



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALLAN EDUARDO WILHELM

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E ULTRAESTRUTURA DO FILÉ
DE PEITO DE FRANGO PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*)**

Londrina
2009

ALLAN EDUARDO WILHELM

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E ULTRAESTRUTURA DO FILÉ
DE PEITO DE FRANGO PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*)**

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: Prof. Dr. Massami Shimokomaki

Londrina
2009

ALLAN EDUARDO WILHELM

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E ULTRAESTRUTURA DO FILÉ
DE PEITO DE FRANGO PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*)**

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

Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares

Prof. Dr. José Fernando Machado Menten

Londrina, 08 de Maio de 2009.

Dedicatória

*Aos meus pais, Inácio e Ivete,
exemplos de amor e caráter,
por sempre acreditarem em
mim, incondicionalmente.*

*Ao meu irmão Vitor,
amigo e parceiro de longa data.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu guia e protetor pelos caminhos da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Massami Shimokomaki que me acolheu prontamente no grupo de carnes, pelos sábios direcionamentos e ensinamentos que ajudaram muito no meu crescimento e que levarei por toda vida.

À Profa. Dra. Elza Louko Ida, pela amizade, ajuda e grandes conselhos dispensados para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Adriana Soares Lourenço e ao Prof. Dr. Alexandre Oba, do grupo de carnes, pela amizade e pelas sugestões dispensadas nas inúmeras reuniões e ajuda nos diversos experimentos realizados.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernández-Blazquez da Universidade de São Paulo, pela inestimável colaboração na realização dos experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Alessandro Rossa pela inestimável colaboração no fornecimento das amostras utilizadas para a concretização deste trabalho e à trainee Damaris pela grande ajuda dispensada na coleta de amostras no frigorífico.

Ao Prof. Dr. José Antônio Braga Neto, Profa. Dra. Priscila Aiko Hiane, Profa. Dra. Maria Isabel Lima Ramos e Prof. Dr. Manoel Mendes Ramos Filho, todos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela dedicação e ensinamentos dispensados que formaram minha base em alimentos.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

À CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Araucária pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

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

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta instituição, em especial à Sandra Rezende e Elza Youssef, pela ajuda e atenção dispensada.

Aos alunos de Mestrado e Doutorado desta instituição, pelos momentos de convívio durante estes dois anos: Denis, Luiz, Elvis, Leonardo, Íris, Gislaine, Tatiana, Michele, Cristina, Cleusa, Cassiana.

Aos colegas da turma de Mestrado, pela amizade e momentos compartilhados.

Aos alunos de Mestrado e Doutorado do Grupo de Carnes desta instituição pelos momentos de convívio e conhecimentos compartilhados.

Aos estagiários do Grupo de Carnes desta instituição, em especial à Janaína e Gleice, pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos e amigas que estiveram comigo em algum momento da vida, com os quais aprendi muito.

Aos meus queridos familiares, que sempre estão ao meu lado, e que contribuíram tanto para a formação da pessoa que sou hoje.

À minha namorada Melicia Cintia Galdeano pelo amor, carinho e ajuda nos momentos difíceis. Enfim, por estar comigo e fazer parte de minha vida.

Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança para ela.

(Albert Einstein)

WILHELM, Allan Eduardo. **Atividade proteolítica e ultraestrutura do filé de peito de frango pse (pale, soft, exudative)**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

O aumento da demanda por qualidade por parte do consumidor e a crescente preocupação com custos e perdas na indústria processadora tornam fundamental o melhor entendimento da anomalia PSE. Assim, as causas e conseqüências da carne de frango PSE têm sido objetos de estudo recente de diversos grupos de pesquisa. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estimar a atividade das enzimas proteolíticas nos filés (*Pectoralis major*) de frango PSE e suas conseqüências para a qualidade da carne. A matéria prima foi coletada em uma linha comercial de abate e classificada com base no valor de pH inicial medido 1h30 *postmortem* (pH₁₅), em grupos Controle (pH₁₅>6,0) e PSE (pH₁₅<6,0). Os filés foram analisados quanto aos valores de pH final (pH₂₄), cor (L*, a*, b*), capacidade de retenção de água (CRA), perdas de peso por cozimento (PPC), força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI), além de análises ultraestruturais por meio de microscopia eletrônica. Os valores de pH₂₄ foram menores (p<0,01) no grupo PSE, no entanto, não houve diferença significativa entre os valores de pH₁₅ e pH₂₄ no grupo PSE, indicando que todo o glicogênio havia sido consumido na primeira hora após o abate. Os filés do grupo PSE apresentaram maiores valores de L* (p<0,01), b* (p<0,01) e PPC (p<0,05) e menor CRA (p<0,01), evidenciando a desnaturação protéica e a conseqüente perda de suas propriedades funcionais. A combinação dos maiores valores de MFI (p<0,01) e o menor FC (p<0,05) indicou a existência de maior atividade proteolítica nas primeiras 24h dentro do grupo PSE. Foi constatado também que os valores de MFI correlacionaram-se positivamente com L* (p<0,01) e PPC (p<0,05) e negativamente com os valores de CRA (p<0,01), indicando que quanto maior a proteólise, maior é o prejuízo das propriedades funcionais do filé. Finalmente, as análises ultraestruturais em cortes longitudinais da carne PSE revelaram a despolimerização dos miofilamentos e a desorganização e super contração do sarcômero. Esta contração arrasta componentes do sarcômero em direção à linha Z tornando-as desalinhas e comparativamente muito densas. Nos cortes transversais foi possível observar o surgimento de compartimentos intracelulares e a formação de canais no endomísio para a possível passagem de água em direção ao perimísio, de onde segue para a superfície da carne. Portanto, pode-se afirmar que ocorre ativação precoce das enzimas proteolíticas na carne PSE de frango, afetando a integridade da estrutura da fibra muscular e prejudicando a funcionalidade das proteínas desta carne.

Palavras-chave: PSE. Filés de frango. Fragmentação miofibrilar. Proteases. Ultraestrutura muscular.

WILHELM, Allan Eduardo. **Proteolytic activity and ultrastructure of chicken breast pse (*pale, soft, exudative*) meat.** 2009. 70p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Increased demand for quality by consumers and the growing concern with costs and losses in the manufacturing process make fundamental the need of understanding the PSE abnormality. Thus, the causes and consequences of chicken PSE meat have been subject of recent study by several research groups. This work was carried out in order to estimate the proteolytic enzymes activity in chicken PSE breast meat (*Pectoralis major m.*) and its consequences for the meat quality. Meat samples were collected in a slaughter commercial plant and classified in Control group based on the pH values measured at 1h30 pos mortem, $pH_{15} > 6.0$ and in PSE group, $pH_{15} < 6.0$. The fillets samples were analyzed for final pH values at 24h post mortem (pH_{24}), color (L^* , a^* , b^*), water holding capacity (WHC), cooking loss (CL), shear force (SF), myofibrillar fragmentation index (MFI) an indirect evaluation of proteases activity and electron microscopy ultrastructural observation. pH_{24} values were lower ($p < 0.01$) in PSE group, however, no significant difference was found between pH_{24} and pH_{15} values in this group, indicating that all the glycogen had been consumed in the first hour after slaughter. PSE samples group presented higher L^* ($p < 0.01$), b^* ($p < 0.01$) and PPC ($p < 0.05$) values and lower WHC ($p < 0.01$) values, indicating the proteins denaturation occurred and consequently loss of their functional properties occurred. Furthermore the association of higher MFI ($p < 0.01$) and lower SF ($p < 0.05$) indicated the existence of higher proteolytic activity in the first 24h within the PSE group. It was found that MFI values were positively correlated to L^* ($p < 0.01$) and CL ($p < 0.05$) and negatively to WHC ($p < 0.01$) values, indicating that the higher the proteolysis the greater the loss of meat proteins functional properties. Lastly, the longitudinal section of PSE meat ultrastructural studies revealed the myofilaments depolymerization, the disorganization and a super contraction of sarcomere. This contraction draws some of the sarcomere components towards the Z- lines making them to be comparatively very dense. The protein denaturation and the loss of WHC possibly promoted the water movement from the myofibrillar to interfibrillar compartments then to the extracellular compartments and finally drip is formed on the meat surface giving the watery appearance. Therefore, we can state that occurs early activation of proteolytic enzymes in PSE meat chicken, affecting muscle fiber structure integrity and harming the functionality of the proteins of meat.

Keywords: PSE. Chicken fillet. Myofibrillar fragmentation. Proteases. Muscle ultrastructure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura hierárquica do músculo esquelético.....	20
Figura 2 –	Ultra-estrutura muscular.....	21
Figura 3 –	Esquema representativo do sarcômero e algumas de suas proteínas estruturais (nebulina, titana e desmina)	22
Figura 4 –	Esquema representativo da fibra muscular evidenciando o retículo sarcoplasmático e os túbulos T envolvendo as miofibrilas	23
Figura 5 –	Mecanismo proposto para indução de PSS, causado por anomalias nos canais liberadores de Ca^{2+} localizados no retículo sarcoplasmático.....	27
Figura 6 –	Esquema representativo das potenciais mudanças no diâmetro da célula muscular durante o período <i>postmortem</i> influenciado pela proteólise.....	33
Figura 7 –	Eletromicrografias de uma seção longitudinal de filés de frango Controle (A) e PSE (B) obtidas 1h30 <i>postmortem</i>	50
Figura 8 –	Eletromicrografias de uma seção longitudinal de filés de frango Controle (A) e PSE (B) obtidas 72h <i>postmortem</i>	51
Figura 9 –	Eletromicrografias de uma seção transversal de filés de frango controle (A) e PSE (B) obtidas 1h30 <i>postmortem</i>	53
Figura 10 –	Eletromicrografias de uma seção transversal de filés de frango controle (A) e PSE (B) obtidas 72h <i>postmortem</i>	54
Figura 11 –	Esquema representativo do provável mecanismo de relação entre a atividade das calpaínas e o prejuízo das propriedades funcionais da carne de frango PSE	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios de pH₁₅ (1h30), pH₂₄ (24h) e Cor (L*, a*, b*) dos filés de peito de frango dos grupos Controle e PSE.....42
- Tabela 2** – Valores médios de Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e Força de Cisalhamento (FC) dos filés de peito de frango dos grupos controle e PSE obtidos 24h *postmortem*.....44
- Tabela 3** – Valores médios de Capacidade de Retenção de Água (CRA) e Perdas de Peso por Cozimento (PPC) dos filés de peito de frango dos grupos controle e PSE obtidos 24h *postmortem*.....45
- Tabela 4** – Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos e físico-químicos de filés de peito de frango.....47

LISTA DE ABREVISTURAS E SIGLAS

a* – Componente vermelho - verde do sistema de cor CIELAB

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

b* – Componente amarelo - azul do sistema de cor CIELAB

CRA – Capacidade de retenção de água

FC – Força de cisalhamento

HM – Hipertermia maligna

L* – Luminosidade do sistema de cor CIELAB

MFI – Índice de fragmentação miofibrilar

N – Newton

pH₁₅ – pH medido 1h30 *postmortem*

pH₂₄ – pH medido 24h *postmortem*

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PPC – Perdas de peso por cozimento

PSE – Pale, Soft, Exudative

PSS – Porcine Stress Syndrome

USDA – United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE	17
3.1.1 Cor	17
3.1.2 Capacidade de Retenção de Água	18
3.1.3 Maciez	18
3.2 ULTRAESTRUTURA MUSCULAR	19
3.3 CONTRAÇÃO MUSCULAR <i>IN VIVO</i>	23
3.4 TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE	24
3.5 PSE E PSS EM SUÍNOS	26
3.6 PSE EM AVES	28
3.7 PROTEASES	30
3.8 PROTEASES NA CARNE PSE	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 MATÉRIA PRIMA	36
4.2 MÉTODOS	36
4.2.1 Classificação dos Filés de Frango em PSE e Controle	36
4.2.1.1 Medida de pH	36
4.2.1.2 Medida de cor	37
4.2.2 Atividade Proteolítica no Filé de Frango	37
4.2.2.1 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI)	37
4.2.2.2.1 Extração	37
4.2.2.2.2 Determinação de proteína solúvel	38
4.2.2.2.3 Medida do MFI	38
4.2.2.3 Força de cisalhamento	38
4.2.3 Propriedades Funcionais	39

4.2.3.1 Capacidade de retenção de água (CRA).....	39
4.2.3.2 Perda de peso por cozimento (PPC).....	39
4.2.4 Ultraestrutura dos Filés de Frango.....	40
4.2.4.1 Microscopia eletrônica.....	40
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS FILÉS DE FRANGO EM PSE E CONTROLE.....	42
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	43
5.3 EFEITO DO PSE SOBRE PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FILÉS DE FRANGO.....	45
5.4 CORRELAÇÕES ENTRE AS ANÁLISES E SUAS IMPLICAÇÕES.....	46
5.5 EFEITO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DO TEMPO SOBRE A ULTRAESTRUTURA DOS FILÉS DE FRANGO.....	48
5.5.1 Microscopia Eletrônica.....	48
6 DISCUSSÃO GERAL.....	55
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira alcançou nas últimas décadas níveis de produtividade e ajustes na organização e coordenação que a colocam como uma das mais competitivas no mercado global. Avanços tecnológicos e conhecimento científico permitiram melhorar significativamente os principais índices técnicos como a conversão alimentar, idade de abate e taxa de mortalidade das aves. Dados referentes ao ano de 2008 indicam que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango com 11,03 milhões de toneladas, o terceiro maior consumidor e o líder absoluto em exportações com 38,6% do mercado (USDA, 2009). Estes números confirmam a grande relevância do mercado de aves no cenário agropecuário tornando-se um dos propulsores da economia nacional.

O crescimento da demanda e as mudanças relacionadas aos padrões de consumo, como o aumento da comercialização de produtos processados ou em cortes, exigem que as indústrias processadoras de aves invistam na solução de problemas relacionados à qualidade da carne, que não eram temas de grande relevância quando as aves eram comercializadas apenas inteiras (BARBUT *et al.*, 2008).

Os aspectos relativos à qualidade da carne de frango são essenciais para a manutenção de suas propriedades funcionais adequadas e influenciam na decisão de compra e aceitação pelo consumidor. Estão relacionadas principalmente a sua capacidade de retenção de água (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005; GUARNIERI *et al.*, 2002), textura (BRESSAN; BERAQUET, 2002; CORÓ; YOUSSEF; SHIMOKOMAKI, 2002) e intensidade e homogeneidade da cor (FLETCHER, 1999; OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001; SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006). De acordo com Olivo, Fukushima e Shimokomaki (1998) e Le Bihan-Duval *et al.* (2008), todos estes fatores estão fortemente relacionados à velocidade da taxa de queda do pH *postmortem*.

Uma das grandes barreiras para a evolução da qualidade da carne de frango é a existência da anomalia designada PSE, cuja denominação tem origem do inglês Pale, Soft e Exudative, indicando características de palidez, flacidez e baixa capacidade de retenção de água. O PSE ocorre em face à rápida glicólise *postmortem*, que associada à elevada temperatura da carcaça promove

desnaturação protéica (WISMER-PEDERSEN, 1959; OLIVO *et al.*, 2001) comprometendo as propriedades funcionais da carne e limitando suas aplicações industriais (BARBUT *et al.*, 2008). Segundo Soares *et al.* (2003a), a incidência de carne de frango PSE, no Brasil, pode chegar a 22% e causar prejuízos de grande magnitude para a indústria processadora.

O grau de estresse pré-abate a que as aves são submetidas influi diretamente na geração de carnes PSE. Segundo Guarnieri *et al.* (2002) e Simões *et al.* (2009) fatores como a apanha nas granjas, o transporte e a recepção são decisivos para a garantia da qualidade final do produto. Entretanto, alterações também podem ocorrer após o abate, de acordo com técnicas de estimulação elétrica, resfriamento (chilling) e maturação (SAMS, 1999).

O sistema formado pelas enzimas proteolíticas cálcio-dependentes u-calpaína e m-calpaína, e pela calpastatina, uma proteína que age como inibidor destas enzimas, é o principal responsável pela proteólise, que provoca a degradação de proteínas miofibrilares do músculo esquelético e conduz ao processo de maturação (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

O aumento do influxo de cálcio no músculo PSE resulta em ativação precoce da u-calpaína (CLAYES *et al.*, 2001), causando degradação de algumas proteínas miofibrilares, como desmina e troponina T (O'HALLORAN *et al.*, 1997; ROWE *et al.*, 2001a; MELODY *et al.*, 2004). No entanto, o rápido declínio do pH sob altas temperaturas e o excesso de cálcio causam autólise precoce destas enzimas proteolíticas, reduzindo sua atividade sobre as proteínas miofibrilares e influenciando negativamente suas propriedades funcionais no prolongamento do período *postmortem* (BOLES *et al.*, 1992; BEE *et al.*, 2007).

Sendo assim, a ativação precoce do sistema calpaína na carne PSE seguida de sua autólise poderia ser responsável tanto pela exsudação como pela menor maciez observada nesta carne no prolongamento do período *postmortem*. Portanto, torna-se importante estabelecer uma ligação entre o rápido declínio de pH e a atuação das enzimas proteolíticas e verificar as conseqüências para as propriedades funcionais da carne de frango PSE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade proteolítica nos filés de frango PSE e suas conseqüências para a qualidade da carne.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer correlações entre a atividade proteolítica no filé de frango PSE e suas propriedades funcionais.

Avaliar as alterações provocadas pelas enzimas proteolíticas na ultraestrutura muscular do filé de frango PSE.

Investigar o impacto da queda brusca de pH observada no filé de frango PSE sobre a atuação das enzimas proteolíticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE

3.1.1 Cor

Segundo Allen *et al.* (1998), a cor afeta diretamente a aparência da carne tornando-se um atributo crítico na avaliação inicial da qualidade pelo consumidor e influencia sua decisão de compra. A percepção visual precede a apreciação das características de odor, sabor e textura e, assim, quando a variação da cor da carne é maior do que a esperada, normalmente o produto é rejeitado pelo consumidor (FLETCHER; QIAO; SMITH, 2000; QIAO *et al.*, 2001).

A cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da luz pela mioglobina e por outros importantes componentes presentes, como as fibras musculares e suas proteínas, bem como pela quantidade de líquido livre presente (OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001; SWATLAND, 2008). Segundo os autores, quanto maior o grau de desnaturação protéica, menos luz é transmitida através das fibras e mais luz acaba sendo dispersa, resultando na palidez da carne.

Os parâmetros utilizados para avaliação da cor da carne segundo o Sistema CIELab consistem em luminosidade (L^*), teor de vermelho (a^*) e teor de amarelo (b^*). O valor L^* representa o parâmetro luminosidade no eixo perpendicular e varia de zero a 100, sendo zero o preto e 100 o branco. O valor a^* representa a faixa de cor no eixo horizontal, variando do verde para o vermelho. O valor b^* é o eixo vertical e varia do azul para o amarelo.

L^* é o principal parâmetro utilizado para determinação da cor da carne de frango. Segundo Olivo, Guarnieri e Shimokomaki (2001), para carne de frango e peru, a faixa ideal de luminosidade deve estar em torno do valor 50.

3.1.2 Capacidade de Retenção de Água

A capacidade de reter água é uma importante propriedade funcional da carne fresca, pois influencia seu aspecto, sua palatabilidade e interfere diretamente na qualidade de produtos processados (BARBUT, 1997a; MELODY *et al.*, 2004). A perda de água incorre em prejuízos econômicos para a indústria, em decorrência da perda de peso, e do valor nutritivo para o consumidor, devido a quantidade significativa de proteína que é carregada junto com a água (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

A maior parte da água no músculo está presente nas miofibrilas, nos espaços entre os filamentos grossos de miosina e os filamentos finos de actina (LAWRIE, 2005) e é mantida entre estes filamentos por forças capilares (OFFER; TRINICK, 1983).

De acordo com Huff-Lonergan e Lonergan (2005), o mecanismo da capacidade de retenção de água está centrado nas proteínas e estruturas que ligam e imobilizam a água, especialmente as proteínas miofibrilares. Segundo os mesmos autores existem evidências que demonstram haver um efeito direto do pH, da força iônica e da oxidação na capacidade das proteínas miofibrilares, das miofibrilas e das células musculares em reter água. Um rápido declínio de pH associado à alta temperatura do músculo, como ocorre no PSE, leva a desnaturação das proteínas miofibrilares resultando em severa queda da capacidade destas estruturas de reter água (WISMER-PEDERSEN, 1959).

Os métodos de referência para determinar a capacidade de retenção de água da carne consistem nas perdas de água por exsudação da carne crua e as perdas de água durante o cozimento (HONIKEL, 1998).

3.1.3 Maciez

A maciez é o principal atributo de qualidade que influencia a satisfação do consumidor em relação à palatabilidade da carne. Miller *et al.* (2001) demonstraram que o consumidor é capaz de discernir variações de maciez na carne e está disposto a pagar mais por carnes que apresentem melhores características.

O grau de maciez pode ser relacionado a 3 categorias de proteínas do músculo; do tecido conjuntivo, do sarcoplasma e da miofibrila, e a importância de sua relativa contribuição depende de circunstâncias como o grau de contração das miofibrilas, o tipo de músculo e a temperatura de cozimento (LAWRIE, 2005). As proteínas que compõem o tecido conjuntivo, principalmente colágeno e elastina, formam uma complexa rede entre as fibras musculares e são importantes para a textura da carne (SWATLAND, 1994). Coro *et al.* (2002) encontraram uma correlação positiva entre a idade de abate dos animais e o número de ligações cruzadas termoestáveis (piridinolina) de colágeno, responsáveis pelo aumento da dureza da carne com o avanço da idade dos animais. As proteínas sarcoplasmáticas (enzimas glicolíticas, creatina quinase e mioglobina) são solúveis em água e contribuem pouco para a textura da carne (LAWRIE, 2005). De acordo com Koochmaraie e Geesink (2006) o enfraquecimento da estrutura miofibrilar decorrente da degradação *postmortem* de proteínas miofibrilares é o principal fator contribuinte para a tenderização da carne. Segundo Robson *et al.* (1997), as proteínas envolvidas neste processo são miofibrilares e citoesqueléticas e incluem: troponina T, desmina, vinculina, meta-vinculina, distrofina, nebulina e titana. A atividade da enzima endógena u-calpaína é apontada como a principal responsável pela degradação de proteínas miofibrilares que determinam a variação da maciez da carne (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

Entre os métodos utilizados para determinar a maciez da carne, destacam-se a força de cisalhamento (BRATZLER, 1949) e o índice de fragmentação miofibrilar (MFI). Os valores de MFI são baseados na quantidade de refração de luz que ocorre na suspensão de miofibrilas. Quando os valores aumentam existe um correspondente aumento do número de partículas em decorrência da fragmentação da estrutura miofibrilar pela atuação de enzimas proteolíticas (VEERAMUTHU; SAMS, 1999).

3.2 ULTRAESTRUTURA MUSCULAR

O músculo esquelético possui uma estrutura hierárquica (Figura 1). Em nível macroscópico, consiste de feixes (fascículos) de fibras celulares alongadas multinucleadas (miofibras) que contribuem para o aspecto estriado do músculo

esquelético. O sarcoplasma das fibras musculares contém organelas específicas e feixes de miofibrilas, que são compostas de proteínas miofilamentosas. As fibras musculares estão envoltas em tecido conjuntivo de revestimento denominado endomísio, enquanto os fascículos são revestidos pelo perimísio e o músculo como um todo pelo epimísio (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

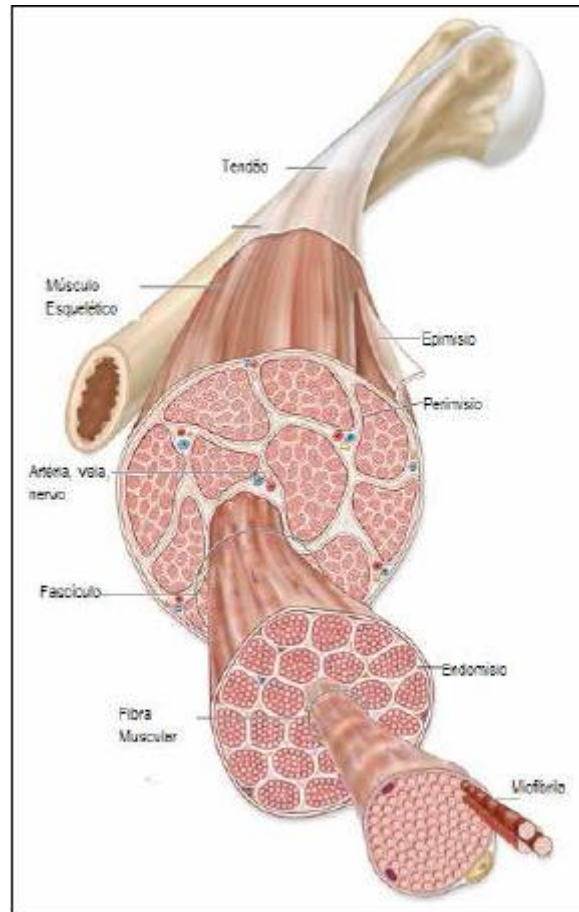


Figura 1 – Estrutura hierárquica do músculo esquelético (Adaptado de HERBRANDSON, 2008)

As miofibrilas possuem uma estrutura periódica (Figura 2), alternando regiões de coloração escura e clara, conhecidas como bandas A e I, respectivamente. No centro da banda I está localizada a linha Z, de coloração mais escura, enquanto no centro da banda A existe a banda H, de coloração mais clara com uma linha M central (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

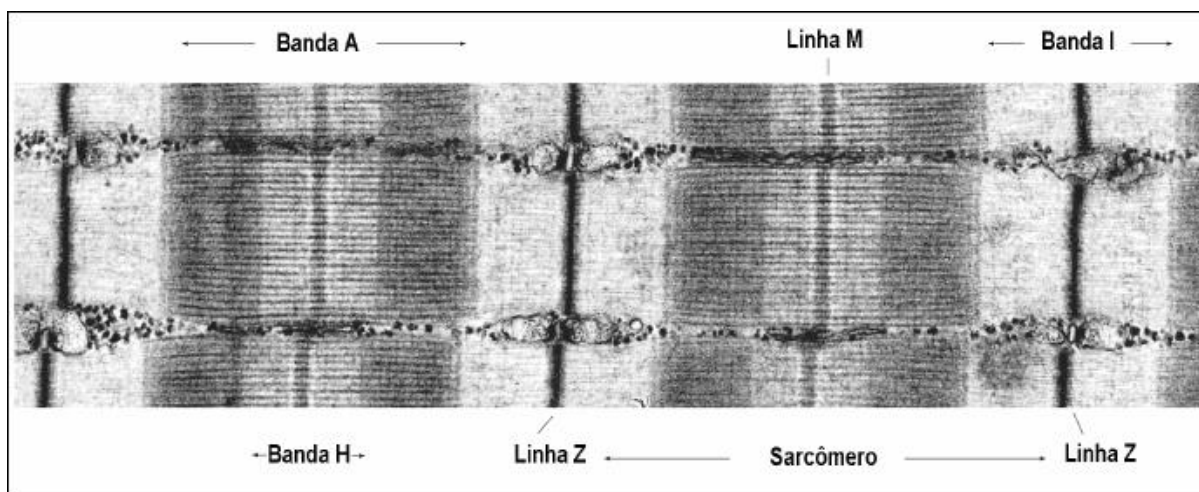


Figura 2 – Ultraestrutura muscular (Adaptado de CRAIG, 2008).

Os miofilamentos são compostos primariamente de duas proteínas filamentosas, a miosina e a actina. Os filamentos grossos de miosina são os principais componentes da banda A e são formados por outras proteínas como a C, M, I e F. Os filamentos finos de actina originam a linha Z, formam exclusivamente a banda I e se estendem para a banda A entre os filamentos grossos de miosina. Cada filamento fino de actina é formado por dois filamentos de actina fibrosa (actina F), dispostos em dupla hélice. Uma proteína fibrosa, a tropomiosina, ocupa o espaço entre a actina F, enquanto a troponina, uma proteína globular, ocupa um sítio específico a cada meia volta da hélice. A troponina e a tropomiosina são proteínas reguladoras do mecanismo de contração. Nas linhas Z estão localizadas diversas outras proteínas: a-actinina, desmina, filamina, vimetina e sinemina. A nebulina é encontrada na região da banda I e a titana está distribuída ao longo dos filamentos grossos e finos (LAWRIE, 2005; BANKS, 1991). As ligações entre as miofibrilas e o sarcolema são compostas por estruturas filamentosas denominadas costâmeros, que contêm as proteínas integrina, vinculina e talina, entre outras (TAYLOR *et al.*, 1995). A função destas proteínas é manter a integridade estrutural das miofibrilas e sua degradação por meio de sistemas proteolíticos irá causar enfraquecimento da miofibrila e conseqüente amaciamento da carne (SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006).

A unidade estrutural repetitiva da miofibrila onde os eventos morfológicos do ciclo de contração e relaxamento do músculo ocorrem é o sarcômero (Figura 3), que é definido como o segmento entre duas linhas Z sucessivas, incluindo, portanto, uma banda A e duas metades de bandas I. Os

comprimentos do sarcômero e da banda I variam de acordo com o estado de contração do músculo, enquanto a banda A permanece constante (JUDGE *et al.*, 1989).

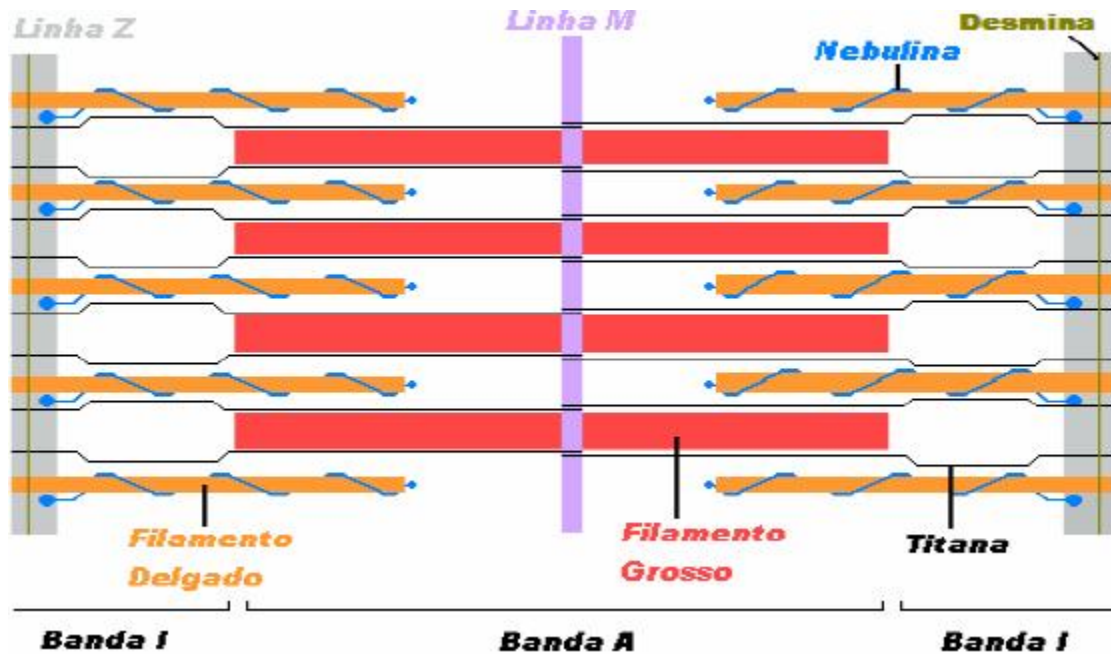


Figura 3 – Esquema representativo do sarcômero e algumas de suas proteínas estruturais: nebulina, titana e desmina (Adaptado de SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006).

Segundo Dubowitz e Brooke (1984), três tipos de fibras podem ser identificadas nas musculaturas das aves: tipo I - contração lenta e oxidativa; tipo IIa - contração rápida, oxidativa e glicolítica; e tipo IIb - contração rápida e glicolítica. As fibras do tipo I, ou vermelhas, são pequenas, resistentes à fadiga e possuem numerosas mitocôndrias e o pigmento mioglobina, que serve para o armazenamento e transporte de oxigênio no interior da fibra e lhes confere a cor vermelha. As fibras do tipo II, ou brancas, são células musculares grandes que possuem pequena quantidade de mioglobina e de mitocôndrias. As fibras do tipo IIa são resistentes à fadiga, enquanto as fibras IIb são facilmente fatigáveis, com grande acúmulo de ácido láctico. As fibras aeróbicas, por estarem associadas a processo contínuo de produção e consumo de energia, têm elevada troca de metabólitos e de oxigênio, apresentando pequena área. Já as fibras anaeróbicas, com reduzida taxa de trocas metabólicas e de oxigênio, apresentam maior área e, portanto, maior processo de hipertrofia (BANKS, 1991).

3.3 CONTRAÇÃO MUSCULAR *IN VIVO*

As miofibrilas encontram-se envelopados em uma membrana estrutural especializada denominada retículo sarcoplasmático (RS). O RS é rico em uma Ca^{2+} -ATPase, que bombeia o Ca^{2+} para o seu interior, mantendo o Ca^{2+} citosólico na célula muscular em concentrações submicromolares. Em contato íntimo com o RS estão os túbulos transversais (túbulos T), que são originados de invaginações do sarcolema ao redor das miofibrilas nas linhas Z (Figura 4) (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

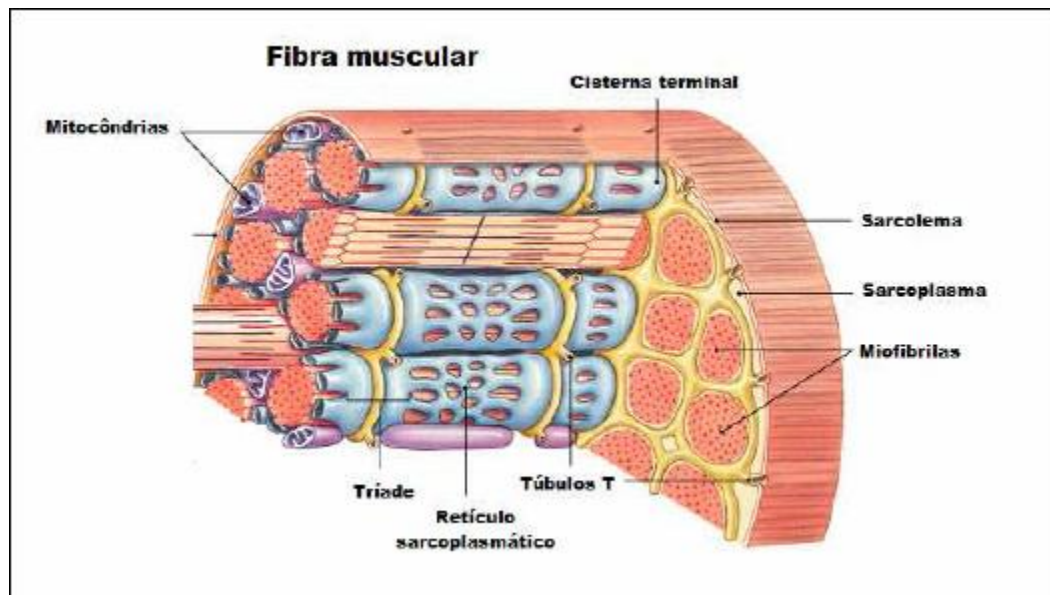


Figura 4 – Esquema representativo da fibra muscular evidenciando o retículo sarcoplasmático e os túbulos T envolvendo as miofibrilas (Adaptado de McNAIR, 2008).

Durante a contração muscular, as células da miofibrila respondem a um estímulo nervoso através da placa motora terminal, que é transmitida ao RS, produzindo a abertura dependente de voltagem dos canais de Ca^{2+} . A rede de túbulos T assegura a transmissão do impulso nervoso despolarizante para regiões terminais do RS. O Ca^{2+} é liberado do RS e sua concentração no citoplasma muscular aumenta em até 100 vezes, iniciando a contração muscular e hidrólise de ATP (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

O cálcio liga-se à troponina C no filamento delgado inativando o sistema troponina-tropomiosina e expondo os sítios de ligação para a miosina. Em consequência ocorre a reação entre actina e miosina que resulta na contração muscular. Durante esta fase de contração, os filamentos de actina deslizam ao longo dos filamentos de miosina por meio de uma série de interações rápidas entre os filamentos e o comprimento do sarcômero diminui. A energia utilizada para o processo de deslizamento é derivada da desfosforilação do ATP em ADP. O complexo actomiosina transforma a energia química do ATP na ação mecânica do músculo. Quando finaliza o estímulo nervoso, os íons Ca^{2+} são transportados novamente para o retículo sarcoplasmático através da bomba de cálcio, que também requer energia na forma de ATP (PEARSON; YOUNG, 1992).

A primeira fonte de energia utilizada pelo organismo para reconstituir o ATP utilizado na contração muscular é um composto altamente energético denominado fosfocreatina. A fosfocreatina é clivada pela creatina quinase e a energia liberada provoca a ligação do fosfato ao ADP para formar o ATP. Quando a atividade muscular continua e a fosfocreatina é exaurida, o organismo passa a utilizar o glicogênio previamente armazenado e, em um processo denominado glicólise, gera energia para converter ADP em ATP. A última fonte de energia, utilizada em atividades de longa duração, é proveniente do metabolismo oxidativo, onde a energia é originada da combinação de oxigênio com carboidratos, gorduras e proteínas (PEARSON; YOUNG, 1992).

3.4 TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE

O processo de conversão do músculo em carne envolve modificações metabólicas, físicas e estruturais (KUBOTA; OLIVO; SHIMOKOMAKI, 1993).

Com a morte e, por consequência, com a falência do fluxo sangüíneo, o aporte de oxigênio e o controle nervoso deixam de chegar à musculatura. O nível de ATP é mantido por conversão do ADP a ATP (fosfocreatina + ADP creatina + ATP), mas quando a fosfocreatina é exaurida, seguida pelas reservas de glicogênio e outros carboidratos, o ATP, rico em energia, é esgotado.

Quando acabam as reservas de ATP celular, o músculo não consegue mais relaxar (*rigor mortis*) e a concentração de cálcio no citoplasma permanece alta. A glicólise *postmortem* ocorre em um ambiente celular anaeróbico, onde o glicogênio é transformado em ácido pirúvico e este é convertido em ácido láctico, que se acumula no interior das células (PEARSON; YOUNG, 1992; LAWRIE 2005). Como resultado, os prótons que são produzidos durante a glicólise e durante a hidrólise de ATP a ADP causam diminuição significativa do pH intracelular (BATE-SMITH; BENDALL, 1949).

Imediatamente após a morte do animal, com temperatura entre 38-40°C, sem estímulo nervoso e com uma quantidade suficiente de ATP presente, os íons Ca^{2+} são ativamente transportados para o retículo sarcoplasmático pelo sistema bomba de cálcio-ATP. As mitocôndrias também armazenam cálcio no músculo vivo, que é proveniente do sarcoplasma em presença de oxigênio. Com a queda do pH, ATP, temperatura e ausência de oxigênio, as mitocôndrias liberam cálcio para o sarcoplasma ao mesmo tempo em que a atividade da bomba de cálcio diminui. A concentração de cálcio nas miofibrilas aumenta dando início ao processo de contração, similar à estimulação nervosa que induz a contração do músculo vivo. Na contração muscular *postmortem* enquanto a reserva energética na forma de ATP for suficiente, os miofilamentos mantêm-se móveis e por esta razão o músculo é elástico. Quando o nível de ATP reduz, ou seja, diminui a energia para o processo de deslizamento dos miofilamentos, começa a formação de enlaces ou pontes permanentes entre actina e miosina, o músculo perde a elasticidade e entra em *rigor mortis* (SWATLAND, 1994).

Após o estabelecimento do *rigor mortis* começa o processo de resolução do rigor (maturação da carne). A resolução do rigor é caracterizada pelo amaciamento progressivo da carne pela ação de enzimas que hidrolisam as proteínas musculares, provocando o desprendimento dos filamentos de actina da linha Z. As principais mudanças que ocorrem nas células durante a resolução do rigor são: degradação da linha Z, desaparecimento da troponina T e degradação das proteínas estruturais desmina, titana e nebulina. A lise destas proteínas provoca o enfraquecimento da linha Z (KOOHMARAIE, 1988; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

3.5 PSE E PSS EM SUÍNOS

O termo PSE tem origem nas iniciais das palavras inglesas pale, soft e exudative, que significam carne com características pálida, flácida e exudativa. A carne PSE apresenta suas propriedades funcionais comprometidas face à rápida glicólise *postmortem* (WISMER-PEDERSEN, 1959), a qual acelera a queda de pH muscular enquanto a temperatura da carcaça ainda está alta (BARBUT, 2008, 1997a, 1997b). A combinação destas duas variáveis pode levar à desnaturação de proteínas musculares acarretando em perda de sua funcionalidade e capacidade de reter a água (FERNANDEZ *et al.*, 2002; MOLETTE; RÉMIGNON; BABILE, 2003). Segundo Sosnicki *et al.* (1998), a condição PSE poderá ser encontrada quando o pH da carne estiver abaixo de 5,8 e sua temperatura maior que 35°C.

Durante a contração muscular, um receptor rianodina mutante provoca a manutenção do canal aberto, permitindo um maior influxo de cálcio dentro do sarcoplasma (MICKELSON; LOUIS, 1993). Essa mutação consiste na substituição de uma timina por uma citosina 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 (FUJI *et al.*, 1991).

Devido à manutenção do canal no estado aberto (Figura 5), torna-se difícil a remoção do cálcio do sarcoplasma para permitir o relaxamento do músculo, permanecendo, assim, em contínua contração e resultando em um aumento do metabolismo muscular, da temperatura corporal e do acúmulo de ácido láctico. Sendo assim, a rápida elevação da temperatura corpórea apresentada pelos suínos susceptíveis aos estressores naturais, resulta em uma síndrome aguda e fatal conhecida como PSS, do inglês *Porcine Stress Syndrome* ou Hipertermia Maligna (MACLENNAN; PHILLIPS, 1992). O gene halotano é o responsável pelo receptor de rianodina defeituoso e recebe este nome em decorrência da sensibilidade dos suínos portadores do gene defeituoso ao gás anestésico halotano (HALL; LUCKE; LISTER, 1980; HARRISON, 1979). Em decorrência desta associação, o halotano tem sido usado como ferramenta para identificar os animais susceptíveis ao estresse e que possuem tendência a desenvolver carne PSE.

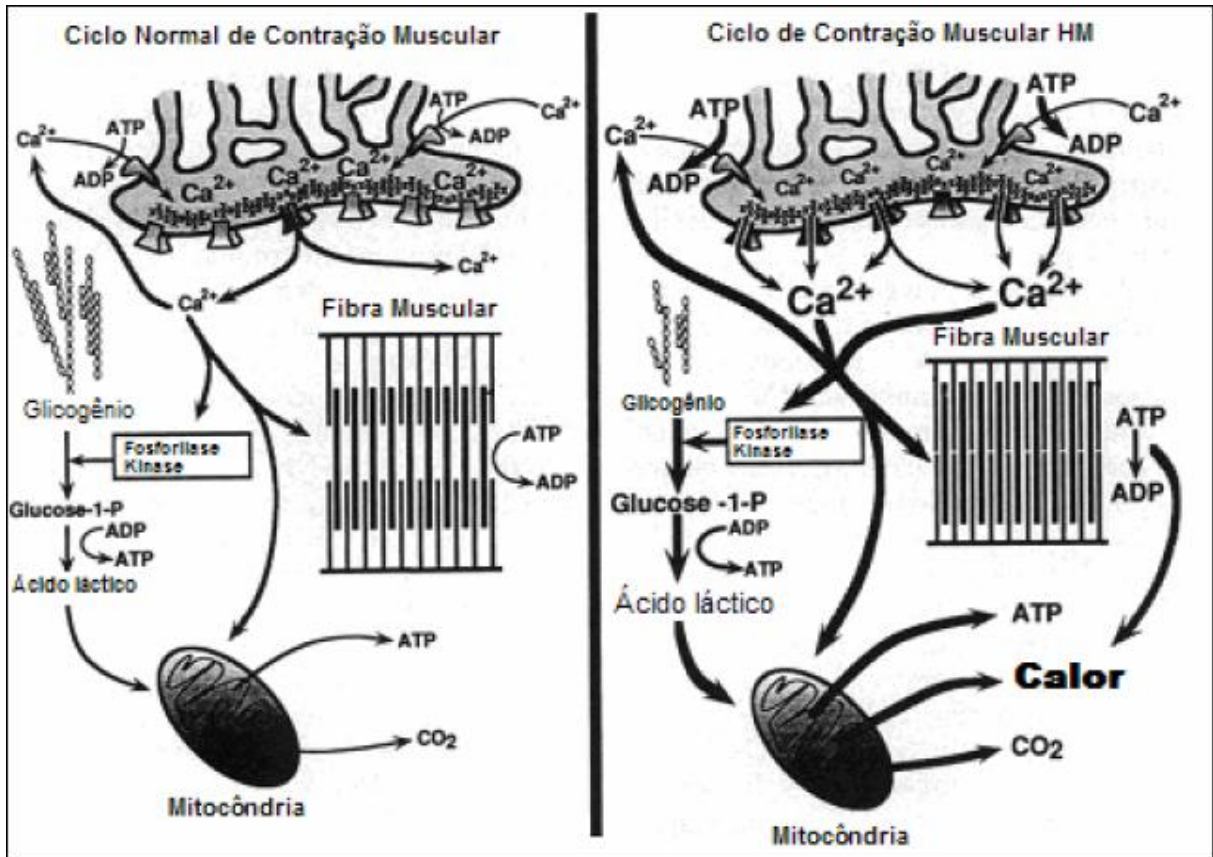


Figura 5 – Mecanismo proposto para indução de PSS, causado por anomalias nos canais liberadores de íons Ca^{2+} localizados no retículo sarcoplasmático (RS). Em um ciclo normal de contração-relaxamento (esquerda), o Ca^{2+} é bombeado para dentro do RS por uma ATPase para iniciar o relaxamento e liberado através dos canais de Ca^{2+} para iniciar uma nova contração. Estes canais são regulados pela concentração do próprio Ca^{2+} , pelo ATP e Mg^{2+} , e quando estimulados permanecem abertos por pouco tempo. Na condição anormal de PSS (direita), os canais liberadores de Ca^{2+} são sensíveis a baixas concentrações dos reguladores, ficando abertos por longos períodos e aumentando as taxas de Ca^{2+} no sarcoplasma. A contração muscular é mantida, gerando rigidez muscular, e o metabolismo glicolítico e aeróbio são aumentados, gerando ácido láctico, CO_2 e calor. Ocorre injúria nas membranas celulares e problemas sistêmicos típicos de PSS. HM= Hipertermia Maligna (Adaptado de MACLENNAN; PHILLIPS, 1992).

A taxa de glicólise *postmortem* e a taxa de liberação de cálcio das mitocôndrias do músculo *Longissimus dorsi* estão bem correlacionadas com o teste do halotano, que identifica a susceptibilidade ao desenvolvimento da síndrome do estresse suíno. Os suínos sensíveis ao halotano possuem níveis de cálcio sarcoplasmático consideravelmente maiores em relação aos suínos insensíveis, evidenciando que o excesso de cálcio no sarcoplasma está intimamente associado à formação de carne PSE (CHEAH *et al.*, 1984).

É provável que a fosfolipase A2 (PLA2) mitocondrial ativada por Ca^{2+} desempenhe um papel central na série de eventos bioquímicos na hipertermia maligna em suínos e fundamentais na formação das condições PSE associada à carne de animais susceptíveis ao estresse. Ácidos graxos liberados das mitocôndrias pela PLA2 em suínos com tendência a hipertermia maligna induziriam a liberação de mais Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático aumentando assim o nível de Ca^{2+} no sarcoplasma, que levaria a uma perda de controle da glicólise (CHEAH; CHEAH, 1981). Soares *et al.* (2003b) avaliaram a relação entre a atividade da enzima PLA2 e o desenvolvimento de carne PSE em frangos e constataram que a PLA2 desempenha um importante papel para a ocorrência dos sintomas do PSE, tendo sua atividade aumentada conforme o avanço na idade das aves.

3.6 PSE EM AVES

Froning, Babji, Mather (1978) foram os pioneiros a descrever a condição PSE em aves, no entanto, os mecanismos fundamentais deste fenômeno em frangos ainda não estão totalmente elucidados (LE BIHAN-DUVAL *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de carnes PSE em aves apresenta características semelhantes ao de suínos (SOLOMON; VAN LAACK; EASTRIDGE, 1998; SOSNICKI *et al.*, 1998), no entanto, diferentemente do que ocorre nos suínos, ainda não foi comprovada uma relação entre as linhagens de frango e a condição PSE.

A participação da proteína receptora de cálcio, os receptores rianodina, na ocorrência da carne PSE em aves ainda não está estabelecida, mas sua existência foi constatada em perus e frangos (WANG *et al.*, 1999). Owens *et al.* (2000a) reportaram que aproximadamente 3,5% de perus expostos ao halotano apresentaram sinais de rigidez muscular nos membros inferiores enquanto em outros estudos foram observadas respostas na faixa de 2 a 15% (WHEELER *et al.*, 1999) e 10% (OWENS *et al.*, 2000b). No entanto o teste do gás halotano em perus não tem sido eficiente para classificar as aves como normais e susceptíveis ao PSE (OWENS *et al.*, 2000b; WHEELER *et al.*, 1999).

O PSE em aves resulta em carnes com elevada perda de exsudato e conseqüente fabricação de produtos processados com baixas características de qualidade. Sua determinação em carnes de aves tem sido realizada pela combinação das análises de pH e cor nos músculos do peito (SWATLAND, 1995; OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001). A palidez da carne está diretamente relacionada com a desnaturação protéica causada pelo baixo pH (SWATLAND, 1993). Woefel *et al.* (2002) constatou que grande parte da carne de frango processada comercialmente e que apresenta características de palidez tem potencial para possuir uma menor capacidade de retenção de água.

A carne identificada como PSE pode ser usada em produtos que não exigem alta capacidade de retenção de água, como cortes inteiros, ou misturada com outras carnes para amenizar o efeito desta baixa capacidade de retenção de água. Não selecionar a carne, especialmente em produtos de músculo inteiro, pode resultar em baixos índices de produtividade e aumento nas perdas após cozimento (BARBUT *et al.*, 2008).

Um dos principais fatores que influenciam a qualidade dos produtos cárneos está relacionado ao estresse das aves nas horas em que antecedem o abate, onde práticas de manejo adequadas são decisivas para as etapas posteriores de processamento. As condições de manejo pré-abate as quais as aves são submetidas, como apanha, transporte, temperatura e umidade relativa do ambiente, são fatores que conduzem ao estresse, influenciando na qualidade da carne e aumentando a incidência de carnes PSE (SAMS, 1999; SIMÕES *et al.*, 2009). Aves submetidas a estresse pré-abate consomem rapidamente suas reservas de glicogênio *postmortem* resultando em um acúmulo de ácido láctico no músculo com conseqüente queda brusca de pH (VAN LAACK *et al.*, 2000). De acordo com McKee e Sams (1997) o estresse térmico acelera o metabolismo *postmortem* e as mudanças bioquímicas no músculo, gerando carnes PSE em perus. Aksit *et al.* (2006) demonstraram que altas temperaturas durante o encaixotamento de frangos também afetam negativamente a qualidade da carne. Guarnieri *et al.* (2004) constataram por meio de análise bioquímicas e ultraestruturais que a utilização da nebulização de água nas aves pouco antes do abate previne o desenvolvimento de carne PSE. Simões *et al.* (2009) concluíram que a temperatura ambiental durante o transporte também influencia na formação de carnes PSE.

3.7 PROTEASES

Três sistemas proteolíticos presentes no músculo têm sido investigados por sua possível participação na proteólise e tenderização *postmortem*: o sistema calpaína, as catepsinas lisossômicas e o complexo multicatalítico de proteases (proteasoma) (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

Além de serem endógenas no músculo esquelético, estes sistemas proteolíticos precisam ter acesso aos substratos e, finalmente, serem capaz de reproduzir o padrão proteolítico *postmortem* observado no armazenamento da carne (GOLL *et al.*, 1983; KOOHMARAIE, 1988). Um papel significativo do proteasoma pode ser excluído, já que as miofibrilas são pobres substratos para este sistema proteolítico (KOOHMARAIE, 1992a). A incubação de proteínas miofibrilares com catepsinas resulta em diferentes padrões de degradação em relação àqueles que ocorrem durante o armazenamento *postmortem* do músculo, como a quebra da junção da banda I com a linha Z. Além disto, é duvidoso que as catepsinas sejam liberadas dos lisossomos no músculo *postmortem* (KOOHMARAIE, 1988). Sendo assim, o sistema calpaína é o sistema proteolítico responsável pela proteólise *postmortem* de proteínas miofibrilares que resultam no amaciamento da carne (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

As calpaínas desempenham diversas funções nas células, incluindo participação no ciclo mitótico e crescimento celular, modificações proteolíticas de moléculas, regulação de expressões gênicas, regulação da proliferação celular e degradação de substratos durante a apoptose (GOLL *et al.*, 2003). Estudos de imunolocalização têm mostrado que as calpaínas possuem localização exclusivamente intracelular. No músculo esquelético normal a maioria das calpaínas e da calpastatina está localizada sobre ou próximo à linha Z, com pequenas quantidades na banda I e muito pouco na área da banda A (KUMAMOTO *et al.*, 1992). Estudos sugerem que em resposta a algum sinal da célula, possivelmente fluxo de íons Ca^{2+} , as calpaínas se realocam de uma distribuição dispersa, para uma localização preferencial na periferia da célula (SAIDO *et al.*, 1993; GIL-PARRADO *et al.*, 2003). Kumamoto *et al.* (1992) sugerem que uma porção substancial das calpaínas não está livre no citoplasma, mas sim associadas às subestruturas celulares, como as miofibrilas.

O sistema calpaína é composto de proteases ativadas pelo cálcio com atividade ótima em pH neutro. No músculo esquelético, o sistema calpaína consiste de pelo menos três proteases: u-calpaína (calpaína 1), m-calpaína (calpaína 2) e calpaína músculo-específica ou p94 (calpaína 3); e um inibidor da u- e m-calpaína, a calpastatina (GOLL *et al.*, 2003).

Ambas u- e m-calpaína são compostas de duas sub-unidades com massa molar de 28 e 80 kDa (DAYTON *et al.*, 1976; EMORY *et al.*, 1986). Uma importante característica da u- e m-calpaína é que elas sofrem autólise na presença de cálcio, o que as transformam em moléculas consideravelmente menos estáveis. A autólise reduz a necessidade de cálcio para a ativação da u- e m-calpaína e pode ser usada como indicador da atividade proteolítica na célula (DAYTON, 1982; GOLL *et al.*, 2003). As calpaínas são cataliticamente inativas na ausência de Ca^{2+} pois os 3 resíduos que constituem a tríade catalítica (cisteína, histidina e asparagina) não estão suficientemente perto para tornarem-se um sítio ativo (GOLL *et al.*, 2003). A autólise da u-calpaína reduz a necessidade de cálcio para sua atividade de cerca de 3,0 a 50 μM (pré-autólise) para 0,5 a 2,0 μM (GOLL *et al.*, 1995), reduzindo a necessidade por íons Ca^{2+} para próximo da faixa fisiológica (ZIMMERMAN; SCHLAEPFER, 1991). A autólise inicial da sub-unidade maior da u-calpaína produz um fragmento de 78 kDa seguido por um fragmento de 76 kDa (INOMATA *et al.*, 1988). A autólise inicial da sub-unidade maior da m-calpaína produz um fragmento de 78 kDa (BROWN; CRAWFORD, 1993). Conseqüentes autólises da u- e m-calpaína levam a fragmentos de menor massa molar e perda de atividade. As isoformas da calpaína têm a característica de se degradarem quando são ativadas (KOOHMARAIE; CROUSE; MERSMAN, 1989; KOOHMARAIE; WHIPPLE; CROUSE, 1990). Em aves, o processo de proteólise *postmortem* é pouco documentado. Segundo Sorimachi *et al.* (1995), no músculo *Pectoralis major* de frango, a forma homóloga a m-calpaína não é traduzida e, em seu lugar, existiria a u/m-calpaína, uma forma de calpaína sensível a concentrações de cálcio intermediárias entre a m-calpaína e a u-calpaína dos mamíferos. A u/m-calpaína encontrada no frango é mais sensível ao cálcio que as calpaínas dos mamíferos podendo desempenhar uma função importante no processo *postmortem*, o que explicaria a rapidez deste processo nas aves (LEE *et al.*, 2008).

A calpaína p94 é um polipeptídeo de 94 kDa com seqüência homóloga às grandes subunidades da u- e m-calpaína (SORIMACHI; ISHIURA;

SUZUKI, 1989). Sua purificação e caracterização têm sido extremamente difíceis, pois se encontra associada com a titana (SORIMACHI *et al.*, 1995) e sua expressão *in vitro* é dificultada pela sua rápida autólise em níveis fisiológicos de cálcio, além de sua autólise não ser inibida por inibidores da calpaína (SORIMACHI *et al.*, 1993).

A calpastatina é o inibidor endógeno específico da u- e m-calpaína (MAKI *et al.*, 1988) e requer cálcio para se ligar e inibir as calpaínas (COTTIN; VIDALENC; DUCASTAING, 1981; IMAJOH; SUZUKI, 1985). É resistente a agentes desnaturantes (GOLL *et al.*, 2003), mas pode se tornar um substrato para as calpaínas e ser degradada na presença de cálcio (DOUMIT; KOOHMARAIE, 1999). A degradação da calpastatina não leva a uma completa perda da atividade inibitória, e mesmo após extensa proteólise, alguma atividade inibitória persiste (NAKAMURA *et al.*, 1989).

Resultados recentes têm reforçado a hipótese de que a u-calpaína desempenha um papel crucial no processo de tenderização *postmortem*. Sua atividade nestas condições *in vitro* e *in situ* tem sido confirmada. Evidências disponíveis indicam que a m-calpaína não está envolvida no processo de tenderização *postmortem*, a menos que os níveis de cálcio no músculo sejam artificialmente aumentados. O papel da calpaína p94 no processo de tenderização permanece para ser determinado (GEESINK *et al.*, 2000).

A ativação da u-calpaína ocorre no início do período *postmortem* antes do pH cair para cerca de 6,1, sendo isto demonstrado pela proteólise. O desenvolvimento do rigor e o encurtamento das fibras se opõem à proteólise inicial, mas na fase posterior, o *post rigor*, o efeito cumulativo da proteólise reverte o aumento da dureza proporcionada pelo *rigor mortis* e a tenderização irá acontecer (HOPKINS; THOMPSON, 2002). A atividade da u-calpaína no músculo *postmortem* é regulada principalmente pela alteração na concentração de Ca^{2+} requerida para atividade, pela calpastatina e provavelmente pela localização intracelular (GOLL *et al.*, 2003), mas também pode ser afetada pela taxa de queda do pH, temperatura, força iônica e oxidação (GEESINK *et al.*, 1992; MADDOCK-CARLIN *et al.*, 2006). A interação destes fatores determina a taxa e extensão da proteólise *postmortem* (VEERAMUTHU; SAMS, 1999).

Muitas proteínas envolvidas na tenderização e na perda de água são substratos para a enzima u-calpaína (HUFF-LONERGAN *et al.*, 1996). As calpaínas não degradam as duas principais proteínas miofibrilares, actina e miosina, mas

causam remoção da linha Z e liberam actinina não degradada (GOLL *et al.*, 1991b). A u-calpaína degrada importantes proteínas constituintes das estruturas miofibrilares e costaméricas, entre elas desmina, troponina T, titana, nebulina, integrina, talina e vinculina, conduzindo a um enfraquecimento da miofibrila com conseqüente amaciamento (GOLL *et al.*, 1991a; DELGADO *et al.*, 2001).

Pesquisas têm sugerido que a degradação de proteínas musculares não apenas determina a maciez da carne, mas também pode afetar sua capacidade de reter água. Uma redução na degradação das proteínas que ligam a miofibrila à membrana celular (Figura 6), como a desmina, durante a conversão do músculo em carne, pode permitir que o encurtamento da miofibrila seja transmitido para toda célula muscular. Este encurtamento reduz o diâmetro da fibra e abre canais de escoamento através do endomísio, levando ao aumento da perda de água (KRISTENSEN; PURSLOW, 2001; ROWE; HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005; ZHANG *et al.*, 2006).

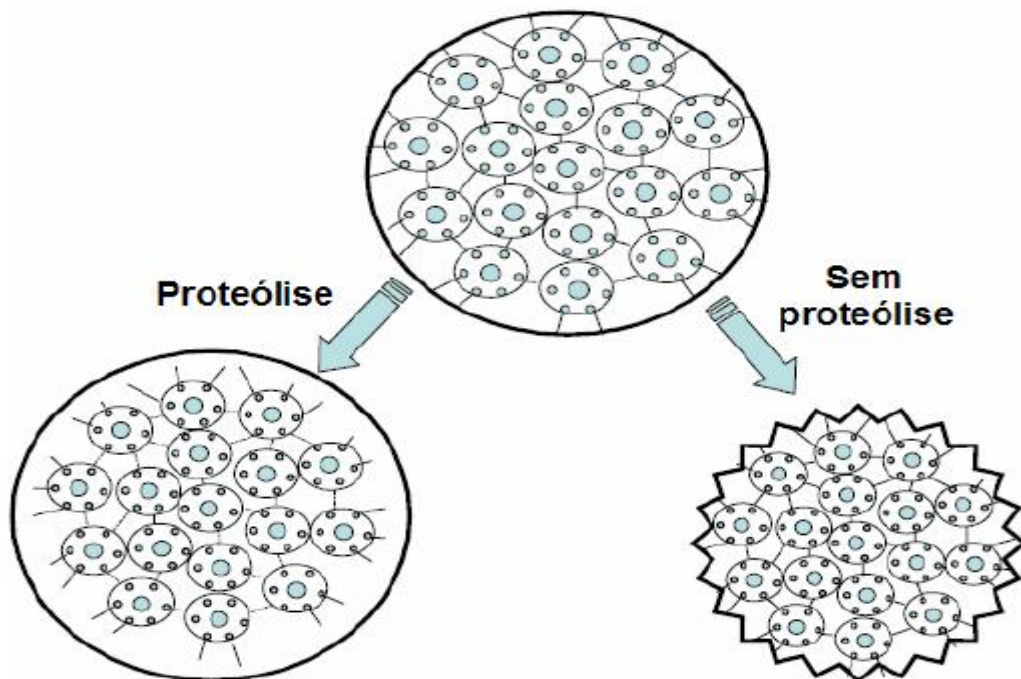


Figura 6 – Esquema representativo das potenciais mudanças no diâmetro da célula muscular durante o período *postmortem* influenciado pela proteólise. Se as ligações protéicas entre as miofibrilas e a membrana celular permanecem intactas (direita) durante a conversão do músculo em carne, o encurtamento das miofibrilas provenientes do *rigor mortis* seria transmitido para toda a célula e reduziria seu diâmetro, formando canais entre as fibras e facilitando o escoamento de água para o exterior do músculo (Adaptado de HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

3.8 PROTEASES NA CARNE PSE

A perda da homeostase gerando níveis elevados de cálcio, como acontece no PSE, leva a um aumento da sua concentração intracelular e ativa as calpaínas. Segundo Goll *et al.* (2003), a perda da homeostase do cálcio resulta no rompimento de alguns processos fisiológicos que regulam a atividade das calpaínas nas células e conduz a uma atividade desregulada das mesmas.

Claeys *et al.* (2001) hipotetizaram que um rápido declínio de pH da carne suína, acompanhado de aumento na concentração de íons Ca^{2+} , resulta em ativação e autólise prematura da u-calpaína, com subsequente menores níveis de atividade durante o prolongamento do período *postmortem*.

Melody *et al.* (2004) verificaram maior taxa de ativação da u-calpaína aos 45 min e 6h *postmortem* em músculo suíno que apresentava rápida queda de pH em relação ao normal e, conseqüentemente, obtiveram maior taxa de degradação de desmina e talina nestes mesmos tempos. Estes autores também relataram menor força de cisalhamento 24h *postmortem* no músculo com rápida queda de pH, no entanto, esta diferença em relação ao músculo normal não foi observada 48h e 120h *postmortem*. Rowe *et al.* (2001a) verificaram que em *Longissimus dorsi* suíno, com baixo pH em 2 h, houve grande taxa de ativação e autólise da u-calpaína e conseqüente prematura degradação de desmina e troponina T (24h *postmortem*) em relação ao músculo normal. Neste mesmo sentido, O'Halloran *et al.* (1997) relataram maior taxa ativação da u-calpaína (3h *postmortem*) em músculo *Longissimus dorsi* bovino com alta taxa de glicólise e rápida queda de pH. Também foi observada maior taxa de proteólise de desmina e troponina T medidas 24h *postmortem*, além de maior maciez obtida por força de cisalhamento e análise sensorial.

Boles *et al.* (1992) verificaram que a taxa de degradação *postmortem* da titana e da nebulina foi substancialmente reduzida no músculo PSE de suínos em comparação ao normal após 7 dias de armazenamento. Similarmente menor degradação *postmortem* da linha Z também foi observada no músculo *Longissimus dorsi* PSE. Ambos os fenômenos podem ser explicados por alterações no sistema calpaína/calpastatina resultando em menor proteólise *postmortem* em músculos PSE em comparação ao normal durante o prolongamento do período

postmortem (BOLES *et al.*, 1992). Bee *et al.* (2007) demonstraram que a ativação da u-calpaína ocorre mais cedo em carne suína com rápido declínio de pH, o que eventualmente resultaria em uma prematura perda da atividade proteolítica, e explicaria a menor degradação de desmina e talina obtidas 24h, 48h e 120h *postmortem* nesta carne.

Pesquisas da relação entre atividade proteolítica e o PSE em aves são raras na literatura. No entanto, em suínos, está bem evidenciado que a taxa de declínio de pH durante as primeiras horas após a sangria influencia a taxa de ativação da u-calpaína e pode ter um papel fundamental na regulação da atividade proteolítica no início do período *postmortem*, implicando conseqüências para a capacidade de retenção de água e a maturação no prolongamento do período *postmortem* (MELODY *et al.*, 2004; ROWE *et al.*, 2001a; O'HALLORAN *et al.*, 1997; BOLES *et al.*, 1992; BEE *et al.*, 2007)

Ultraestruturalmente, Soares (2003) observou, em filés de frango PSE 72h *postmortem*, espessamento das linhas Z, desaparecimento da banda I e diminuição do tamanho do sarcômero. No entanto houve o surgimento de lacunas no sarcômero e em alguns casos a linha Z perdeu sua integridade apresentando-se descontinuada. Guarnieri *et al.* (2004), através de técnicas microscópicas, constataram que em frangos tratados com nebulização de água antes do abate com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de carnes PSE, o sarcômero apresentou estrutura organizada e a linha Z estava enfraquecida devido à atividade das proteases. Porém, no grupo não tratado a estrutura do sarcômero apresentou-se desorganizada e a linha Z mais pronunciada. Pospiech, Greaser e Sosnicki (1995) relataram danos mais extensos das titanas nas miofibrilas de músculo normal de peru 24h *postmortem* em comparação com os encontrados em amostras PSE. Miofibrilas normais frequentemente tinham linhas Z ausentes enquanto nas amostras PSE de peru a linha Z geralmente permanece intacta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA PRIMA

Foram utilizadas amostras de filés de peito (*Pectoralis major m.*) de frango de linhagens comerciais, de ambos os sexos e com 42 dias de idade cedidas por um frigorífico de grande porte na região oeste do Paraná. Os animais foram abatidos e processados em planta frigorífica, sendo submetidos aos processos de insensibilização, sangria, escaldagem, depenagem, pré-chiller, chiller, gotejamento e desossa antes da coleta. O tempo transcorrido entre o abate e a desossa foi de aproximadamente 1h30. Os filés foram classificados de acordo com pH inicial (pH_{1.5}), assim 20 amostras PSE (pH_{1.5}<6,0) e 30 amostras Controle (pH_{1.5}>6,0) foram coletadas. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (2°C) durante 24h antes das análises.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Classificação dos Filés de Frango em PSE e Controle

4.2.1.1 Medida de pH

As medidas de pH foram realizadas diretamente no filé com auxílio de potenciômetro de contato Testo 205 nos tempos 1h30 e 24h *postmortem*. O ponto de incisão do eletrodo foi na parte cranial ventral do filé conforme descrito por Boulianne e King (1995).

4.2.1.2 Medida de Cor

As medidas de cor foram realizadas 24h *postmortem* na face ventral do filé em três pontos diferentes por amostra (SOARES *et al.*, 2002). A medida de cor foi realizada utilizando um colorímetro Minolta® CR 400 com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°. Os valores de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema de cor CIELab.

4.2.2 Atividade Proteolítica no Filé de Frango

4.2.2.1 Índice de fragmentação miofibrilar

A extração das miofibrilas, determinação de proteína solúvel e medida do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) foram realizadas de acordo com o método descrito por Culler *et al.* (1978), com adaptações, conforme segue:

4.2.2.2.1 Extração

Utilizou-se 4g do filé do músculo *Pectoralis major* livres de gordura e tecido conjuntivo aparente. As amostras foram homogeneizadas em Ultra turrax a 13500 rpm em 20mL de tampão MFI a 2°C (100mM de KCl, 20mM de fosfato de potássio pH 7,0, 1mM de EDTA, 1mM de MgCl₂ e 1mM de azida sódica) duas vezes por 30 segundos com mesmo intervalo em gelo. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas (Jouan BR4i) a 1000 x G (3500 rpm) por 15 minutos a 2°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspense em 20 mL de tampão MFI a 2°C. As amostras foram mais uma vez centrifugadas a 1000 x G por 15 minutos a 2°C e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi então ressuspense em 10mL de tampão MFI a 2°C e submetido ao vórtex até a

amostra tornar-se bastante homogênea para ser filtrada em peneira com malha de polietileno de 1,0mm² (mesh 18) para remover o tecido conectivo. Foram adicionados mais 10mL de tampão MFI a 2°C para lavagem do tubo da centrifuga e auxiliar na filtragem. A extração foi conduzida em triplicata.

4.2.2.2 Determinação de proteína solúvel

A quantificação de proteínas miofibrilares totais foi realizada conforme o método de Biureto (GORNALL; BARDWILL; DAVID, 1949) utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg/mL. Em tubos de ensaio colocou-se 1mL da amostra e em seguida adicionou-se 4mL de reagente de Biureto. Os tubos foram colocados em ambiente escuro por 30 minutos para completar a reação. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro Cintra 20 a 540nm e o teor de proteína solúvel foi calculado para se estabelecer o volume de amostra necessário para medida do MFI.

4.2.2.3 Medida do MFI

Para a determinação do MFI as amostras foram preparadas em triplicata com tampão MFI para um volume final de 8mL e concentração de proteína 0,5mg/mL. As amostras foram homogeneizadas por agitação em vortex e submetidas à leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm. O valor do MFI foi expresso como a absorvância multiplicada por 200.

4.2.2.3 Força de Cisalhamento

A força de cisalhamento (FC) foi determinada em sextuplicata em amostras cozidas (24h *postmortem*) utilizando texturômetro TA TX-2 Texture Analyser, equipado com lâmina Warner-Bratzler na velocidade de 5mm/seg, de acordo com Bratzler (1949). As amostras de filés de peito de frango dos grupos

Controle e PSE foram cortadas em pedaços de 1x1x2cm (altura x largura x comprimento), sendo que o comprimento seguiu o sentido das fibras da carne. A lâmina cortou as fibras transversalmente e os resultados foram expressos como força máxima (N) necessária para o corte das amostras. Para determinação da força de cisalhamento das amostras cozidas foram utilizadas as mesmas amostras da análise de perda de peso por cozimento.

4.2.3 Propriedades Funcionais

4.2.3.1 Capacidade de retenção de água

A avaliação da Capacidade de Retenção de Água (CRA) foi realizada 24h *postmortem* conforme procedimento descrito por Hamm (1960). Nesta análise, realizada em duplicata, a amostra foi coletada da parte cranial do filé e cortada em cubos de 2,0g ($\pm 0,10$). Em seguida, a amostra foi colocada entre 2 papéis filtros e posteriormente entre 2 placas de acrílico. Este sistema foi deixado sob um peso de 10kg por 5 min. Em seguida a carne foi pesada. A CRA foi determinada pela porcentagem de água exsudada por meio da fórmula:

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

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

4.2.3.2 Perda de peso por cozimento

Para a realização da análise de Perda de Peso por Cozimento (PPC) as amostras foram descongeladas sob refrigeração, pesadas, acondicionadas em sacos plásticos hermeticamente fechados e, em seguida, cozidas em banho-maria a 80°C até atingirem temperatura interna de 75°C (HONIKEL, 1998). Após o

cozimento a água exsudada foi desprezada, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e novamente pesadas. O resultado foi expresso em % de água perdida, considerando o peso inicial e final da amostra.

4.2.4 Ultraestrutura dos Filés de Frango

4.2.4.1 Microscopia eletrônica

Após a classificação dos filés de frango em Controle e PSE, as amostras obtidas 1h30 *postmortem* foram cortadas seguindo o eixo longitudinal da fibra e fixadas em solução (4°C) de glutaraldeído 2% tamponada com cacodilato de sódio 0,14M pH 7,4 contendo sacarose a 180mM. Também passaram por este processo amostras armazenadas sob refrigeração após 72h. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M a pH 7,2, lavadas em ósmio-cacodilato (um volume de tetróxido de ósmio 2% em água destilada 0,1M pH 7,2 e sacarose na concentração de 10,56g por 100mL) e permaneceram nesta solução por duas horas a 4°C, sofrendo agitação contínua por rotação. Após, foram lavadas rapidamente em solução de cloreto de sódio 0,9% com sacarose na concentração de 504g por litro. Em seguida, os fragmentos foram colocados por 24h em solução de acetato de uranila 0,5% em água destilada e sacarose na concentração de 10,56g por 100mL a 4°C. A seguir as peças foram desidratadas em uma série de soluções de etanol com concentrações crescentes, seguindo-se de duas passagens em óxido de propileno puro por 20 min cada. Posteriormente foi realizada a infiltração com óxido de propileno mais resina em partes iguais por 12 h, seguidas por uma passagem em resina pura por 1 h a 37°C e inclusão em resina Spurr (SEM, Hatfiel) em moldes de silicone por 2 dias. Após a polimerização os blocos foram cortados em ultramicrótomo Porter Blum MT-2, com obtenção de cortes de 0,5um de espessura corados com mistura de azul de metileno 1% e azur II 1% em solução de bórax 1% e observados ao microscópio óptico. Após a seleção da região de interesse, foram levados ao ultramicrótomo e obtidos cortes de 70nm, colhidos em telas de cobre de 200 malhas e contrastados pelo acetato de uranila 2% por 1h,

seguinte-se coloração por citrato de chumbo 0,5% por 30 minutos após lavagem. O exame dos cortes ultrafinos e as eletromicrografias foram feitas no microscópio eletrônico JEOL 100CX II do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A determinação do comprimento dos sarcômeros foi realizada de maneira aleatória diretamente nas eletromicrografias.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada utilizando o programa STATISTICA for Windows versão 6.0 (OKLAHOMA, 2001). O teste t de Student foi utilizado para a comparação das diferenças significativas entre as amostras classificadas entre PSE e Controle em relação às análises de pH, cor, CRA, FC, PPC e MFI. Os coeficientes de correlação de Pearson entre as mesmas variáveis também foram calculados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS FILÉS DE FRANGO EM PSE E CONTROLE

A Tabela 1 apresenta as médias dos valores de pH₁₅, pH₂₄, L*, a* e b* dos filés de peito de frango classificados em grupo Controle e grupo PSE. Como critério de classificação utilizou-se a medida de pH inicial (PIETRZAK; GREASER; SOSNICKI, 1997). Sendo assim, filés que apresentaram pH_{1,5}>6,0 foram classificados como Controle e filés com pH₁₅<6,0 classificados como PSE.

Tabela 1 – Valores médios de pH_{1.5} (1h30), pH₂₄ (24h) e Cor (L*, a*, b*) dos filés de peito de frango dos grupos Controle e PSE.

Grupos	pH _{1.5}	pH ₂₄	L*	a*	b*
Controle (n=30)	6,49 ^{a, A} ±0,39	5,89 ^{a, B} ±0,15	52,00 ^a ±1,65	2,90 ^a ±2,10	5,08 ^a ±2,13
PSE (n=20)	5,81 ^{b, A} ±0,11	5,77 ^{b, A} ±0,12	57,37 ^b ±2,75	2,12 ^a ±1,60	7,29 ^b ±1,98

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença a 1% de probabilidade (p<0,01) no teste t de Student.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha para o pH indicam diferença a 5% de probabilidade (p<0,05) no teste t de Student. ± Desvio padrão.

Os valores de pH₁₅ diferiram significativamente (p<0,01) entre os filés dos grupos Controle (6,49) e PSE (5,81). O pH₂₄ médio do grupo PSE (5,77) também foi significativamente (p<0,01) menor daquele apresentado pelo grupo Controle (5,89). É possível notar que nas amostras do grupo Controle existe um decréscimo dos valores de pH durante o período *postmortem*, enquanto nas amostras do grupo PSE ocorre extensa glicólise *postmortem* e rápida queda de pH no estágio inicial do rigor mortis (BARBUT, 1997a; PIETRZAK; GREASER; SOSNICKI, 1997; VAN LAACK *et al.*, 2000; OLIVO; FUKUSHIMA; SHIMOKOMAKI,

1998). Isto pode ser confirmado pela inexistência de diferença significativa ($p=0,32$) entre os valores de pH1.5 e pH24 no grupo PSE, indicando que o glicogênio muscular nestes filés já havia sido consumido 1 h30 *postmortem*. De acordo com Soares *et al.* (2003b) e Barbut *et al.* (2008), o aumento da concentração de Ca^{2+} sarcoplasmático é o responsável pela ativação do metabolismo muscular e acelera a produção de ácido láctico causando acentuada queda de pH no músculo PSE nos primeiros momentos *postmortem*.

Os valores de L^* (Tabela 1) dos filés do grupo PSE (57,37) diferiram significativamente ($p<0,01$) do grupo Controle (52,00). Filés com $L^* > 53,00$ têm sido classificados como PSE (BARBUT, 1997a; McKEE; SAMS, 1997; OWENS *et al.*, 2000a; OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001; SOARES *et al.*, 2002) e apresentam exacerbada palidez, decorrente da maior dispersão de luz proporcionada pela desnaturação protéica (OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001; SWATLAND, 2008).

Os valores de a^* (Tabela 1) não diferiram entre os grupos Controle (2,90) e PSE (2,12). Fletcher, Qiao e Smith (2000) e Soares *et al.* (2002) também não encontraram diferença significativa entre os valores de a^* de filés de peito de frango pálido e normal. Entretanto esta diferença nos valores de a^* foi relatada por outros pesquisadores (ALLEN *et al.*, 1998; BOULIANNE; KING, 1995; QIAO *et al.*, 2001).

Os valores de b^* (Tabela 1) diferiram significativamente ($p<0,01$) para os filés dos grupos Controle (5,08) e PSE (7,29), sugerindo que filés mais amarelos são também mais pálidos. Os maiores valores de b^* encontrados nos filés PSE também foram observados em outros estudos (QIAO *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2002; KISSEL, 2008), enquanto Fletcher *et al.* (1999) não encontraram diferença significativa neste parâmetro entre os filés "normal" e PSE.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A Tabela 2 apresenta os valores de índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e força de cisalhamento (FC) dos filés de frango 24h *postmortem*. Os valores de MFI do grupo PSE foram significativamente ($p<0,01$) maiores (117,40)

em relação ao grupo Controle (103,86). Inversamente os valores de FC foram significativamente ($p < 0,05$) menores (43,46) no grupo PSE em relação ao grupo Controle (58,09).

Tabela 2 – Valores médios de Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e Força de Cisalhamento (FC) dos filés de peito de frango dos grupos controle e PSE obtidos 24h *postmortem*.

Grupos	MFI	FC (N)
Controle (n=30)	103,86 ^a ±12,53	58,09 ^A ±16,76
PSE (n=20)	117,40 ^b ±17,78	43,46 ^B ±20,47

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença a 1% de probabilidade ($p < 0,01$) no teste t de Student.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) no teste t de Student. ± Desvio padrão. N - Newton

O MFI tem sido amplamente adotado como método de avaliação indireta da extensão da atividade proteolítica, pois reflete o tamanho das miofibrilas e possui correlação com índices de maciez aferidos pela força de cisalhamento e análise sensorial (KRIESE *et al.*, 2007; CULLER *et al.*, 1978). Assim, miofibrilas mais curtas resultam em elevação do MFI, com conseqüente maior maciez (MOLLER; VESTERGAARD; WISMER-PEDERSEN, 1973). As calpaínas contribuem para o aumento do MFI por meio de quebras nas ligações intermiofibrilares (desmina) e pela sua ação sobre a titana e a nebulina, causando rupturas nas bandas I e A do sarcômero e enfraquecendo a ligação dos filamentos finos com a linha Z (HOPKINS; MARTIN. GILMOUR, 2004; TAYLOR *et al.*, 1995). Sendo assim, pode-se afirmar que a atividade proteolítica medida pelo MFI foi aproximadamente 13% maior nas amostras do grupo PSE. Soares *et al.* (2003) demonstraram que frangos susceptíveis ao PSE apresentavam níveis de cálcio sarcoplasmático aproximadamente 49% maiores em relação ao controle. Portanto, é plausível afirmar que a maior concentração de cálcio sarcoplasmático encontrada nas amostras do

grupo PSE pode ser responsável pela ativação precoce das enzimas cálcio-dependentes do sistema calpaína, explicando tanto a maior fragmentação das miofibrilas como a maior maciez. Koohmaraie (1992b) verificou em bovinos, que após 60 minutos a 25°C e pH 5,8 a u-calpaína retinha apenas 9,2% de sua atividade original, evidenciando também a importância da rápida queda de pH para a ativação e conseqüente autólise precoce da enzima. Esta ativação precoce pode ser responsável pela maior maciez apresentada pelas amostras do grupo PSE em relação ao controle 24h *postmortem*.

5.3 EFEITO DO PSE SOBRE PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FILÉS DE FRANGO

A Tabela 3 apresenta os valores médios de capacidade de retenção de água (CRA) e da perda de peso por cozimento (PPC) dos filés de peito de frango classificados em grupo Controle e grupo PSE 24h *postmortem*.

Tabela 3 – Valores médios de Capacidade de Retenção de Água (CRA) e Perdas de Peso por Cozimento (PPC) dos filés de peito de frango dos grupos controle e PSE obtidos 24h *postmortem*.

Grupos	CRA (%)	PPC (%)
Controle (n=30)	69,12 ^a ±2,55	24,01 ^A ±2,10
PSE (n=20)	65,56 ^b ±1,72	25,59 ^B ±2,71

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença a 1% de probabilidade ($p < 0,01$) no teste t de Student.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) no teste t de Student. ± Desvio padrão.

A CRA é calculada pela porcentagem da água exsudada em relação ao peso inicial da amostra, logo, quanto menor o valor de CRA, maior é a perda de água. A CRA dos filés classificados como PSE (65,56%) foi significativamente ($p < 0,01$) menor do que a do grupo Controle (69,12%), enquanto a porcentagem de PPC dos filés classificados como PSE (25,59%) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos valores obtidos para o grupo Controle (24,01%) (Tabela 3).

O menor valor de CRA e o maior PPC observados nos filés PSE são atribuídos à rápida glicólise *postmortem* que conduz à desnaturação das proteínas miofibrilares, diminuindo sua capacidade de reter água (SOLOMON; VAN LAACK; EASTRIGE, 1998; OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001; SOARES, 2003; KISSEL, 2008).

Uma recente hipótese propõe que a degradação de proteínas musculares (desmina, talina e vinculina) que ligam a miofibrila ao sarcolema pela u-calpaína minimizaria a perda da CRA causada pelo encolhimento das miofibrilas no músculo *postmortem* (MELODY *et al.*, 2004; HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005). A prematura ativação e autólise da u-calpaína, poderia comprometer em parte a perda da CRA observada nos filés PSE, já que ela deixaria de atuar sobre estas proteínas no decorrer do período *postmortem*.

Segundo Barbut *et al.*, (2008), a perda de água é um dos principais fatores que implicam na diminuição da qualidade de produtos cárneos nas indústrias. O uso de carne de frango PSE em industrializados gera um produto de baixa CRA e deficiente fatiabilidade quando comparado à carne normal (ZHANG; BARBUT, 2005; OLIVO; GUARNIERI; SHIMOKOMAKI, 2001).

5.4 CORRELAÇÕES ENTRE AS ANÁLISES E SUAS IMPLICAÇÕES

Os coeficientes de correlação de Pearson de filés de frango entre as medidas de pH_{1,5}, pH₂₄, L*, a*, b*, CRA, PPC, MFI e FC 24h *postmortem* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos e físico-químicos de filés de frango.

	FC	MFI	PPC	CRA	b*	a*	L*	pH ₂₄
pH _{1.5}	0,19	-0,16	-0,35*	0,66**	-0,19	0,13	-0,57**	0,50**
pH ₂₄	-0,33	-0,06	-0,29*	0,29*	-0,34*	0,08	-0,31*	
L*	-0,35*	0,53**	0,42**	-0,49**	0,45**	-0,29*		
a*	0,19	-0,25	-0,33*	0,23	0,04			
b*	-0,09	0,09	0,00	-0,18				
CRA	0,25	-0,45**	-0,48**					
PPC	-0,04	0,39*						
MFI	-0,42*							

pH₁₅ e pH₂₄ - valores de pH medidos 90 min e 24h *postmortem* respectivamente. CRA -capacidade de retenção de água. PPC - perda de peso por cozimento. MFI - índice de fragmentação miofibrilar. FC - força de cisalhamento. *p<0,05; **p<0,01.

Os valores de pH₁₅ apresentaram correlação negativa significativa com os valores de L* (-0,57, p<0,01) e PPC (-0,35, p<0,05) e positiva com a CRA (0,66, p<0,01), ou seja, quanto menor o pH₁₅ da carne maior é sua palidez e menor é sua capacidade de reter água, evidenciando o comprometimento das propriedades funcionais de suas proteínas logo na primeira hora após o abate. Os valores de pH₂₄ correlacionaram-se negativamente com os valores de PPC (-0,29, p<0,05), b* (-0,34, p<0,05), L* (-0,31, p<0,05) e positivamente com os valores de CRA (0,29, p<0,05) e pH_{1.5} (0,50, p<0,01).

Os valores de L* também estão correlacionados positivamente com PPC (0,42, p<0,01), MFI (0,53, p<0,01), e b* (0,45, p<0,01) e negativamente com FC (-0,35, p<0,05), CRA (-0,49, p<0,01) e a* (-0,29, p<0,05). Estas correlações sugerem que quanto maior é a palidez da carne em decorrência da desnaturação protéica, maiores são as perdas de água.

Além das correlações citadas acima, os valores de CRA também apresentaram correlação negativa significativa com os valores de MFI (-0,45, p<0,01) e PPC (-0,48, p<0,01). Os valores de PPC também estão correlacionados positivamente com o MFI (0,39, p<0,05) e negativamente com a* (-0,33, p<0,05).

Assim, podemos afirmar que há uma associação negativa entre a atividade proteolítica e as propriedades funcionais das proteínas da carne. Conforme verificado em outros trabalhos (KRIESE *et al.*, 2007; CROUSE e KOOHMARAIE, 1990; CULLER *et al.*, 1978), os valores de FC apresentaram correlação negativa significativa com MFI (-0,42, $p < 0,05$), sugerindo que quanto maior é a atividade proteolítica medida pelo MFI maior é a maciez da carne.

5.5 EFEITO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DO TEMPO SOBRE A ULTRAESTRUTURA DOS FILÉS DE FRANGO

5.5.1 Microscopia Eletrônica

As Figuras 7a e b mostram as eletromicrografias de seção longitudinal de músculo esquelético *Pectoralis major* de frangos Controle e PSE, respectivamente, obtidas 1h30 *postmortem*. Observa-se que na amostra Controle (Figura 7a), a estrutura dos miofilamentos permanece íntegra e sem quaisquer mudanças destrutivas aparentes, apresentando bandas A e I, zona H e linhas Z e M evidentes, como observado por Guarnieri *et al.* (2004). Contrariamente, a aparência ultraestrutural das miofibrilas do músculo PSE (Figura 7b) é notavelmente diferente, apresentando desorganização parcial da estrutura do sarcômero e o surgimento de lacunas entre os miofilamentos. Também é possível notar uma exacerbada contração muscular, evidenciada pelo encolhimento do sarcômeros, que são aproximadamente 44% menores ($p < 0,01$ / $n=30$) no PSE (1,11 μm) em relação ao Controle (1,97 μm). Isto favorece a separação das miofibrilas e o destacamento dos sarcômeros adjacentes, originando a abertura de espaços para passagem de água (seta 1).

Está claro que das proteases presentes no tecido muscular esquelético a u-calpaína é a única enzima capaz de agir sobre as proteínas miofibrilares, já que as enzimas lisossomais não têm acesso ao substrato e o proteosoma não é capaz de agir sobre a estrutura complexa dos componentes miofibrilares (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). Comparando as amostras Controle

e PSE (Figuras 7a e b) entende-se que o sistema calpaína parece iniciar sua atividade muito antes na amostra PSE, possivelmente pelos miofilamentos, em decorrência da desnaturação protéica, causando o desprendimento das proteínas ancoradas na linha Z, como nebulina e troponina T, conduzindo ao colapso da estrutura do sarcômero. O excesso na concentração de Ca^{2+} sarcoplasmático observado por Soares *et al.* (2003) no estágio inicial *postmortem* na carne PSE, parece ser o principal fator que favorece a ativação prematura da u-calpaína.

Após 72h *postmortem* o padrão observado anteriormente nas amostras Controle é de alguma forma alterado (Figura 8a). As miofibrilas do sarcômero estão aparentemente despolimerizadas e lacunas podem ser observadas entre os miofilamentos e os sarcômeros, indicando que as proteínas foram fragmentadas em decorrência do processo de maturação. Segundo Lee *et al.* (2008) a atividade da u-calpaína em frangos desaparece 6h *postmortem*, enquanto a u/m-calpaína permanece ativa até 72h *postmortem*.

Distintamente, a amostra do grupo PSE (Figura 8b) apresenta completa desorganização e desalinhamento do sarcômero e o típico padrão de bandas clara e escura não é evidente. Os filamentos de miosina predominam no sarcômero quase tocando a linha Z enquanto os filamentos de actina são raramente vistos. Espaços abertos são visíveis e a contração muscular é evidente, possivelmente arrastando componentes do sarcômero de encontro à linha Z, fazendo-as parecer comparativamente muito densa. A ativação e autólise precoce das calpaínas no início do período *postmortem* na amostra PSE parecem influenciar negativamente a degradação das proteínas miofibrilares 72h *postmortem*.

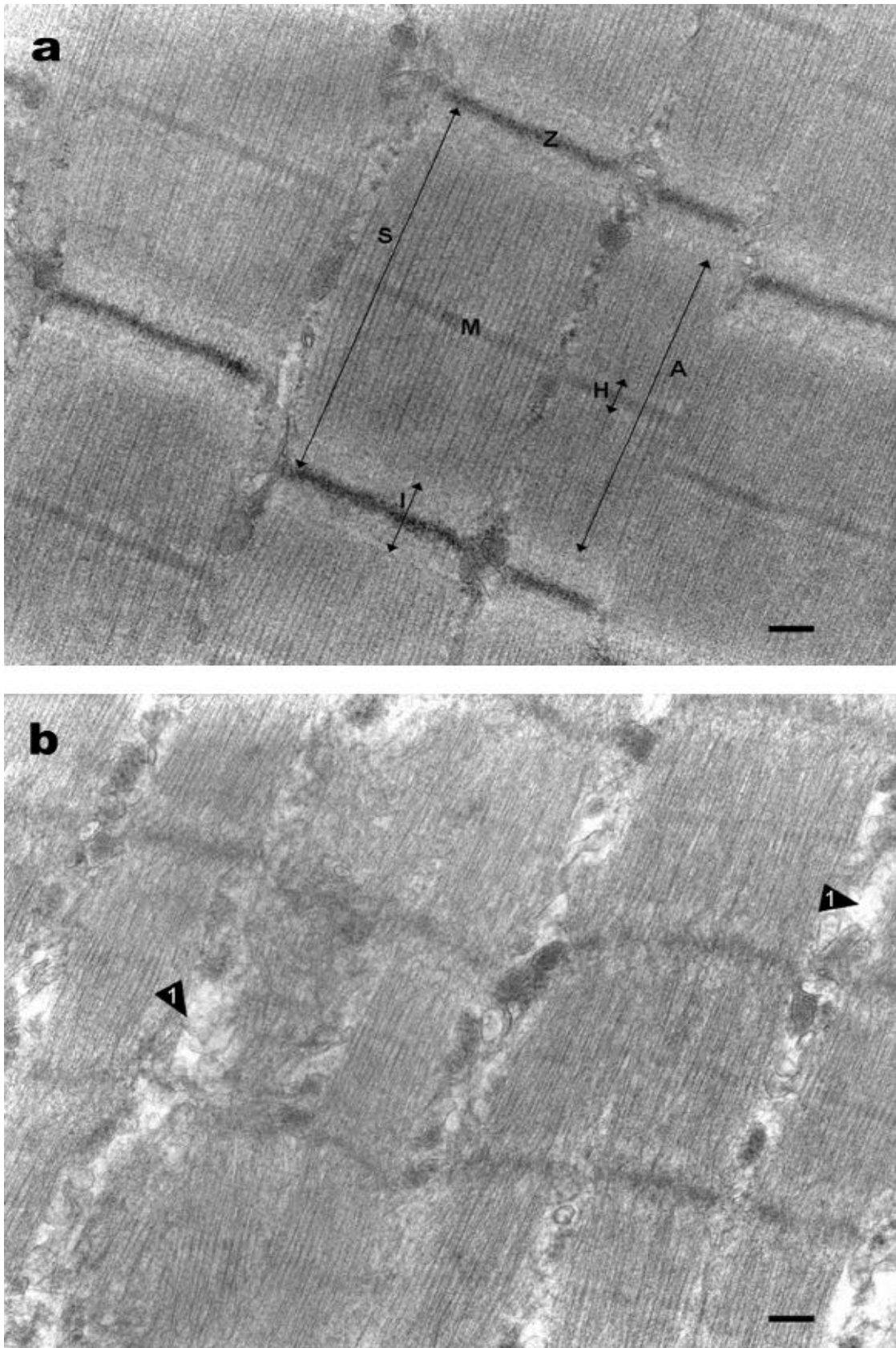


Figura 7 – Eletromicrografias de uma seção longitudinal de filés de frango Controle (a) e PSE (b) obtidas 1h30 *postmortem*. S= sarcômero; A= banda A; I= banda I; H= zona H; Z= linha Z; M= linha M. Aumento 25000x. Barra= 200 nm. Observar a desorganização parcial e destacamento de sarcômeros adjacentes (1) na amostra PSE.

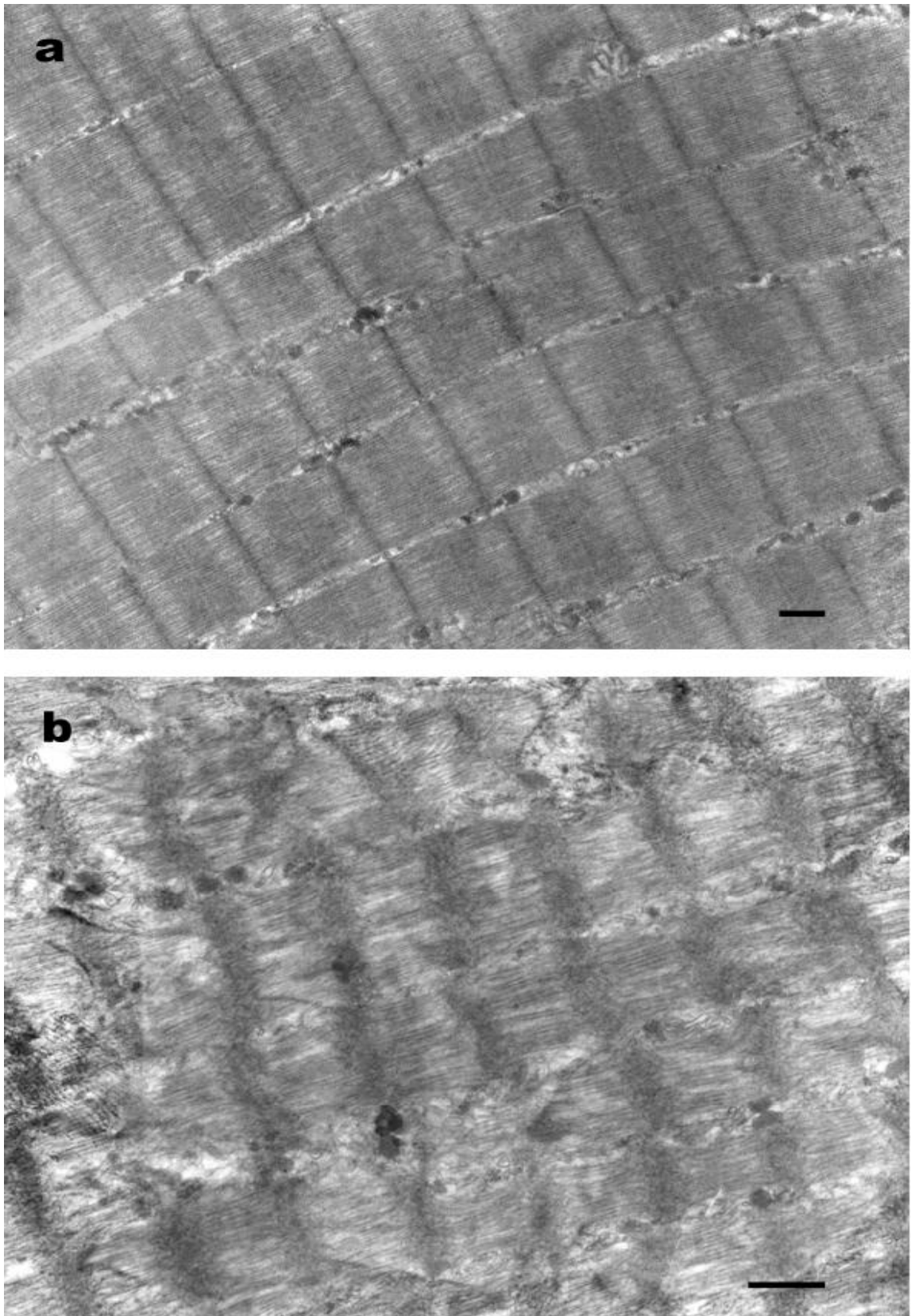


Figura 8 – Eletromicrografias de uma seção longitudinal de filés de frango Controle (a) e PSE (b) obtidas 72h *postmortem*. Aumento 10000x (a) e 15000x (b). Barra= 500nm. Observar a atividade proteolítica na amostra controle em contraste à completa desorganização e colapso das estruturas do sarcômero na amostra PSE.

As eletromicrografias de seção transversal de músculo esquelético *Pectoralis major* de frangos Controle e PSE obtidas 1h30 *postmortem* são exibidas nas Figuras 9a e b, respectivamente. Nota-se no grupo Controle (Figura 9a) que as fibras musculares estão arranjadas de forma densa e compacta, preenchendo quase por completo o espaço endomisial. As miofibrilas apresentam aspecto uniforme, bordas regulares e ocupam todo o espaço intracelular. No grupo PSE (Figura 9b) a estrutura das fibras musculares está arranjada de maneira disforme, além de apresentar diâmetro reduzido em decorrência da contração muscular. Guarnieri *et al.* (2004), por meio de microscopia óptica, observaram que as fibras musculares do grupo PSE possuíam diâmetro 10% menor em relação ao Controle. Este diâmetro reduzido permite o surgimento grandes lacunas na região do endomísio (seta 2). Barbut, Zhang e Marcone (2005) também observaram que a carne PSE de frango apresentava grandes aberturas entre as fibras musculares e entre os feixes de fibras. Intracelularmente também podem ser notados pequenos espaços, provavelmente em função da desnaturação protéica e da ação precoce das enzimas proteolíticas. As ligações intermiofibrilares contêm desmina, que é rapidamente clivada pelas calpaínas (TAYLOR *et al.*, 1995). É razoável acreditar que é a partir desta região que se inicia o escoamento de água do espaço intracelular (seta 1) para o endomísio (seta 2). Dali segue em direção ao perimísio e finalmente atinge a superfície muscular. Nota-se após 72h que o grupo Controle (Figura 10a) apresenta sinais de fragmentação proteolítica, como o surgimento de áreas claras no espaço intracelular e a ligeira separação entre as fibras musculares. No grupo PSE (Figura 10b) as bordas da célula muscular apresentam contornos irregulares e ocorrem as mesmas lacunas percebidas anteriormente além de evidente contração muscular.

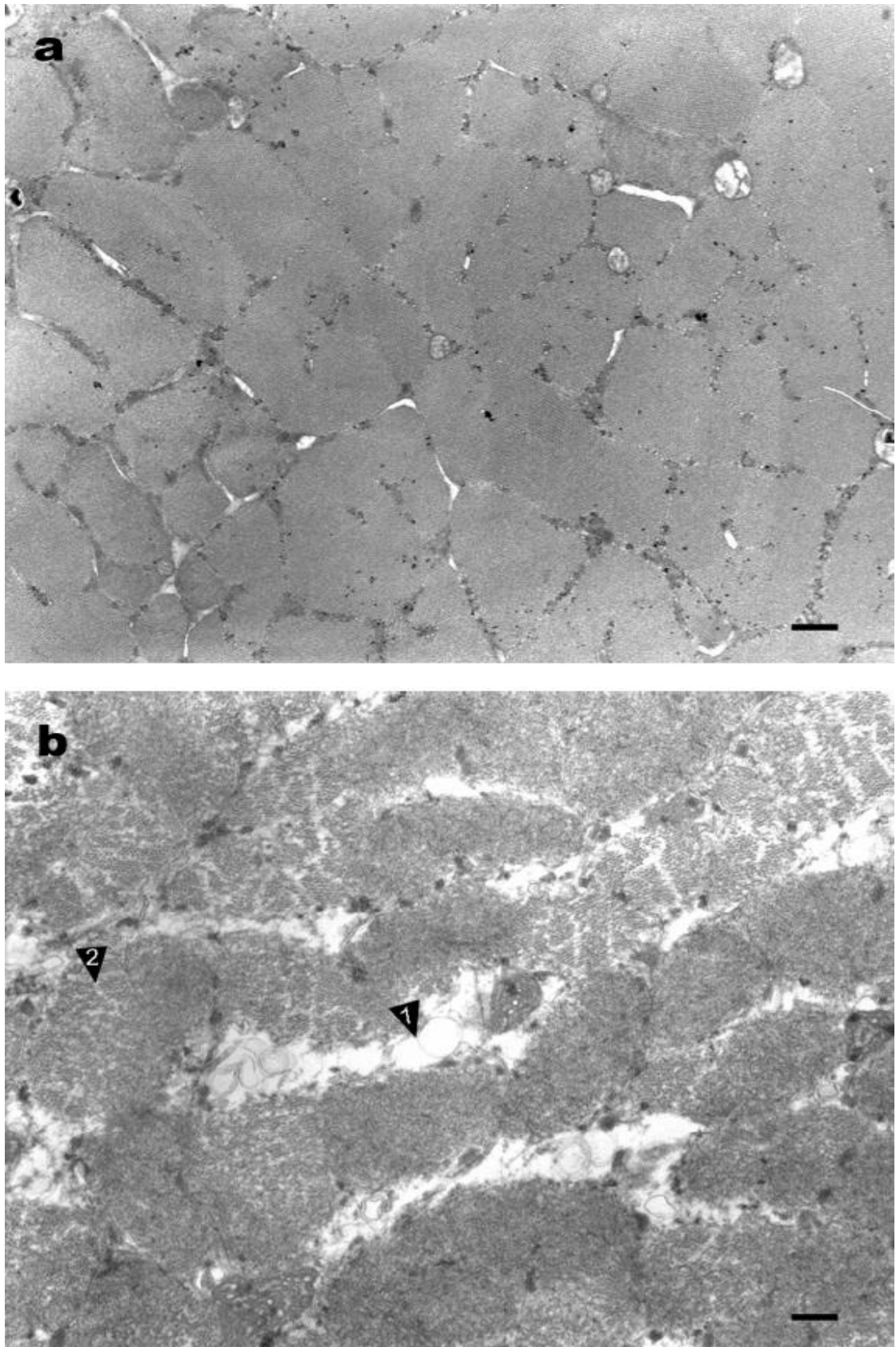


Figura 9 – Eletromicrografias de uma seção transversal de filés de frango controle (a) e PSE (b) obtidas 1h30 *postmortem*. 1: endomísio. 2: espaço intracelular. Aumento 10000x. Barra= 500 nm. Observar a formação de grandes lacunas na amostra PSE devido ao encolhimento da fibra muscular.

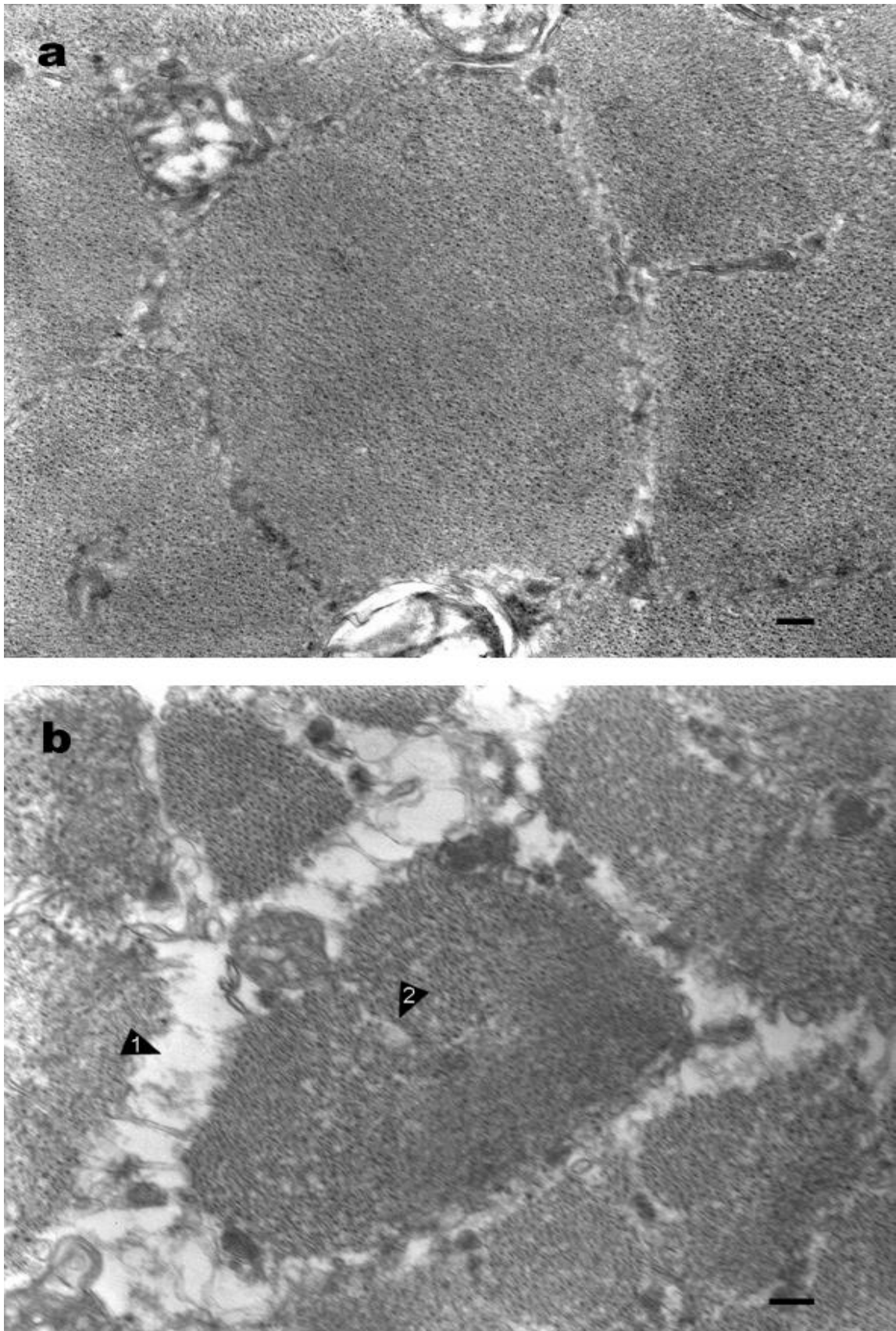


Figura 10 – Eletromicrografias de uma seção transversal de filés de frango controle (a) e PSE (b) obtidas 72h *postmortem*. 1: endomísio. 2: espaço intracelular. Aumento 25000x. Barra= 200 nm. Observar a formação de canais para o escoamento de água no endomísio da amostra PSE.

6 DISCUSSÃO GERAL

As propriedades funcionais comprometidas da carne PSE de frango sempre foram relacionadas à desnaturação protéica decorrente da combinação de baixo pH e alta temperatura. No entanto, a atuação das enzimas proteolíticas do sistema calpaína, em especial a u-calpaína (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006), também parece estar envolvida.

A Figura 11 ilustra o provável mecanismo da relação entre a atividade das calpaínas e

o prejuízo das propriedades funcionais da carne PSE de frango. Os diversos fatores que induzem a formação de carnes PSE, como o manejo pré-abate (SAMS, 1999) e possivelmente fatores genéticos (OWENS *et al.*, 2000b), promovem a aceleração metabólica, aumento do influxo de íons Ca^{2+} no sarcoplasma (SOARES *et al.*, 2003) e acúmulo de ácido láctico. A associação destes fatores parece conduzir à ativação precoce do sistema calpaína. A exacerbada atividade proteolítica em período *postmortem* prematuro (BEE *et al.*, 2007; MELODY *et al.*, 2004; ROWE *et al.*, 2001a) pode estar relacionada tanto às propriedades funcionais da carne analisadas 24h *postmortem* bem como às mudanças ultraestruturais observadas. O aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} também causam forte contração muscular facilitando a formação de canais de escoamento, e influenciando principalmente a CRA.

Com o aumento da fragmentação das miofibrilas causada pela atuação precoce das calpaínas sobre a banda I, provavelmente sobre a desmina, troponina T e nebulina, a carne se torna mais macia e menos força é necessária para o seu cisalhamento no início do período *postmortem*. Tem sido reportado que em carnes macias ocorre elevada taxa de degradação da troponina T e desmina (O'HALLORAN *et al.*, 1997). É importante salientar que após a ativação, as calpaínas sofrem autólise e perdem sua atividade (GOLL *et al.*, 2003), podendo influenciar negativamente o processo de maturação e a maciez em relação à carne normal no prolongamento do período *postmortem*.

A rápida perda de atividade da u-calpaína, assim como a desnaturação protéica, contribui para a diminuição da capacidade de retenção de água na carne PSE. Assim, estas enzimas deixariam de atuar sobre proteínas que

fazem a ligação das miofibrilas ao sarcolema, como desmina, talina e vinculina no decorrer do período *postmortem* (BEE *et al.*, 2007; BOLES *et al.*, 1992), o que contribuiria para a saída de água da célula (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

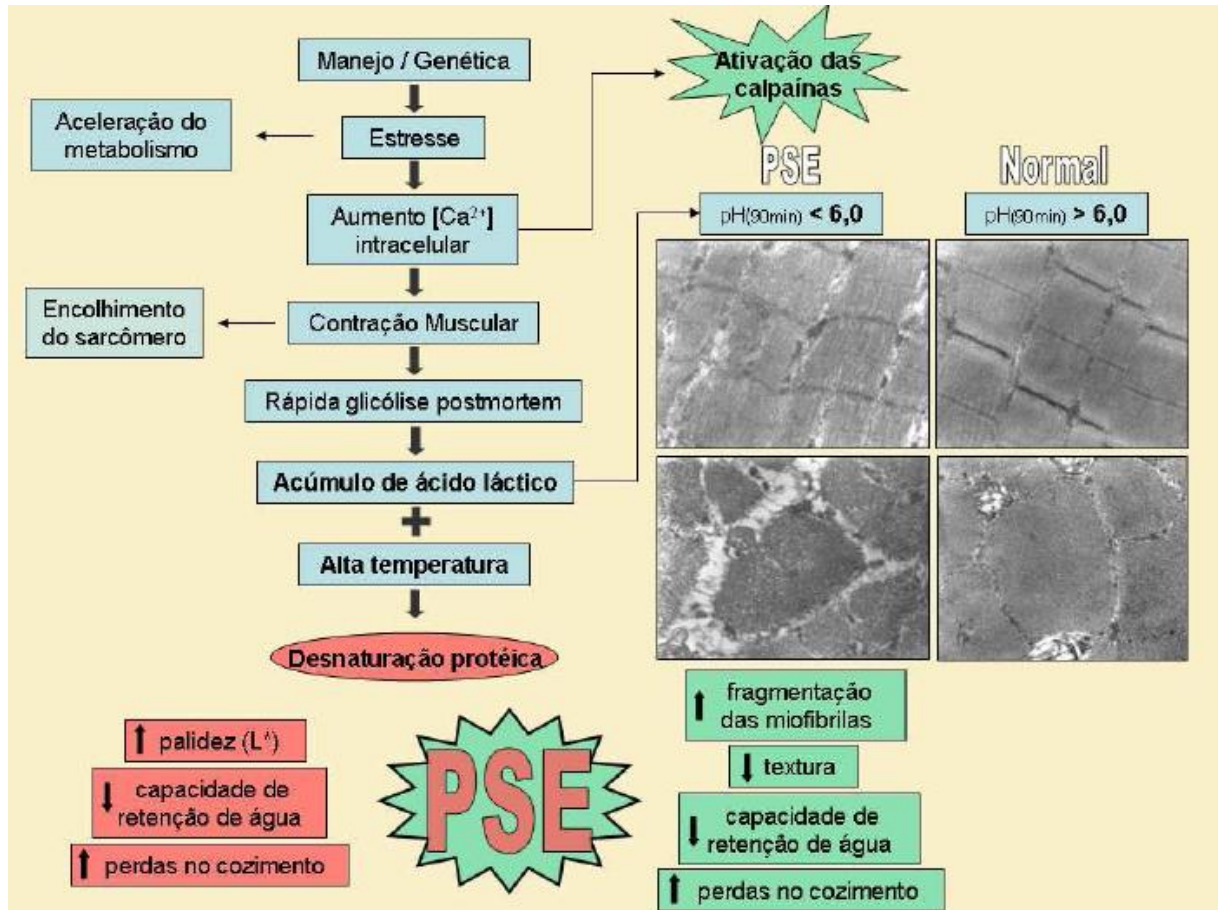


Figura 11 – Esquema representativo do provável mecanismo de relação entre a atividade das calpaínas e o prejuízo das propriedades funcionais da carne PSE de frango. O aumento do influxo de Ca²⁺ causa a ativação precoce das calpaínas contribuindo para as alterações ultraestruturais e a diminuição das propriedades funcionais das proteínas.

7 CONCLUSÃO

Ocorre ativação precoce das enzimas proteolíticas durante a instalação da carne PSE de frango, provavelmente em decorrência do aumento do influxo de íons Ca^{2+} no sarcoplasma e da queda de pH, afetando a integridade da estrutura da fibra muscular e prejudicando a funcionalidade das proteínas desta carne.

REFERÊNCIAS

AKSIT, M.; YALCIN, S.; OZKAN, S.; METIN, K.; OZDEMIR, D. Effects of temperature during rearing and crating on stress parameters and meat quality of broilers. **Poultry Science**, v.85, p.1867-1874, 2006.

ALLEN, C.D.; FLETCHER, D.L.; NORTHCUTT, J.K.; RUSSELL, S.M. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. **Poultry Science**, v.77, p.361-366, 1998.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole, 1991, p.215-236.

BARBUT, S.; SOSNICKI, A.A.; LONERGAN, S.M.; KNAPP, T.; CIOBANU, D.C.; GATCLIFFE, L.J.; HUFF-LONERGAN, E.; WILSON, E.W. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. **Meat Science**, v.79, p.46-63, 2008.

BARBUT, S.; ZHANG, L.; MARCONE, M. Effects of pale, normal, and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. **Poultry Science**, v.84, p.797-802, 2005.

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

BARBUT, S. Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. **British Poultry Science**, v.38, p.74-77, 1997b.

BATE-SMITH, E.C.; BENDALL, J.R. Factors determining the time course of *rigor mortis*. **The Journal of Physiology**, v. 110, p.47-65, 1949.

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

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

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

BOULIANNE, M.; KING, J.A. Biochemical and color characteristics of skinless boneless pale chicken breast. **Poultry Science**, v.74, p.1693-1698, 1995.

BRATZLER, L.J. Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. **Proceedings of the Second Annual Reciprocal Meat Conference**. National Livestock and Meat Board, Chicago, IL. AMSA, Savoy, IL, p. 117, 1949.

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

BROWN, N.; CRAWFORD, C. Structural modifications associated with the change in Ca^{2+} sensitivity on activation of m-calpain. **FEBS Letters**, v.322, p.65-68, 1993.

CHEAH, K.S.; CHEAH, A.M. Mitochondrial calcium transport and calcium-activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.634, p.70-84, 1981.

CHEAH, K.S.; CHEAH, A.M.; CROSLAND, A.R.; CASEY, J.C.; WEBB, A.J. 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.

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

CORÓ, F. A. G.; YOUSSEF, E. Y.; SHIMOKOMAKI, M. Age related changes in poultry breast meat collagen pyridinoline and texture. **Journal of Food Biochemistry**, v.26, n.6, p.533-541, 2002.

COTTIN, P.; VIDALENC, P.L.; DUCASTAING, A. Ca^{2+} -dependent association between a Ca^{2+} -activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. **FEBS Letters**, v.136, p.221-224, 1981.

CRAIG, R. Disponível em <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/z1 z2/>>. Acesso em 16/10/2008.

CROUSE, J.D.; KOOHMARAIE, M. Effect of time of sampling *postmortem* on myofibril fragmentation index of meat. **Journal of Food Science**, v.55, p.254-256, 1990.

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

DAYTON, W.R.; GOLL, D.E.; ZEECE, M.G.; ROBSON, R.M.; REVILLE, W. A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. **Biochemistry**, v.15, p.2150-2158, 1976.

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

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

DOUMIT, M.E.; KOOHMARAIE, M. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in *postmortem* muscle. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1467-1473, 1999.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. **Muscle biopsy: a modern approach**. London: W.B. Saunders Company, 1984. 472p.

EMORI, Y.; KAWASAKI, H.; IMAJOH, S.; KAWASHIMA, S.; SUZUKI, K. Isolation and sequence analysis of cDNA clones for the small subunit of rabbit calcium-dependent protease. **Journal of Biological Chemistry**, v.261, p.9472-9476, 1986.

FERNANDEZ, X.; SANTÉ, V.; BAEZA, E.; LEBIHAN-DUVAL, E.; BERRI, C.; RÉMIGNON, H.; BABILÉ, R.; LE POTTIER, G.; ASTRUC, T. Effects of the rate of muscle *post mortem* pH fall on the technological quality of turkey meat. **British Poultry Science**, v.43, p.245-252, 2002.

FLETCHER, D.L. Broiler breast meat color variation, pH, and texture. **Poultry Science**, v.78, p.1323-1327, 1999.

FLETCHER, D.L.; QIAO, M.; SMITH, D.P. The relationship of raw broiler breast meat color and pH to cooked meat color and pH. **Poultry Science**, v.79, n.5, p.784-788, 2000.

FRONING, G.W.; BABJI, A.; MATHER, F.B. The effect of preslaughter temperature, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. **Poultry Science**, v.57, p.630-633, 1978.

FUJI, J.; OTSU, K.; ZORATO, F.; DELEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermia. **Science**, v.253, p.448-451, 1991.

GEESINK, G.H.; OUALI, A.; SMULDERS, F.J.M.; TALMANT, A.; TASSY, C.; GUIGNOT, F.; VAN LAACK, H.L.J.M. The role of ultimate pH in proteolysis and calpain/calpastatin activity in bovine muscle. **Biochimie**, v.74, p. 283-289, 1992.

GEESINK, G.H.; ILIAN, M.A.; MORTON, J.D.; BICKERSTAFFE, R. Involvement of calpains in *postmortem* tenderization. A review of recent research. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.60, p.99-102, 2000.

GIL-PARRADO, S.; POPP, O.; KNOCH, T.A.; ZAHLER, T.A.; BESTVATER, F.; FELGENTRAGER, M.; HOLLOSCHI, A.; FERNÁNDEZ-MONTALAVÁN, A.; AUERSWALD, E.; FRITZ, H.; FLUENTES-PRIOR, P.; MACHLEIDT, W.; SPIESS, E. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous u-calpain. **Journal of Biological Chemistry**, v.278 (18), p.16336-16346, 2003.

GOLL, D.E.; OTSUKA, Y.; NAGAINIS, P.A.; SHANNON, J.D.; SATHE, S.K.; MUGURUMA, M. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. **Journal of Food Biochemistry**, v.7, p.137-177, 1983.

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

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

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; EDMUNDS, T.; CONG, J. Properties and biological regulation of the calpain system. **Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation**, p.47-68. In OUALI, A., DEMEYER, D.I., SMULDERS, F. Ed. *Ecceamst*, Utrecht, The Netherlands, 1995.

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

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

GUARNIERI, P.D.; OLIVO, R.; SOARES, A.L.; IDA, E.I.; LARA, J.A.F.; SHIMOKOMAKI, M. Bem-estar animal e qualidade da carne das aves: uma exigência dos consumidores. **Revista Nacional da Carne**, ano XXVI, n.301, p.36-44, 2002.

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

HALL, G.M.; LUCKE, J.N.; LISTER, D. Malignant hyperthermia: pearls out of swine. **British Journal of Anaesthesia**, v.52, p.165-171, 1980.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research**, v.10, p.335-362, 1960.

HARRISON, G.G. Porcine malignant hyperthermia. **International Anaesthesiology Clinics**, v.17, p.25-61, 1979.

HERBRANDSON, C. Disponível em <<http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201McKinley/muscular.htm>>. Acesso em 16/10/2008.

HONIKEL, K. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, v.49, p.447-457, 1998.

HOPKINS, D.L.; THOMPSON, J.M. Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderization in beef and sheep meat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.53, p.149-166, 2002.

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

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

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

IMAJOH, S.; SUZUKI, K. Reversible interaction between Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. **FEBS Letters**, v.187, p. 47-50, 1985.

INOMATA, M.; KASAI, Y.; NAKAMURA, M.; KAWASHIMA, S. Activation mechanism of calcium activated neutral protease. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.19783-19787, 1988.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORRESTE, J. C.; HEDRICK, H. B.; MERKEL, R. A. **Principles of Meat Science**. 2ed. Iowa: Kendall/ Hunt Publishing Company, 1989. 351p.

KISSEL, C. **Carnes PSE (pale, soft, exudative) e análogo ao DFD (dark, firm, dry) de frango em embutidos cárneos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. In **Proceedings of 41st annual reciprocal meat conference**, Wyoming, USA, p.89-100, 1988.

KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J.D.; MERSMAN, H.J. Acceleration of *postmortem* tenderization in ovine carcasses though infusion of calcium chloride: Effect of concentration and ionic strength. **Journal of Animal Science**, v.67, p.934-942, 1989.

KOOHMARAIE, M.; WHIPPLE, G.; CROUSE, J.D. Acceleration of *postmortem* tenderization in lamb and brahman-cross beef carcasses though infusion of calcium chloride. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1278-1283, 1990.

KOOHMARAIE, M. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effect on myofibrils with u-calpain. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3697-3708, 1992a.

KOOHMARAIE, M. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle u-calpain. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3071-3080, 1992b.

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

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

KRISTENSEN, L.; PURSLOW, P.P. The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. **Meat Science**, v.58, p.17-23, 2001.

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

KUMAMOTO, T.; KLEESE, W.C.; CONG, J.; GOLL, D.E.; PIERCE, P.R.; ALLEN, R.E. Localization of the Ca²⁺-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. **Anatomica Record**, v.232, p.60-77, 1992.

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

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

LE BIHAN-DUVAL, E.; DEBUT, M.; BERRI, C.M.; SELLIER, N.; SANTÉ-LHOUELIER V; JÉGO, Y; BEAUMONT, C. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. **BMC Genetics**, 9:53, 2008.

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

MACLENNAN, D.H.; PHILLIPS, M.S. Malignant hyperthermia. **Science**, v.256, p.789-794, 1992.

MADDOCK CARLIN, K.R.; HUFF-LONERGAN, E.; ROWE, L.J.; LONERGAN, S.M. Effect of oxidation, pH, and ionic strength on calpastatin inhibition of u- and m-calpain. **Journal of Animal Science**, v.84, p.925-937, 2006.

MAKI, M.; TAKANO, E.; OSAWA, T.; OOI, T.; MURACHI, T.; HATANAKA, M. Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.10254-10261, 1988.

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

McKEE, S.R.; HARGIS, B.M.; SAMS, A.R. Pale, soft and exudative meat in turkeys treated with succinylcholine. **Poultry Science**, v.77, n.2, p.356-360, 1998.

McNAIR, R.E. Disponível em <<http://coe.unt.edu/mcnair/McNair/Notesfiles/Ch%2010%20-%20Muscle%20Tissue.ppt>>. Acesso em 16/10/2008.

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

MICKELSON, J.R.; LOUIS, C.F. Calcium (Ca²⁺) regulation in porcine skeletal muscle - Review, p.160-184 in: **Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors**. E. Poulanne and D. I. Demeyer, ed. CAB International, Wallingford, UK, 1993.

MILLER, M.F.; CARR, M.F.; RAMSEY, C.B.; CROCKETT, K.L.; HOOVER, L.C. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v.79, p.3062-3068, 2001.

MOLETTE, C.; RÉMIGNON, H.; BABILE, R. Effect of rate of pH fall on turkey breast meat quality. **British Poultry Science**, v.44, n.5, p.787-788, 2003.

MOLLER, A.J.; VESTERGAARD, T.; WISMER-PEDERSEN J. Myofibril fragmentation in bovine Longissimus dorsi as an index of tenderness. **Journal of Food Science**, 38:824, 1973.

NAKAMURA, M., INOMATA, M., IMAJOH, S., SUZUKI, S., KAWASHIMA, S. fragmentation of a endogenous inhibitor upon complex formation with high- and low-Ca-requiring forms of calcium-activated neutral proteases. **Biochemistry**, v.28, p.449-455, 1989.

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

OFFER, G.; TRINICK, J. On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils. **Meat Science**, v.8, p.245-281, 1983.

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

OLIVO, R.; FUKUSHIMA, P. S.; SHIMOKOMAKI, M. Carne PSE em Frangos. **Revista Nacional da Carne**, v.27, n.252, p.32-34, 1998.

OWENS, C.M.; HIRSCHLER, E.M.; MCKEE, S.R.; MARTINEZ-DAWSON, R.; SAMS, A.R. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative turkey meat in a commercial plant. **Poultry Science**, v.79, p.553-558, 2000a.

OWENS, C.M.; MCKEE, S.R.; MATTHEWS, N.S.; SAMS, A.R. The development of pale, soft, exudative meat in two genetic lines of turkey subjected to heat stress and its prediction by halothane screening. **Poultry Science**, v.79, n.3, p.430-435, 2000b.

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

PIETRZAK, M.; GREASER, M.L.; SOSNICKI, A.A. Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionally in Pectoralis major muscle of domestic turkeys. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2106-2116, 1997.

POSPIECH, E.; GREASER, M.L.; SOSNICKI, A.A. Titin changes in turkey breast muscle varying in quality. **Journal of Animal Science**, v.73, Suppl.1. (Abstract), p.161, 1995.

QIAO, M.; FLETCHER, D.L.; SMITH, D.P.; NORTHCUTT, J.K. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. **Poultry Science**, v.80, n.5, p.676-680, 2001.

ROBSON, R.M.; HUFF-LONERGAN, E.; PARRISH, F.C.; HO, C.Y.; STROMER, M.H.; HUIATT, T.W.; *et al.* Postmortem changes in the myofibrillar and cytoskeletal proteins in muscle. **Proceedings of the 50th annual reciprocal meat conference**, Iowa, USA, p.43-52, 1997.

ROWE, L.J.; LONERGAN, S.M.; ROTHCHILD, M.F.; HUFF-LONERGAN, E. Relationship between porcine *Longissimus dorsi* pH decline and u-calpain activity/autolysis and protein degradation. **Journal of Animal Science**, v.79 (Suppl.1), p.20 (Abstr), 2001a.

ROWE, L.J.; HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S.M. Desmin degradation influences water-holding capacity and tenderness of fresh pork. **Journal of Animal Science**, v.79 (Suppl. 1), p.443 (Abstract), 2001b.

SAIDO, T.C.; SUZUKI, H.; YAMAZAKI, H.; TANOUE, K.; SUZUKI, K. In situ capture of u-calpain activation in platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.7422-7426, 1993.

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

SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I.; KRIESE, P.R.; SOARES, A.L. Calpaínas e Calpastatinas. In: OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.G.M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. p.185-194.

SIMÕES, G.S.; ROSSA, A.; OBA, A.; MATSUO, T.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Influência do Transporte em frangos PSE e a-DFD. **Revista Nacional da Carne**, v.383, p.20-30, 2009.

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

SOARES, A.L. **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.

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

SOARES, A.L.; IDA, E.I.; MYIAMOTO, S.; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.W.; SHIMOKOMAKI, M. Phospholipase A2 activity in poultry PSE, pale, soft, exudative, meat. **Journal of Food Biochemistry**, v.27, n.4, p.309-320, 2003b.

SOLOMON, M.B.; VAN LAACK, R.L.J.M.; EASTRIDGE, J.S. Biophysical basis of pale, soft, exudative (PSE) pork and poultry muscle: a review. **Journal of Muscle Foods**, v.9, n.1, p.1-11, 1998.

SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium dependent protease distinct from both m- and u-types. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.20106-20111, 1989.

SORIMACHI, H.; TOYAMA-SORIMACHI, N.; SAIDO, T.C.; KAWASAKI, H.; SUGITA, H.; MIYASAKA, M. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.10593-10605, 1993.

SORIMACHI, H.; KINBARA, K.; KIMURA, S.; TAKAHASHI, M.; ISHIURA, S.; SASAGAWA, N. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.31158-31162, 1995.

SOSNICKI, A.A.; GREASER, M.L.; PIETRZAK, M.; POSPIECH, E.; SANTE, V. PSE-like syndrome in breast muscle of domestic turkeys: a review. **Journal of Muscle Foods**, v.9, p.13-23, 1998.

SWATLAND, H.J. Explaining the P in PSE. **Meat Focus International**, v.2, p.362-367, 1993.

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

SWATLAND, H.J. On line evaluation of meat. **Lancaster: Technomic**, 1995, 343p.

SWATLAND, H.J. How pH causes paleness or darkness in chicken breast meat. **Meat Science**, p.396-40, 2008.

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

USDA-Foreign Agricultural Service. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, Circular Series, April 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em 16/04/2009.

VEERAMUTHU, G.I.; SAMS, A.R. *Postmortem* pH, myofibrillar fragmentation, and calpain activity in Pectoralis from electrically stimulated and muscle tensioned broiler carcass. **Poultry Science**, v.78, p.272-276, 1999.

VAN LAACK, R.L.J.M.; LIU, C.-H.; SMITH, M.O.; LOVEDAY, H.D. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. **Poultry Science**, v.79, p.1057-1061, 2000.

WANG, L.J.; BYREM, T.M.; ZAROSLEY, J.; BOOREN, A.M.; STRASBURG, G.M. Skeletal muscle calcium channel ryanodine binding activity in genetically unimproved and commercial turkey populations. **Poultry Science**, v.78, n.6, p.792-797, 1999.

WOELFEL, R.L.; OWENS, C.M.; HIRSCHLER, E.M.; MARTINEZ-DAWSON, R.; SAMS, A.R. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. **Poultry Science**, v.81, p.579-584, 2002.

WHEELER, B.R.; MCKEE, S.R.; MATTHEWS, N.S.; MILLER, R.K.; SAMS, A.R. A halothane test to detect turkeys prone to developing pale, soft and exudative meat. **Poultry Science**, v.78, n.11, p.1634-1638, 1999.

WISMER-PEDERSEN, J. Quality of pork in relation to rate of pH change post mortem. **Food Research**, v.24, p.711-726, 1959.

ZHANG, L.; BARBUT, S. Effect of regular and modified starches on cooked PSE, normal and DFD chicken breast meat batters. **Poultry Science**, v.84, p.789-796, 2005.

ZHANG, W.G.; LONERGAN, S.M.; GARDNER, M.A.; HUFF-LONERGAN, E. Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and u-calpain to variation in water holding capacity of pork. **Meat Science**, v.74, p.578-585, 2006.

ZIMMERMAN, U.P.; SCHLAEPFER, W.W. Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1078, p.192-198, 1991.