoio, sugestões e ajuda dispensada no decorrer deste trabalho.

À empresa Big Frango, pelo espaço e amostras cedidos.

À Profa. Dra. Alice Murakami da Universidade Estadual de Maringá e ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernández Blazquez da Universidade de São Paulo pela colaboração na obtenção de reagentes.

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.

Aos alunos de Mestrado e Doutorado do Grupo de Carnes desta instituição: Íris, Cassiana, Allan, Cristina, Marta, Gislaine, Luiz Gustavo e Adriana Droval pela valiosa e indispensável ajuda nos experimentos realizados.

Aos estagiários do Grupo de Carnes desta instituição: Gleice, Bruno, Alberto, Thaísa, Elisa, Lucas, Felipe, Janaina e Pedro e também ao Apoio Técnico Valdecir pelos auxílios destinados aos experimentos deste trabalho.

Aos Funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta instituição pela ajuda e atenção dispensada.

Aos alunos do curso de Zootecnia: Rimena, Gustavo, Vitor e Maurício, pelo auxílio experimental dispensado no decorrer deste mestrado.

Aos meus amigos: Melícia, Melissa, Fernando, Valéria, Cleusa, Luiz Rodrigo, Luciana Bernd, e Fernanda Campanha, pelo incentivo, amizade e por estarem sempre presentes no decorrer destes 2 anos de trabalho, muito obrigado pela amizade e consideração.

Aos colegas e companheiros da minha turma de mestrado, em especial: Ariane e Ana Augusta pelos momentos compartilhados e pela amizade.

Aos colegas do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, em especial: Carolline Caliori, Norma Miranda, Elvis, Alexandre e Rafael, pela convivência e parceria.

Aos colegas de graduação Eduardo Niehues, Michele Rosset e Tiago Jorge, pela convivência contínua e apoio.

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

Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos. Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO, e quantas vezes for preciso. Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa.

Mário Quintana

MARCHI, Denis Fabrício. **Avaliação da sensibilidade de frangos ao halotano e ao estresse térmico e sua relação com a qualidade da carne.** 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Três experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a sensibilidade de frangos ao halotano e ao estresse térmico e sua relação com o desenvolvimento de filés PSE. Uma câmara foi elaborada exclusivamente para este trabalho, a qual foi interligada a um aparelho de anestesia veterinária, em que 3 aves por vez foram submetidas ao teste do halotano. No primeiro experimento, frangos de linhagem comercial (n=352) foram submetidos ao teste do halotano e classificados como sensíveis, indefinidos e não-sensíveis ao halotano baseados na rigidez dos seus membros inferiores. Após 3 e 48h da aplicação do teste, amostras de sangue foram coletadas de 12 aves de cada grupo e destinadas para a avaliação de parâmetros hematológicos como concentração de glicose e atividade enzimática de creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) Após 48h da aplicação do teste do halotano, 25 aves de cada grupo foram abatidas e o músculo Pectoralis major foi coletado 24h post mortem e o pH, cor (L*, a*, b*) e capacidade de retenção de água (CRA) foram determinadas para a caracterização de carnes PSE. As análises do valor de R foram realizadas em filés coletados aproximadamente 30 min post mortem e armazenados em nitrogênio líquido (-196°C). No segundo experimento, 298 aves bisavozeiras da linhagem fêmea foram também submetidas ao teste do halotano. As amostras de sangue foram coletadas após 3h da aplicação do teste do halotano para avaliação dos parâmetros hematológicos descritos anteriormente. Em seguida, 2, 11 e 15 aves dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível, respectivamente, foram abatidas e os valores de pH30min e pH24h, cor e CRA foram determinadas e os filés foram classificados quanto ao desenvolvimento de PSE. No terceiro experimento, 24 frangos de linhagem comercial foram divididos em 4 tratamentos: HHH (frangos submetidos ao teste do halotano e abatidos 1h após o teste), HET (frangos submetidos ao teste do halotano e a 35°C/1h após 48h a realização do teste do halotano com posterior abate), EET (frangos submetidos ao estresse térmico e abatidos imediatamente após este tratamento) e finalmente o Controle (CCC) em que os frangos não foram submetidos ao teste do halotano e nem ao estresse térmico. No primeiro experimento, 9,1% frangos foram sensíveis, 18,4% indefinidos e 72,5% não-sensíveis ao halotano. Contudo, no grupo Sensível, 40% foram classificados como carnes PSE, seguidos por também 40% obtidos no grupo Indefinido e 28% no grupo Não-sensível. A concentração de glicose foi significativamente menor ($p \leq 0.05$) em 48h após o teste do halotano em comparação com o tempo de 3h em todos os grupos. A atividade de LDH no grupo Não-sensível foi aproximadamente 40% menor em relação ao grupo Sensível em ambos os tempos pós-teste do halotano. Estes resultados explicam a maior ocorrência de carnes PSE no grupo Sensível devido à atividade da LDH na transformação de piruvato a lactato durante a instalação do rigor mortis. No segundo experimento, apenas 0,67% (n=2) das aves foram sensíveis, 3,69% (n=11) foram indefinidas e 95,6% (n=285) foram não-sensíveis ao halotano. Apenas 3 aves do grupo Indefinido e 3 do grupo Não-sensível originaram filés PSE. A atividade da LDH foi 3 vezes significativamente superior para os grupos sensível e

indefinido em relação ao grupo Não-sensível. No terceiro experimento, os tratamentos HHH, HET e EET apresentaram 4 aves cada com carnes PSE e 2 aves do tratamento CCC originaram filés PSE. O valor de pH_{24h} foi maior ($p \leq 0.05$) para os filés do tratamento CCC em comparação aos demais tratamentos e o valor de R foi maior para as aves dos tratamentos HET e EET em comparação ao CCC ($p \leq 0.05$) sugerindo que o rigor mortis foi instalado mais rapidamente nas amostras derivadas das aves submetidas ao estresse térmico. A concentração de glicose e as atividades de CK e LDH não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. Finalmente nossos resultados demonstraram que os frangos sensíveis ao halotano corroboram com o seu papel preditor de aves a originar carnes PSE como observado previamente em suínos e perus. Além disso, o halotano mostrou ser um agente estressor desencadeando alterações nos parâmetros hematológicos e no músculo das aves, semelhantes às desencadeadas pelo estresse térmico pré-abate.

Palavras-chave: Teste do Halotano. Estresse térmico. Carnes PSE.

MARCHI, Denis Fabrício. **Evaluation of the sensibility of broiler chicken to halothane and heat stress and relationship to meat quality.** 2008. 94f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Three experiments were conducted in order to evaluate broiler sensibility towards both halothane and thermal stress and its relationship to PSE fillet meat development. An original camera was designed equipped with an upper outside exhaustor and three birds were tested per experiment and linked to the veterinarian anesthetic equipment. In the first experiment, commercial lineage broilers (n=352) were submitted to halothane test and classified as halothane sensitive, insensitive and intermediate based on their response as leg rigidity. After 3 and 48 h of test application blood samples were collected from 12 birds of each group and quantitative analysis were carried out for hematological parameters evaluation as for the determination of glucose concentration and enzyme activity of creatine kinase (CK) and dehydrogenase lactate (LDH). Furthermore after 48h of halothane test 25 birds were slaughtered and Pectoralis major m. was collected after 24h post mortem and pH value, color (L*, a*, b*) and water holding capacity (WHC) were determined in order to characterize PSE meat. R value analysis was carried out in fillet samples collected after approximately 30 min post mortem and stored in liquid nitrogen (-196C). In the second experiment, 298 grand grandparents of female birds lineage were also submitted to halothane test. Blood samples were collected after 3h of halothane test in order to obtain the hematological parameters as described previously. Thus 2, 11, and 15 birds from sensitive, intermediate and insensitive, respectively, were slaughtered and values of pH_{30min} and pH_{24h}, color and WHC were determined and fillet samples were characterized for PSE. In the third experiment, 24 birds from commercial lineage were left for 4 treatments as follows: HHH treatment submitted to halothane test and slaughtered after 1h; HET treatment submitted to halothane test and thermal stress at 35C for 1h after 48h after halothane test and slaughtered immediately after this treatment; EET treatment submitted to thermal stress and slaughtered immediately; and finally CCC treatment control submitted neither to halothane test nor to thermal stress. In the first experiment, 9.1% were sensitive, 18.4% intermediate and 72.5% insensitive. However, in the sensitive group 40.0% were classified as PSE meat and the same 40.0% were obtained in the intermediate group and 28.0% in the insensitive group. The glucose concentration was significantly lower (p≤0.05) at 48h after halothane treatment in comparison to 3h in all groups and LDH activity in insensitive was app. 40.0% lower in relation to sensitive group at both post halothane testing times. These results explained the higher occurrence of PSE meat in sensitive group because of LDH activity on the transformation of piruvate to lactate during the installation of muscle rigor mortis. In the second experiment, only 0.67% (n=2) of birds were sensitive, 3.69% (n=11) were intermediate and 95.6% (n=285) were insensitive. Only three birds from intermediate group and three birds from insensitive group originated PSE fillet meat. LDH activity was 3 times significantly higher for both sensitive and intermediate groups in relation to insensitive group. In the experiment 3, HHH, HET, EET treatments presented 4 birds each which originated PSE meat and two birds from CCC oddly originated PSE meat. The pH_{24h} value was higher (p≤0.05)

in the breast fillet meat from CCC treatment in comparison to other treatments and R values on the other hand was higher in samples from HET and EET in comparison to CCC ($p \leq 0.05$) suggesting that rigor mortis was more rapidly installed in samples derived from thermally stress muscles. Glucose concentration and CK and LDH enzymic activities didnot show significant difference among those treatments. Finally our results, demonstrated that broiler chickens were sensitive to halothane corroborating its role as predictor to potentially of determining those birds to originate PSE breast fillet meat as observed by other authors previously for pork and turkeys.

Key-words: Halothane test. Heat stress. PSE Meat .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fatores ambientais de impacto sobre a qualidade da carne suína e de aves.....	24
Figura 2 –	Mecanismo de contração muscular normal e em animais portadores da PSS, que devido à elevação da temperatura também é chamada de Hipertermia Maligna (HM) (MACLENNAM e PHILIPS, 1992)	26
Figura 3 –	Parte do eixo da seqüência de aminoácidos no DNA, na qual ocorreu uma mutação de Arg ⁶¹⁵ para cisteína (localizada na caixa). A seqüência normal GCGCTC foi alterada para GTGCTC (FUJII et al., 1991)	28
Figura 4.–	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).....	31
Figura 5 –	Mecanismo de produção do ácido láctico, a qual é catalisada pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH), relacionada à rápida queda do pH do músculo (ROÇA e SERRANO, 1994, adaptada).....	32
Figura 6 –	Ações hormonais que levam a maior produção de glicose sanguínea.....	34
Figura 7 –	Estruturas químicas dos hormônios corticosterona e cortisol	34
Figura 8 –	Em situação de estresse, há maior liberação de Ca ²⁺ , o que promove aceleração metabólica do músculo acarretando uma queda brusca do pH, proporcionando assim carnes PSE. Ao mesmo tempo ocorre a quebra do ATP em ADP e, finalmente deste último em IMP. (SOARES et al., 2007).....	35
Figura 9 –	Procedimento de obtenção do composto halotano na sua forma líquida.....	38

Figura 10 – Peru classificado como sensível ao gás halotano, exibindo sinais de rigidez nos membros inferiores (a). Peru classificado como não sensível ao gás halotano apresentando ausência de rigidez nos membros inferiores (b) (OWENS et al., 2000b)	40
Figura 11 – Câmara de aplicação do teste do halotano (ao centro) elaborada exclusivamente para o teste em frangos	43
Figura 12 – Classificação dos frangos frente à aplicação do teste do halotano a 3 % por 5 min.; a) não-sensível (ausência de enrijecimento dos membros inferiores), b) sensível (enrijecimento dos membros inferiores) e c) indefinido (enrijecimento de apenas um dos membros)	43
Figura 13 – Coleta de sangue realizada na asa do frango, após 3 e 48 h da aplicação do teste do halotano, onde aproximadamente um volume de 5 mL do mesmo foi coletado de cada animal.....	45
Figura 14 – Câmara construída para a aplicação de estresse térmico (35°C/1h) em frangos	54
Figura 15 – Frangos desacordados após serem submetidos ao teste do halotano a 3 % por 5 min	57
Figura 16 – Incidência de frangos sensíveis, indefinidos e não-sensíveis ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min	58
Figura 17 – Incidência de carnes de frango com características PSE nos grupos Sensível (a), Indefinido (b) e Não-sensível (c) ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min	60
Figura 18 – Incidência de frangos sensíveis, indefinidos e não-sensíveis ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 minutos	68
Figura 19 – Incidência de carnes de frango com características PSE nos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min	70

Figura 20 – Ocorrência de carnes com características PSE em frangos dos tratamentos HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.....	75
Figura 21 – Frangos apresentando dispnéia típica durante a aplicação de estresse térmico a 35 °C por 1 h.....	76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios de pH final (pHf), Cor (L*, a*, b*) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos filés de peito de frango 24h post mortem dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min63
- Tabela 2** – Valor de R de filés de frangos dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min64
- Tabela 3** – Concentração de glicose sanguínea e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) dos frangos dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano, coletados após 3 e 48 h a serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min66
- Tabela 4** – Valores médios de pH inicial (pHi) e final (pHf), Cor (L*, a*, b*) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos filés de peito de frango 24 h post mortem dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min72
- Tabela 5** – Concentração de glicose e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) sanguíneas dos frangos dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano, coletados após 3 h a serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min73
- Tabela 6** – Valores médios de pH inicial (pHi) e final (pHf), Cor (L*, a*, b*) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos filés de peito de frango dos tratamentos77
- Tabela 7** – Valor de R de filés de frango dos tratamentos79
- Tabela 8** – Concentração de glicose sanguínea e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) dos frangos dos tratamentos.....80

Tabela 9 – Concentração de glicose e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) sanguíneas dos frangos dos tratamentos	81
Tabela 10 – Concentração de glicose sanguínea e das atividades de CK e LDH dos frangos dos tratamentos.....	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 QUALIDADE DA CARNE	22
3.2 ESTRESSE ANIMAL	23
3.3 PSS E PSE EM SUÍNOS	25
3.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS RELACIONADAS COM PSE	30
3.5 PSE EM AVES	36
3.6 TESTE DO HALOTANO	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 EXPERIMENTO 1 TESTE DO HALOTANO EM LINHAGEM COMERCIAL DE FRANGOS	42
4.1.1 Animais	42
4.1.2 Teste do Halotano	42
4.1.3 Coleta de Sangue	44
4.1.3.1 Obtenção do plasma sanguíneo	45
4.1.3.2 Obtenção do soro sanguíneo	45
4.1.4 Análise dos Parâmetros Hematológicos dos Animais	46
4.1.4.1 Medida de glicose	46
4.1.4.2 Medida da atividade de lactato desidrogenase (LDH)	46
4.1.4.3 Medida da atividade de creatina quinase (CK)	46
4.1.5 Abate	47
4.1.6 Análises no Músculo Pectoralis Major	47
4.1.6.1 Medida de pH final	47
4.1.6.2 Medida de cor	48
4.1.6.3 Medida da capacidade de retenção de água (CRA)	48
4.1.6.4 Medida do valor de R	49
4.1.7 Classificação das Amostras	49

4.1.8 Análise Estatística	49
4.2 EXPERIMENTO 2: TESTE DO HALOTANO AVES BISAVOZEIRAS DE LINHA FÊMEA DO FRANGO COMERCIAL	50
4.2.1 Animais.....	50
4.2.2 Teste do Halotano	51
4.2.3 Coleta de Sangue.....	51
4.2.4 Análise dos Parâmetros Hematológicos dos Animais	51
4.2.5 Abate	51
4.2.6 Análises no Músculo Pectoralis major	52
4.2.7 Classificação das Amostras	55
4.2.8 Análise Estatística	55
4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO HALOTANO E DO ESTRESSE TÉRMICO COMO AGENTES ESTRESSORES NAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E NA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO	53
4.3.1 Animais.....	53
4.3.2 Tratamentos	53
4.3.3 Teste do Halotano	54
4.3.4 Estresse Térmico	54
4.3.5 Coleta de Sangue.....	55
4.3.6 Análise dos Parâmetros Hematológicos dos Animais	55
4.3.7 Abate	55
4.3.8 Análises no Músculo Pectoralis major	56
4.3.9 Classificação das Amostras	56
4.3.10 Análise Estatística	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 EXPERIMENTO 1: TESTE DO HALOTANO EM LINHAGEM COMERCIAL DE FRANGOS	57
5.1.1 Sensibilidade ao Halotano.....	57
5.1.2 Avaliação do Músculo Pectorallis major	60
5.1.2.1 Incidência de carnes PSE	60
5.1.2.2 Avaliação dos parâmetros de detecção de carnes PSE entre os grupos.....	62
5.1.2.2.1 <i>pH final, cor e CRA</i>	62
5.1.2.2.2 <i>Valor de R</i>	63

5.1.3 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Animais	65
5.2 EXPERIMENTO 2: TESTE DO HALOTANO EM AVES BISAVOZEIRAS DA LINHAGEM FÊMEA DO FRANGO COMERCIAL	68
5.2.1 Sensibilidade ao Halotano	68
5.2.2 Avaliação do músculo Pectoralis major	69
5.2.2.1 Incidência de carnes PSE	69
5.2.2.2 Avaliação dos parâmetros de detecção de carnes PSE entre grupos.....	71
5.2.2.2.1 <i>pH inicial e final, cor e CRA</i>	71
5.2.3 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Animais	72
5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO HALOTANO E DO ESTRESSE TÉRMICO COMO AGENTES ESTRESSORES NAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO	74
5.3.1 Influência do Estresse Térmico e do Halotano sobre as características PSE.....	74
5.3.1.1 Ocorrência de carnes PSE	74
5.3.1.2 Avaliação dos parâmetros de detecção de carnes PSE.....	77
5.3.1.2.1 <i>pH inicial e final, Cor e CRA</i>	77
5.3.1.2.2 <i>valor de R</i>	78
5.3.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Animais	79
6 DISCUSSÃO GERAL	83
7 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de carne de aves está entre as mais importantes cadeias agropecuárias do país, e devido sua dimensão e organização, o Brasil desfruta a terceira posição na produção mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA, 2008). Em relação à exportação, o Brasil ocupa o primeiro lugar, apresentando como um dos diferenciais a avançada tecnologia aplicada, onde produtores e indústrias contam com investimentos que permitem, por exemplo, programar a produção de frangos para obter maior rendimento de partes nobres como peito, coxas e sobrecoxas (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2008).

Esse avanço genético foi responsável pela obtenção do “frango moderno”, capaz de atingir 2 kg de peso em aproximadamente 42 dias. Porém, pouco se sabe sobre o impacto que a seleção genética pode ter provocado sobre a qualidade da carne de frango, e conseqüentemente, sobre suas propriedades funcionais (LE BIHAN DUVAL, 2003; BARBUT, 1997).

Uma das possíveis conseqüências da seleção genética é a carne PSE (Pale, Soft, Exudative), que apresenta como característica de superfície: palidez, flacidez e perda de exsudato. Essas alterações são decorrentes do desenvolvimento de uma glicólise post mortem elevada, ocasionando uma queda drástica do pH muscular. Essa rápida queda do pH associada à elevada temperatura da carcaça (aproximadamente 35 °C) causa a desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, levando à perda de exsudato (BENDAL; WISMER-PERDERSEN, 1962) e, conseqüentemente, compromete as propriedades funcionais da carne (CANDEK-POTOKAR et al., 1998; BREWER; MCKEITH, 1999).

Estudos realizados com suínos mostram uma relação entre carnes PSE e uma síndrome denominada Síndrome do Estresse Suíno (PSS -Porcine Stress Syndrome) relacionada com a excessiva liberação de íons Ca^{2+} celular durante a contração muscular, o que leva ao rápido metabolismo anaeróbico e a rigidez do músculo (MITCHELL; HEFFRON, 1982; BERTOL, 2005). Essa relação foi comprovada por Fujii et al. (1991) que detectaram um ponto de mutação no gene *ryr1*, responsável por codificar a proteína denominada receptora de rianodina do tipo

1 (RyR1) ou canal liberador de íons Ca^{2+} , localizado no retículo sarcoplasmático (RS) do músculo esquelético (O'BRIEN, 1995).

A PSS foi inicialmente detectada com auxílio do halotano, um anestésico capaz de promover a rigidez muscular dos membros inferiores de suínos portadores dessa síndrome (BERTOL, 2005). A ação do halotano também foi avaliada em perus, onde foi constatado que os mesmos apresentavam reação similar à encontrada em suínos (WHELLER et al., 1999; OWENS et al., 2000 a,b). Em frangos um estudo realizado por Cavitt et al. (2004) demonstrou tal reação, porém os autores afirmaram que a sensibilidade desses animais ao halotano não explica toda a ocorrência de carnes PSE.

Fatores ambientais, tais como apanha dos animais, transporte, temperatura e tempo de jejum, reconhecidamente, têm papel fundamental sobre a qualidade final da carcaça dos animais. Entretanto, a alteração da qualidade pode também ser obtida através do uso de diferentes tecnologias de abate e pós abate como tempo de resfriamento, tempo e temperatura de maturação e estimulação elétrica (KAUFFMAN; MARSH, 1987).

Dessa forma, tanto os fatores genéticos quanto ambientais podem ter papéis relevantes sobre a qualidade da carne de frango, porém alguns ainda são pouco evidenciados. Assim, pesquisas que possam avaliar as origens do estresse em frangos através de parâmetros bioquímicos e fisiológicos são de extrema importância para uma descrição objetiva da anomalia PSE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade dos frangos ao halotano e ao estresse térmico e sua relação com o desenvolvimento de filés PSE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a sensibilidade de frangos comerciais e bisavós ao halotano através da aplicação do teste com este anestésico.

Avaliar a relação entre a sensibilidade ao halotano e a ocorrência de filés PSE em frangos de linhagem comercial e bisavós.

Investigar a relação entre a sensibilidade ao halotano e as alterações hematológicas e musculares de frangos.

Avaliar os efeitos do halotano e do estresse térmico pré-abate na ocorrência de filés PSE e nas alterações hematológicas e do músculo de frangos comerciais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUALIDADE DA CARNE

Atualmente, o sucesso de um produto depende de sua aceitação pelo consumidor. O termo “qualidade da carne” pressupõe um conceito bastante amplo e complexo, pode envolver todas as etapas da cadeia agroindustrial, desde o nascimento do animal até o preparo final da carne in natura e de produtos processados. Resumidamente, qualidade pode ser definida como a medida das características desejadas e valorizadas pelo consumidor.

Hofmann (1973) definiu qualidade da carne como sendo a soma de todas as propriedades sensoriais, nutritivas, higiênicas, toxicológicas e tecnológicas. Posteriormente, em 1974, o mesmo autor formulou uma forma breve e geral:

“Qualidade é a soma de todos os fatores qualitativos”.

Entre os aspectos qualitativos, os de maiores impactos são a cor e maciez da carne. A coloração da carne é a primeira propriedade observada pelo consumidor no momento de adquirir o produto nas gôndolas de supermercados (PELICANO; PRATA, 2007).

A coloração observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da luz pela mioglobina e outros componentes importantes presentes, como fibras musculares e suas proteínas. A quantidade de líquido livre e a forma de corte estão também entre os fatores que influenciam na cor do produto final (OLIVO et al., 2001).

A maciez da carne é a característica sensorial de maior influência no julgamento da qualidade da carne (PELICANO; PRATA, 2007). A maciez é decorrente do processo de degradação de algumas proteínas estruturais, por enzimas endógenas (proteólise post mortem), estando o grau de maciez correlacionado a três tipos de proteínas do tecido muscular: as do tecido conjuntivo, as miofibrilares e as sarcoplasmáticas (LAWRIE, 1977).

Tanto a coloração quanto a maciez da carne podem ser afetadas por fatores ante mortem, como susceptibilidade ao estresse e post mortem, como, por

exemplo, pH inicial e final da carcaça e a velocidade de queda da temperatura da carcaça, relacionados a alguns problemas descritos nas próximas sessões.

3.2 ESTRESSE ANIMAL

Os seres vivos sobrevivem graças à manutenção de um equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso, denominado homeostase, que é resultante de respostas fisiológicas reguladoras. Portanto, toda vez que o organismo é ameaçado, física ou psicologicamente, ocorre uma série de respostas adaptativas, que se contrapõem aos efeitos dos estímulos, na tentativa de restabelecer a homeostasia. Nessa condição, diz-se que o animal está em estado de estresse (FURLAN; FARIA FILHO, 2003).

Dessa forma, o estresse é definido como uma condição do animal que resulta da ação de um ou mais fatores estressantes, que podem ter origem tanto externa como interna. Um fator estressante pode ser considerado prejudicial, dependendo da forma como o organismo é capaz de lidar com uma situação ameaçadora e como ele recupera a homeostase (SMITH et al., 2004). Caso o animal seja incapaz de manter a homeostasia, a consequência direta será um eventual prejuízo ao seu bem-estar, podendo refletir no desenvolvimento de reações bioquímicas post mortem e na qualidade final da carne (LAWRIE, 1991).

Os dois principais sistemas fisiológicos mediadores da resposta ao estresse são o sistema adrenal simpático (SAS), descrito como produtor da “Síndrome de Emergência” ou “Reação de Luta ou Fuga” e o eixo hipotálamo adenohipófise-adrenocortical (HPA), envolvido na “Síndrome Geral de Adaptação” (GAS) (MITCHELL; KETTLEWELL, 1998).

O mecanismo de “luta e fuga” desencadeia muitos processos adaptativos visando melhorar a capacidade física do animal. Nessa primeira fase, ocorre um aumento no consumo de glicogênio, a fim de aumentar a disponibilidade de ATP para os músculos locomotores e cardíaco. Nesse momento, também é notável o aumento da temperatura corporal. A segunda fase, que é a adaptação ao estresse, é caracterizada pela liberação de glicocorticóides, os quais atuam amenizando os efeitos da adrenalina (BRESSAN, 1998, apud COSTA, 2006).

Vários fatores podem promover o estresse e podem ser classificados em: 1) **estresse mental** onde o medo exerce importante papel sobre o bem estar animal; 2) **estresse físico** que provoca injúrias e estresse mental; 3) **estresse misto** (mental e físico), em que o ambiente se mostra como um conjunto de fatores interagindo onde prevalecem o manejo e o transporte (ELROM, 2000).

Os fatores ambientais exercem importante papel sobre o estresse animal, onde os de maior impacto sobre a qualidade final da carne estão ilustrados na Figura 1. Suas ações drásticas ou em conjunto podem levar ao estresse agudo ou crônico prejudicando o bem-estar animal e, conseqüentemente, a qualidade final da carne.

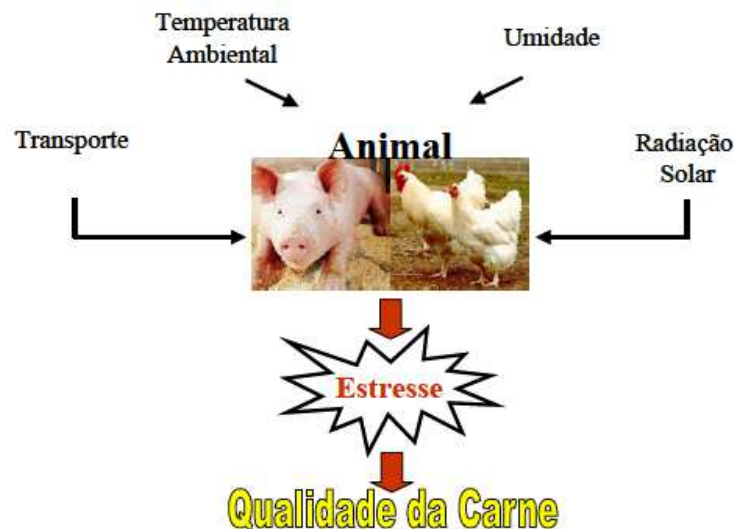


Figura 1 – Fatores ambientais de impacto sobre a qualidade da carne suína e de aves.

O transporte pré-abate é um fator de impacto sobre o estresse sendo que a temperatura e a umidade ambiental representam juntas um dos maiores problemas sobre o bem estar animal originando o estresse térmico, ocasionando problemas na qualidade da carne (LANGER et al., 2007).

Em temperaturas ambientais fora da zona de conforto térmico do animal, o centro hipotalâmico, responsável pelo sistema de termorregulação, é ativado para a manutenção da temperatura corpórea. Em temperaturas baixas, geralmente abaixo de 13°C, pode ocorrer a hipotermia. Já em temperaturas

ambientais elevadas, a liberação de calor, na maioria das espécies animais, é realizada por três mecanismos físicos: formação de suor, aumento da atividade respiratória e dilatação das arteríolas cutâneas. No caso das aves, como não dispõem de glândulas sudoríparas termorregulares ativas, a irrigação das porções cutâneas desprovidas de penas e as trocas gasosas pela respiração são de suma importância para o controle da temperatura corporal (BRESSAN et al., 2003).

3.3 PSS E PSE EM SUÍNOS

Nos últimos 40 anos, o setor produtor de suínos, a nível mundial, tem se esforçado para selecionar animais com maior porcentagem de carne magra, bem como o aumento de peso de abate (LUDTKE et al., 2006; BERTOL, 2005). Porém foi observado que esta seleção aumentou a mortalidade de suínos por estresse (LUDTKE et al., 2006). Essa susceptibilidade ao estresse foi detectada na década de 70, sendo denominada pela sigla PSS, do inglês Porcine Estresse Syndrome, a qual está relacionada com a liberação excessiva de íons Ca^{2+} celular durante a contração muscular, o que leva ao rápido metabolismo anaeróbico e à rigidez do músculo (BERTOL, 2005).

O mecanismo de indução da PSS, causado por uma anomalia nos canais liberadores de Ca^{2+} do RS foi proposto por MacLennam e Phillips (1992) e está ilustrado na Figura 2. A concentração de Ca^{2+} no RS, especializado em estocar e liberar estes íons, regula a contração muscular, glicólise e função mitocondrial. Em um ciclo normal, durante a contração, o Ca^{2+} é liberado de forma controlada pelos canais do RS mediante a presença de energia obtida pelo metabolismo glicolítico e aeróbico que são realizados de forma balanceada. Assim, a liberação de Ca^{2+} é regulada pela ATP, Mg^{2+} e pela sua própria concentração. Na descontração, o Ca^{2+} é bombeado para dentro do RS por uma ATPase para iniciar o relaxamento. Em condição anormal do PSS, os canais liberadores de Ca^{2+} são sensíveis a baixas concentrações de Ca^{2+} , mantendo-se abertos e aumentando sua concentração no citoplasma. A contração muscular é mantida, gerando a rigidez muscular. O metabolismo glicolítico e aeróbico aumentam, gerando ácido láctico, CO_2 e calor o

que pode ocasionar injúria nas membranas celulares e problemas sistêmicos típicos do PSS (MACLENNAM; PHILIPS, 1992).

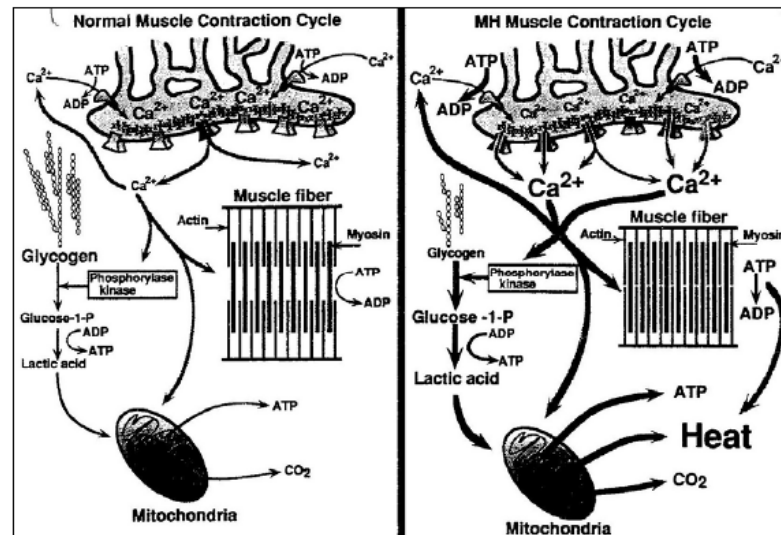


Figura 2 – Mecanismo de contração muscular normal e em animais portadores da PSS, que devido à elevação da temperatura também é chamada de Hipertermia Maligna (HM)

Fonte: Maclenna e Philips (1992).

Suíños afetados pela PSS quando vivos mostram inicialmente tremor rápido da cauda, rigidez geral acompanhada do aumento na rigidez muscular e dispnéia a ponto de respirarem pela boca. A temperatura corpórea se eleva notavelmente até aproximadamente 45°C, sendo observado também zonas irregulares da pele com palidez. Nesta etapa, o animal é, freqüentemente, vítima de ataques por outros suínos do grupo. Assim, o animal sofre colapso e morre. O tempo total de duração desta síndrome é por volta de 4 a 6 minutos. A porcentagem de perdas durante o transporte pode chegar a 1% dependendo da sensibilidade do animal ao estresse e também das condições de transporte, sendo mais comum quando os animais estão aglomerados e a temperatura ambiental está elevada (verão) (BONELLI; SCHIFFERLI, 2001).

A predisposição genética para PSS tem os mesmos sintomas que suínos susceptíveis à Hipertermia Maligna (HM), logo, PSS e HM são anormalidades similares, diferenciando-se na sua origem uma vez que a PSS possui origem natural ou artificial, como descrito anteriormente, e HM resulta somente da ação de agentes

anestésicos voláteis potentes como o gás halotano e também por administração de succinilcolina (MITCHELL; HEFFRON, 1982).

A relação biológica entre o gene halotano (hal) ou gene rianodina (ryr1) e a PSS, foi verificada por Fujii et al. (1991). No cromossomo 6 se encontra o gene ryr1, que codifica esta proteína ou canal liberador de íons Ca^{2+} localizado no RS do músculo esquelético estriado, com um peso molecular de 564 kDA (O'BRIEN, 1995). A denominação "receptora de rianodina" é decorrente da sua capacidade de ligação irreversível ao alcalóide rianodina, isolado do talo de *Ryania speciosa*. É um agente paralisante que induz à contração irreversível da musculatura esquelética, onde se liga aos sítios de alta afinidade do canal de Ca^{2+} , bloqueando-o no estado aberto. Porém, quando em alta concentração, liga-se ao sítio de baixa afinidade fixando o canal no estado fechado (ROSSI; SORRENTINO, 2004).

Três tipos de receptores rianodina com sua distribuição específica são conhecidos. A isoforma RyR1 é encontrada em todos os músculos esqueléticos dos mamíferos. A isoforma RyR2 é predominante no músculo cardíaco e a isoforma RyR3 está presente em músculos esqueléticos e cerebral (FRANZINI-ARMSTRONG; PROTASI, 1997). Todas são codificadas por genes diferentes, **ryr1**, **ryr2** e **ryr3**, respectivamente (SUTKO; AIREY, 1996). São encontradas diferenças bem definidas com relação ao padrão de distribuição dos canais de cálcio no músculo esquelético de vertebrados, onde os mamíferos apresentam predominância da isoforma RyR1 (OGAWA et al., 1999) e em músculo esquelético de aves, existem duas isoformas de RyR encontradas em proporções semelhantes e denominadas de α -RyR e β -RyR, equivalentes às RyR1 e RyR3, respectivamente (OTTINI et al., 1996).

Fujii et al. (1991) detectaram o ponto de mutação no gene ryr1 que se associou com a HM e 6 raças de suínos (BONELLI; SCHIFFERLI, 2001). Essa mutação consiste na substituição de uma citosina por uma timina na posição 1843 da seqüência de DNA do gene ryr1, ocorrendo uma alteração do aminoácido 615, em que o resíduo de arginina é substituído pelo resíduo de cisteína de animais sensíveis ao estresse (Figura 3), provocando o surgimento de PSS em suínos.

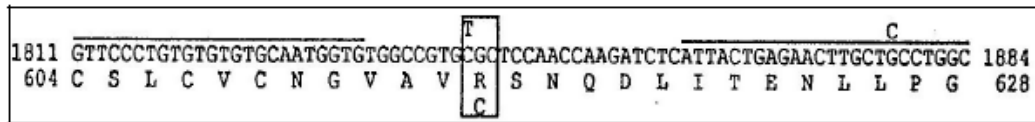


Figura 3 – Parte do eixo da seqüência de aminoácidos no DNA, na qual ocorreu uma mutação de Arg⁶¹⁵ para cisteína (localizada na caixa). A seqüência normal GCGCTC foi alterada para GTGCTC (FUJII et al., 1991).

Fujii et al. (1991) relataram que Arg615 está envolvida na ligação de reguladores do canal de Ca²⁺ e esta alteração conduz a hipersensibilidade do canal regulador de íons Ca²⁺, abrindo-o. Uma vez aberto, o canal poderá não responder aos íons Ca²⁺ e Mg²⁺, que induzem ao seu fechamento, conduzindo assim à contração muscular, hipermetabolismo e hipertermia. Da mesma maneira, Mickelson e Louis (1996) descreveram que as taxas aumentadas de liberação de Ca²⁺ do RS e a maior afinidade do canal de Ca²⁺ para rianodina, em animais sensíveis a HM ou a PSS, poderiam ser devido a maior permanência do canal no estado aberto.

O gene hal está relacionado com a sensibilidade ao anestésico halotano. Suínos normais são dominantes (NN), animais sensíveis são recessivos (nn) e os híbridos são tidos como intermediários (Nn) (FUJII et al, 1991).

Cheah et al (1984) avaliaram a relação de íons Ca²⁺ sarcoplasmático em suínos sensíveis e insensíveis ao halotano em vários intervalos de tempo post mortem (8 min, 45 min, 5 h e 24 h) demonstrando uma relação positiva entre o teste com o anestésico e a concentração de Ca²⁺ no RS em todos os tempos, porém com maior diferença no tempo de 45 min post mortem, onde a concentração de íons Ca²⁺ foi aproximadamente cinco vezes maior para suínos sensíveis ao halotano. Isso está de acordo com a teoria que a PSS e HM estão relacionadas a um defeito encontrado no gene receptor da rianodina (RyR 1), que por sua vez codifica o canal liberador de íons Ca²⁺ (FUJII et al., 1991) conhecido também como gene halotano (LUDTKE et al., 2006).

Este defeito, que originou a PSS, está diretamente relacionado com a qualidade da carne. Suínos portadores desta síndrome apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de carnes com características PSE, do inglês Pale, Soft e Exudative (CULAU et al., 2002), que traduzindo significam carnes com características Pálida, Flácida e Exsudativa. As condições que conduzem ao PSE

resultam de uma taxa de glicólise post mortem extremamente elevada, levando a um valor de pH muscular muito baixo, geralmente inferior a 5,8, enquanto a carcaça do animal ainda está quente, por volta de 35°C aos 45 minutos post mortem. A rápida queda do pH causa a desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, levando à excessiva perda de exsudato (BENDALL; WISMER-PERDERSEN, 1962), prejudicando assim as propriedades funcionais da carne tal como a capacidade de retenção de água (CRA) (CANDEK-POTOKAR et al., 1998).

Tam et al. (1998), avaliando a coloração da carne em suínos portadores do gene hal NN, hal Nn e hal nn, verificaram uma coloração mais clara ($p \leq 0,05$) para os animais recessivos e heterozigotos quando comparados aos suínos dominantes. Estes mesmos autores observaram um pH inicial menor ($p \leq 0,05$) em carcaças com os genótipos Nn e nn em comparação aos animais normais, em que foi verificada uma correlação negativa, pois quanto maior a frequência do alelo n no genótipo halotano menor foi o pH inicial da carne.

Da mesma forma, em estudo realizado por Culau et al. (2001) em que avaliaram a incidência de carnes PSE em suínos com os genótipos halotano dominante (hal NN), heterozigoto (hal Nn) e recessivo (hal nn), os autores verificaram uma maior porcentagem de carnes PSE em suínos hal nn e hal Nn (71,43 e 47,06 % respectivamente) quando comparados aos suínos hal NN (17,20 %) e concluíram que o gene halotano é um dos fatores de maior contribuição para o desenvolvimento de PSE em suínos. Porém, embora a presença de carnes PSE em suínos hal nn e hal Nn tenha sido maior, os autores afirmam que o genótipo por si só não explica toda a incidência de carnes PSE em suínos, visto que o grupo negativo ao halotano também apresentou, embora numa menor porcentagem, carnes com características PSE.

Uma possível explicação para a tendência ao desenvolvimento de carnes PSE em suínos hal NN pode estar relacionado ao aumento da proporção em área de fibras brancas glicolíticas devido às seleções genéticas para a melhora da qualidade da carne suína. Estas fibras brancas apresentam maior diâmetro, em comparação com os animais de mesma linhagem não selecionados. As fibras glicolíticas respondem rapidamente às demandas de energia, seja em situações de estresse e/ou exercício físico, produzindo energia preferencialmente pela via anaeróbica, cujo produto final é o ácido láctico, que por sua vez está diretamente relacionado ao rápido declínio do pH originando carnes PSE (BERTOL, 2005).

Mesmo que exista correlação significativa entre animais portadores do gene halotano e produção de carne PSE (SILVEIRA, 1996), é afirmado que o genótipo por si só não explica totalmente a ocorrência dessa anomalia (WARRIS, 1995), havendo a necessidade de se avaliar tanto o músculo quanto o sangue dos animais verificando suas alterações frente aos fatores genéticos e ambientais.

3.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS RELACIONADAS COM PSE

O pH de um músculo vivo está em torno de 7,2 a 7,4, mas em situações estressantes, o ácido láctico é produzido e o pH pode temporariamente diminuir até 6,2. Da mesma forma, em situações post mortem normais, esse efeito é observado, porém o pH pode chegar a 5,5 em suínos e aproximadamente 5,8 em aves (ODA et al., 2003; POSO; PUOLANE, 2005).

As mudanças estruturais mais importantes a nível muscular no post mortem são a contração e o rigor mortis, que podem ser considerados dois processos distintos. No músculo vivo, a contração muscular ocorre devido a uma neuroestimulação que faz com que os íons Ca^{2+} do RS sejam liberados para o sarcoplasma. Estes, por sua vez, inativam o sistema troponina-tropomiosina por ligação do Ca^{2+} à troponina e, conseqüentemente, ocorre a reação entre a actina e a miosina que resulta na contração muscular, o que faz com que o comprimento do sarcômero diminua (ROÇA; SERRANO, 1994) (Figura 4).

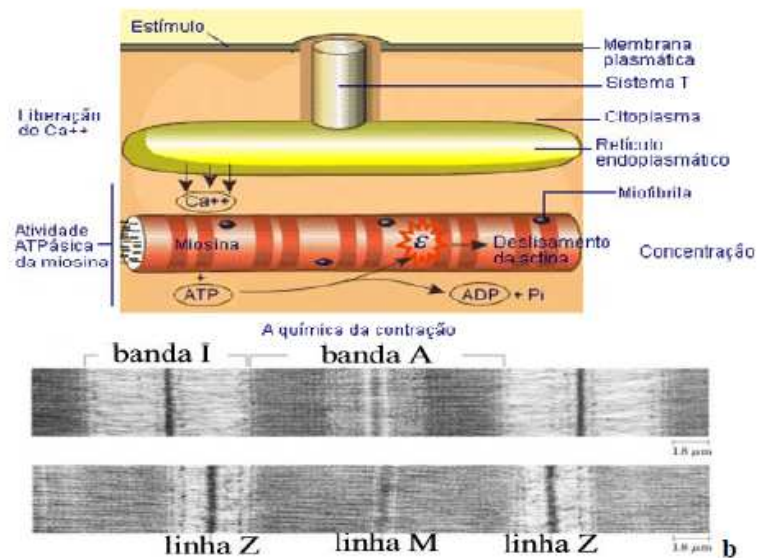


Figura 4 – Sistema muscular e o mecanismo de contração muscular, o qual depende do estímulo nervoso que se propaga pelo sistema T fazendo com que o retículo sarcoplasmático libere íons Ca^{2+} , iniciando o processo de contração (b).

Em condições pré-abate drásticas que levam ao estresse o pH decai rapidamente devido ao acúmulo de ácido láctico no músculo, onde associado à elevadas temperaturas, ocasiona o desenvolvimento da síndrome PSE, comprometendo a qualidade final da carne e suas propriedades funcionais (CANDEK-POTOKAR et al., 1998).

No momento do abate, a principal fonte de energia para a glicólise post mortem provém do glicogênio, exclusivamente pela via anaeróbica (ODA et al., 2003). Após a sangria, onde o suprimento de oxigênio é cortado, prevalece a via anaeróbica e o ácido pirúvico, produto da via glicolítica, não entra no ciclo de Krebs-Johnson e na cadeia citocrômica para formar ATP (ROÇA; SERRANO, 1994) sendo utilizado pela via anaeróbica o qual resulta a redução de piruvato a lactato (Figura 5), onde tal reação é catalisada pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH) no citosol celular (PUOLANNE et al., 2002).

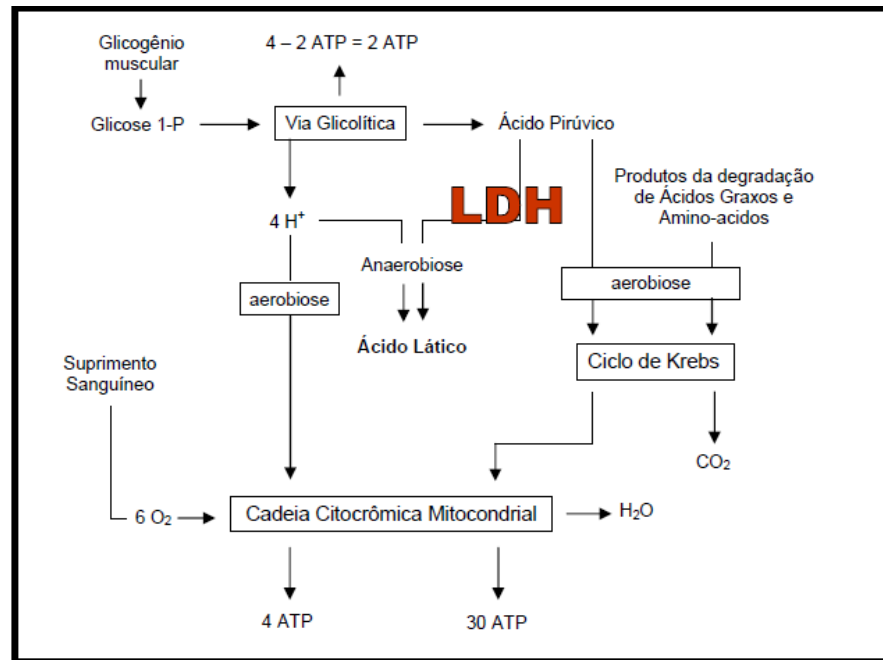


Figura 5 – Mecanismo de produção do ácido láctico, a qual é catalisada pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH), relacionada à rápida queda do pH do músculo (ROÇA; SERRANO, 1994, adaptada).

Em músculos, bem como em outros tecidos, a LDH ocorre como 5 isoenzimas tetraméricas (LDH 1 a LDH 5). A LDH 5 apresenta um elevado Km (constante de Michaelis Menten) para o piruvato, favorecendo a formação de ácido láctico quando a taxa de glicólise está alta. A LDH é uma enzima da classe das oxireduases, em que seu sítio ativo é formado pelos resíduos arginina 171 e histidina 195. Estes aminoácidos englobam a molécula do piruvato que é o substrato natural desta enzima, promovendo a sua redução pela adição do hidreto fornecido pelo cofator NADH (VOET; VOET, 1995).

O músculo de suínos apresenta elevada atividade de LDH e o aumento da sua atividade está relacionada à ocorrência da PSS e HM (MITCHELL; HEFFRON, 1982; POSO; PUOLANNE, 2005).

Uma outra enzima que também apresenta relação com a PSS é Creatina Quinase (CK), encontrada no citoplasma dos músculos cardíacos ou esqueléticos e sensível na indicação de lesões musculares, onde condições pré-abate que conduzem ao estresse de animais sensíveis (PSS) elevam a atividade da CK (MITCHELL; HEFFRON, 1982; MITCHELL et al., 2003).

A CK é uma enzima intracelular que está envolvida na transfosforilação reversível da adenosina difosfato (ADP) e creatina, sendo essencial para a manutenção das reservas de energia celular, através do tamponamento das concentrações de ATP. Portanto, a CK é controlada em uma série de tecidos com elevada atividade metabólica específica. Nos mamíferos, a CK está presente em três formas iso-enzimáticas com origem no músculo esquelético (MM-CK), no cérebro (BB-CK) e no miocárdio (MB-CK) A separação de isoenzimas e a determinação de seus perfis de atividade no soro ou no plasma sanguíneo podem, portanto, serem empregadas para identificar o local e os padrões de desenvolvimento de patologia tecidual (MITCHELL et al., 2003).

Ações estressantes podem promover injúrias musculares levando ao efluxo destas enzimas, refletindo-se também no aumento da sua atividade na corrente sanguínea (MITCHELL; HEFFRON, 1982).

Além de elevar as atividades das enzimas CK e LDH, o manejo pré-abate estressante e animais portadores da PSS apresentam elevados níveis plasmáticos de hormônios corticóides e catecolaminas, como cortisol e adrenalina, respectivamente, que em resposta ao estresse psicológico sofrido, prepara o organismo com o suprimento extra de glicose no sangue para permitir a “reação de luta e fuga” (MITCHELL; HEFFRON, 1982; LUDTKE et al., 2006). O mecanismo dessas ações hormonais está ilustrado resumidamente na Figura 6.

Em situações de estresse, a adrenalina ativa a adenilciclase, aumentando a produção de ácido cicloadenílico que estimula a transformação da fosforilase b em a. Com essa ativação no fígado, ocorre a glicogenólise, com aumento da glicose que é lançada posteriormente no sangue. Concomitantemente, o estresse estimula o hipotálamo a secretar o fator de liberação da corticotrofina. Este fator estimula a hipófise a aumentar a secreção de ACTH (adrenocorticotrópicos), que por sua vez estimula a secreção de cortisol e corticosterona (em aves) liberando glicose na corrente sanguínea.

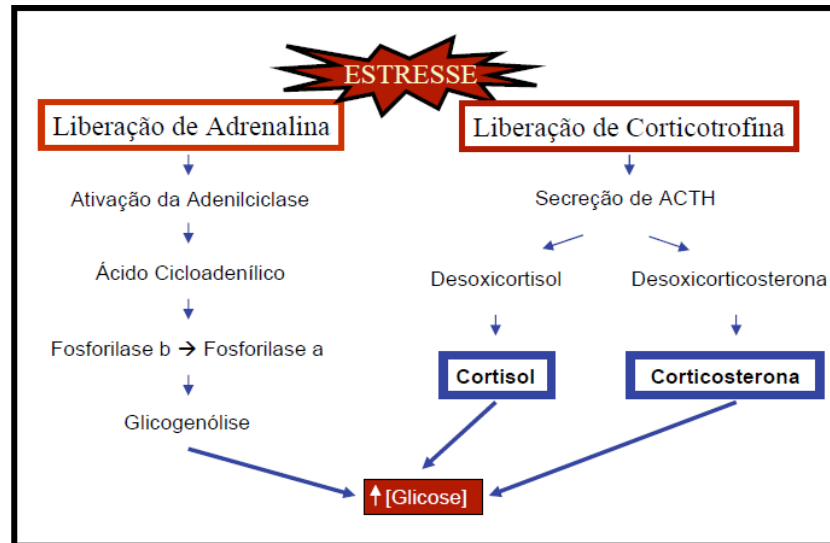


Figura 6 – Ações hormonais que levam a maior produção de glicose sanguínea.

Brow et al. (1998) estabeleceram para os suínos abatidos em condições estressantes valores médios de cortisol de 17,02 µg/100 mL e em situações de manejo normal, valores próximos de 7,62 µg/100 mL de plasma. Em aves, a corticosterona é o glicocorticóide mais importante diferindo do cortisol apenas no carbono 17 da sua estrutura, onde o cortisol apresenta um grupamento OH (Figura 7) (GUTRTLER et al., 1984).

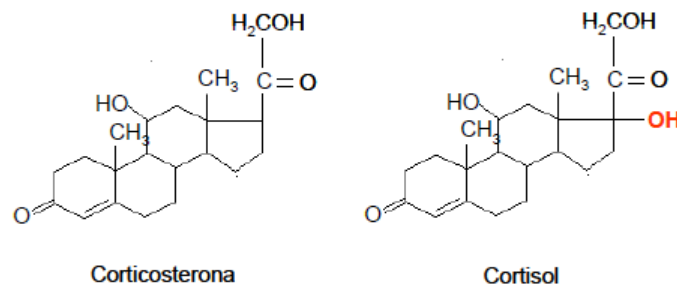


Figura 7 – Estruturas químicas dos hormônios corticosterona e cortisol.

Outro fator que está associado à condição PSE e à PSS é o valor de R. As carnes PSE apresentam alterações nos níveis dos nucleotídeos adenosina e inosina. A depleção de ATP (adenosina trifosfato) é a causa do início do rigor mortis. Após a morte do animal, o ATP é rapidamente convertido em ADP (adenosina difosfato) e subsequentemente em AMP (adenosina monofosfato) e IMP (inosina

monofosfato). Nas carnes PSE, a quebra dos nucleotídeos de adenosina em IMP ocorre mais rapidamente que em carnes normais (Figura 8). Portanto, músculos PSE contêm baixos níveis de ATP e altos níveis de IMP enquanto que altas concentrações de ATP e baixas quantidades de IMP são observadas para músculos normais (BATLLE et al., 2000). O valor de R, determinado pela metodologia desenvolvida por Honikel e Fischer (1977), permite a quantificação da relação entre IMP e ATP no músculo no momento do abate. Conforme sugerido por Honikel et al. (1981) e evidenciado por Sams e Mills (1993), o valor de R igual ou maior do que 1,10 indica predominância de ATP e é utilizado com critério de que a ave encontra-se em rigor mortis.

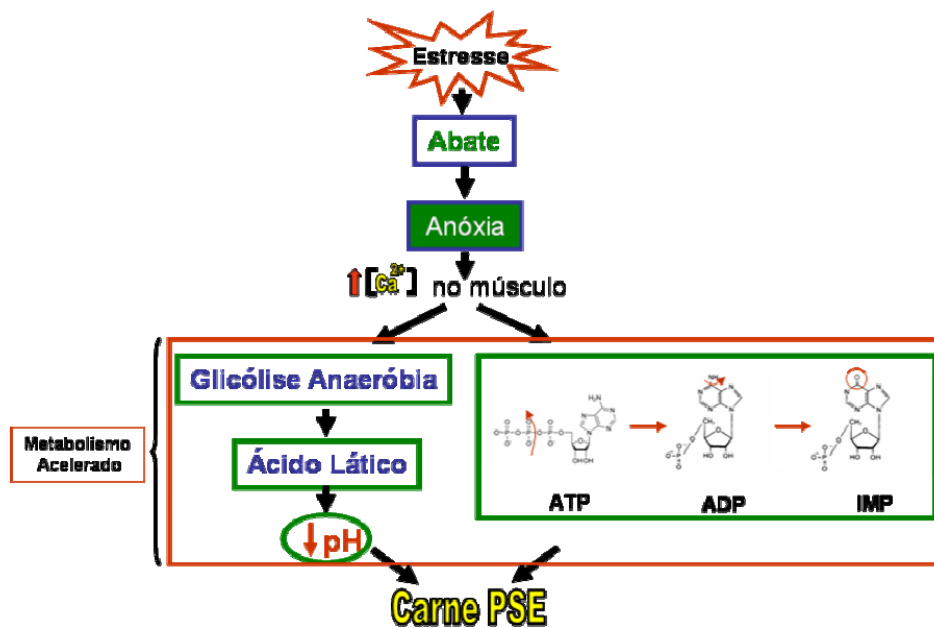


Figura 8 – Em situação de estresse, há maior liberação de Ca^{2+} , o que promove aceleração metabólica do músculo acarretando uma queda brusca do pH, proporcionando assim carnes PSE. Ao mesmo tempo ocorre a quebra do ATP em ADP e, finalmente deste último em IMP (SOARES et al., 2007).

Embora a PSS causa várias mudanças metabólicas, algumas análises relacionadas à sua ocorrência têm explicado pouco as variações encontradas em nível de desvios de qualidade muscular com impacto na industrialização da carne, principalmente em se tratando da formação da carne

Pálida, Mole e Exudativa - PSE (PELOSO, 2001). Portanto, avaliar tanto os parâmetros sanguíneos quanto os musculares permitem uma melhor descrição desta anomalia.

3.5 PSE EM AVES

As condições de manejo pré-abate a que são submetidas as aves, como transporte, temperatura, umidade relativa do ambiente, são fatores que conduzem ao estresse, influenciando a qualidade da carne e aumentando a incidência de carnes PSE (SAMS, 1999). Segundo McCurdy et al. (1996) e Barbut (1998) a incidência de PSE em perus é maior nos meses de verão, quando a temperatura ambiente é elevada, sugerindo a susceptibilidade das aves ao estresse térmico. Da mesma forma, McKee e Sams (1997) sugeriram que o estresse térmico acelera o metabolismo post mortem e mudanças bioquímicas no músculo, produzindo assim carnes de perus com características PSE. Olivo et al. (2001) demonstraram que frangos foram susceptíveis ao estresse térmico com desenvolvimento de carnes PSE, com propriedades funcionais comprometidas e que a suplementação com vitamina E na dieta foi capaz de inibir o desenvolvimento da carne PSE.

A transformação do músculo em carne compreende três fases bioquímicas (pré-rigor, rigor e post-rigor), que se diferenciam com relação às reservas de energia e produtos finais destas reações. As fontes intracelulares de energia disponíveis para o metabolismo são: o ATP, a fosfocreatina e o glicogênio. A glicose é responsável, no post mortem, pela transformação das reservas de glicogênio muscular em lactato. Dessa forma, o acúmulo do ácido láctico e a queda do pH no post mortem dependem fundamentalmente da quantidade de glicogênio no momento do sacrifício (PEARSON, 1994).

A condição PSE em aves, assim como em suínos, também é caracterizada pelo processo de rigor mortis acelerado, com pH baixo (< 5,80) e uma temperatura muscular elevada (acima de 35°C), levando à desnaturação das proteínas miofibrilares (SOSNICKI et al., 1998). Olivo et al. (2001) constataram que em frangos pode-se obter valores de pH abaixo de 5,8 em até 15 minutos post

mortem, indicando que o rigor mortis é mais acelerado do que em suínos, cujo pH final é atingido após 45 minutos.

A incidência destas carnes no Brasil pode chegar a 22% conforme já detectado pelo nosso grupo de pesquisa (SOARES et al., 2003a). Entretanto, as origens do PSE em frangos ainda não estão bem esclarecidas, apenas que o estresse ante-mortem a que são submetidos os animais favorecem o seu desenvolvimento como as elevadas temperaturas durante o transporte (OLIVO et al., 2001; GUARNIERI et al., 2002).

Estudos recentes realizados com perus evidenciam, conforme já observado em suínos, uma relação positiva entre o desenvolvimento de carnes PSE e a sua positividade (sensibilidade) ao teste do halotano. Owens et al. (2000b) utilizaram o teste com este anestésico para verificar a predisposição de perus em desenvolverem carnes com características PSE quando transportados antes do abate e constataram uma incidência maior de carnes PSE (70 %) em perus sensíveis ao anestésico, embora o grupo normal (não sensíveis ao halotano) tenha apresentado elevada incidência de carnes PSE (50 %). Assim, os autores concluíram que o teste do halotano seria um limitado preditor de PSE em perus. Em um outro estudo, avaliado com um outro fator estressante, o calor, Owens et al. (2000a), trabalharam com exposição de perus com 20 semanas de idade (10% halotanos positivos e metade dos halotanos negativos) à fatores estressantes de calor a 30°C durante o dia e 36°C durante a noite, por 4 semanas, onde metade dos halotanos negativos foram expostos a temperaturas de 21°C durante o dia e 13°C durante a noite. A incidência de aves com características PSE foi significativamente maior nos animais sensíveis ao halotano (34,7%) comparado aos não sensíveis (13,4%).

Em contrapartida alguns estudos mostram que o teste, embora tenha sido caracterizado em aves pelo enrijecimento dos seus membros inferiores, não mostrou-se um preditor eficiente para carnes com características PSE. Wheeler et al. (1999) aplicaram o teste do halotano em perus com 4 semanas de idade e os abateram com 20 semanas. Os autores não encontraram diferenças significativas de pH e capacidade de retenção de água (CRA) entre os grupos halotano positivo e negativo sugerindo que a susceptibilidade de perus do grupo positivo ao desenvolvimento de carnes PSE não é 100 %. Já Cavitt et al. (2004) avaliaram o efeito da ação do halotano e da injeção de succinilcolina (relaxante muscular) em

frangos com 4 semanas de idade, demonstrando que o halotano em conjunto com a succinilcolina não foi preditor para detecção de aves propensas a desenvolverem carnes com características PSE.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a incidência de carnes com características PSE em 140 frangos comerciais através da aplicação do teste do halotano, onde dos 13,6 % frangos positivos ao teste, 42,1 % apresentaram carnes PSE evidenciando uma provável correlação entre esta anomalia e a sensibilidade ao anestésico halotano e conseqüentemente à síndrome estressante em frangos (Soares et al., 2007). Mesmo havendo evidências de que a manifestação de carnes PSE têm origem genética e terem sido encontradas em outras espécies como os suínos (FUJII, 1991) e em perus (STRASBURG; CHIANG, 2003), em frangos, esse mecanismo ainda não foi elucidado, apesar dos trabalhos de Lara (2003), Droval (2004) e Oda (2006).

Assim, é necessária uma maior investigação das origens da anomalia PSE a fim de avaliar uma possível síndrome de estresse em aves e elucidar os problemas relacionados à qualidade da carne de frango.

3.6 TESTE DO HALOTANO

Halotano é o nome usual do hidrocarboneto halogenado bromo-2-cloro-2-trifluoretano-1,1,1, largamente utilizado como inalador anestésico. É um líquido, onde apresenta como método de preparação, a reação de adição de ácido fluorídrico ao tricloroetileno em presença de cloreto antimônico seguida de uma reação de substituição com bromo, conforme mostra a Figura 9 (HALL; CLARKE, 1987).

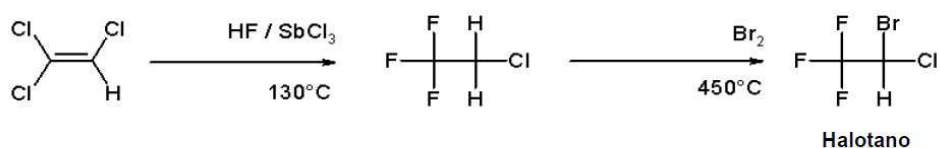


Figura 9 – Procedimento de obtenção do composto halotano na sua forma líquida.

Na anestesia inalatória, o halotano é mesclado com o oxigênio, onde difunde-se do alvéolo para o seu local de ação, no sistema nervoso central (SNC). A suspensão da administração de anestésico desenvolve instantaneamente um gradiente de difusão reversa e o sangue leva o halotano do SNC novamente ao alvéolo, do qual ele é expirado (FIALHO, 1986).

O julgamento do plano ou estágio anestésico em animais baseia-se no esquema clássico de Guedel citado por Manssone (2003), na anestesia pelo éter, adaptado posteriormente os outros anestésicos, inclusive o halotano. O autor estabeleceu quatro estágios definidos:

Estágio 1: pode ser definido como aquele que vai desde o início da administração do fármaco até a perda da consciência do animal.

Estágio 2: conhecido como excitação e delírio, este estágio é responsável pela perda da consciência e alterações no SNC.

Estágio 3: caracteriza-se por perda de consciência e depressão progressiva do SNC, podendo chegar à parada respiratória.

Estágio 4: é o mais crítico de todos os anteriormente citados, pois é nele que se observam a abolição ou diminuição de certos reflexos, além de eventual parada respiratória e cardíaca que, se não socorrida em segundo, pode levar à morte do animal.

A sensibilidade ao halotano, anestésico utilizado em cirurgias humanas, foi inicialmente detectada em suínos que faziam parte do programa de transplante de fígados em humanos, e participavam como animais experimentais. Os animais sensíveis ao anestésico apresentavam-se ofegantes, com cianose, pernas enrijecidas, taquicardia, acidose metabólica e temperatura de 44°C. (HARRISON, apud OHNISHI; OHNISHI, 1994), Sintomatologia semelhante é observada em humanos com hipertermia maligna, entretanto, o quadro pode ser revertido pela administração do medicamento dantrolene, que provoca o relaxamento dos músculos esqueléticos (OHNISHI; OHNISHI, 1994). A descoberta da PSS em 1967 e sua direta relação com o halotano permitiram o desenvolvimento do teste com este anestésico, e sua correlação com a síndrome PSE, pois animais portadores da PSS apresentavam maior predisposição ao desenvolvimento desta, ou seja, são mais sensíveis ao estresse (MICTHELL; HEFFRON, 1982).

Até a década de 90, suínos positivos à PSS eram identificados através do teste com halotano na sua forma gasosa (CULAU et al., 2001; BERTOL,

2005). Neste teste, os animais inalam o gás por 5 min., e o surgimento da rigidez muscular no tempo de 1 a 4 min. de exposição ao anestésico, indica sensibilidade ao halotano e maior predisposição ao desenvolvimento de carnes PSE (MCGLOUGHLIN, 1980).

O gene do halotano além de determinar a maior predisposição ao estresse em suínos, é responsável pela produção de carcaças com maior produção de carne magra também relacionado à produção de carnes PSE (MITCHELL; HEFFRON, 1982; CULAU, 2001).

Em aves há recentes estudos no sentido de detectar a relação entre a genética e o desenvolvimento de carnes PSE. A positividade ao teste do halotano é observada em aves que apresentam rigidez dos seus membros inferiores (WHEELER et al., 1999; OWENS et al., 2000b) conforme mostra a Figura 10.

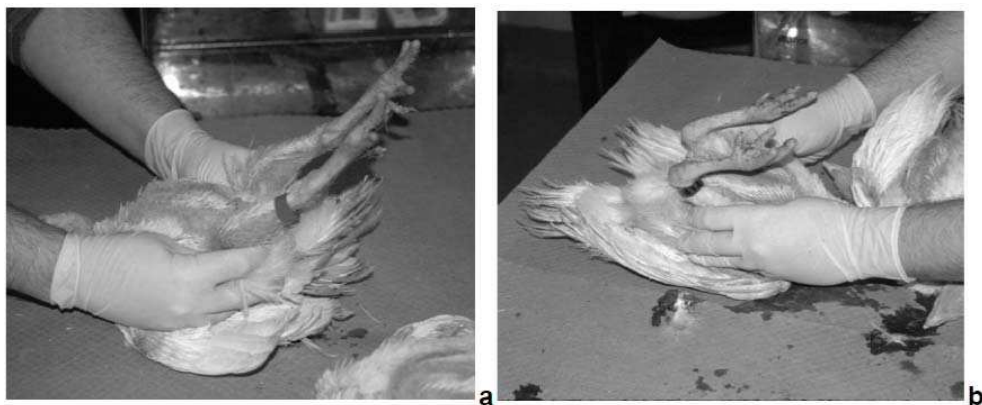


Figura 10 – Peru classificado como sensível ao gás halotano, exibindo sinais de rigidez nos membros inferiores (a). Peru classificado como não sensível ao gás halotano apresentando ausência de rigidez nos membros inferiores (b) (OWENS et al., 2000b).

Cavitt et al. (2004) avaliaram a eficiência do teste do halotano para detectar o PSE em frangos de corte de várias linhagens comerciais e observaram que a sensibilidade ao halotano variou de 13,2 a 22,9% dependendo da linhagem comercial. Owens et al. (2000 a) avaliaram o teste halotano em duas linhagens de perus com 4 semanas de idade e observaram que aproximadamente 10% das amostras estudadas foram sensíveis ao halotano, apresentando rigidez muscular. Aplicando o teste do halotano em frangos comerciais, Soares et al. (2007)

encontraram valores próximos aos anteriores evidenciados pela incidência de 13,6 % de frangos positivos ao teste. Já Wheeler et al., (1999) encontraram apenas 5 % de perus sensíveis ao halotano em 120 animais avaliados, em que neste experimento, os animais que não apresentaram rigidez total dos membros inferiores foram classificados como halotano indefinidos.

Embora as reações frente ao teste do halotano em aves tenham se mostrado similares ao observado em suínos, pouco se sabe sobre os eventos bioquímicos ocorrentes e sua relação com a anomalia PSE.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido em 3 experimentos, com o objetivo de avaliar o halotano como agente preditor e estressor em associação com estresse térmico nas alterações bioquímicas e na qualidade da carne, descritos a seguir.

4.1 EXPERIMENTO 1: TESTE DO HALOTANO EM LINHAGEM COMERCIAL DE FRANGOS.

Neste experimento, o efeito do halotano como preditor de uma possível síndrome estressante em frangos e sua relação com a síndrome PSE e alterações bioquímicas foi avaliada.

4.1.1 Animais

Os frangos machos de uma linhagem comercial (n=352) foram criados na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina até a realização do teste com o anestésico halotano.

4.1.2 Teste do Halotano

O teste do halotano foi aplicado com o auxílio de uma câmara elaborada exclusivamente para este experimento. A mesma apresenta três entradas frontais, onde foi inserida a cabeça de cada frango, e dimensões internas de 12x12x100cm. A câmara foi interligada a um aparelho de anestesia veterinária acoplado a um cilindro de O₂ conforme ilustrado na Figura 11.

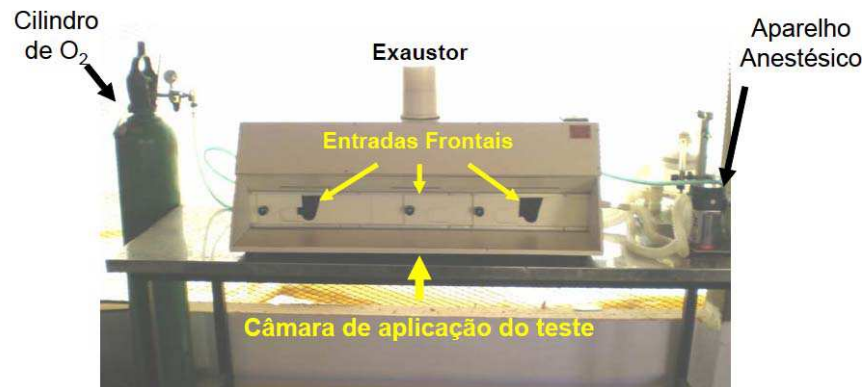


Figura 11 – Câmara de aplicação do teste do halotano (ao centro) elaborada exclusivamente para o teste em frangos.

Assim, o oxigênio foi liberado do cilindro com uma vazão de 6 L/min. chegando ao aparelho de anestesia veterinária, onde foi mesclado com o halotano a uma concentração de 3,0%, sendo então, enviado para a câmara e inalado pelos frangos por um período de 5 min (WHELLER et al., 1999, OWENS et al., 2000 a,b). Ao mesmo tempo, os frangos foram avaliados, em três animais por vez, por três julgadores aleatórios e um julgador fixo sendo selecionados e classificados em três grupos: frangos sensíveis ao halotano (enrijecimento dos dois membros inferiores), indefinidos (enrijecimento de apenas um dos membros) e não-sensíveis (ausência de enrijecimento) conforme ilustrado na Figura 12. Após a realização do teste do halotano, os frangos permaneceram por aproximadamente 2 a 3 min. desacordados, demonstrando o efeito da anestesia sobre os mesmos.

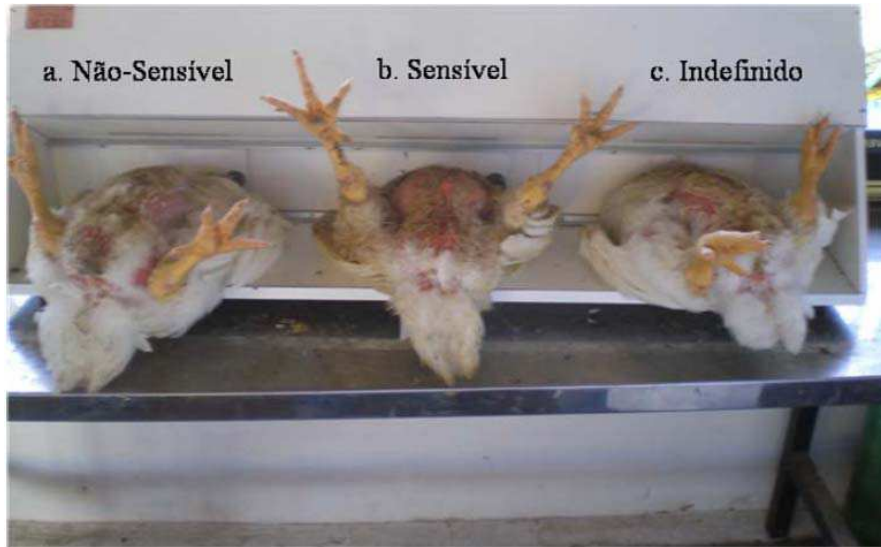


Figura 12 – Classificação dos frangos frente à aplicação do teste do halotano a 3 % por 5 min.; a) não-sensível (ausência de enrijecimento dos membros inferiores), b) sensível (enrijecimento dos membros inferiores) e c) indefinido (enrijecimento de apenas um dos membros).

4.1.3 Coleta de Sangue

Após 3 e 48 horas da aplicação do teste do halotano, o sangue dos frangos sensíveis, indefinidos e não-sensíveis (n=12 para cada grupo) foi coletado da asa dos animais (Figura 13) com o auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha (0,7 x 2,5 mm) e armazenado em tubos de vidro contendo anticoagulante (oxalato + fluoreto) e em tubos plásticos (12 x 75 mm), ambos com tampa, para posterior extração de plasma e soro, respectivamente.



Figura 13 – Coleta de sangue realizada na asa do frango, após 3 e 48 h da aplicação do teste do halotano, onde aproximadamente um volume de 5 mL do mesmo foi coletado de cada ave.

4.1.3.1 Obtenção do plasma sanguíneo

Após 2 h de coletado o sangue e armazenado em tubos contendo anticoagulante, este foi centrifugado à 2500 rpm por um período de 10 min. Em seguida, o sobrenadante (plasma) foi coletado sendo então armazenado em tubos plásticos com tampa e congelados à -22°C , por um período máximo de 3 meses.

4.1.3.2 Obtenção do soro sanguíneo

Depois de reservado em tubos plásticos com tampa, o sangue foi deixado em repouso por 2 a 4 horas para que ocorresse a dessoração sanguínea e conseqüente obtenção do soro. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2500 rpm/10min. e o sobrenadante (soro) armazenado em tubos plásticos com tampa, sendo posteriormente congelados à -22°C , por 3 meses no máximo.

4.1.4 Análise dos Parâmetros Hematológicos dos Animais

Todas as análises sanguíneas foram determinadas através de kits específicos e analisadas em um auto-analisador bioquímico da marca Bayer, modelo: ADVIA 1650. A análise de glicose foi realizada no plasma e as medidas das atividades de LDH e CK foram feitas no soro sanguíneo, por espectrofotometria.

4.1.4.1 Medida de glicose

A glicose foi determinada segundo a técnica descrita por Kunst et al. (1983). O nível de glicose foi avaliado pela oxidação da glicose catalisada pela glicose oxidase com formação de peróxido de hidrogênio, o qual reagiu em seguida com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, formando antipirilquinomina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor (490-520 nm), é proporcional à concentração de glicose na amostra, expressa em mg/dL.

4.1.4.2 Medida da atividade de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi determinada através da conversão de piruvato a lactato na presença de NADH, onde a oxidação do NADH foi verificada em comprimento de onda de 405 nm que é proporcional à atividade da LDH na amostra, a qual foi expressa em U/L (unidades enzimáticas/litro).

4.1.4.3 Medida da atividade de creatina quinase (CK)

A medida da atividade de CK foi determinada segundo a técnica descrita por Oliver (1955) e Rosalki (1967) e modificada por Tietz (1986). A N-acetil-

L-cisteína (NAC) foi incluída na reação para assegurar a total ativação da creatina quinase no soro.

Para a análise, cada frasco do substrato do kit foi dissolvido e homogeneizado suavemente até a completa dissolução. Então, a solução foi incubada por 5 min. e em seguida a amostra foi adicionada e misturada suavemente por imersão. Decorridos 3 min., a leitura da amostra foi realizada a 340 nm sendo as leituras repetidas exatamente em 1, 2 e 3 min. após a primeira leitura, em que a atividade de CK foi expressa em U/L.

4.1.5 Abate

Após 48h à realização do teste do halotano, 25 aves de cada grupo (Sensível, Indefinido e Não-sensível) com 46 dias de idade, foram deixadas em jejum alimentar por aproximadamente 10 h, e então abatidas de acordo com os procedimentos de abate de uma planta comercial, isto é, insensibilização elétrica, sangria, depenagem, evisceração, chiller, desossa e refrigeração (NORTHCUTT, 2001, GUARNIERI et al., 2004). As medidas de pH e cor foram determinadas após 24 h de estocagem dos filés a 4°C (GUARNIERI et al., 2004).

4.1.6 Análises no Músculo Pectoralis major

4.1.6.1 Medida de pH final

As medidas de pH foram realizadas 24 h post mortem em duplicata diretamente no filé com auxílio do um potenciômetro de contato Testo 205. Os pontos de incisão do eletrodo foram na parte cranial ventral do filé conforme descrito por Boulianne e King (1995) e adaptado por Olivo et al. (2001).

4.1.6.2 Medida de cor

As medidas de cor foram realizadas 24 h post mortem na face ventral do filé, tomando-se três pontos diferentes de leitura por amostra. Esta medida foi utilizada utilizando um colorímetro Minolta CR 400 com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°. Os valores medidos foram os de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) b* (componente amarelo-azul), expressos no sistema de cor CIELAB.

4.1.6.3 Medida da capacidade de retenção de água (CRA)

A avaliação da CRA foi realizada 24 h post mortem conforme procedimento descrito por Hamm (1960). A amostra utilizada para esta análise foi coletada na parte cranial do peito de frango. O procedimento foi realizado em duplicata, onde a amostra foi cortada em cubo com um peso inicial de 2,0 g. Em seguida, a amostra foi colocada entre dois papéis filtro e posteriormente entre duas placas de acrílico. Este sistema foi deixado sob um peso de 10 kg por 5 min. Finalmente, a carne foi pesada e o cálculo da média de CRA determinado utilizando a fórmula abaixo:

$$CRA = 100 - \frac{(P_{inicial} - P_{final})}{(P_{inicial})} \times 100$$

Onde: P_{inicial} e P_{final} são os pesos inicial e final da carne, respectivamente.

4.1.6.4 Medida do valor de R

O valor de R representa a razão entre monofosfato de inosina e trifosfato de adenosina e avalia o consumo de ATP no momento do abate. As amostras de filés de frango foram coletadas da parte cranial do músculo Pectoralis major aproximadamente 30 min. post mortem e congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) até realização das análises. A determinação foi realizada, em duplicata, segundo metodologia de Honikel e Fischer (1977) em que a extração dos nucleotídeos de 2,0 g de amostra foi obtida através de homogeneização por 30 segundos em solução de ácido perclórico 1 M, na proporção de 1:10 em p/v. A seguir, esta foi filtrada e centrifugada por 5 minutos a 4800 rpm. Uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante foi diluída em 4,8 mL de tampão fosfato a 0,1 M em pH 7,0 e lida em espectrofotômetro a 250 nm (monofosfato de inosina) e 260 nm (trifosfato de adenosina). O tampão fosfato foi utilizado como branco e o valor de R foi calculado como a razão entre as duas absorvâncias.

4.1.7 Classificação das Amostras

O valor de L^* foi utilizado como parâmetro determinante para a classificação dos filés, onde filés com valores de $L^* \geq 53,0$ foram classificados como PSE conforme já padronizado por Soares et al. (2002). Essa classificação foi realizada nos três grupos (Sensível, Indefinido e Não-sensível).

4.1.8 Análise Estatística

O programa STATISTICA for Windows versão 6.0 foi utilizado para a análise dos resultados.

Os frangos foram classificados em três grupos: Sensível (enrijecimento dos membros inferiores) Indefinido (enrijecimento parcial) e Não-

sensível (ausência de enrijecimento) pelo teste do halotano. O teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade foi aplicado para comparar as diferenças entre os três grupos com relação às medidas de pH final, Cor (L^* , a^* , b^*), CRA, valor de R, concentração de glicose sanguínea, LDH e CK.

O teste t-student a 5% probabilidade foi aplicado para comparar as diferenças entre os diferentes tempos de coleta de sangue com relação às medidas da concentração de glicose, atividades de CK e LDH.

4.2 EXPERIMENTO 2: TESTE DO HALOTANO AVES BISAVOZEIRAS DE LINHA FÊMEA DO FRANGO COMERCIAL.

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do halotano como preditor de uma síndrome estressante em frangos e sua relação com aves bisavós da linha fêmea.

O termo bisavozeiras ou bisavós é atribuído às aves que geram os galos nas linhas machos e as galinhas nas linhas fêmeas que serão os pais das matrizes que são responsáveis pela produção de ovos férteis dando origem ao frango de corte. As aves bisavós de linha fêmea são selecionadas e melhoradas geneticamente para o sistema reprodutor enquanto que bisavós de linha macho são melhorados geneticamente para maior rendimento muscular.

4.2.1 Animais

Os frangos machos de linha fêmea (n=298) foram criados, por uma empresa situada no estado de Minas Gerais, até a realização do teste com o anestésico halotano e abate, realizados na unidade experimental da Universidade de São Paulo, campus do município de Pirassununga – FEZEA, SP.

4.2.2 Teste do Halotano

O teste do halotano foi aplicado nas mesmas condições conforme descrito no item 4.1.2., onde a classificação dos frangos também foi realizada da mesma forma como ilustrado na Figura 12.

4.2.3 Coleta de Sangue

Após 3 h da aplicação do teste do halotano, o sangue dos frangos sensíveis, indefinidos e não-sensíveis (n=2, 11 e 15 respectivamente) foi coletado seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.1.3. A obtenção do plasma e do soro sanguíneo foram realizados conforme descrito nos itens 4.1.3.1 e 4.1.3.2, respectivamente.

4.2.4 Análise dos Parâmetros Hematológicos dos Animais

As análises sanguíneas de glicose, LDH e CK seguiram os procedimentos descritos nos itens 4.1.5.1, 4.1.5.2 e 4.1.5.3., respectivamente.

4.2.5 Abate

Após 3 h à realização do teste do halotano, 2 frangos sensíveis, 11 indefinidos e 15 não-sensíveis ao halotano, com 42 dias de idade, foram deixados em jejum alimentar por aproximadamente 20 h em jejum, e então foram abatidos de acordo com os procedimentos de abate de uma planta comercial, isto é, insensibilização elétrica, sangria, depenagem, evisceração, chiller, desossa e refrigeração (NORTHCUTT, 2001, GUARNIERI et al., 2004). O pH inicial do músculo

Pectoralis major foi realizado aproximadamente 30 min. post mortem e o pH final e cor foram determinados após 24 h de estocagem dos filés a 4°C (GUARNIERI et al., 2004).

4.2.6 Análises no Músculo Pectoralis major

A medida de pH inicial foi realizada aproximadamente 30 min. post mortem diretamente no filé com auxílio do um potenciômetro de contato Texto 205. Os pontos de incisão do eletrodo foram na parte cranial ventral do filé conforme descrito por Boulianne e King (1995) e adaptado por Olivo et al. (2001).

As demais análises, ou seja, pH final, Cor (L^* , a^* , b^*), CRA e valor de R foram realizadas seguindo os procedimentos descritos anteriormente nos itens 4.1.6.1, 4.1.6.2, 4.1.6.3 e 4.1.6.4, respectivamente.

4.2.7 Classificação das Amostras

O valor de L^* foi utilizado como parâmetro determinante para a classificação dos filés, onde filés com valores de $L^* \geq 53,0$ foram classificados como PSE conforme já padronizado por Soares et al. (2002). Essa classificação foi realizada nos três grupos (sensível, indefinido e não-sensível ao halotano).

4.2.8 Análise Estatística

O programa STATISTICA for Windows versão 6.0 foi utilizado para a análise dos resultados.

O teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade foi aplicado para comparar as diferenças significativas entre os três grupos (Sensível, Indefinido e

Não-sensível), com relação às medidas de pH inicial e final, Cor (L^* , a^* , b^*), CRA, glicose, LDH e CK.

4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO HALOTANO E DO ESTRESSE TÉRMICO COMO AGENTES ESTRESSORES NAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E NA QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO.

Neste experimento, foram avaliadas as ações do halotano como agente estressor e do estresse térmico com o objetivo de verificar o impacto destes dois parâmetros nas alterações bioquímicas e na qualidade da carne de frango.

4.3.1 Animais

Os frangos machos de linhagem comercial (n=24) foram criados na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina – UEL até a realização do teste com o anestésico halotano, estresse térmico e finalmente o abate.

4.3.2 Tratamentos

Os frangos foram divididos em 4 tratamentos compostos por 6 animais cada. A seguir estão apresentadas a descrição de cada um dos 4 tratamentos.

Tratamento HHH: Frangos submetidos ao teste do halotano e abatidos após 1 h de aplicação do teste.

Tratamento HET: Frangos submetidos ao teste do halotano, estresse térmico, 48 h após aplicação do teste e posterior abate.

Tratamento EET: Frangos submetidos ao estresse térmico e posterior abate.

Tratamento CCC (Controle): Frangos não foram submetidos ao teste do halotano e nem ao estresse térmico.

4.3.3 Teste do Halotano

O teste do halotano foi aplicado nos frangos com 44 dias de idade seguindo as mesmas condições descritas no item 4.1.2. Neste teste não foram realizadas as classificações quanto ao enrijecimento dos membros inferiores dos frangos.

4.3.4 Estresse térmico

O estresse térmico foi aplicado com o auxílio de um compartimento fechado regulado à 35°C. Os frangos foram deixados em 6 animais por vez por 1 h, imediatamente antes do abate, no mesmo, conforme pode ser observado na Figura 14.



Figura 14 – Câmara construída para a aplicação de estresse térmico (35°C/1h) em frangos.

4.3.5 Coleta de Sangue

As coletas de sangue foram realizadas nos frangos dos quatro tratamentos, descritos no item 4.3.2. O sangue foi coletado da asa dos animais (Figura 13) com o auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha (0,7 x 2,5 mm) e armazenado em tubos de vidro contendo anticoagulante (oxalato + fluoreto) para análise de glicose e em tubos contendo heparina para as análises de LDH e CK, até a posterior extração do plasma que seguiu o procedimento descrito no item 4.1.3.1.

Nos animais dos tratamentos HHH e HET, as coletas de sangue foram realizadas 1 h após o teste do halotano, sendo que logo após a aplicação do estresse térmico, as aves do grupo HET foram submetidas novamente à coleta de sangue, seguidas pelas aves do tratamento ET, sendo imediatamente abatidas.

4.3.6 Análise dos Parâmetros Hematológicos dos Animais

As análises sanguíneas de glicose, LDH e CK seguiram os procedimentos descritos nos itens 4.1.5.1, 4.1.5.2 e 4.1.5.3, respectivamente.

4.3.7 Abate

As aves do grupo controle e tratamentos H foram abatidas com 44 dias de idade. Já os frangos dos tratamentos HET e ET foram abatidos com 46 dias de idade. O abate foi realizado de acordo com os procedimentos de abate de uma planta comercial, isto é, insensibilização elétrica, sangria, depenagem, evisceração, chiller, desossa e refrigeração (NORTHCUTT, 2001, GUARNIERI et al., 2004).

Neste experimento, as aves não foram deixadas em jejum.

4.3.8 Análises no Músculo Pectoralis major

A medida de pH inicial foi realizada aproximadamente 30 min. post mortem diretamente no filé com auxílio de um potenciômetro de contato Testo 205. Os pontos de incisão do eletrodo foram na parte cranial ventral do filé conforme descrito por Boulianne e King (1995) e adaptado por Olivo et al. (2001).

As demais análises, ou seja, pH final, Cor (L^* , a^* , b^*), CRA e valor de R foram realizadas seguindo os procedimentos descritos anteriormente nos ítems 4.1.6.1, 4.1.6.2, 4.1.6.3 e 4.1.6.4, respectivamente.

4.3.9 Classificação das Amostras

O valor de L^* foi utilizado como parâmetro determinante para a classificação dos filés, onde filés com valores de $L^* \geq 53,0$ foram classificados como PSE conforme já padronizado por Soares et al. (2002). Essa classificação foi realizada para os 4 tratamentos.

4.3.10 Análise Estatística

O programa STATISTICA for Windows versão 6.0 foi utilizado para a análise dos resultados.

O teste de média de Tukey a 5 % de probabilidade foi aplicado para comparar as diferenças entre os 4 tratamentos em relação às medidas de pH inicial e final, Cor (L^* , a^* , b^*), CRA, valor de R, glicose, LDH e CK.

O teste t-student a 5% de probabilidade também foi utilizado, apenas quando as comparações foram realizadas entre 2 tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1: TESTE DO HALOTANO EM LINHAGEM COMERCIAL DE FRANGOS.

5.1.1 Sensibilidade ao Halotano

No presente experimento, todas as aves avaliadas pelo teste do halotano saíram desacordadas da câmara de aplicação do teste (Figura 15), e permaneceram neste estado por aproximadamente 2 a 3 min. demonstrando a ação anestésica do mesmo, em que segundo Bennett (1992), a indução anestésica com halotano pode variar entre 2 e 4 min. e a dose mínima anestésica (DAM) está em torno de 0,85 V%.



Figura 15 – Frangos desacordados após serem submetidos ao teste do halotano a 3 % por 5 min.

O tempo em que as aves foram avaliadas com relação à sensibilidade ao halotano variou entre 3 e 4 min., tempo em que provavelmente as aves apresentavam-se entre o 2º e 3º estágios anestésico (GUEDEL, 1951, citado

por MANSSONE, 2003) frente às reações observadas nestes animais que apresentavam-se desacordados (inconscientes) e com respiração lenta.

O tempo de recuperação após a aplicação do teste do halotano variou entre 2 e 3 min., resultado similar ao relatado por Bennett (1992) que demonstrou que a recuperação pode variar entre 3 e 5 min.

A ocorrência de frangos comerciais sensíveis, indefinidos e não-sensíveis ao halotano está ilustrada na Figura 16. Dos 352 frangos comerciais avaliados neste experimento, 9,1 % mostraram-se sensíveis, 18,4% indefinidos e 72,5% não-sensíveis ao halotano.

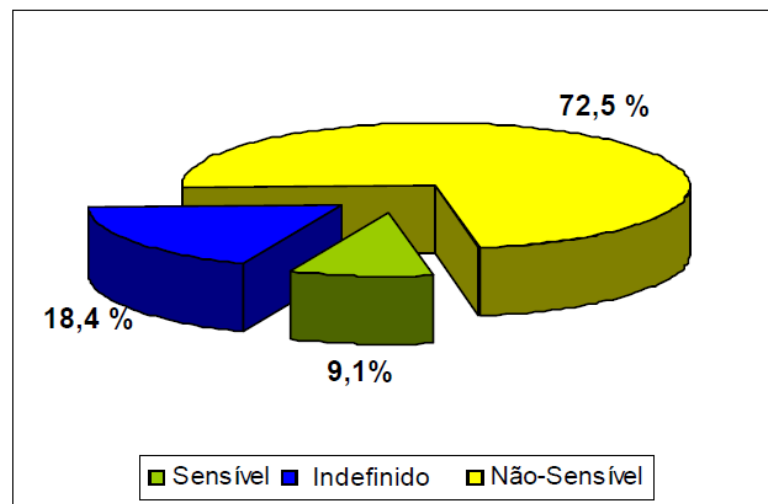


Figura 16 – Incidência de frangos sensíveis, indefinidos e não-sensíveis ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

Assim como em suínos, para que o teste do halotano possa ser bem sucedido, é necessário, primeiramente, que ele seja de fácil qualificação, onde a sensibilidade ao halotano possa ser facilmente visualizada (WHELLER et al., 1999). Portanto, somente os animais que apresentaram completa rigidez dos dois membros inferiores foram classificados como sensíveis ao halotano neste experimento. A ocorrência de 9,1% de frangos sensíveis ao halotano foi similar ao encontrado nos experimentos realizados com perus. Wheller et al. (1999) encontraram 5 % em 120 animais avaliados. Owens et al. (2000 a,b) em dois trabalhos realizados também

com perus, encontraram uma incidência de animais sensíveis ao halotano que variou de 3,5% a 10%.

Em comparação ao estudo realizado por Cavitt et al. (2004) com frangos, este resultado, embora próximo apresentou-se menor. Os autores encontraram uma variação de 13,2 a 22,9%, dependendo da linhagem comercial avaliada, demonstrando uma maior sensibilidade desses animais ao halotano. Resultado similar aos de Cavitt et al. (2004) foi encontrado por Soares et al. (2007), que avaliando também frangos comerciais, obtiveram uma incidência de 13,6% de aves sensíveis a este anestésico.

Essa menor incidência encontrada no presente experimento (9,1%) pode estar relacionada à variação quanto à detecção das aves sensíveis ao halotano. Por ser um método qualitativo, sua variação pode ser elevada, dificultando a comparação entre um experimento e outro quando os julgadores são distintos. Em suínos, essa sensibilidade ao halotano é bem variável, podendo alcançar 88% em alguns casos. Porém em muitas raças essa incidência pode variar apenas de 0 a 20 % (WEBB et al., 1982), onde foi comprovado que a sensibilidade à ação do halotano é resultado de excessivas contrações induzidas por este anestésico decorrente de um dilúvio de íons Ca^{2+} no tecido muscular, devido ao defeito no gene que codifica o canal liberador destes íons (MICKELSON; LOUIS, 1996).

A classificação dos frangos como indefinidos ao halotano foi primeiramente observada por Wheeler et al. (1999), que encontraram uma incidência de 10% de perus com respostas parciais ao halotano, comparando com os dados deste trabalho observa-se uma incidência 8,4% maior com relação à estes frangos. Uma possível justificativa relatada pelos autores para essa resposta parcial foi de que talvez estas aves pudessem ser mais resistentes à ação do anestésico, pois se duas formas do receptor de rianodina estão presentes no músculo, poderia ser possível que apenas um desses receptores fosse defeituoso. Assim, o receptor não defeituoso poderia promover adequada regulação de íons Ca^{2+} , ocorrendo então tanto respostas negativas (ausência de sensibilidade) e parciais frente à ação do halotano.

5.1.2 Avaliação do músculo Pectorallis major

5.1.2.1 Incidência de carnes PSE

A incidência de carnes caracterizadas como PSE está ilustrada na Figura 17. Ambos os grupos, Sensível e Indefinido ao halotano, apresentaram 40% de carnes PSE cada, seguidos de 28% no grupo Não-sensível.

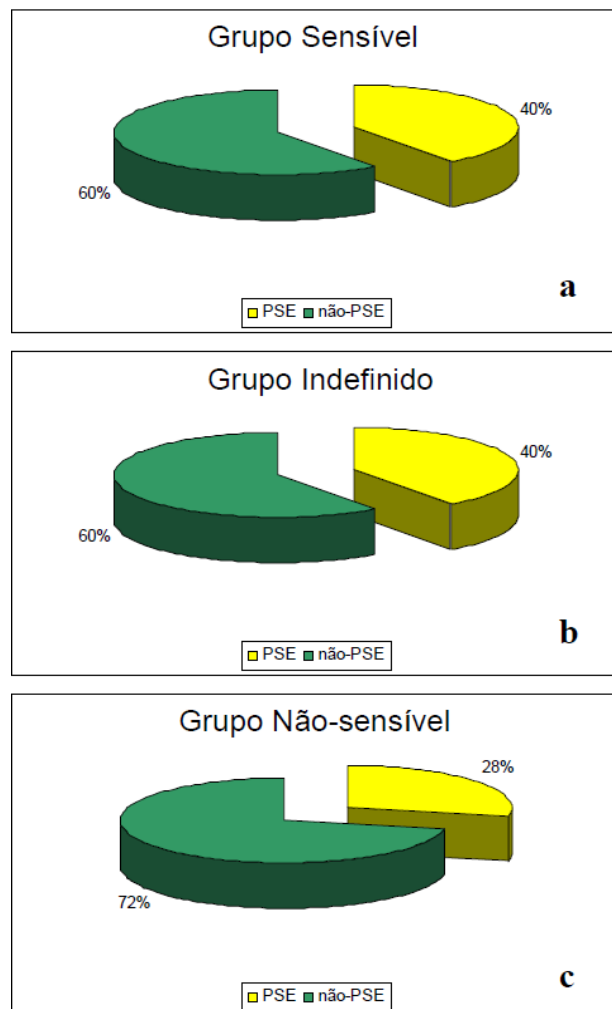


Figura 17 – Incidência de carnes de frango com características PSE nos grupos: Sensível (a), Indefinido (b) e Não-sensível (c) ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

Essa maior ocorrência de carnes com características PSE no grupo Sensível (Figura 17) está de acordo com a teoria tanto relatada em suínos (MITCHELL; HEFFRON, 1982) quanto em aves (OWENS et al., 2000b). Em recente estudo, realizado por Soares et al. (2007) com frangos comerciais, onde foi avaliada a incidência de carnes PSE, os autores observaram que o grupo sensível ao halotano apresentou 42,1% de filés com características PSE, resultado similar ao encontrado neste experimento (40%).

Owens et al. (2000b) aplicaram o teste do halotano em perus para verificar a predisposição destes animais em desenvolverem filés PSE quando transportados antes do abate, constatando que 70% dos perus sensíveis ao halotano apresentaram carnes com características PSE.

Quanto à ocorrência da mesma incidência de PSE nos grupos Indefinido e Sensível, essa relação ainda não é clara em aves. Wheller et al., (1999), embora tenham encontrado perus com respostas parciais, não chegaram a avaliar os efeitos dos parâmetros de qualidade final da carne nestes animais. O que se sabe até o momento é que em suínos heterozigotos, o enrijecimento dos membros frente à ação do halotano não é estimulado na maior parte do tempo (MICKELSON; LOUIS, 1996). Em aves, essa relação com animais heterozigotos ainda não pode ser afirmada em decorrência do problema genético não ter sido ainda elucidado. Entretanto, a maior incidência de carnes PSE no grupo Sensível demonstra que os frangos apresentam sensibilidade ao halotano e o PSE possivelmente indica origem genética, mas provavelmente diferente de suínos. Em frangos, o controle do fluxo de íons Ca^{2+} do RS é feito por duas isoformas da rianodina, a α -RYR e a β -RYR (OTTINI et al., 1996), enquanto que este controle é realizado apenas pela isoforma RYR1, a qual é codificada pelo gene que sofreu mutação de ponto promovendo a falta de controle desta isoforma. Em aves, até o momento não foram encontradas mutações similares, mas têm sido objeto de estudo (LARA, 2003; DROVAL, 20004; ODA, 2006).

Importante salientar que não só os grupos Sensível e Indefinido ao halotano apresentaram carnes caracterizadas como PSE. O grupo Não-sensível, embora em uma menor quantidade, mas não baixa (28 %) (Figura 17), apresentou também a anomalia. No trabalho de Owens et al. (2000b), além de terem encontrado 70% de carnes PSE em perus sensíveis ao halotano, observaram também que 50%

dos animais que não apresentaram sensibilidade ao anestésico, exibiram filés PSE, deduzindo que o teste do halotano não seria um preditor 100 % deste fenômeno. Portanto, o PSE também pode ser desencadeado por fatores ambientais de estresse pré-abate, além de sua possível origem genética.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o problema PSE pode estar relacionado também a fatores de ordem ambiental, onde a temperatura e o transporte são de suma importância, comprometendo a qualidade da carne (BARBUT, 1997; BRESSAN; BERAQUET, 2002; AKSIT et al., 2006), como também já verificado por Lara et al., 2002 e Langer et al., 2007. O mesmo pode ser observado em suínos submetidos a uma variedade de fatores estressantes simulando condições comerciais de pré-abate (BROW et al., 1998; BERTOL, 2005). Esses fatores em conjunto geram um problema multifatorial difícil de ser solucionado, porém, podendo ser amenizado quando controlado.

5.1.2.2 Avaliação dos parâmetros de detecção de carnes PSE entre os grupos

5.1.2.2.1 *pH final, cor e CRA*

Estão apresentados na Tabela 1 os valores das medidas de pH final (pHf), Cor (L^* , a^* , b^*) e CRA dos filés de peito de frango dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível. Não foram encontradas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os parâmetros avaliados. A ausência de resultados distintos entre os grupos Sensível e Indefinido e o grupo Não-sensível provavelmente deve-se ao fato de que em todos os grupos foram observadas carnes PSE, embora no grupo Não-sensível esta tenha ocorrido em menor quantidade.

Tabela 1 – Valores médios de pH final (pH_f), Cor (L*, a*, b*) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos filés de peito de frango 24h post mortem dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

Grupos	pH _f	L*	a*	b*	CRA (%) n = 20
Sensível (n=25)	6,04 ^a ± 0,14	52,48 ^a ± 3,93	2,60 ^a ± 1,02	9,67 ^a ± 1,84	73,38 ^a ± 2,04
Indefinido (n=25)	6,02 ^a ± 0,11	51,84 ^a ± 2,74	2,36 ^a ± 0,68	9,02 ^a ± 1,50	73,43 ^a ± 2,89
Não-sensível (n=25)	6,04 ^a ± 0,11	51,77 ^a ± 2,54	2,44 ^a ± 0,98	9,45 ^a ± 1,84	73,77 ^a ± 3,63

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). \pm Desvio-padrão

Wheller et al., (1999) avaliaram os valores de pH e cor (L*) 1 e 24 h post mortem respectivamente em perus que responderam positivamente (sensíveis) e negativamente (não-sensíveis) ao halotano. Os autores não evidenciaram diferenças significativas tanto entre o pH 1h quanto o valor de L* 24h post mortem. O mesmo foi encontrado por Owens et al. (2000b) que também não observaram diferenças ($p > 0,05$) tanto entre o pH inicial e final quanto entre o valor de L* de filés de frangos sensíveis e não sensíveis ao halotano.

5.1.2.2.2 Valor de R

A medida do valor de R, denominada como a relação entre inosina monofosfato (IMP) e adenosina trifosfato (ATP), diretamente relacionados ao desenvolvimento de carnes PSE (Honikel e Fischer, 1977), está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Valor de R de filés de frangos dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

Grupos	Valor de R
	n = 6
Sensível	1,21 ^a ± 0,06
Indefinido	1,20 ^a ± 0,03
Não-sensível	1,27 ^a ± 0,02

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). \pm Desvio-padrão

Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos, demonstrando direta relação com as demais análises avaliadas anteriormente, que também não apresentaram diferenças ($p > 0,05$). Segundo Honikel (1981), quando o valor de R é igual ou superior a 1,10, indica que as carnes das aves encontram-se em rigor mortis. O que se pode verificar, é que todos os valores de R da Tabela 2 apresentaram-se superiores a 1,10 demonstrando que o rigor já havia se instalado nos filés avaliados, devido ao tempo de coleta do filé ter sido realizado em aproximadamente 30 min., pois segundo Olivo et al. (2001) e Chiang et al. (2008) a instalação do rigor em aves ocorre por volta de 10 a 15 min.

Resultado similar a este foi observado por Soares et al. (2007) quando avaliaram carnes PSE, normais e análogas ao DFD (Dark, Firm, Dry), sugerindo que esses elevados valores poderiam ser uma provável explicação para a não ocorrência de diferenças ($p > 0,05$) entre os filés avaliados.

5.1.3 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Animais

Algumas análises sanguíneas são de suma importância para a averiguação dos transtornos metabólicos relacionados ao estresse de suínos (MITCHELL; HEFFRON, 1982). A Tabela 3 apresenta as avaliações de glicose, realizadas no plasma, e de CK e LDH, ambas realizadas no soro sanguíneo dos frangos testados com halotano.

A coleta de sangue 48 h após o teste do halotano foi destinada para avaliação do efeito de possíveis fatores ambientais comuns nas práticas de manejo pré-abate. Segundo Mitchell et al. (1999), que investigaram os efeitos da exposição de aves ao halotano, este anestésico promove, independente da positividade das aves ao teste, aumentos significativos nas atividades de CK e LDH permanecendo por aproximadamente 48 h.

Embora haja relatos que indiquem maiores concentrações de glicose sanguínea em suínos portadores da PSS e conseqüentemente, sensíveis ao anestésico halotano (MITCHELL; HEFFRON, 1982), não foram encontradas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os três grupos (Sensível, Indefinido e Não-sensível) quanto à sua concentração no plasma sanguíneo coletados tanto no tempo de 3 h quanto no de 48 h após o teste do halotano (Tabela 3). Em aves, a escassez de estudos voltados para este tipo de pesquisa dificulta concluir algo em relação a tal resultado. O que se permite hipotisar até o presente momento é que somente a sensibilidade ao teste do halotano não foi capaz de desencadear reações hormonais, tais como as catecolaminas e corticosterona, que atuam liberando glicose na corrente sanguínea das aves.

Quando a média das concentrações de glicose foi comparada entres os diferentes tempos de coleta do plasma nas aves de cada grupo, foi possível observar diferenças significativas ($p \leq 0,05$), em que as concentrações de glicose mostraram-se superiores no plasma coletado no tempo de 3 h (Tabela 3). A menor concentração de glicose plasmática coletada no tempo de 48 h, provavelmente, está relacionada ao jejum pré-abate (10 h), o qual as aves passam a utilizar suas reservas energéticas para suprir a demanda de energia requerida para a sua sobrevivência (MOREIRA, 2005).

Tabela 3 – Concentração de glicose sanguínea e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) dos frangos dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano, coletados após 3 e 48 h a serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

ANÁLISE	TEMPOS DE			NÃO-SENSÍVEL
	COLETA			
		SENSÍVEL	INDEFINIDO	
GLICOSE (mg/dL)	3h	256,2 ^{aa}	247,2 ^{aa}	249,5 ^{aa}
	(n=12)	± 17,64	± 13,95	± 20,99
	48 h	228,17 ^{ab}	212,25 ^{ab}	224,33 ^{ab}
	(n=12)	± 21,85	± 9,44	± 15,94
CK (U/L)	3h	4606,8 ^{aa}	4983,0 ^{aa}	4914,5 ^{aa}
	(n=12)	±1.291,1	±956,32	±1.172,8
	48 h	3847,2 ^{aa}	4099,6 ^{aa}	4051,3 ^{aa}
	(n=12)	±1625,9	±1833,2	±1693,1
LDH (U/L)	3h	2004,9 ^{aa}	1508,8 ^{abA}	1390,6 ^{ba}
	(n=12)	±472,10	± 513,4	± 515,4
	48 h	2081,0 ^{aa}	1756,0 ^{abA}	1253,0 ^{ba}
	(n=12)	±782,0	± 713,8	± 519,1

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, entre as mesmas análises, diferem entre si pelo teste t-student a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). \pm Desvio-padrão

A atividade da enzima CK, responsável por catalisar a via mais rápida de produção de energia na forma de ATP pela conversão de fosfocreatina à creatina com liberação de grupamentos fosfatos (MITCHELL; HEFFRON, 1982), não foi significativamente diferente ($p \geq 0,05$) tanto entre os grupos quanto entre os diferentes tempos de coleta do soro (Tabela 3). A similaridade entre os valores observados pode estar relacionada ao elevado desvio-padrão encontrado, onde o coeficiente de variação ultrapassou 20% em todos os grupos. Embora estudos relacionem a atividade de CK com a PSS e também com estresse de ordem não

genética (MITCHEL; HEFFRON, 1982; MITCHELL et al., 2003) alguns autores já demonstraram dificuldades em se encontrar diferenças significativas entre a atividade de CK em suínos normais e susceptíveis ao estresse devido à alta variabilidade dos resultados encontrados, sem conclusões quanto a sua causa (NELSON et al., 1974; FÀBREGA et al., 2003).

Mitchell e Heffon (1982) atribuem a elevada variabilidade da atividade de CK em suínos a três fatores: 1) variação diurna que pode ter um aumento de até 50%, 2) relação com a atividade muscular e 3) idade do animal, que segundo os autores seria a mais importante, onde a atividade máxima de CK está relacionada com o pico do anabolismo protéico, que ocorre entre 11 e 28 semanas de idade, tornando difícil a distinção das atividades de CK em suínos nessa faixa de idade.

Com relação às medidas da atividade de LDH, foram observadas diferenças ($p \leq 0,05$) na sua atividade quando comparando-se com os grupos Sensível e Não-sensível ao halotano tanto para o tempo de 3h quanto para o tempo de 48 h após o teste do halotano. A atividade desta enzima mostrou-se aproximadamente 40 % maior nas aves do grupo Sensível do que no grupo Não-sensível, condizendo com a maior ocorrência de carnes PSE no grupo Sensível, pois a LDH atua catalisando a transformação de piruvato a lactato (PUOLANNE et al., 2002). Esta enzima interfere de forma significativa sobre a qualidade final da carne, pois ela está diretamente relacionada à rápida queda do pH da carne devido a acelerada produção de lactato (PUOLANNE et al., 2002) levando à maior ocorrência de carnes PSE (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006). Estes resultados são semelhantes aos evidenciados pela literatura (MITCHELL; HEFFRON, 1982; PUOLANNE et al., 2002), onde os autores afirmam que a atividade de LDH é aumentada em resposta a ações estressantes e também em suínos com maior susceptibilidade ao estresse. Portanto, estes resultados indicam que o halotano é um agente identificador e desencadeador de estresse em frangos, em decorrência das maiores atividades observadas tanto no tempo de 3 h quanto no de 48 h após a aplicação do teste do halotano.

Apesar da detecção de aves portadoras de uma possível síndrome estressante pelo teste do halotano e sua relação com o fenômeno PSE estarem em fases iniciais de pesquisa, estes resultados permitem evidenciar que o teste do halotano e sua relação com a susceptibilidade ao estresse em aves tem fundamento,

uma vez que aves com sensibilidade ao halotano apresentaram maior atividade de LDH (Tabela 3) e maior incidência de carnes PSE (Figura 17)

5.2 EXPERIMENTO 2: TESTE DO HALOTANO EM AVES BISAVOZEIRAS DA LINHAGEM FÊMEA DO FRANGO COMERCIAL.

5.2.1 Sensibilidade ao Halotano

A ocorrência de aves bisavozeiras da linha fêmea sensíveis, indefinidas e não-sensíveis ao halotano está ilustrada na Figura 18. Dos 298 frangos avaliados neste experimento, apenas 0,67 % mostraram-se sensíveis, seguidos por 3,69 % indefinidos e 95,64 % não-sensíveis ao halotano.

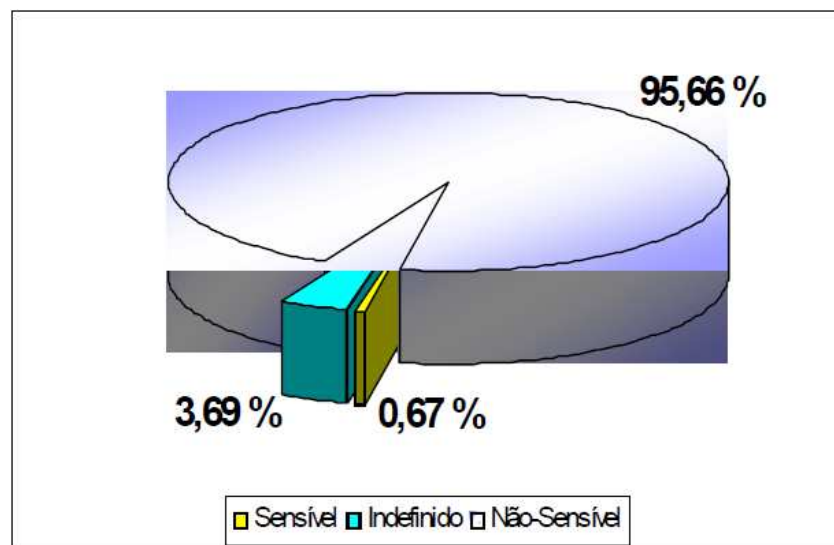


Figura 18 – Incidência de frangos sensíveis, indefinidos e não-sensíveis ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 minutos.

Assim como ocorreu no Experimento 1, todas as aves avaliadas pelo teste do halotano saíram desacordadas da câmara de aplicação do teste,

permanecendo nesse estado por um tempo que variou de 2 a 3 min., comprovando a ação anestésica do halotano (Figura 15).

Como pode ser observado na Figura 18, a incidência de frangos sensíveis ao halotano apresentou-se muito baixa (0,67%, 2 animais) quando comparada à incidência nos frangos de linhagem comercial que foi de 9,1% (Figura 16) e com dados de outros pesquisadores (WHELLER et al., 1999; OWENS et al., 2000a; CAVITT et al., 2004; SOARES et al., 2007). Provavelmente, esta baixa incidência deve-se a linha analisada ser fêmea que é desenvolvida com o objetivo de melhorar o sistema reprodutor enquanto que os frangos da linhagem macho são desenvolvidos para um acelerado ganho de peso e maior rendimento de carcaça e peito (SCHEUERMANN, 2005) Existem relatos de que o melhoramento genético para aumento de peso levaram à alterações metabólicas e algumas anomalias tais como o PSE (OBA, et al., 2006). Portanto, hipotetiza-se que a baixa incidência de animais sensíveis ao halotano bem como de animais classificados como indefinidos (3,69%, 11 animais) está relacionada com a linha fêmea, possivelmente se o teste fosse aplicado em animais de linha macho esta incidência seria maior.

Resultados relativamente baixos também foram observados no grupo classificado como Indefinido. Apenas 11 animais (3,69%) de 298 frangos avaliados mostraram respostas parciais frente ao halotano, resultado este menor ao encontrado no Experimento 1 (18,4 %). O restante das aves (95,66%) não apresentaram reações que as classificassem como sensíveis ou indefinidas ao halotano. Assim, as mesmas foram intituladas como não-sensíveis ao anestésico.

5.2.2 Avaliação do músculo Pectoralis major

5.2.2.1 Incidência de carnes PSE

A incidência de carnes PSE está ilustrada na Figura 19. O grupo Sensível ao halotano não apresentou carnes caracterizadas como PSE. As características PSE foram observadas apenas no grupo Indefinido, que apresentou 3 animais de 11 selecionados pelo teste do halotano, e no grupo Não-Sensível que

também teve 3 frangos com carnes PSE de 15 animais selecionados após o teste do halotano. O baixo número de aves sensíveis ao halotano (n=2) dificultou a observação de carnes com características PSE, provavelmente se um número maior de aves apresentassem sensibilidade ao halotano seria possível a detecção e caracterização de carnes PSE, semelhantemente ao ocorrido no experimento com frangos de linhagem comercial.

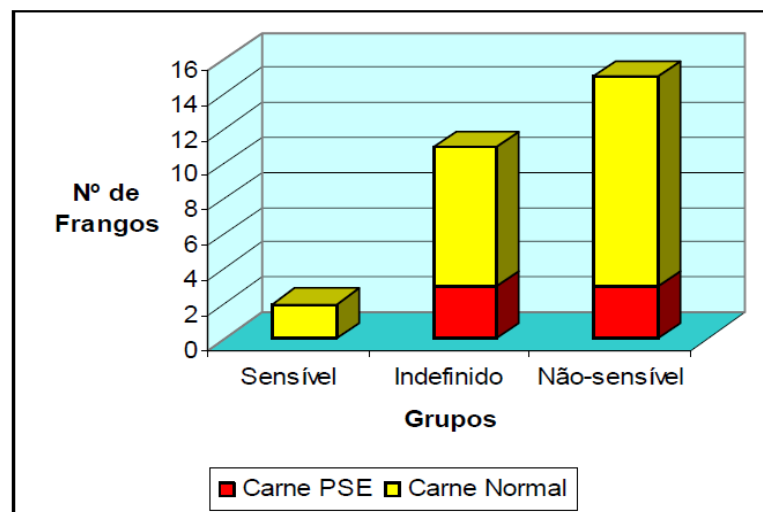


Figura 19 – Incidência de carnes de frango com características PSE nos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

Embora as aves da linhagem fêmea também possam apresentar carnes PSE, frente aos resultados encontrados neste experimento, é bem provável que elevadas incidências de carnes PSE estão mais relacionadas aos frangos oriundos da linhagem macho, destinados ao rápido crescimento e ganho de massa muscular (DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999). Segundo Oba et al. (2006) a seleção genética destas aves para ganho de massa muscular desenvolveu um aumento da área transversal das fibras, que proporcionou o desenvolvimento de miopatias relacionadas à qualidade da carne e também o problema PSE.

A incidência em frangos da linha macho do frango comercial com carnes caracterizadas como PSE é preocupante, a qual vários autores têm focado suas pesquisas para este problema. Soares et al. (2003,a), avaliando a incidência de

PSE em frangos comerciais no Brasil, encontraram 22% de carnes caracterizadas como PSE. Outra pesquisa realizada por Woelfel et al. (2002) demonstrou que 47 % dos filés avaliados apresentaram-se classificados como carnes PSE, demonstrando a dimensão do problema.

Os manejos pré-abate e fatores ambientais também são importante em relação à ocorrência de carnes PSE (GUARNIERI et al., 2002; LANGER et al., 2007). Portanto, além da genética, outra possível explicação para a baixa ocorrência de carnes PSE no presente experimento quando comparado aos estudos dos autores citados acima, está relacionada ao tempo de jejum das aves antes do abate que foi de aproximadamente 20 h. Esse elevado período de restrição alimentar pode ter contribuído para a baixa reserva de glicogênio no momento do abate que conduziu a baixa formação de ácido láctico e conseqüentemente a pH superiores e não característicos de PSE (ROÇA; SERRANO, 1994).

5.2.2.2 Avaliação dos parâmetros de detecção de carnes PSE entre grupos

5.2.2.2.1 pH inicial e final, cor e CRA

Estão apresentados na Tabela 4 os valores das medidas de pH inicial (pHi) e final (pHf), Cor (L^* , a^* , b^*) e CRA dos filés de peito de frango dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano.

Os três grupos avaliados sensível, indefinido e não-sensíveis ao halotano diferiram ($p \leq 0,05$) apenas com relação ao pH inicial, sendo maior para os frangos sensíveis, seguidos pelos indefinidos e não-sensíveis. Os outros parâmetros avaliados não diferiram ($p > 0,05$), possivelmente devido ao baixo número de aves com características PSE e a baixa amostragem de animais sensíveis ao halotano.

Tabela 4 – Valores médios de pH inicial (pHi) e final (pHf), Cor (L*, a*, b*) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos filés de peito de frango 24 h post mortem dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano após serem submetidos ao anestésico halotano a 3% por 5 min.

Grupos	pHi	pHf	L*	a*	b*	CRA %
Sensível (n=2)	6,86 ^a ± 0,14	5,90 ^a ± 0,12	50,28 ^a ± 2,28	3,05 ^a ± 0,13	5,30 ^a ± 0,37	74,22 ^a ± 1,19
Indefinido (n=11)	6,35 ^{ab} ± 0,24	5,96 ^a ± 0,16	51,43 ^a ± 1,99	3,68 ^a ± 0,81	6,67 ^a ± 0,59	73,59 ^a ± 3,19
Não-sensível (n=15)	6,30 ^b ± 0,20	5,97 ^a ± 0,15	51,71 ^a ± 1,32	4,25 ^a ± 1,57	6,31 ^a ± 1,41	75,34 ^a ± 3,68

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). ± Desvio-padrão

5.2.3 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Animais

A Tabela 5 apresenta as avaliações de glicose, realizadas no plasma, e de CK e LDH, ambas realizadas no soro sanguíneo dos frangos testados com halotano.

Tabela 5 – Concentração de glicose e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) sanguíneas dos frangos dos grupos Sensível, Indefinido e Não-sensível ao halotano, coletados após 3 h a serem submetidos ao anestésico halotano a.3 % por 5 min.

Grupos	Glicose (mg/dL)	CK (U/L)	LDH (U/L)
Sensível (n=2)	187,0 ^a ± 4,24	8471,5 ^a ±364,2	2822,0 ^a ±534,6
Indefinido (n=11)	186,6 ^a ± 10,80	6222,1 ^a ±1567,7	2724,3 ^a ±749,6
Não-sensível (n=15)	169,8 ^a ± 19,40	7488,5 ^a ±2414,4	967,6 ^b ± 236,8

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). \pm Desvio-padrão

As concentrações de glicose sanguínea não apresentaram diferenças ($p \geq 0,05$) entre os grupos avaliados, resultado similar ao observado no experimento com frangos de linhagem comercial. Assim como no experimento anterior, o que se pode observar até o presente momento é que somente a positividade ao teste do halotano também não foi capaz de desencadear reações hormonais que pudessem levar à maior liberação de glicose na corrente sanguínea das aves, conforme mostrado no esquema ilustrado na Figura 6.

A atividade de CK também não mostrou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos. Entretanto, observa-se que os valores de atividade de CK da Tabela 5 são superiores aos descritos na Tabela 3. Esta diferença pode estar relacionada à atividade muscular elevada resultante do transporte destes animais que foi de aproximadamente 5 h enquanto que os animais do primeiro experimento não foram transportados. Este fator está diretamente relacionado tanto a elevadas atividades de CK, quanto às suas elevadas variações (MITCHELL; HEFFRON, 1982; MITCHELL et al., 2003).

As atividades de LDH foram menores ($p \leq 0,05$) para os animais do grupo Não-sensível ao halotano quando comparadas com dos animais dos grupos Sensível e Indefinido, indicando que frente às ações estressantes, as aves sensíveis e indefinidas ao teste do halotano tendem a produzir maiores concentrações de ácido láctico no músculo ocasionando a queda do pH. Porém, os valores de pH não diferiram ($p > 0,05$) entre os três grupos avaliados como pode ser observado na Tabela 4. A queda de pH não foi observada, pois estes animais permaneceram em jejum por 20 h antes do abate, o que provavelmente ocasionou o consumo de glicogênio não havendo substrato suficiente para atuação da LDH levando a maior formação do ácido láctico. Outra hipótese levantada foi de que o halotano por si só possa ser uma agente estressante capaz de desencadear reações nas aves conduzindo a alterações bioquímicas o que será discutido com mais detalhes no próximo capítulo.

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO HALOTANO E DO ESTRESSE TÉRMICO COMO AGENTES ESTRESSORES NAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO.

5.3.1 Influência do Estresse Térmico e do Halotano sobre as características PSE.

5.3.1.1 Ocorrência de carnes PSE

Neste experimento foram avaliados os efeitos do estresse térmico pré-abate e do halotano em frangos sobre o desenvolvimento de carnes PSE, para tanto os frangos foram divididos em quatro tratamentos:

Tratamento HHH: Frangos (n=6) submetidos ao teste do halotano e abatidos após 1 h de aplicação do teste.

Tratamento HET: Frangos (n=6) submetidos ao teste do halotano, estresse térmico, 48h após aplicação do teste e posterior abate.

Tratamento EET: Frangos (n=6) submetidos ao estresse térmico e posterior abate.

Tratamento CCC (Controle): Frangos (n=6) não foram submetidos ao teste do halotano e nem ao estresse térmico.

Em cada tratamento foi verificada a ocorrência de carnes com características PSE, conforme apresentado na Figura 20. Para classificar as carnes em PSE e não PSE foi utilizado o valor de L* conforme estabelecido por Soares et al. (2002) e descrito anteriormente (item 4.1.7)

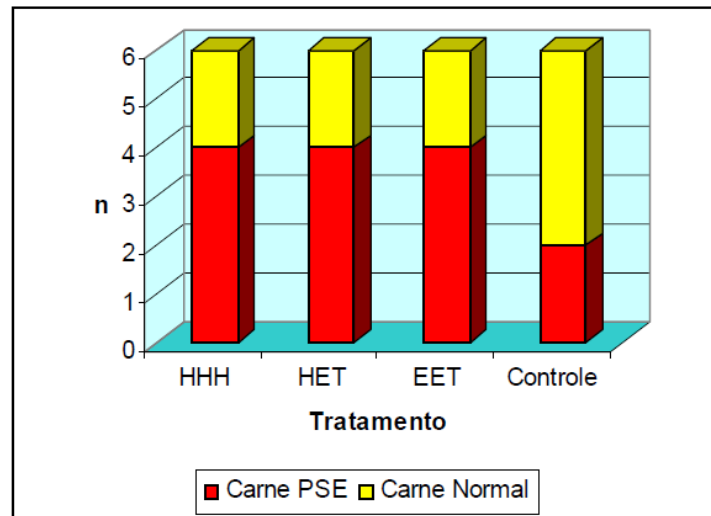


Figura 20 – Ocorrência de carnes com características PSE em frangos dos tratamentos HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.

O anestésico halotano é utilizado como preditor da síndrome PSS em suínos (MITCHELL; HEFFRON, 1982) e atualmente está sendo também utilizado em aves como forma de prever os animais sensíveis que poderiam desenvolver carnes com as características de PSE (WHELLER et al., 1999; OWENS et al., 2000a,b, CAVITT et al., 2004; SOARES et al., 2007). O halotano quando inalado por alguns animais pode levar ao aumento do metabolismo anaeróbico com maior produção de ácido lático e calor, além da manutenção da contração muscular, que pode ser observada pela rigidez dos membros inferiores (MITCHELL; HEFFRON, 1982). Estes sintomas estão associados a defeitos genéticos no gene hal que codifica a proteína rianodina responsável pelo controle do fluxo de íons Ca^{2+} no RS (FUJII et al., 1991). Devido à ação do halotano em acelerar o metabolismo dos

animais a alterar a atividade de algumas enzimas tais como CK e LDH (MITCHELL et al., 1999), foi levantada à hipótese de que este poderia atuar como agente estressor e levar a maior produção de carnes PSE. Os resultados apresentados indicam que o halotano realmente atuou como agente estressor, o que pode ser constatado pelo maior número de filés PSE no tratamento HHH quando comparados com o tratamento Controle.

Por outro lado, o efeito do estresse térmico sobre o desenvolvimento de carnes PSE já vêm sendo descrito por vários pesquisadores (OLIVO et al., 2001; BRESSAN BERAQUET, 2002; SOARES, 2003; AKSIT et al., 2006). Entretanto, alguns autores relatam que o estresse térmico por si só não é capaz de determinar a ocorrência significativa de carnes PSE, sugerindo que esta anomalia é consequência de uma interação de fatores ambientais e genéticos, onde um único fator tomado isoladamente não pode caracterizar satisfatoriamente esta síndrome (LARA et al., 2002). Os resultados mostraram que o estresse térmico provocou o desenvolvimento de maior número de filés com características PSE quando comparados com o controle. Realmente, os animais submetidos ao estresse térmico apresentaram dispnéia durante o tempo em que permaneceram na câmara térmica, permitindo-se verificar a influência da temperatura sobre o bem-estar destes animais, como pode ser visualizado na Figura 21.



Figura 21 – Frangos apresentando dispnéia típica durante a aplicação de estresse térmico a 35 °C por 1 h.

Entretanto, o fato do tratamento Controle ter apresentado carnes com as características PSE, embora em quantidade menor, demonstra que vários fatores pré-abate podem influenciar a qualidade final das carnes e não só o estresse térmico, mas o próprio procedimento de abate pode ser considerado um fator estressante para os animais.

5.3.1.2 Avaliação dos parâmetros de detecção de carnes PSE

5.3.1.2.1 pH inicial e final, cor e CRA

Na Tabela 6 estão apresentados os valores das medidas de pH inicial (pHi) e final (pHf), Cor (L*, a*, b*) e CRA dos filés de peito de frango dos tratamentos: HHH, HET e EET e Controle.

Tabela 6 – Valores médios de pH inicial (pHi) e final (pHf), Cor (L*, a*, b*) e Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos filés de peito de frango dos tratamentos.

Tratamentos	pH _i	pH _f	L*	a*	b*	CRA %
HHH (n=6)	6,09 ^a ± 0,25	5,79 ^b ± 0,10	53,92 ^a ± 2,57	3,59 ^a ± 1,40	7,37 ^a ± 0,75	70,51 ^a ± 3,91
HET (n=6)	6,31 ^a ± 0,23	5,79 ^b ± 0,08	53,61 ^a ± 0,90	3,26 ^a ± 1,35	7,46 ^a ± 0,95	72,76 ^a ± 1,70
EET (n=6)	6,11 ^a ± 0,16	5,76 ^b ± 0,05	53,92 ^a ± 2,57	2,84 ^a ± 0,91	7,29 ^a ± 1,14	70,51 ^a ± 3,91
CCC (n=6)	6,25 ^a ± 0,25	5,92 ^a ± 0,09	52,00 ^a ± 2,78	3,01 ^a ± 0,84	7,08 ^a ± 0,79	72,78 ^a ± 2,08

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). ± Desvio-padrão Tratamentos: HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.

Dos parâmetros avaliados apenas o pH final diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos. O menor pH observado nos filés de frango dos tratamentos HHH, HET e EET está relacionado com o estresse destes animais que levaram a maior produção de ácido láctico e conseqüentemente a maior ocorrência de PSE, conforme constatado na Figura 20. O valor de L^* geralmente está relacionado com o pH, quanto menor o pH maior a luminosidade, ou seja, mais pálido apresenta-se o filé (SOARES, 2003; ODA, 2006). A CRA não diferiu significativamente entre os tratamentos, resultado semelhante foi descrito por Lara et al. (2002).

5.3.1.2.2 Valor de R

A medida do valor de R, denominada como a relação entre inosina monofosfato (IMP) e adenosina trifosfato (ATP), para os tratamentos HHH, HET, EET e controle, está apresentada na Tabela 7.

Conforme já relatado anteriormente, valores de R superiores a 1,10 demonstram a instalação de rigor mortis e a presença do fenômeno PSE no filé (HONIKEL, 1981). Embora os valores de R estejam todos superiores a 1,10 foi possível evidenciar diferenças ($p \leq 0,05$) entre os filés do tratamento controle e os tratamentos HET e EET. As aves que sofreram ação do estresse térmico (HET e EET) apresentaram maiores valores ($p \leq 0,05$) do que o grupo controle demonstrando que os frangos destes tratamentos apresentaram estágios mais elevados de rigor mortis, com maior produção de IMP e conseqüentemente menores concentrações de ATP (HONIKEL; FISCHER, 1977).

Tabela 7 – Valor de R de filés de frango dos tratamentos.

Tratamentos	Valor de R
HHH (n=2)	1,15 ^{ab} ± 0,06
HET (n=4)	1,18 ^a ± 0,03
EET (n=4)	1,22 ^a ± 0,02
Controle (n=4)	1,11 ^b ± 0,02

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). \pm Desvio-padrão Tratamentos: HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.

Estes resultados corroboram com o relatado por Bressam e Araújo (2003), onde os autores afirmam que as aves submetidas, no pré-abate, ao excesso de calor apresentam aceleração da glicólise e hidrólise de ATP, entretanto, em temperaturas ambientais baixas essa evolução é retardada. Resultados similares também foram encontrados por Bressan e Beraquet (2002), onde o tratamento com temperatura em torno de 30°C foi suficiente para promover maior valor de R em filés quando comparados aos peitos dos frangos submetidos à temperatura de 17°C.

Por outro lado, os filés do tratamento HHH apresentaram valores de R similares aos demais tratamentos, indicando que o halotano não influenciou tanto quanto o estresse térmico na hidrólise do ATP.

5.3.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos dos Animais

A Tabela 8 apresenta a concentração de glicose sanguínea e das atividades de CK e LDH dos frangos dos tratamentos HHH, HET, EET e Controle.

Tabela 8 – Concentração de glicose sanguínea e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) dos frangos dos tratamentos.

Tratamentos	Glicose (mg/dL)	CK (U/L)	LDH (U/L)
HHH (n=6)	238,3 ^a ± 3,33	4458,3 ^a ±1625,8	1386,8 ^a ±214,7
HET (n=6)	231,3 ^a ± 10,15	5116,0 ^a ±1976,3	1127,3 ^a ±175,5
EET (n=6)	237,8 ^a ± 10,80	3629,5 ^a ±1464,4	1053,4 ^a ±121,9
Controle (n=6)	245,3 ^a ± 25,54	5585,3 ^a ±2088,9	1299,3 ^a ± 276,6

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). \pm Desvio-padrão
Tratamentos: HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.

As concentrações de glicose e as atividades de CK e LDH não diferiram ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos. O emprego de tubos contendo heparina (anticoagulante) neste experimento tinha o objetivo de diminuir a variação das atividades enzimáticas encontradas nos experimentos anteriores, pois como a dessoração do sangue era demorada e bem variável, imaginava-se que este tempo oscilante estivesse influenciando sobre as medidas das atividades tanto de CK quanto de LDH. Entretanto, mesmo em condições mais controladas e com tempos de extração mais próximos, o elevado desvio-padrão permaneceu, sendo característico do tipo de análise enzimática conforme constado por outros autores (NELSON et al., 1974; FÀBREGA et al., 2003).

Mitchell et al. (1999) monitoraram a concentração de glicose e das atividades de CK e LDH no plasma sanguíneo de aves após a aplicação do teste do halotano por um período de 48 h e as compararam com o grupo controle (sem teste do halotano). Os autores também não observaram diferenças ($p > 0,05$) entre as concentrações de glicose, porém as atividades de ambas as enzimas apresentaram-se diferentes ($p \leq 0,05$) em comparação ao grupo controle, onde a maior atividade de ambas esteve entre o período de 1 e 6 h após a aplicação do teste do halotano.

Para avaliar precisamente a influência do estresse térmico sobre os parâmetros sanguíneos avaliados, a concentração de glicose e as atividades de CK e LDH foram estimadas nos mesmos animais, ou seja, antes (Controle 2) e após à aplicação do estresse térmico (ET 2). A seguir são apresentadas na Tabela 9, as concentrações de glicose e as atividades de CK e LDH sanguíneas das aves antes.

O estresse térmico não afetou de forma significativa as aves a ponto de promoverem alterações tanto nos teores de glicose quanto nas atividades de CK e LDH, quando comparadas com as aves do tratamento Controle 2.

Tabela 9 – Concentração de glicose e das atividades de Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) sanguíneas dos frangos dos tratamentos.

Tratamentos	Glicose (mg/dL)	CK (U/L)	LDH (U/L)
Controle 2 (n=6)	238,7 ^a ± 17,92	3751,5 ^a ±1748,2	1307,2 ^a ±231,8
ET 2 (n=6)	237,8 ^a ± 12,84	3629,5 ^a ±1464,4	1053,4 ^a ±121,9

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t-student a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). ± Desvio-padrão
Tratamentos: HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.

As ações do halotano e do estresse térmico foram avaliadas nos mesmos animais para verificar qual dos dois fatores apresentava maior influência

sobre os parâmetros sanguíneos avaliados. O tratamento com halotano (HH 3) foi realizado 48 h antes de submeter as mesmas aves ao estresse térmico (ET 3). A comparação entre os resultados obtidos está apresentada na tabela 10.

Houve diferenças ($p \leq 0,05$) entre os níveis de glicose, em que os frangos submetidos ao teste do halotano (tratamento HH 3) apresentaram maiores concentrações, comprovando a ação deste anestésico como agente estressor. Essa ação se reflete sobre os hormônios do estresse, neste caso, sobre as catecolaminas e a corticosterona que atuam em situações estressantes suprimindo as demandas de energia com o objetivo de manter a homeostasia do animal.

Tabela 10 – Concentração de glicose sanguínea e das atividades de CK e LDH dos frangos dos tratamentos.

Grupos	Glicose	CK	LDH
HH 3	247,4 ^a	5434,0 ^a	1445,3 ^a
(n=6)	± 11,70	±1752,6	±164,78
ET 3	231,3 ^b	5116,0 ^a	1127,3 ^b
(n=6)	± 10,15	±1976,6	±175,53

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t-student a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Tratamentos: HHH (submetidos ao teste do halotano), HET (submetidos ao teste do halotano e ao estresse térmico - 35°C/1h - 48 h após o teste), EET (submetidos ao estresse térmico - 35°C/1h) e Controle.

A atividade de LDH também foi mais elevada ($p \leq 0,05$) nos frangos do tratamento HH 3, demonstrando que além de alterações hormonais, o halotano pode interferir de forma significativa sobre a atividade da LDH promovendo uma aceleração na transformação de piruvato a lactato, o que leva a um rápido declínio do pH muscular em temperaturas ainda elevadas, prejudicando o bem-estar animal e conseqüentemente a qualidade da carne pela maior ocorrência de carnes PSE.

Não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) nas atividades de CK, provavelmente em relação ao elevado desvio-padrão, como mencionado nos experimentos anteriores.

6 DISCUSSÃO GERAL

Há diversos fatores ante mortem e post mortem que originam as carnes PSE em frangos (ALVARADO; SAMS, 2004). Porém, assim como em perus, a seleção genética para maior ganho de peso contribuiu para o aumento de anormalidades em frangos refletindo-se na qualidade da carne (OBA et al., 2006). Evidências estas que puderam ser observadas neste trabalho.

A relação do halotano com a mutação no gene *ryr1*, responsável por codificar a proteína RyR1 em suínos (FUJII et al., 1991), permite hipotizar que o PSE em frangos tem origem genética e pode não ser apenas decorrente de fatores ambientais ou práticas inadequadas de manejo pré-abate, devido à similaridade da reação das aves frente à aplicação do teste do halotano. Além disso, foi possível observar uma maior ocorrência de carnes PSE nos animais sensíveis ao halotano, bem como algumas alterações nos parâmetros sanguíneos avaliados, corroborando com a teoria de que este anestésico é um preditor da susceptibilidade ao estresse e conseqüentemente do desenvolvimento de carnes PSE. Portanto, o PSE em frangos possivelmente tem origem genética, embora ainda não esteja totalmente esclarecida.

Em frangos existem duas isoformas da proteína RyR, a α e β RyR, que controlam o fluxo de íons Ca^{2+} no RS do músculo esquelético equivalentes às formas RyR1 e RyR2 em suínos, respectivamente (OTTINI et al., 1996). É provável que a origem genética do PSE em aves não esteja na mesma região que a mutação de ponto encontrada no gene *hal* em suínos, além disso, pode ser que mais de uma mutação possa ter ocorrido, o que justifica o fato de que em frangos apesar da existência da sensibilidade ao halotano a sua relação com o desenvolvimento de carnes PSE é menor que em suínos, ou seja, em suínos praticamente todos os animais sensíveis ao halotano desenvolvem carnes com características PSE enquanto que em frangos a incidência de PSE em animais sensíveis ao halotano está ao redor de 40 % (MITCHELL; HEFFRON, 1982; OWENS et al., 2000b; SOARES et al., 2007). Assim, o fenômeno PSE em frangos é influenciado por outros fatores do manejo pré-abate o que pôde ser constatado pela ocorrência de filés PSE nos animais não-sensíveis ao halotano (experimentos 1 e 2).

Foi verificada uma maior sensibilidade ao halotano pelos frangos de linha macho comercial, uma vez que as aves bisavozeiras de linha fêmea quase não demonstraram sensibilidade ao teste do halotano. Este fato deve-se provavelmente que a sensibilidade ao halotano em frangos e o fenômeno PSE estão relacionados com a seleção genética que propiciaram o desenvolvimento do frango moderno com um rápido ganho de peso em curto espaço de tempo levando à anormalidades nestes animais e conseqüentemente na qualidade de suas carnes.

O anestésico halotano também mostrou ser um agente estressor em frangos quando aplicado antes do abate dos animais conduzindo a alterações tanto musculares quanto sanguíneas em aves e ao desenvolvimento de carnes PSE, conforme constatado no experimento 3.

Foi observado que o estresse térmico é um importante fator do manejo pré-abate para o desenvolvimento de filés PSE, promovendo alterações musculares e sanguíneas em frangos semelhantes às desencadeadas pelo halotano (experimento 3).

7 CONCLUSÃO

Os frangos demonstraram sensibilidade ao halotano através do enrijecimento dos seus membros inferiores assim como observado em suínos e perus, sendo que animais sensíveis apresentaram maior ocorrência de filés PSE, comprovando assim o seu efeito como preditor de carnes PSE. Além disso, o halotano mostrou ser uma agente estressor desencadeando alterações nos parâmetros hematológicos e no músculo das aves, semelhantes às desencadeadas pelo estresse térmico pré-abate.

REFERÊNCIAS

ALVARADO, C. Z.; SAMS, A. R. Update on PSE in poultry meat. In: AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 57., 2004, Lexington, Kentucky. **Proceedings...** Lexington, Kentucky, 2004. p.123-128.

ASKIT, M. et al. Effects of temperature during rearing and crating on stress parameters and meat quality of broilers. **Poultry Science**, v.85, p.1867-1874, 2006.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE AVICULTURA. Disponível em: <<http://www.apa.com.br/>>. Acesso em: 10 abr. 2008.

BARBUT, S. Estimating the magnitude of the PSE problem in poultry. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v.9, n.1, p.35-49, 1998.

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

BATTLE, N. M.; ARISTOY, C.; TOLDRÁ, E. Early postmortem detection of exudative pork meat based on nucleotide content. **Food Chemistry**. Washington, v.65, n.3, p.413-416, 2000.

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.144-457, 1962.

BENNETT, R. A. Current methods in avian anesthesia. In: ACVS VETERINARY SYMPOSIUM, 20, 1992, Miami. **Proceedings...** Miami: American College of Veterinary Surgeons, 1992. 636p.

BERTOL, T. M. et al. Effects of dietary supplementation with L-carnitine and fat on blood acid-base responses to handling in slaughter weight pigs.. **Journal Animal Science**. v. 83. p. 75-81. 2005.

BONELLI, A. M.; SCHIFFERLIR, C. Síndrome Estrés Porcino. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, 2001.

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.

BRESSAN, M. C.; BERAQUET, N.J. Efeito de fatores pré-abate sobre a qualidade da carne de peito de frango. **Revista de Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.1049-1059, 2002.

BRESSAN, M. C. et al. Como diminuir o estresse causado pela apanha, transporte e abate visando o bem-estar de frangos. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2003. p.255-268.

BROWN, S. N. et al. Meat quality in pigs subjected to minimal preslaughter stress. **Meat Science**, v. 49, p.257-265, 1998.

CANDEK-POTOKAR, M.; et al.. 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.

CAVITT, L. C., HARGIS, B. M. OWENS, C. M. The use of halothane and succinylcholine to identify broilers prone to developing pale, soft, exudative meat. **Poultry Science**, v. 83, p.1440-1444, 2004.

CHEAH, K. S. et al. Relationship between Ca^{2+} release, sarcoplasmic Ca^{2+} , glycolysis and meat quality in halothane-sensitive and halothane-insensitive pigs. **Meat Science**. v.10, p.117-130, 1984.

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.

COSTA, F. M. R. **Influência das condições de pré-abate no bem-estar de frangos de corte**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticaba, 2006.

CULAU, P.O.V. et al. Influência do gene halotano sobre a qualidade da carne suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2(supl.), p.954-961, 2002.

DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A. A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. **Poultry Science**, v. 78, p.743-746, 1999.

DROVAL, A. A. **Carne PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos. Mutações no gene receptor da rianodina tipo 3 e alterações no perfil de ácidos graxos.** 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ELROM, K. Review: handling and transportation of broilers: welfare, stress, fear and meat quality. **Israel Medical Association**, v.55, n.3, 2000.

FÀBRECA, E. et al. A comparison of halothane homozygous negative and positive pietrain sire lines in relation to carcass and meat quality, and welfare traits. **Meat Science**, v.66, p.777-787, 2004.

FRANZINI-ARMSTRONG, C; PROTASI, F. **Physiol. Reviews**, v.77, p.699-729, 1997.

FUJII, J. et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, v. 253, p.448-451, 1991.

FURLAN, R. L.; FARIAFILHO, D. E. Aspectos fisiológicos do estresse em aves. **AveWorld**, v.1, n.3, 2003.

GUARNIERI, P. D. et al. Bem estar Animal e qualidade da Carne. Uma exigência dos Consumidores. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 301, p.36-44, 2002.

GUARNIERI, P. D. et al. Presslaughter 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, n.3, 2004.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research Cleveland**, v.10, n.2, p.335-443, 1960.

HOFMANN, K. 1973 e 1974. In: CONCEPTOS de calidad en carne y productos cárnicos. **Fleischwirtsch.**, v.2, p.3-12, 1994.

HONIKEL, K. O.; FISCHER, C.A. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscle. **Journal of Food Science**, v.42, n.7, p.1663-1676, 1977.

HONIKEL, K. O. et al. Influence of post mortem changes in bovine muscle on water-holding capacity of beef. Post mortem storage of muscle at 20°C. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p.1-7, 1981.

KUNST, A., DRAEGER, B., ZIEGENHORN, J. UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 6, p.163-172, 1983.

LANGER, R. et al. Estresse durante o transporte de frangos e qualidade da sua carne. **Revista Nacional da Carne**, v.30, n.359, p.20-25, 2007.

LARA, J. A. F. et al. Estresse térmico e carne PSE em frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2002, Campinas. Brazilian Journal of Poultry Science, 2002. v.3. p. 19.

LARA, J. A. F. **Carne PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos. Ocorrência de mutações no gene receptor da rianodina**. 2003. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

LAWRIE, R. A. **Meat Science**. 5. ed. New York, Pergamon Press, 1991. 293p.

LE BIHAN-DUVAL, E. Genetic variability of poultry meat quality. 2003. Disponível em: <<http://www.poultryscience.org/pba/1952-2003/2003/2003%20Duval.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2008.

LUDTKE, C. B. et al. Bem estar animal no manejo pré-abate e sua influência sobre a qualidade da carne suína. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, 5., 2006, Florianópolis.

McGLOUGHLIN, P. Genetics aspects of pig meat quality. **Pig News Inf**, p.1, 1980.

McKEE, S. R.; SAMS, A. R. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exsudative turkey meat. **Poultry Science**, v. 76, n. 11, p.1616-1620, 1997.

MACLENNAN, D. H.; PHILLIPS, M. S. Malignant hyperthermia. **Science**, v.256, p.789794, 1992.

MANSSONE, F. Planos Anestésicos. In: ANESTESIOLOGIA Veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. p.49-55.

MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca^{2+} release channel, and cell Ca^{2+} regulation defects. **Physiology Review**, v.76, n.2, p.537-592, 1996.

MITCHELL, G.; HEFFRON, J. J. A. Porcine stress syndromes. **Advances in Food Research**, New York, v.28, p.167-230, 1982.

MITCHELL, M. A.; KETTLEWELL, P. J. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solution not problem. **Poultry Science**, v.77, n.12, p.1803-1814, 1998.

MITCHELL, M. A. et al. Skeletal muscle damage following halothane anaesthesia in the domestic fowl: plasma biochemical responses. **Research in Veterinary Science**, v.67, 59-64, 1999.

MITCHELL, M. A.; SANDRECOCK, D. A.; COOKE, V. E.. Seleção para rendimento de carne e indução de miopatia idiopática: implicações para o bem-estar de frangos. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. **Anais ...Campinas: APINCO**, 2003. p. 217-233.

MOREIRA, J. Causas da ocorrência de carnes PSE em frangos de corte e como controlá-las. In SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, 4., 2005, Florianópolis. **Qualidade da Carne de Aves: enfoque na industrialização**. Florianópolis, 2005.

NELSON, T. E. et al. Porcine Malignant hyperthermia: Observations on the occurrence of pale, soft, exudative muscle among susceptible pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v.35, p.347-350, 1974.

NORTHCUTT, J. K. Preslaughter factors affecting poultry meat quality In: SAMS, A. R. (ed.). **Poultry Meat Processing**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 5-18.

OBA, A. et al. A evolução da seleção genética do frango e as anomalias que afetam a produção das carnes. **Aveworld**, n.2, p.48-51, 2006.

O'BRIEN, P. J. The causative mutation for porcine stress syndrome. **Food Animal**. p.257-269, 1995.

ODA, S. H. I. **Análises moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e a ocorrência de carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos.** 2006. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ODA, S. H. I. et al. Detecção de cor em filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne.** v. 28, n. 321, p.30-34, 2003.

OGAWA, Y; KUREBAYASHI, N; MURAYAMA, T. **Adv. Biophysics,** v. 36, p. 27-64, 1999.

OHNISHI, S. T.; OHNISHI, T. **Malignant hyperthermia: a genetic membrane disease.** CRC Press., 1994. 330 p.

OLIVER, I. T. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. **Biochem J.** v.61, p.116.

OLIVO, R. et al. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal of Food Biochemistry,** v.25, n.4, p.271-283, 2001.

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

OTTINI, L. et al. **Biochem. J.,** v. 315, p. 207-216, 1996.

OWENS C. M. et al. The development of pale, exudative meat in two genetic lines of turkeys subjected to heat stress and its prediction by halothane screening. **Poultry Science,** v.79, p.430-435, 2000 a.

OWENS C. M.; MATHEWS, N. S.;SAMS, A. R. The use of halothane gas to identify turkeys prone to pale, exudative meat when transported before slaughter. **Poultry Science,** v.79, p. 789-795, 2000 b.

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.

PELOSO, J. V., Influence of pre-slaughter fasting in muscle condition in swine and its effects on the final meat processing quality. **Second International Virtual Conference on Pork Qualit.** 2001.

POSO, A. R.; PUOLANNE, E. Carbohydrate metabolism in meat animals. **Meat Science.** v.70, p.423-434, 2005.

PUOLANNE, E. J. et al. Lactic acid in muscle and its effects on meat quality. In: Reciprocal Meat Conference, 55., 2002. **Proceedings...**s. l.: s. n, 2002.

ROÇA, R. O.; SERRANO, A. M. Abate de bovinos: Conversão do músculo em carne. **Revista Nacional da Carne.** p. 87-94. out. 1994.

ROSALKI, S. B. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 69, p. 696-705, 1967.

ROSSI, D.; SORRENTINO, V. The ryanodine receptors gene family: expression and functional meaning. **Basic Appl. Myol.**, v.14, n.5, p. 323-343. 2004.

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

SAMS, A. R.; MILLS, K. A. The effect of feed withdrawal duration on the responsiveness of broiler Pectoralis to rigor mortis acceleration. **Poultry Science**, v.72, n.9, p.1789-1796, 1993.

SCHEUERMANN, G. N. Alteração na quantidade e qualidade da carne de aves através da manipulação das fibras musculares. Disponível em <http://www.avisite.com.br/> Acesso em: 23 abr. 2008.

SILVEIRA, E. T. F. Impacto da qualidade na industrialização da carne suína. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO DE SUÍNOS, 2., 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 99-122, 1996.

SMITH, G. C. et al. Effect of transport on meat quality and animal welfare of cattle, pigs, sheeps, horses, deer and poultry. Disponível em <http://www.grandin.com/behaviour/effect.of.transport.html> Acesso em: 03 dez. 2007.

SOARES, A. L. et al. 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. **PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos: Implementação de parâmetro de cor e avaliação bioquímica e estrutural do filé (Pectoralis major)**. 2003. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

SOARES, A. L. et al. Influence of preslaughter handling practices on broiler meat color in a commercial plant. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS ANNUAL MEETING, 2003, Chicago. **Abstracts...** Chicago, 2003. p. 201.

SOARES, A. L. et al. Similaridades entre os sintomas da Síndrome do Estresse das Aves (PtSS) e da Síndrome do Estresse Suíno (PSS), originando as carnes PSE de frangos. **Revista Nacional da Carne**, p. 69-74, mar. 2007.

SOSNICKI, A. A. et al. Pse-like syndrome in breast muscle of domestic turkeys: a review. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 9, n. 1, p.13-23, 1998.

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W. Genetic basis for pale, soft and exudative turkey meat. In: AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 56., 2003. **Proceedings** ...2003. p. 17-22.

SUTKO, J. L.; AIREY, J. A. Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function. **Physiology Review**, v. 76, n. 4, p. 1027-1071, 1996.

TAM, L. G.; BERG, E. P.; GERRARD, D. E. Effect of halothane genotype on porcine meat quality and myoglobin antioxidation. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 41-53, 1998.

TIETZ, N. W. General method. In: BURTIS, C. A, ASHWOOD, E.R., TIETZ, N. W. **Textbook of Clinical Chemistry**, Philadelphia, W. B. Saunders, 1986. p. 682-686.

TIETZ, N. W. Specimen collection and storage recommendations. In: BURTIS, C. A, ASHWOOD, E.R., TIETZ, N. W. **Textbook of Clinical Chemistry**, Philadelphia, W. B. Saunders, 1986. p. 478-497.

TIETZ, N. W. Techniques and procedures to minimize laboratory infections. In: BURTIS, C. A, ASHWOOD, E.R., TIETZ, N. W. **Textbook of Clinical Chemistry**, Philadelphia, W. B. Saunders, 1986. p. 52-53.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. Disponível em: <<http://www.uba.org.br/>>. Acesso em: 10 abr. 2008.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. p. 678-680.

WARRIS, P. New developments in He preslaughter handling of pigs. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO DE SUÍNOS, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. p.81-107.

WEBB, A. J. et al. Porcine stress in pigs breeding. In: WORLD CONGRESS ON GENETCS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2., 1982, Madrid. **Proceedings...** Madrid, Editorial Garsi, 1982. p. 588-608.

WHEELER, B. R. et al. A halothane test to detect turkeys prone to developing pale, soft, and exudative meat. **Poultry Science**, v.78, p.1634-1638, 1999.

WOELFEL, R. J. et al. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a comercial processing plant. **Poultry Science**, v. 81, p. 579-584, 2002.