**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mecanismos adaptativos em frangos submetidos a estresse térmico
agudo pré abate e suas implicações na funcionalidade protéica
muscular**

Carolina de Castro Santos

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2007**

Carolina de Castro Santos
Médico Veterinário

**Mecanismos adaptativos em frangos submetidos a estresse térmico
agudo pré abate e suas implicações na funcionalidade protéica
muscular**

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO FRANCISQUINE DELGADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Santos, Carolina de Castro

Mecanismos adaptativos em frangos submetidos a estresse térmico agudo pré abate e suas implicações na funcionalidade protéica muscular / Carolina de Castro Santos. - - Piracicaba, 2007.

57 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Bioclimatologia animal 2. Carcaça 3. Carne e derivados 4. Fisiologia animal
5. Frangos de corte I. Título

CDD 636.513

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedicatória

Ao Prof. Dr. Eduardo Francisquine Delgado, mestre, amigo e quase um pai, que mais que orientação profissional me ensinou lições para a vida toda.

Aos meus pais, incansáveis incentivadores da minha jornada com muito amor, carinho e paciência.

À Dra. Aparecida Carla de Moura Pedreira, grande amiga e idealizadora deste trabalho que sempre me incentivou e apoiou com suas palavras de força e carinho.

E principalmente aos animais, que são a fonte de todas as minhas ações e inspirações.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba, SP, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, pela consideração, pela coordenação do Projeto e por todo o auxílio prestado na execução do trabalho.

À Prof. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo, pela paciência, auxílio e disposição para a realização do Projeto.

Ao Prof. Dr. Iran José Oliveira da Silva e aos pós-graduandos do NUPEA, Marco Aurélio Neves da Silva e José Antônio Delfino Barbosa Filho pela colaboração e disposição durante a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Gérson Barreto Mourão e Dra. Cláudia Paro de Paz, pela realização das análises estatísticas.

À Maria Antônia Etchegaray, carinhosamente chamada de Tuka, técnica do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal, ESALQ, pela colaboração, disposição e amizade durante a realização das análises.

À Carla Maris Machado Bittar, responsável técnica do Laboratório de Bromatologia da ESALQ e ao técnico Carlos César Alves, pela colaboração na realização das análises.

À Nirlei A. Silva, técnica do Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ, pela colaboração e paciência durante o uso dos equipamentos.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, setor Não Ruminantes, ESALQ, em especial ao Alexandre Sebastião Soares, pela colaboração e amizade durante a realização do experimento.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP, campus de Pirassununga, pela concessão das instalações e pessoal para a realização deste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação, em especial Júlio Kuhn da Trindade, Felipe Tonato, Salim Jacaúna de Souza, José Fernando Guarín Montoya e Eric Franchi Leonardo, pela amizade, companheirismo, convívio e incentivo durante a execução dos trabalhos.

Aos amigos queridos Amanda Caravita, Carolina e Rodrigo Fontana, Teluira e Meire Andrade, pelo apoio, amizade, carinho e companheirismo.

Aos estagiários em especial à Priscila Robertina dos Santos, e colegas do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal, LAFA, pela amizade e colaboração na execução das análises.

À secretária da pós-graduação Giovana Maria de Oliveira pela colaboração e profissionalismo.

Aos secretários do departamento Vera Lúcia Durrer e José Luis Francqueschi Piedade pelo convívio, amizade e paciência durante a realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que me auxiliaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Resposta fisiológica das aves ao estresse térmico.....	11
2.1.1 Dissipação de calor.....	11
2.1.2 Parâmetros sanguíneos.....	12
2.1.2.1 Hematócrito.....	12
2.1.2.2 Creatina quinase.....	12
2.2 Macro e micro estrutura muscular.....	13
2.2.1 Transformação de músculo em carne: mudanças bioquímicas e físicas que ocorrem no animal após o abate.....	16
2.2.2 Fatores <i>ante mortem</i> que afetam metabolismo muscular após abate.....	16
2.3 Estresse térmico pré-abate e qualidade de carne.....	17
2.3.1 Efeito do estresse térmico agudo nas proteínas musculares.....	18
2.3.1.1 Ocorrência carne pálida, mole e exudativa (PSE).....	18
2.3.1.2 Proteínas miofibrilares: funções e modificações post mortem.....	18
2.3.1.2.1 Troponina-T.....	18
2.3.1.2.2 Vinculina.....	18
2.3.1.3 Alteração na funcionalidade das proteínas em carnes PSE.....	19
2.3.2 Capacidade de Retenção de Água (CRA) em carne de frangos.....	19
2.3.2.1 Alteração na permeabilidade das miofibrilas.....	20
2.3.2.2 Alteração na CRA em carnes PSE	20
2.3.3 Caracterização da carne PSE através do valor de L*	21
Referências.....	21
3 PERMEABILIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA DA MUSCULATURA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM CÂMARA CLIMÁTICA	

Resumo.....	28
Abstract.....	29
3.1 Introdução.....	29
3.2 Material e Métodos.....	31
3.2.1 Animais.....	31
3.2.2 Determinação dos parâmetros fisiológicos.....	31
3.2.3 Distribuição de água corporal.....	32
3.2.4 Análise Estatística.....	33
3.3 Resultados e Discussão.....	33
3.4 Conclusão.....	39
Referências.....	39
4 ALTERAÇÕES NAS PROTEÍNAS MUSCULARES (SARCOPLASMÁTICAS E MIOFIBRILARES) DECORRENTES DO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO	
Resumo.....	43
Abstract.....	43
4.1 Introdução.....	44
4.2 Material e Métodos.....	45
4.2.1 Funcionalidade Protéica.....	45
4.2.2 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI)	46
4.2.3 Extração das frações sarcoplasmáticas e miofibrilar.....	47
4.2.4 SDS-PAGE e Imunodeteção.....	47
4.2.5 Análise Estatística.....	48
4.3 Resultados e Discussão.....	49
4.4 Conclusão.....	55
Referências.....	55

RESUMO

Mecanismos adaptativos em frangos submetidos a estresse térmico agudo pré abate e suas implicações na funcionalidade protéica muscular

A produção de frangos de corte é um dos maiores segmentos em crescimento no mundo. É um importante fornecedor de proteínas para consumo humano, devido a sua facilidade e rapidez de produção. Devido a essa demanda, surgiram alguns problemas de manejo, que causam o aparecimento de problemas fisiológicos. Os problemas mais relevantes são relacionados com estresse, tanto físico como psicológico. No capítulo 1 estão descritas as alterações nas estruturas das miofibras e a distribuição de água na musculatura de frangos causada pelo estresse térmico em câmara climática. O estresse térmico pode causar alterações na fisiologia das aves, que levam a mudanças na cor, capacidade de retenção de água e maciez dos produtos cárneos, aspectos que influenciam diretamente na aquisição do produto pelo consumidor. Foram avaliados os seguintes parâmetros: hematócrito, creatina quinase plasmática, peso e rendimento de carcaça, vísceras, peito, pernas, asas e percentagem de água livre e ligada no peito. Conclui-se que a redução do hematócrito pode ser uma medida para prevenir uma possível hipovolemia devido à perda de água, principalmente pela hiperventilação. Embora exista efeito na estrutura da miofibrila devido ao estresse térmico agudo, a drenagem de água de tecidos e órgãos nesta condição parece não envolver os músculos da ave, especialmente a musculatura do peito. No capítulo 2, estão descritas as modificações estruturais ao nível das proteínas musculares, que compõem a fibra muscular. O estresse térmico agudo causa alterações nas propriedades das miofibrilas, que afetam as características funcionais da carne, principalmente a capacidade de retenção de água. O presente experimento teve como objetivo identificar mudanças na proteólise miofibrilar e migração entre as frações miofibrilar e sarcoplasmática, decorrentes do estresse térmico pré-abate, através do índice de fragmentação miofibrilar (MFI), SDS-PAGE das frações miofibrilar e sarcoplasmática e imunodeteção de vinculina. Concluiu-se que a taxa de fragmentação miofibrilar pode ser prejudicada pelo estresse térmico agudo e que modificações na fração sarcoplasmática são observados em carne pálida, independente da condição ambiental pré-abate.

Palavras-chave: Condição ambiental; Carcaça; Água livre; Proteína miofibrilar; SDS-PAGE; Imunodeteção

ABSTRACT

Adaptative mechanisms in broilers submitted to pre-slaughter acute heat stress and its relations with muscle protein functionality

The production of broiler chickens is one of the biggest segments in growth in the world. It is an important protein supplier for human consumption, due to its easiness and velocity of production. Owing to this demand, some handling problems occurred and cause the appearance of physiological problems. The most important problems are related with stress, in such a way physicist as psychological. In chapter 1 the alterations in the structures of myofibril and the water distribution in the muscle of broilers caused by acute heat stress in climatic chamber are described. Acute heat stress can change birds physiology and leads to alterations in the colour, water holding capacity and tenderness of meat products, factors that affect consumers purchase decision. The following parameters had been evaluated: hematocrit, plasmatic creatine kinase, weight and yield of carcass, viscera, breast, legs, wings, back and percentage of free water in the breast. It is concluded that the hematocrit and creatine kinase can change due to acute heat stress. The weight of carcass and its parts is not altered. The percentage of free and bound water can change due to acute heat stress. In chapter 2, the structural modifications of the muscular proteins are described. The proteins are responsible for the structure of myofibrils and are related with the physical and biochemical processes which determine the characteristics of the meat product. Acute heat stress (AHS) causes alterations in the properties of myofibrils affecting functional characteristics of the meat, mainly the water holding capacity. The present experiment aimed to identify changes in myofibrillar proteolysis and migration between the myofibrillar and sarcoplasmatic fractions due to pre-slaughter heat stress. The myofibrillar fragmentation index (MFI), SDS-PAGE of the muscle protein fractions and western blot of vinculin were used. It is concluded that AHS can be harmful in the process myofibrillar proteolysis. In the SDS-PAGE we observed modifications in sarcoplasmatic fraction, in pale meat, independent of the environmental condition.

Keywords: Environmental conditions; Carcass; Free water; Myofibrillar proteins; SDS-PAGE; Western blot

1 INTRODUÇÃO

Em 2005 a produção mundial de carne de frango foi de 71 milhões de toneladas, sendo os EUA, a China e o Brasil, respectivamente, os maiores produtores (FAO STAT, 2007). O segmento avícola é um importante fornecedor de proteínas, contribuindo com 27% do consumo humano, porcentagem essa que era de 12% nos anos 60. Contribuem parcialmente para este cenário a flexibilidade e relativa facilidade de produção (ciclo curto, intensiva). O aumento da demanda ocasionou uma pressão na produção com conseqüentes prejuízos devidos ao manejo incorreto desses animais. A intensificação do melhoramento genético para rápido crescimento e ganho de peso, também acarretou o aparecimento de alguns problemas fisiológicos.

Um dos maiores desafios fisiológicos para as aves está relacionado ao estresse térmico agudo antes do abate. Esta condição tem sido relacionada a um pH final mais baixo (HOLM; FLETCHER, 1997; SANDERCOCK et al., 1999), com redução da capacidade de retenção de água (SANDERCOCK et al., 1999; PETRACCI et al., 2001), e diminuição da maciez da carne (FRONING et al., 1978; HOLM; FLETCHER, 1997; PETRACCI et al., 2001).

O problema relacionado a queda rápida de pH da carne de aves, denominado PSE (carne pálida, mole e exsudativa), tem impacto no aspecto visual da carne a fresco, influenciando na escolha durante aquisição pelo consumidor, bem como na funcionalidade das proteínas que definem rendimento durante processamento industrial da carne.

Para tentar mitigar os efeitos do estresse térmico, as aves utilizam mecanismos a fim de controlar o aumento da temperatura corpórea, gerando grandes alterações no sistema cárdio-respiratório, circulatório e muscular. Essas alterações se refletem no hematócrito, no extravazamento de enzimas musculares e na estabilidade do produto cárneo.

O objetivo deste trabalho é verificar as alterações provocadas pelo estresse térmico agudo na estrutura muscular e das miofibrilas com possíveis impactos na funcionalidade protéica na carne de frangos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resposta fisiológica das aves ao estresse térmico

2.1.1 Dissipação de calor

As aves, sendo animais homeotermos, dispõem de um centro termorregulador, localizado no hipotálamo, capaz de controlar a temperatura corporal através de mecanismos fisiológicos e respostas comportamentais, mediante a produção e liberação de calor, determinando assim a manutenção da temperatura corporal normal (MACARI et al., 1994). Normalmente as asas são afastadas do corpo (aumentando a área de superfície) e as penas eriçadas, para permitir o resfriamento pela redução da insulação corporal. Internamente, a corrente sanguínea é desviada de órgãos como fígado, rins e intestinos para a circulação periférica, permitindo melhor troca de calor.

A perda de calor não evaporativo pode também ocorrer com o aumento da produção de urina, se esta perda de água for compensada pelo maior consumo de água fria (BORGES et al., 2003).

A melhor ferramenta de dissipação de calor utilizada pela ave é a hiperventilação (aumento da taxa respiratória ou ofegação). Este processo remove aproximadamente 540 calorias por grama de água perdida pelos pulmões. Entretanto necessita de grande esforço da musculatura, resultando num maior aporte de energia, gerando mais calor (BUTCHER; MILES, 1996). A morte ocorre rapidamente por exaustão, principalmente em aves mais pesadas.

A hiperventilação começa a ocorrer quando a temperatura ambiental está próxima dos 30°C. A umidade relativa do ar influencia negativamente o processo de hiperventilação, dificultando a perda de calor evaporativo (YAHAV et al., 1995; MALONEY, 1998).

Outro resultado do processo de hiperventilação relaciona-se com perda excessiva de dióxido de carbono (CO_2), diminuindo a pressão parcial de CO_2 (pCO_2), levando à queda na concentração de ácido carbônico (H_2CO_3) e hidrogênio (H^+). Esta alteração do equilíbrio ácido-base é denominada de alcalose respiratória.

2.1.2 Parâmetros Sangüíneos

2.1.2.1 Hematócrito

O sistema sangüíneo é particularmente sensível às mudanças de temperatura e se constitui em um importante indicador das respostas fisiológicas da ave a agentes estressores. Alterações quantitativas e morfológicas nas células sangüíneas são associadas ao estresse calórico, traduzidas por variações nos valores do hematócrito, número de leucócitos circulantes, conteúdo de eritrócitos e teor de hemoglobina no eritrócito (ALTAN et al., 2000).

O hematócrito é um parâmetro que mensura a proporção de células vermelhas no sangue. Embora exista relato de manutenção dos valores de hematócrito em frangos submetidos ao estresse térmico (ALTAN et al., 2000), existe a possibilidade de diminuição do hematócrito, provavelmente, decorrente da desidratação dos eritrócitos e retirada de água de compartimentos extra e intracelulares, especialmente de músculos e pele, para manutenção do volume plasmático. Estas modificações foram observadas em humanos durante exercício físico intenso em altas temperaturas ambientais (MAW et al., 1998).

Outro parâmetro sanguíneo, a relação heterófilo/linfócito, tem sido proposto como um índice sensível de estresse crônico em frangos de corte, que nestas condições aumentam os heterófilos e reduzem os linfócitos (GROSS; SIEGEL, 1983).

A concentração de corticosteróides sanguíneos também pode ser utilizada como medidor do nível de estresse ambiental em aves (EDENS et al., 1976), apesar de ser um parâmetro menos sensível ao estresse térmico.

2.1.2.2 Creatina quinase (CK)

A enzima CK é encontrada em praticamente todos os tecidos, envolvida nos processos de estocagem de energia nas células. A elevação da atividade de CK no plasma é considerada um bom indicador em processos de injúria, ou mudanças na integridade de membrana da célula muscular (MITCHELL; SANDERCOCK, 1995).

Em casos de injúria celular (alterações na permeabilidade do sarcolema das fibras musculares), ocorre um aumento na atividade plasmática dessa enzima, resultado do seu extravazamento para a corrente sangüínea (SILLER et al., 1978; LUMEIJ et al., 1988;

MITCHELL et al., 1992; MITCHELL; SANDERCOCK, 1995). A atividade dessa enzima aumenta com a idade e, além disso, a seleção genética para crescimento rápido induz alterações na estrutura das fibras musculares, elevando o efluxo de enzimas intracelulares (MITCHELL; SANDERCOCK, 1994).

O estresse térmico agudo induz a injúria, provocando miopatias (MITCHELL et al., 1992; MITCHELL; SANDERCOCK, 1995), fazendo com que a enzima migre da fibra muscular para o sangue.

2.2 Macro e microestrutura muscular

Cerca de 30 a 40% do peso vivo animal, incluindo o homem, consiste de músculo esquelético (PEARSON; YOUNG, 1989). O sistema muscular esquelético constitui a maior parte da musculatura do corpo, formando o que se chama popularmente de carne. Essa musculatura recobre totalmente o esqueleto e está presa aos ossos, sendo responsável pela movimentação corporal.

Nos músculos esqueléticos as fibras musculares estão organizadas em grupos de feixes. Cada conjunto de feixes é envolvido por uma fina lâmina de tecido conjuntivo, o epimísio, que também recobre o músculo inteiro. Do epimísio, partem septos de tecido conjuntivo que separam os feixes entre si, o perimísio. Cada feixe é envolvido então pelo perimísio. Cada fibra muscular é envolvida pelo endomísio.

A fibra muscular ou miofibra é uma célula, cilíndrica ou prismática, com comprimento variando de 3 a 12 centímetros e diâmetro de 10 a 100 micrômetros. Junto a membrana da célula, também conhecida como sarcoplasma aparecem muitos núcleos, dando a idéia da fibra ser constituída por várias células fusionadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

No sarcoplasma, como é denominado o citoplasma da fibra muscular esquelética, as proteínas filamentosas que compõe as miofibrilas, denominadas proteínas miofibrilares, constituem cerca de 50-55% das proteínas musculares. Outros 30-35% são compostos de proteínas sarcoplasmáticas (não compõe as miofibrilas), e os 10-15% restantes são compostos pelas proteínas do estroma (extracelulares) (GOLL et al., 1989). Grânulos de glicogênio também estão presentes no sarcoplasma em proporção relevante e com importância para o metabolismo energético das miofibras.

As muitas miofibrilas contráteis são constituídas por filamentos compostos por dois tipos principais de proteínas – a actina e a miosina. Estes miofilamentos de actina e miosina dispostos regularmente originam um padrão bem definido de estrias (faixas) transversais alternadas, claras e escuras. Essa estrutura existe somente nas fibras que constituem os músculos estriados.

As miofibrilas são constituídas por unidades que se repetem ao longo de seu comprimento, denominadas sarcômeros. A distribuição dos filamentos de actina e miosina varia ao longo do sarcômero. As faixas mais extremas e mais claras do sarcômero, chamadas banda I, contêm apenas filamentos de actina. Dentro da banda I existe uma linha que se cora mais intensamente, denominada linha Z, que corresponde a várias uniões entre dois filamentos de actina, com grande presença de alfa actinina. A faixa central, mais escura, é chamada banda A, cujas extremidades são formadas por filamentos de actina e miosina sobrepostos. Dentro da banda A existe uma região mediana mais clara – a banda H – que contém apenas miosina. Um sarcômero compreende o segmento entre duas linhas Z consecutivas e é a unidade contrátil da fibra muscular, pois é a menor porção da fibra muscular com capacidade de contração e distensão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A ultraestrutura do sarcômero apresenta algumas proteínas miofibrilares importantes para a manutenção da unidade básica de contração e integração entre sarcômeros. Embora existam vinte proteínas diferentes que compõem as miofibrilas, apenas seis constituem mais de 90% do total de proteínas das miofibrilas. Além da actina e miosina, merecem atenção titina, troponina e filamentos intermediários (e.g., vinculina) (HEDRICK et al., 1994; TAYLOR et al., 1995) (ver Figura 1).

Figura 1 - Macro e microestrutura do músculo estriado esquelético com detalhe da composição e localização de proteínas miofibrilares. (Junqueira & Carneiro, 2004 e Taylor et al., 1995, modificados)

2.2.1 Transformação de músculo em carne: mudanças bioquímicas e físicas que ocorrem no animal após o abate

O *rigor mortis* é um processo que faz parte da conversão do músculo em carne, caracterizado em enrijecimento da musculatura. Este processo decorre da formação de ligações cruzadas permanentes entre os miofilamentos de actina e miosina, formando a actomiosina, decorrente de condições que impossibilitam a geração de ATP pela quase completa exaustão das reservas energéticas (glicogênio) e queda do pH (De FREMERY; POOL, 1963). O rigor é dependente da temperatura, pH e quantidade de glicogênio presente na musculatura no pré-abate, ocorrendo de maneira mais rápida em aves (McKee et al., 1997) que em outros animais como suínos e bovinos (LAWRIE, 1953).

Durante o processo de *rigor mortis* podem ocorrer variações na taxa e extensão da queda natural do pH, que irão influenciar na qualidade final da carne. O problema visualmente relacionado com queda excessivamente rápida de pH na carne de aves é denominado PSE (do inglês “Pale, Soft and Exudative”, que significa carne pálida, mole e exsudativa), com implicações para outros parâmetros de qualidade (HEDRICK et al., 1994).

Dos atributos relacionados com a aparência da carne, a cor do músculo é certamente o mais variável e o mais importante na escolha para aquisição de produtos “in natura” pelo consumidor (MONTGOMERY et al., 2003).

Dentre os fatores que afetam atributos de qualidade da carne com impactos na aparência, os fatores *ante mortem*, desempenham um papel de destaque.

2.2.2 Fatores *ante mortem* que afetam o metabolismo muscular após abate:

Alguns fatores intrínsecos aos animais como idade ao abate, sexo, raça e tipo de músculo podem afetar as características sensoriais da carne (SAÑUDO et al., 1993; ZEOLA et al., 2002).

Além dos fatores genéticos, nutricionais e fisiológicos já extensivamente estudados (BERRI et al., 2001; ROÇA, 2000; HEDRICK et al., 1994), fatores ambientais

e suas interações com o animal, especialmente nos aspectos relacionados com estresse pré-abate, têm recebido crescente atenção.

O termo estresse é uma expressão genérica referente a ajustes fisiológicos (tais como ritmo cardíaco e respiratório, temperatura corporal e pressão sanguínea) que ocorrem durante a exposição do animal a condições adversas (estressores) (HEDRICK et al., 1994).

Agentes estressores pré-abate podem incluir altas ou baixas temperaturas ambientais (LEE et al., 1976; BARBUT, 2002; WOELFEL et al., 2002), intervalos de jejum e dieta hídrica (SAMS; MILLS, 1993; LYON et al., 1991) e manejo da ave viva antes do processamento (BARBUT, 2002; WOELFEL et al., 2002). A duração e a intensidade desses fatores afetam o metabolismo muscular *post mortem* e consequentemente a qualidade da carne.

Os fatores *ante mortem* atuam sobre as seguintes características da carne: capacidade de retenção de água (CRA), perda por gotejamento, cor, firmeza, maciez, sabor, suculência, capacidade de emulsificação das matérias primas, rendimentos do processo e cor dos produtos processados (HEDRICK et al., 1994).

2.3 Estresse térmico pré-abate e qualidade de carne

O estresse térmico pré-abate é um dos fatores ambientais que mais influencia na qualidade da carne provocando alterações ou características da síndrome PSE (NORTHCUTT et al., 1994).

Filés de peito de frango submetidos a estresse térmico exibem características similares à condição de PSE (pálida, mole e exsudativa) que ocorre na carne de suínos (VAN LAACK et al., 2000a,b; QIAO et al., 2002). A palidez e baixa CRA podem ser relacionadas a um baixo pH determinado após o rigor, denominado pH final (BARBUT, 1998).

2.3.1 Efeito do estresse térmico agudo nas proteínas musculares

2.3.1.1 Ocorrência de PSE

As proteínas desempenham papel fundamental nas propriedades funcionais da carne, como capacidade de retenção de água, capacidade de emulsificação e cor dos produtos cárneos. O estresse térmico causa denaturação das proteínas musculares, aceleração do processo de *rigor mortis* e pH final baixo (< 5.8), decorrentes da acelerada glicólise após o abate (SOSNICKI; WILSON, 1992). O valor baixo de pH, quando combinado com altas temperaturas da carcaça, causa denaturação das proteínas musculares (BRISKEY, 1964).

A perda da funcionalidade protéica devida a essa denaturação é considerada o fator primário para o desenvolvimento de carne com características de PSE (WARRIS; BROWN, 1987; FERNANDEZ et al., 1994; SANTOS et al., 1994).

2.3.1.2 Proteínas miofibrilares: funções e modificações post morte

2.3.1.2.1 Troponina

Trata-se de uma proteína regulatória por ser responsável pela inibição da interação entre actina e miosina no processo de contração (HEDRICK et al., 1994).

O fragmento de 28-32 kDa que aparece durante o processo de maturação ou após período de congelamento foi identificado como parte da troponina-T (Ho et al., 1994). Esta proteína miofibrilar caracteriza-se por ser a mais facilmente degradada no processo de maturação (MacBRIDE; PARRISH, 1977; OLSON; PARRISH, 1976).

O aparecimento deste fragmento na fração miofibrilar tem sido utilizado como indicador de amaciamento da carne. A troponina-T também parece ser uma das proteínas miofibrilares mais sensíveis ao processo de oxidação (ROWE et al., 2004).

2.3.1.2.2 Vinculina

É uma grande proteína do citoesqueleto com peso molecular de 130 kDa que tem a habilidade de se associar com outras proteínas do citoesqueleto (RUDIGER, 1998), sendo importante na estrutura do sarcômero. A sua fragilização durante o

processo de proteólise resulta em amaciamento da carne (KOOHMARAIE et al., 1995; TAYLOR et al., 1995).

2.3.1.3 Alterações na funcionalidade das proteínas em carnes PSE

A solubilidade das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares/citoesquelética, é reduzida em músculos de suínos susceptíveis ao estresse, que resultam em produção de carne PSE. Nestas condições, a degradação da proteína titina ocorre de maneira mais lenta (BOLES et al., 1992). Menor grau de fragmentação miofibrilar e maior resistência da banda Z ao processo proteolítico (desempenhado por protease dependente de cálcio) também foram observados em músculos de suínos com características de PSE (KANG et al., 1978). Estas mesmas características foram relatadas em carne de perus com PSE (SOSNICKI et al., 1998).

A enzima fosforilase, uma abundante proteína sarcoplasmática, sob condições de baixo pH e alta temperatura apresentou deposição nas miofibrilas em carnes de perus caracterizadas como PSE, demonstrando uma mudança entre as frações protéicas (PIETRZAK et al., 1997). Estes autores também relataram que a baixa extratibilidade das proteínas miofibrilares, em perus, é causada principalmente pela denaturação da miosina.

Carne suína com características PSE apresenta uma menor extratibilidade das proteínas miofibrilares, que seria causada pela precipitação das proteínas sarcoplasmáticas nas miofibrilas (BENDALL; WISMER-PEDERSEN, 1962).

2.3.2 CRA em carne de frango

A capacidade de retenção de água (CRA) é definida como a habilidade da carne em reter água sob a aplicação de forças externas, mecânicas ou térmicas (HEDRICK et al., 1994). A maioria da água na musculatura é retida pelas miofibrilas e pelo sarcolema, nas células musculares, feixes e entre os grupos musculares (OFFER; COUSINS, 1992). As miofibrilas são responsáveis pela CRA na carne (OFFER; TRINICK, 1983).

Na musculatura, a água se encontra sob três formas (livre, ligada às proteínas e imobilizada), de acordo com a distribuição dos elétrons, tornando-a carregada positiva ou negativamente. Essa água se associa com as proteínas musculares, que também são carregadas eletricamente, indicando o estado em que ela se encontra na musculatura. A água livre é aquela que se encontra retida por forças de ligação fracas. A água ligada (5%) pode ser retirada da musculatura sob a aplicação de forças mecânicas moderadas e a água imobilizada dificilmente pode ser retirada da musculatura, devido à sua forte ligação com as proteínas. (HEDRICK et al., 1994).

2.3.2.1 Alteração na permeabilidade das miofibrilas

A CRA da carne aumenta à medida que o pH se afasta do ponto isoelétrico (aproximadamente pH 5.2), criando um aumento nas cargas elétricas das proteínas (OFFER; KNIGHT, 1988).

Alguns mecanismos para se aumentar a CRA podem ser utilizados como a adição de cloreto de sódio (NaCl) e de fosfatos alcalinos como o pirofosfato. O NaCl aumenta a CRA pelo aumento da força iônica (HAMM, 1960), interferindo nas forças eletrostáticas que mantêm a estrutura miofibrilar, deixando mais espaço entre as fibras para a água se fixar. Os fosfatos alcalinos aumentam a CRA, aumentando a força iônica e o pH do sistema (TROUT; SCHIMIDT, 1983). Eles “quelam” íons divalentes, ligando os ânions de fosfato às proteínas e dissociando o complexo actina-miosina.

As mudanças na CRA ocorrem devido ao aumento de volume das miofibrilas (OFFER; TRINICK, 1983; PATERSON et al., 1988). O inchaço das miofibrilas pela entrada de água na estrutura miofibrilar ocorria na presença de NaCl e, se pirofosfato fosse adicionado, inchaço semelhante ocorria usando menores concentrações de NaCl.

2.3.2.2 Alterações na capacidade de retenção de água (CRA) em carnes PSE

Alterações de componentes estruturais, especialmente de filamentos de titina podem causar problemas de retenção de água em carnes PSE. A CRA tem seu valor aumentado pela expansão de miofibrilas e do conjunto filamentoso interno de cada

miofibrila (PATERSON et al., 1988). A manutenção da estrutura intacta das regiões onde correm os filamentos de titina, como observado em carnes PSE, pode restringir a CRA.

2.3.3 Caracterização da carne PSE através do valor de L^*

O valor de luminosidade (L^*) é um parâmetro que mensura a cor da carne por reflectância, através de um colorímetro. O instrumento calcula os valores de cor que podem ser expressos em sistemas diferentes. Os mais utilizados são o Hunter (1948) (L , a , b) e o CIE (L^* , a^* , b^*). O método de análise através do sistema Hunter L^* , a^*b^* foi sugerido como uma forma rápida e não invasiva de se detectar carne PSE (BARBUT, 1993).

A luminosidade tem alta correlação com as condições de carne PSE (BARBUT, 1993). A relação entre carne PSE e CRA também foi encontrada, relatando que quanto maior for o valor de L^* , menor será a CRA, além de a carne exibir uma textura mais macia (McCURDY et al., 1996; SOSNICKI et al., 1998). Amostras com o valor de $L^* \geq 49$ apresentam baixa CRA, o que pode ser um indicativo da ocorrência de PSE (BARBUT, 1997). Amostras de peito com valores de L^* altos, associadas a baixo pH final e baixa CRA são associadas com o mecanismo de ocorrência de PSE (WOELFEL et al., 2002). Associação do valor de L^* com pH também tem sido utilizada para detectar PSE (ODA et al., 2003; MOREIRA et al., 2003).

A vantagem desta análise é poder determinar o destino da carne e o tipo de processamento a ser usado a fim de se obter produtos dentro do padrão de qualidade.

Referências

ALTAN, Ö; ALTAN, A.; ÇABUK, M.; BAYRAKTAR, H. Effects of Heat Stress on Some Blood Parameters in Broilers. **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v. 24, p. 145–148, 2000.

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

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

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

BARBUT, S. **Poultry Products Processing – An Industry Guide**. Ed. CRC Press LLC, Ontário, Canada, 2002.

BENDALL, J.R.; WISMER-PEDERSEN, J.W. Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 27, p. 144-159, 1962.

BERRI, C.; WACRENIER, N.; MILLET, N. e BIHAN-DUVAL LE, E. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 833-838, 2001.

BOLES, J. A.; PARRISH JR, 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**, Albany, v. 70, n.2, p.454-464, 1992.

BORGES, S.A.; MAIORKA, A.; SILVA, A.V. F. Heat stress physiology and electrolytes for broilers. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.975-981, 2003.

BRISKEY, E. J. Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. **Advanced Food Research**, New York, v.13 p. 89-105, 1964.

BUTCHER, G. D.; MILES, R. **Heat Stress Management in Broilers**. Institute of Food and Agricultural Sciences, VM 65, University of Florida, 1996. Disponível em: www.edis.ifas.ufl.edu. Acesso em: 20 jul.2007.

de FREMERY, D.; POOL, M. F. The influence of post-mortem glycolysis on poultry tenderness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 28, p. 173-176, 1963.

EDENS, F. W.; SIEGEL, H. S. Modification of corticosterones and glucose responses by sympathetic agents in young chickens during acute heat exposure. **Poultry Science**, Ithaca, v. 55, p. 1704-1712, 1976.

FAO. Disponível em: <<http://www.faostat.org>>. Acesso em: 20 jul. 2007.

FERNANDEZ, X.; FORSLID, A.; TORNBERG, E. The effect of high post mortem temperature on the development of pale, soft and exudative pork: Interaction with ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v. 37, p.133–147, 1994.

FRONING, G.W.; BABJI, A.S.; MATHER, F.B. The effect of pre slaughter temperatures, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. **Poultry Science**, Ithaca, v. 57, n.3, p. 630-678, 1978.

GOLL, D.E.; KLEESE, W. C.; SZPACENKO, A Skeletal muscle proteases and protein turnover. In **Animal Growth Regulation**. CAMPION, D. R.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J. (Ed.). London: Plenum Publ., 1989. cap. 8, p. 141-182

GROSS, W.B.; SIEGEL, H.S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 27, p. 972-979, 1983.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research**, New York, v. 10, p. 355–463, 1960.

HEDRICK, H.B.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. **Principles of meat science**. 3rd.ed. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing, 1994. 354p.

HO, C.Y.; STROMER, M.H.; ROBSON, R.M. Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. **Biochimie**, Paris, v. 76, p. 369-375, 1994.

HOLM, C. G.; FLETCHER, D. Antemortem holding temperatures and broiler breast meat quality. **Journal of Applied Poultry Science Research**, Athens, v.6, p. 180-184, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KANG, C.G.; MUGURUMA, M.; FUKAZAWA, T.; ITO, T. Difference in Z-line removal between normal and PSE porcine myofibrils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 508–514, 1978.

KOOMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; LONERGAN, S.M. DOUMIT, M.E. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, Albany, v.73, p. 3596, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**, p. 91-100, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEE, Y. B.; HARGUS, G. L.; HAGBER, G. Effect of ante-mortem environmental temperatures on post-mortem glycolysis and tenderness in excised broiler breast muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 41, n. 4, p. 1466-1469, 1976.

LUMEIJ, J. T.; MEIDAM, M.; WOLFSWINKEL, J.; VAN DER, HAGE, M. H.; DORRENSTEIN, G. M. Changes in plasma chemistry after drug-induced liver disease or muscle necrosis in racing pigeons (*Columbia livia domestica*). **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 17, p. 865-874, 1988.

LYON, C.E.; PAPA, C.M.; WILSON JR., R.L. Effect of feed withdrawal on yields, muscle pH, and texture of broiler breast meat. **Poultry Science**, Ithaca, v. 70, p.1020-1025, 1991.

MacBRIDE, M.A.; PARRISH, F.C. The 30,000 dalton component of tender bovine *longissimus* muscle, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p.1627–1629, 1977.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994. 296p.

MALONEY, S. K. Heat storage, not sensible heat loss, increase in high temperature, high humidity conditions. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 54, p. 347-352, 1998.

MAW, G.J.; MACKENZIE, I. L.; TAYLOR, N.A.S. Human blood fluid distribution during exercise in hot, temperate and cool environments. **Acta Physiological Scandinavian**, Stockholm, v. 163, p. 297-304, 1998.

McCURDY, R. D.; BARBUT, S.; QUINTON, M. Seasonal effect on pale soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. **Food Research International**, Essex, v. 29, p. 363-366, 1996.

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**, Ithaca, v. 76, p.1616-1620, 1997.

MITCHELL, M. A.; SANDERCOCK, D. A. Creatine kinase isoenzyme profiles in the plasma of the domestic fowls (*Gallus domesticus*): effects of acute heat stress. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 59, p. 30-34, 1995.

MITCHELL, M. A; KETTLEWELL, P. J.; MAXWELL, M. H. Indicators of physiological stress in broiler chickens during road transportation. **Animal Welfare**, Washington, v. 1, p. 91-103, 1992.

MITCHELL, M. A; SANDERCOCK, D. A. Age dependent changes in plasma creatine kinase activity in broiler chickens. In: **EUROPEAN POULTRY CONFERENCE**, 9, 1994. **Anais...**Glasgow, 1994. ; p. 266-267.

MONTGOMERY, J.L.; PARRISH, F.C.; OLSON, D.G.; DICKSON, J.S.; NIEBULU, S. Storage and packaging effects on sensory and colour characteristics of ground beef, **Meat Science**, Barking, v. 64, p. 357–363, 2003.

MOREIRA, J.; MENDES, A.A.; GARCIA, E.A. Avaliação de desempenho, rendimento de carcaça e qualidade da carne do peito em frangos de linhagens de conformação versus convencionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.6, supl. 1, p.1663-1673, 2003.

ODA, S. Detecção de cor em filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 28, p. 30-34, 2003.

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

OFFER, G.; KNIGHT, P. The structural basis of water-holding in meat part 2: Drip losses. In: LAWRIE, R. (Ed.). **Developments in meat science**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 172–243.

OFFER, G; COUSINS, T. The mechanism of drip production: Formation of two compartments of extracellular space in muscle postmortem. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 58, p. 107–116, 1992.

OLSON, D.G.; PARRISH JR. F.C. Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n.2, p.506-509, 1977.

PATERSON, B.C.; PARRISH JR., F.C.; STROMER, M.H. Effects of salt and pyrophosphate on the physical and chemical properties of beef muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, p. 1258–1265, 1988.

PEARSON, A. M.; YOUNG, R. B. **Muscle and Meat Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 457p.

PETRACCI, M.; FLETCHER, D.L.; NORTHCUTT, J. K. The effect of holding temperature on live Shrink, processing yield, and breast meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 670-675, 2001.

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

QIAO, M.; FLETCHER, D.L.; NORTHCUTT, J.K.; SMITH, D.P. The relationship between raw broiler breast meat color and composition. **Poultry Science**, Ithaca, v. 81, p. 422-427, 2002.

ROÇA, R.O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2000. 202p.

ROWE, L.J.; MADDOCK, K.R.; LONERGAN S.M.; HUFF-LONERGAN, E. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of calpain, **Journal of Animal Science**, Albany, v. 82, p. 3254–3266, 2004.

RUDIGER, M. Vinculin and alpha-catenin: shared and unique fractions in adherens junctions. **Bioessays**, Cambridge, v. 20, p. 733-740, 1998.

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

SANDERCOCK, D. A., HUNTER, R. R., NUTE, G. R., HOCKING, P. M., MITCHELL, M. A. Physiological responses to acute heat stress in broilers: implications for meat quality? EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF POULTRY MEAT, 14, 1999, Bologna. **Proceedings...** Bologna, 1999. p. 271-276.

SANTOS C., L. C.; ROSERIO, H.G.; MELO, R. S. Incidence of different pork quality categories in a Portuguese slaughter house: A survey. **Meat science**, Barking, v. 38, p. 279-287, 1994.

SAÑUDO, C.A. La calidad organoléptica de la carne (IV): especial referencia a especie ovina. **Mundo Ganadero**, Madrid, v.2, p.67-69, 1993.

SILLER, W. G.; WIGHT, P. A. L.; MARTINDALE, L.; BANNISTER, D. W. Deep pectoral myopathy: an experimental simulation in the fowl. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 24, p. 267-268, 1978.

SOSNICKI, A.A., WILSON, B. W.; Relationships of focal myopathy of turkey skeletal muscle to meat quality. WORLDS POULTRY CONFERENCE, 19, 1992. Amsterdam. **Proceedings...**, Amsterdam, 1992. v.3 p. 43-46

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**, Trumbull, v. 9, p. 13-23, 1998.

TAYLOR, R.G. Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization **Journal of Animal Science**, Albany, v. 7, p. 1351-1367, 1995.

TROUT, G. R.; SCHMIDT, G. R. Utilization of phosphates in meat products. In RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 36, Fargo, 1983. **Proceedings...**, 1983. p. 24-27.

VAN LAACK, R.L.J.M.; LANE, J.L. Denaturation of myofibrillar proteins from chicken as affected by pH, temperature and adenosine triphosphate concentration. **Poultry Science**, Ithaca, v. 79, p. 104-105, 2000.

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

WARRIS, P. D.; BROWN, S. N. The relationship between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle. **Meat Science**, Barking, v. 20, p. 65-72, 1987.

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**, Ithaca, v. 81, p. 579-584, 2002.

YAHAV, S., GOLDFELD, S; PLAVNIK, I.; HURWITZ, S. Physiological responses of chickens and turkeys to relative humidity during exposure to high ambient temperature. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 245-253,1995.

ZEOLA, N.M.B.L.; SILVA SOBRINHO, A.G.; GONZAGA NETO, S. Influência de diferentes níveis de concentrado sobre a qualidade da carne de cordeiros Morada Nova. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.97, n.544, p.175-180, 2002.

3 PERMEABILIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA DA MUSCULATURA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM CÂMARA CLIMÁTICA

Resumo

O estresse térmico pré-abate é um dos fatores ambientais que mais influencia na qualidade e rendimento da carne. A sua ocorrência pode causar alterações na fisiologia das aves, que levam a mudanças na cor, capacidade de retenção de água e maciez dos produtos cárneos, aspectos que influenciam diretamente na aquisição do produto pelo consumidor. O presente experimento simulou em câmara climática condições de estresse térmico agudo (35°C; 75-85% UR) para se avaliar os seguintes parâmetros: hematócrito (Ht), atividade de creatina quinase plasmática (CK), perda de peso vivo (PPV, g), peso e rendimento de carcaça (PC, g; RC, %) e peito (PP, g; RP, %), peso das asas (PA, g), pernas (PPe, g), vísceras (PV, g) e percentagem de água livre (AgL) e ligada (Agl) no peito de frangos de corte. Os animais foram abatidos com 40, 42 e 44 dias de idade, com peso vivo médio de 2,85, 3,00 e 3,28 kg, em três diferentes dias de abate. Em cada dia de abate 10 animais foram pesados, colocados em caixa de transporte e submetidos a estresse térmico agudo (ET) por 2 horas. Simultaneamente, outros 10 animais foram mantidos em caixa em condição termoneutra (22°C, $\pm 83,66\%$ UR) pelo mesmo período de tempo (NET). Foi realizada coleta seriada de sangue em diferentes tempos (T0, T30, T60 e T120 min.), durante o período de confinamento em caixa, seguida pelo abate. Houve queda nos valores de Ht para as aves ET. A enzima CK apresentou maior atividade plasmática nos frangos submetidos a altas temperaturas, indicando modificações na estrutura das miofibras. Maior PPV ($P < 0,05$) foi observada nos animais ET ($112,0 \pm 6,1$ vs $56,2 \pm 5,2$ g). Somente no primeiro dia de abate os animais ET apresentaram maior PP e RP ($705,1 \pm 16,3$ vs $616,9 \pm 13,2$ g; $34 \pm 0,6$ vs $30 \pm 0,5$ %, respectivamente; $P < 0,01$). A quantidade de AgL e Agl foram diferentes ($P < 0,01$) entre aves ET e NET apenas aos 42 dias de idade ($3,4 \pm 0,15$ e $96,6 \pm 0,14$, e $2,4 \pm 0,15$ e $97,6 \pm 0,15$ %, respectivamente). Apenas os frangos NET apresentaram maior AgL e menor Agl aos 40 dias de idade. A redução do Ht indica uma medida para prevenir uma possível hipovolemia devido a perda de água, principalmente pela hiperventilação. Embora exista efeito na estrutura da miofibrila devido ao estresse térmico agudo, a drenagem de água de tecidos e órgãos nesta condição parece não envolver os músculos da ave, especialmente a musculatura do peito.

Palavras-chave: Condição ambiental; Hematócrito; Carcaça; Creatina quinase; Água livre

Permeability and water distribution in broiler chicken muscle submitted to acute heat stress in climatic chamber

Abstract

Acute heat stress (AHS) occurs in several physiological conditions and may depreciate broiler meat production and quality. Its occurrence can change birds physiology and leads to alterations in the colour, water holding capacity and tenderness of meat products, factors that affect consumers purchase decision. The present experiment aimed to simulate in climatic chamber conditions of AHS (35°C; 85% RH) to evaluate the following parameters: hematocrit (Ht); plasma creatine kinase activity (CK), weight loss (WL, g); carcass weight and yield (CW and CY, %); breast weight and yield (BW, g and BY, %); wing weight (WW), leg weight (LW); visceral weight (VW); breast free (BFW, %) and bound water (BBW, %) of broiler chickens. Animals were slaughtered with 40, 42 or 44 days of age, in three different slaughter times (ST) with average weight of 2.85 Kg (1st ST), 3.00 Kg (2nd ST) and, 3.28 Kg (3rd ST), respectively. In each ST, ten animals were weighed, placed into transport crates and submitted to AHS conditions for 120 min. Simultaneously, other 10 animals (NS) were evaluated in crates kept in room temperature (22°C). Blood was collected in different times of crate confinement (t0, t30, t60 e t120 min) followed by slaughter. The Ht values showed a decline ($P<0.01$) during crate confinement from 30.5 ± 0.6 (t0) to 26.9 ± 0.7 (t120), only for AHS birds. Plasma CK activity was higher for AHS birds, indicating myofibril injury. Higher WL ($P<0.05$) was observed for AHS broilers (112.0 ± 6.1 vs 56.2 ± 5.2 g). In the 1st ST, there were also higher BW and BY ($P<0.01$) for AHS broilers compared to NS (705.1 ± 16.3 vs 616.9 ± 13.2 g; 34 ± 0.6 vs 30 ± 0.5 %, respectively). Within ST, BFW was higher ($P<0.01$) in AHS compared to NS only in the 2nd ST (3.4 ± 0.15 vs 2.4 ± 0.15 %, respectively). The BFW in the 1st ST for NS broilers was higher compared to the others ST, and not different from AHS. The Ht reduction would be a preventive measure to avoid hipovolemia that may occur due to water loss mainly by transpiration. The drainage of water from body tissues during AHS may be concentrated in determined non-carcass tissues and/or groups of skeletal muscle, with a preservation of water in the breast.

Keywords: Environmental condition; Hematocrit; Carcass; Creatine kinase; Muscle Free water

3.1 Introdução

O Brasil situa-se em terceiro no mundo em termos de consumo de carne de frango, totalizando 7,095 mil toneladas (USDA-FAS, abril 2007). A média da quantidade de carne consumida por pessoa é de 36,4 kg por ano. A busca por eficiência nesta cadeia de grande demanda passa pela correção de pontos críticos no manejo pré abate. O estresse térmico pré abate, considerando especialmente as condições de transporte, é

um dos fatores ambientais que mais influencia na qualidade e rendimento da carne (WOOD; RICHARDS, 1975; NORTHCUTT et al., 1994).

Descoloração do peito de frangos e perus tem sido relacionada à manipulação das aves e ou temperaturas extremas suficientes para causar elevado estresse momentos antes do abate (BARBUT, 2002; WOELFEL et al., 2002). A mudança da aparência do filé de peito de frango motivou a comparação das suas características ao fenômeno do PSE (pálida, mole e exsudativa) verificado em carne suína (VAN LAACK et al., 2000a,b; QIAO et al., 2002).

Estresse térmico agudo em condições de alta temperatura e umidade que ultrapassam a condição inferior de estresse (CIE) provoca aumento de 4,7°C na temperatura corporal (MENTEN et al., 2006). Nessas condições a ave utiliza um processo compensatório, tentando restabelecer a homeostase térmica por mecanismos evaporativos através da hiperventilação (TEETER et al., 1985). A água mobilizada nesse processo provém da corrente sanguínea e da musculatura do animal. A alteração na volemia ocasiona variação nos valores de hematócrito.

Uma proporção considerável da água presente na musculatura interage de forma ordenada com as proteínas miofibrilares, e sua movimentação é inibida pela integridade das proteínas e da estrutura da bicamada lipídica do sarcolema (HONIKEL, 2004).

A mobilização de água e desidratação do tecido muscular pode ocasionar modificações estruturais na miofibrila como a alteração na permeabilidade do sarcolema que pode ser verificada pelo aumento de atividade da enzima creatina quinase (CK) no plasma (MITCHELL; SANDERCOCK, 1995).

A estrutura das miofibrilas também está relacionada com a capacidade de retenção de água (CRA) (HAMM, 1960; HONIKEL et al., 1986), a qual é reduzida em animais que sofreram estresse térmico (McKEE; SAMS, 1997). As propriedades físicas da carne (incluindo cor, textura, firmeza, suculência, maciez) são parcialmente dependentes da CRA (HEDRICK, 1994).

O objetivo deste trabalho é verificar as alterações fisiológicas provocadas pelo estresse térmico no balanço de água no sangue e impacto em órgãos, na integridade da miofibrila e da miofibrila.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais

Foram alojados em aviário experimental 750 frangos de corte da linhagem comercial Cobb com 1 dia de idade, no dia 24 de maio de 2006. Os animais foram criados em lotes mistos, na densidade de 12 aves por m², recebendo ração e água *ad libitum*. As aves foram abatidas aos 40, 42 ou 44 dias de idade com pesos médios de 2,8 (±), 3,0 (±) e 3,2 (±) kg, respectivamente.

Os abates ocorreram nos dias 3, 5 e 7 de julho de 2006 em Abatedouro Experimental. Um dia antes do primeiro abate as aves foram aleatoriamente separadas em três lotes de 200 animais, mantidos no mesmo galpão. Todas as aves sofreram jejum sólido de 8 horas pré-abate.

Em cada dia de abate, um grupo de 20 aves foi colocado em caixas de transporte (10 aves por caixa), sendo uma destinada ao estresse térmico agudo (ET) em câmara climática (35°C e 75 a 85% de UR por 2 horas) e a outra permanecendo no galpão em condições ambientais (22°C e 83±6,6 % de UR por 2 horas), compondo o grupo de animais sem estresse térmico agudo (NET). Após o tempo de exposição ao estresse a caixa era retirada da câmara e transportada em carro fechado por uma distância de 200 m até o abatedouro. A caixa contendo os animais da condição NET seguia no mesmo veículo.

3.2.2 Determinação dos parâmetros fisiológicos

3.2.2.1 Hematócrito e Creatina quinase

Imediatamente após a colocação da caixa na câmara climática foi realizada a primeira coleta de sangue, através de punção da veia da asa com tubo Vacuutainer, com anticoagulante (heparina). Outras três coletas foram realizadas nos tempos 30, 60 e 120 min de estresse térmico. As quatro coletas foram realizadas nas asas da mesma ave. Após o abate das aves estressadas, que tiveram o sangue coletado, o mesmo

procedimento de coleta de sangue foi repetido para as aves da outra caixa, mantida no galpão em condição NET. Para determinação do valor de hematócrito foi utilizado sangue total, segundo o método do microhematócrito (NCCLS, 2000). Logo após a coleta de amostras para esta determinação, o sangue foi centrifugado para obtenção de plasma, utilizado para avaliação da atividade de creatina quinase (CK).

O teste de creatina quinase foi realizado utilizando um kit comercial (CK-NAC método cinético - UV, marca Laborlab). A leitura da atividade foi realizada por espectrofotometria (Shimadzu UV 1601 PC) em 340 nm a 30°C para detecção da formação de NADP pela fosforilação de NAD por CK (INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY, 1980), com pequena modificação de volume. Foram colocados na cubeta 1,5 mL de solução reagente e 30 μ L da amostra de plasma, somente para ajustar volume que permitisse a leitura pelo espectrofotômetro.

3.2.3 Distribuição de água corporal

3.2.3.1 Peso das partes

As aves ET foram pesadas (balança digital, peso_{max}: 5 kg, peso_{min}: 1 g) antes de entrar na câmara climática e imediatamente após a sua saída. O mesmo foi feito com as aves NET, isto é, antes da colocação nas caixas e imediatamente antes do abate. Após o abate as carcaças foram evisceradas, pesadas e divididas em partes. As variáveis analisadas foram o peso de: carcaça, vísceras, peito, dorso, coxas e asas.

3.2.3.2 Água retida na musculatura do peito

Para a realização da análise com prensa hidráulica, metade do peito dos 20 animais foram enviados ao ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas- SP), mantidos em caixa com gelo, e analisados através da metodologia descrita por Grau e Hamm, 1952. Da outra metade do peito foram retiradas cinco gramas, picados em pedaços pequenos e colocados em estufa a 100°C durante 24 horas (AOAC, 1990) para obtenção da umidade total das amostras.

As frações de água na musculatura (livre e ligada) foram calculadas de acordo o procedimento de Hamm (GRAU; HAMM, 1957), com algumas modificações.

O cálculo foi realizado através das fórmulas:

$$\text{Umidade total (mg)} = \text{peso da amostra (amostra que foi colocada na prensa)} \times 1000 \times \text{umidade (\%)} \\ \text{Água livre (\%)} = \frac{\text{área total de superfície [pol}^2] - \text{área da carne [pol}^2]}{\text{Umidade total}} \times (61,10)$$

$$\text{Água ligada (\%)} = 100 - \text{Água livre (\%)}$$

3.2.4 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e 10 repetições, considerando cada ave como unidade experimental. As variáveis foram submetidas à ANOVA através do PROC GLM do SAS (SAS, 2000). Os valores de hematócrito foram analisados considerando o modelo de medidas repetidas no tempo. Nas análises das variáveis de peso de partes, foram incluídas como covariáveis no modelo estatístico os pesos inicial e final. Para a perda de peso corporal e peso de carcaça, a covariável peso inicial foi considerada. Já para as análises do rendimento de carcaça e peito, e água livre e ligada, apenas o peso final foi incluído como covariável. As diferenças entre médias foram analisadas pelo teste de Tukey-Kramer.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Parâmetros sanguíneos

Hematócrito (Ht)

Uma queda na leitura do valor de hematócrito foi observada quando os frangos completaram 120 minutos de exposição ao estresse térmico (Figura 1). Apesar das diferenças de idade entre as três datas de abate, não houve interação entre esta variável e a condição ambiental pré-abate.

Figura 1 - Valores de hematócrito de frangos de corte entre 40 e 44 dias de idade determinados em coleta seriada no tempo sob condições de estresse térmico (▨ - 35°C; 75-85% UR) e não estressados (□ - 22°C; 83±6,6% UR)

A queda nos valores de hematócrito em frangos com o aumento da temperatura ambiental pode ser esperada devido a possíveis alterações no volume e número dos eritrócitos (YAHAV, 2000). Por outro lado, a manutenção do hematócrito na ave em temperaturas ainda mais altas, pelo mesmo período de tempo, foi relatada anteriormente (ALTAN et al., 2000). A discrepância de resultados pode ser devida a diferenças significativas nas condições de umidade relativa dos experimentos e forma de coleta de sangue para determinação do comportamento do hematócrito.

Frangos submetidos às mesmas condições ambientais apresentaram hipertermia caracterizada pelo aumento da temperatura retal de 4,7°C (MENTEN et al., 2006). A alta umidade relativa combinada a altas temperaturas dificulta a troca de calor entre os frangos e o ambiente, levando a hipertermia (YAHAV et al., 1995; MALONEY, 1998). Esta condição extrema e aguda leva a hiperventilação para sobrepular a sobrecarga de calor corporal, podendo desenvolver alcalose respiratória (TEETER et al., 1985), com concomitante perda de água.

A queda dos valores de hematócrito observados pode ser reflexo da diminuição da viscosidade sanguínea sob altas temperaturas (ZHOU et al., 1999). Esta mudança pode advir de efluxo de água de compartimentos extracelulares para a corrente sanguínea, bem como redução do volume dos eritrócitos, como observado em humanos durante exercício físico intenso e alta temperatura ambiental (MAW et al., 1998).

Creatina quinase (CK)

A linhagem dos frangos utilizada neste experimento apresentou maior atividade da CK no plasma (Figura 2).

Figura 2 - Valores de atividade de CK (U L⁻¹) de frangos de corte entre 40 e 42 dias de idade, sob condições de estresse térmico (▨ - 35°C; 75-85% UR) e não estressados (□ -22°C; 83±6,6% UR)

Valores semelhantes de atividade plasmática de CK em frangos com idades entre 35 e 63 dias, bem como o aumento na atividade enzimática em condições de alta temperatura e umidade foram obtidos por Sandercock et al. (2001).

O estresse térmico também provoca aumento na atividade de CK plasmática em suínos, com efeitos deletérios na qualidade da carne (SOSNICKI, 1987).

A condição ambiental utilizada foi suficiente para causar elevação da atividade de CK nos frangos ET. Esta é uma indicação de mudanças na permeabilidade da membrana das células musculares (MITCHELL; SANDERCOCK, 1995).

3.3.2 Características físicas pré e pós abate

3.3.2.1 Perda de Peso Vivo

Os frangos submetidos às duas condições ambientais, isto é NET e ET, apresentaram peso vivo inicial e final semelhantes (Tabela 1). Os animais ET apresentaram maior perda de peso durante a contenção nas caixas de transporte.

A maior perda de peso dos animais ET era um resultado esperado devido ao processo de hiperventilação verificado naquelas aves, o que acarretou perda de grande quantidade de água. Maior perda de água, seguida por desidratação ocorre nas aves expostas a estas condições (ARAD et al., 1989).

Tabela 1 - Peso e perda de peso corporal de frangos entre 40 e 44 dias de idade, submetidos a diferentes condições ambientais

	Idade (dias)	Condição ambiental	
		ET ^ȳ	NET [†]
Peso Vivo Inicial (PVI, kg)	40	2,85±0,06	2,72±0,09
	42	3,00±0,09	2,98±0,06
	44	3,27±0,06	3,12±0,06
Peso Vivo Final (PVF, kg)	40	2,67±0,06	2,66±0,09
	42	2,9±0,09	2,92±0,06
	44	3,12±0,09	3,10±0,06
Perda de peso (PPV, g)	40	123,4±11,1 ^A	75,5±9,8 ^B
	42	101,4±8,9 ^C	47,5±8,9 ^D
	44	111,4±12,5 ^E	45,6±9,7 ^F

^ȳ ET (35°C; 75-85% UR); [†] NET (22°C; 83±6,6% UR); ^{ABCDEF} Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma linha indicam efeito (P<0,05) da condição ambiental na variável.

3.3.2.2 Peso da carcaça e partes, rendimento da carcaça e peito e distribuição de água na musculatura peitoral

O peso da carcaça e de algumas partes dos frangos representada por grandes massas musculares periféricas, como perna, asa e dorso, não foram alterados em animais submetidos a duas condições ambientais diferentes (ET e NET) (Tabela 2). O peso das vísceras também não mostrou nenhuma alteração que indicasse drenagem de água para controle de temperatura corporal e ou hipovolemia. Maior rendimento de carcaça foi obtido para os animais ET, podendo ser resultado do aumento de peso e rendimento do peito aos 40 dias de idade. Esse maior peso pode ser devido ao músculo do peito ter sido poupado de uma perda de água excessiva, já que ele possui baixa densidade de capilares.

A hipótese de drenagem de água da musculatura para fazer frente ao processo de perda de peso corporal representada quase exclusivamente como água expelida durante hiperventilação não foi confirmada. O modelo descrito em ratos sob condições de desidratação, apontava para a compensação da perda de fluido corporal realizada pela retirada de água de compartimentos extra e intracelulares, especialmente de músculos e pele (NOSE et al., 1983).

Em condições de desafio da termorregulação e aumento do tônus simpático, ocorre uma redistribuição do fluxo circulatório, com a vasoconstrição em órgãos internos, principalmente vísceras, e vasodilatação nas regiões periféricas, principalmente pele. Como as aves domésticas têm grande vascularização na barbela e na crista, uma eficiente troca de calor ocorre nessas regiões devido ao aumento do fluxo sanguíneo (MACARI et al., 1994). Portanto, conclui-se que os músculos não são bons candidatos a retirada de água para fazer frente a hipovolemia e hipertermia.

Nos frangos com 42 dias de idade a condição ambiental modificou a quantidade de água livre na musculatura do peito (Tabela 3). Houve também efeito da idade das aves NET sobre a distribuição de água no peito. A água livre foi maior e água ligada menor nas aves mais jovens, isto é aos 40 dias de idade. Em conjunto, os resultados parecem corroborar com a idéia de drenagem de água na musculatura do peito das aves NET e conservação da água na musculatura das aves ET.

Tabela 2 - Características de carcaça de frangos de corte entre 40 e 44 dias de idade submetidos a diferentes condições ambientais

Características de carcaça	Condição Ambiental		
	Idade (dias)	ET ^ȳ	NET [‡]
Peso da carcaça (PC, kg)	40	2,01±0,02	2,09±0,02
	42	2,03±0,02	2,07±0,02
	44	2,06±0,02	2,35±0,02
Rendimento da carcaça (RC, %)	40	70±0,01	70±0,01
	42	70±0,01	71±0,01
	44	72±0,01	70±0,01
Peso do peito (PP, g)	40	705,1±16,3*	616,9±13,2
	42	649,1±12,0	631,1±13,0
	44	679,4±16,9	643,2±14,1
Rendimento do peito (RP, %)	40	34± 0,6 *	30±0,5
	42	31±0,5	31±0,5
	44	32±0,6	32±0,5
Peso de vísceras (PV, g)	40	352,8±16,7	329,6±13,6
	42	334,4±12,3	317,9±13,3
	44	303,4±17,3	312,9±14,4
Peso das asas (PA, g)	40	244,8±4,2	243,9±3,4
	42	241,5±3,1	248,9±3,4
	44	242,4±4,4	248,7±3,7
Peso das pernas (PPe, g)	40	286,1±6,9	291,5±5,6
	42	290,6±5,1	295,9±5,5
	44	295,1±7,1	289,2±5,9
Peso do dorso (PD, g)	40	299,2±8,1	300,7±6,6
	42	293,4±6,0	308,6±6,4
	44	299,9±8,4	272,4±6,7

^ȳET (35°C; 75-85% UR); [‡]NET (22°C; 83±6,6% UR); * Efeito significativo (P<0,05) dentro da mesma linha.

Tabela 3 - Proporção de água livre e ligada presentes na musculatura peitoral de frangos de corte, entre 40 e 44 dias de idade, submetidos a diferentes condições ambientais

		Condição ambiental			
		ET ^ȳ		NET [‡]	
		AgL*	AgI ⁺	AgL	AgI
		%		%	
Idade (dias)	40	3,5±0,19	96,5±0,19	3,5±0,17 ^a	96,5±0,17 ^a
	42	3,4±0,15 ^A	96,6±0,14 ^C	2,4±0,15 ^{Bb}	97,6±0,15 ^{Db}
	44	2,7±0,20	97,3±,20	2,7±0,16 ^b	97,3±0,16 ^b

^ȳET (35°C; 75-85% UR); [‡]NET (22°C; 83±6,6% UR); *AgL: Água livre; ⁺AgI: Água ligada; ^{ABCD}Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma linha e para a mesma variável indicam efeito significativo (P<0,05) da condição ambiental; ^{ab}Letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam efeito significativo (P<0,05) da idade.

3.4 Conclusões

O estresse térmico agudo foi suficiente para causar alterações significativas no hematócrito dos frangos, devido a grande perda de água na hiperventilação. O estresse também causou alterações na estrutura das miofibras, permitindo extravazamento de CK. As alterações devido ao estresse não influenciaram negativamente o peso de partes componentes da carcaça. A relação entre água livre e ligada na musculatura do peito pode sofrer mudanças devido ao estresse térmico.

Referências

ALTAN, Ö; ALTAN, A.; ÇABUK, M.; BAYRAKTAR, H. Effects of Heat Stress on Some Blood Parameters in Broilers. **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v. 24, p. 145–148, 2000.

AOAC Official Methods of analysis .15th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

ARAD, Z.; MIDTGARD, U.; BERNSTEIN, M. Thermoregulation in turkey vultures: vascular anatomy, arteriovenous heat exchange and behaviour. **The condor**, Santa Clara, v. 91, n. 3, p. 505-514, 1989.

BARBUT, S. **Poultry Products Processing – An Industry Guide**. Ontario: Ed. CRC Press, 2002.

GRAU, R.; HAMM, R. Über das Wassersbindungsvermögen des Säugetiermuskels. II Mitt. Über die Bestimmung der Wasserbindung des Muskels. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung** v. 105, p. 446–460, 1957.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research**, New York, v.10, p. 355–463, 1960.

HONIKEL, K. O.; REAGAN, J. O. Influence of different chilling conditions on hot-boned pork. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 3, p. 766-768, 1986.

HONIKEL, K. O. Water Holding Capacity of meat. In: PAS, M.F.W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. **Muscle Development of Livestock Animals**: Physiology, Genetics and Meat Quality. Cambridge, MA: CABI Publishing, 2004. p. 389-400.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY (IFCC) **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, p. 105-147, 1980.

MAW, G.J.; MACKENZIE, I. L.; TAYLOR, N.A.S. Human blood fluid distribution during exercise in hot, temperate and cool environments. **Acta Physiological Scandinavian**, Stockholm, v.163, p. 297-304, 1998.

MALONEY, S. K. Heat storage, not sensible heat loss, increase in high temperature, high humidity conditions. **World's Poultry science Journal**, Ithaca, v. 54, p. 347-352, 1998.

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**, Ithaca, v. 76, p.1616-1620, 1997.

MENTEN, J. F. M.; BARBOSA FILHO, J. A. D.; SILVA, M. A. N.; SILVA, I. J. O.; RACANICCI, A. M. C.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M. Physiological responses of broiler chicken to pre-slaughter heat stress. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE (EPC), 2006, **Book of abstracts...** suppl., v. 62, p.254, 2006. **World's Poultry Science Journal**.

MITCHELL, M. A.; SANDERCOCK, D. A. Creatine kinase isoenzyme profiles in the plasma of the domestic fowls (*Gallus domesticus*): effects of acute heat stress. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 59, p. 30-34, 1995.

NCCLS. **Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method; Approved Standard**. 3rd ed. [NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne 2000. (NCCLS document H7-A3)]

NORTHCUTT, J. K. **Influence of antemortem treatment on postmortem muscle properties of poultry meat**. 1994. 175 p. Thesis-(Ph.D.) - North Carolina State University, Raleigh, NC, 1994.

NOSE, H; MORIMOTO, T; OGURA, K. Distribution of Water Losses among Fluid Compartments of Tissues under Thermal Dehydration in the Rat. **Japanese Journal of Physiology**, Kyoto, v. 33, p. 1019-1029, 1983.

QIAO, M.; FLETCHER, D.L.; NORTHCUTT, J.K. e SMITH, D.P. The relationship between raw broiler breast meat color and composition. **Poultry Science**, Ithaca, v. 81, p. 422-427, 2002.

SANDERCOCK, D. A.; HUNTER, R. R.; NUTE, G. R.; MITCHELL, M. A. ; HOCKING, P. M. Acute Heat Stress-Induced Alterations in Blood Acid-Base Status and Skeletal Muscle Membrane Integrity in Broiler Chickens at Two Ages: Implications for Meat Quality. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 418–425, 2001.

SAS Institute **SAS Language and procedures**: usage. Version 8.1. Cary: SAS Institute, 2000.

SOSNICKI, A. Association of micrometric traits on meat quality, fattening and slaughter traits in the pig. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 64, p. 1412-1418, 1987.

TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; OWENS, F. N.; ARP, S. C. Chronic Heat Stress and Respiratory Alkalosis: Occurrence and treatment in broiler chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 64, p. 1060-1064, 1985.

USDA - United States Department of Agricultural - Foreign Agricultural Service. **Livestock and Poultry: world markets and trade**. 2007. (Circular Series DL&P 1-07)

VAN LAACK, R.L.J.M.; LANE, J.L. Denaturation of myofibrillar proteins from chicken as affected by pH, temperature and adenosine triphosphate concentration. **Poultry Science**, Ithaca, v. 79, p. 104-105, 2000a.

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

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**, Ithaca, v. 81, p. 579-584, 2002.

WOOD, D.F., RICHARDS, J.F. Effect of some antemortem stressors on post-mortem aspects of chicken broiler pectoralis muscle. **Poultry Science**, Ithaca, v. 54, p. 528-531, 1975.

YAHAV, S., GOLDFELD, S; PLAVNIK, I.; HURWITZ, S. Physiological responses of chickens and turkeys to relative humidity during exposure to high ambient temperature. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 245-253, 1995.

YAHAV, S. Relative humidity at moderate ambient temperatures: its effects on male broiler chickens and turkeys. **British Poultry Science**, London, v. 41, p. 94-100, 2000.

ZHOU, W. T.; FUJITA, M; YAMAMOTO, S. Effects of ambient temperatures on blood viscosity and plasma protein concentration of broiler chicken (*Gallus domesticus*). **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 24, p. 105-112, 1999.

4 ALTERAÇÕES NAS PROTEÍNAS MUSCULARES (SARCOPLASMÁTICAS E MIOFIBRILARES) DECORRENTES DO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Resumo

As proteínas são responsáveis pela estrutura das miofibrilas e são relacionadas com os processos físicos e bioquímicos que determinam as características do produto cárneo. O estresse térmico agudo causa alterações nas propriedades das miofibrilas, que afetam as características funcionais da carne, principalmente a capacidade de retenção de água. O presente experimento teve como objetivo identificar mudanças na proteólise miofibrilar e migração entre as frações miofibrilar e sarcoplasmática, decorrentes do estresse térmico pré-abate, através do índice de fragmentação miofibrilar (MFI), SDS-PAGE das frações miofibrilar e sarcoplasmática e imunodeteção de vinculina. Os animais foram abatidos com 40, 42 e 44 dias de idade, em três diferentes dias de abate. Em cada dia de abate os animais foram colocados em caixas de transporte e submetidos a estresse térmico agudo por 2 horas. Simultaneamente, os outros grupos de animais foram mantidos em caixa em condição termoneutra (22°C, $\pm 83,66\%$ UR) pelo mesmo período de tempo (NET). Após o abate o músculo do peito foi coletado e mantido refrigerado, em caixa com gelo, até a retirada de todas as amostras (0, 1, 2, 6 e 24 horas pós-abate). A amostragem foi realizada de acordo com o valor de luminosidade ($L^* < 49$, normal e > 51 , alto), parâmetro usado posteriormente para se realizar as análises de SDS PAGE e imunodeteção. Para a determinação do MFI, o valor de L^* não foi fator determinante. A cinética do MFI demonstrou que a taxa de fragmentação foi superior nos animais NET, indicando que o estresse térmico pode ser prejudicial no processo de proteólise miofibrilar. Já no SDS-PAGE para Troponina, ocorreram padrões que indicam fragmentação nos tempos 6 e 24 horas, independente do valor de L^* . Apenas nas amostras de 24 horas os fragmentos de 28 a 32 kDa indicaram um padrão diferenciado entre aves ET e NET. Na imunodeteção, a vinculina não se mostrou um bom indicador de alterações no processo de fragmentação, devido à condição ambiental.

Palavras-chave: Índice de fragmentação; Imunodeteção; Troponina; Vinculina; Luminosidade

Abstract

The proteins are responsible for the structure of myofibrils and are related with the physical and biochemists processes which determine the characteristics of the meat product. Acute heat stress (AHS) causes alterations in the properties of myofibrils affecting functional characteristics of the meat, mainly the water holding capacity. The present experiment aimed to identify changes in myofibrillar proteolysis and migration between the myofibrillar and sarcoplasmatic fractions due to pre-slaughter heat stress. The myofibrillar fragmentation index (MFI), SDS-PAGE of the muscle protein fractions and western blot of Vinculina were determined. The animals had been slaughtered at 40, 42 and 44 days of age, in three different days. In each slaughter time, animals were placed in transport crates and submitted AHS for 2 hours. Simultaneously, the other

animals had been kept in crates under thermoneutral condition (22°C , $\pm 83.66\%$ RH) for the same period of time (NS). After slaughter, the breast muscle was collected and kept cooled, in box with ice, until the withdrawal of all the samples (0, 1, 2, 6 and 24 hours after slaughter). The sampling was carried through in accordance with the lightness value (normal $L^* < 49$, and high > 51). This parameter was used later to perform the SDS-PAGE and western analyses. During the determination of the MFI, the L^* value was not used for sampling. The MFI kinetics showed that the fragmentation rate was superior in animals NET, indicating that AHS can be harmful in the process of myofibrillar proteolysis. In the SDS-PAGE for Troponin fragments, there were indication of fragmentation in both times 6 and 24 hours after slaughter, independent of the L^* value. However, at 24-hour samples the 28 – 32 kDa fragments indicated a differentiated pattern between birds AHS and NS. The western of vinculin did not show alterations in the myofibrillar fragmentation related to pre-slaughter environmental conditions.

Keywords: Fragmentation index; Western blot; Troponin; Vinculin; Lightness

4.1 Introdução

Algumas proteínas estão envolvidas em estrutura e elasticidade das miofibrilas e, são normalmente relacionadas com processos de proteólise, solubilização, oxidação e denaturação que determinam as características do produto cárneo.

O estresse térmico agudo (ET) tem sido relacionado com alterações nas propriedades funcionais (cor, capacidade de retenção de água) da carne de perus (PIETRZAK et al., 1997), por causar denaturação (BRISKEY, 1964) e oxidação protéica (NAKASHIMA et al., 2004) prejudicando os processo de proteólise e portanto, maciez (WOOD; RICHARDS, 1975). Estas alterações podem comprometer algumas características importantes de proteínas, que ditam a funcionalidade destas no processamento da carne, em especial a capacidade de reter água que parece estar relacionada com o afrouxamento da estrutura miofibrilar (HAMM, 1960; HONIKEL et al., 1986).

Os efeitos de condições pré-abate sobre a taxa e extensão do processo proteolítico podem ser verificados pela determinação do índice de fragmentação miofibrilar (MFI). A fragmentação ocorre devido a um sistema composto por proteases cálcio dependentes, conhecidas como calpaínas, que favorecem o amaciamento da carne (GOLL et al., 1992). O estresse térmico causa denaturação das proteínas

miofibrilares (BRISKEY, 1964), podendo interferir no processo de fragmentação das miofibrilas.

Proteínas como a troponina T, importante constituinte das proteínas miofibrilares (HEDRICK, 1994), são facilmente degradadas nos processos proteolíticos (MacBRIDE; PARRISH, 1977; OLSON; PARRISH, 1977), e a vinculina, que juntamente com a desmina e α -actinina (citoesqueleto) mantém a estrutura das miofibrilas, e também sofre proteólise post mortem (TAYLOR et al., 1995) são boas candidatas para verificação de modificações do processo proteolítico.

Uma forma de se verificar alterações na funcionalidade protéica da carne é através do valor de luminosidade (L^*), que apresenta alta correlação com as condições de carne PSE (BARBUT, 1993). Quanto maior o valor de L^* , menor a CRA (McCURDY et al., 1996; SOSNICKI et al., 1998). Valores de $L^* > 49$ são indicativos de carne com alterações na funcionalidade das proteínas (BARBUT, 1997).

O objetivo deste trabalho é identificar mudança na proteólise de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, e sua relação com estresse térmico agudo no pré-abate e coloração (luminosidade) do peito de frango.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Funcionalidade protéica

4.2.1.1 Obtenção das amostras de carne

Em todos os dias de abate foram coletados amostra dos músculos do peito (*Pectoralis major*) de animais que sofreram estresse térmico agudo pré-abate (ET; 35°C, 75-85% de UR, 2 horas) e aves que não foram submetidas às mesmas condições de estresse (NET; 22°C, 83±6,6 de UR) durante um período de 2 horas que foram mantidas em caixas de transporte numa densidade de 10 aves por caixa. A amostragem foi realizada de acordo com o valor de luminosidade ($L^* < 49$, normal e > 51 , alto), parâmetro usado posteriormente para se realizar as análises de SDS PAGE e imunodeteção. Para a determinação do MFI, o valor de L^* não foi fator determinante.

Após o abate dos animais, as carcaças foram depenadas, mantidas no chiller por 30 min (até a temperatura interna atingir 0-2°C) e evisceradas. Após a sua pesagem, a carcaça foi separada em partes e o peito foi coletado para realização das análises.

A avaliação do parâmetro luminosidade (L^*) foi obtida pelo colorímetro Minolta Chroma Meter CR-508d no sistema CIELAB, logo após a separação do peito da carcaça. Aproximadamente 30 minutos pós-abate foi coletada a primeira amostra (Tempo 0). Os peitos então eram embalados em sacos plásticos e mantidos em caixas com gelo, até a coleta de todas as amostras (1, 2, 6 e 24 horas pós-abate). Todas as amostras foram congeladas, imediatamente após sua coleta, e mantidas em nitrogênio líquido até serem analisadas.

4.2.1.2 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI)

Para obtenção do homogenato e da fração miofibrilar para a determinação do MFI, utilizou-se o método descrito por Culler et al. (1978), com algumas modificações como segue: 3 g de carne foram homogeneizadas em 10 volumes de tampão de MFI (100mM de KCl, 20mM de KH_2PO_4 , 20mM de K_2HPO_4 , 1mM de EDTA, 1mM de MgCl_2 , pH 7.0, 1mM de NaN_3) a 4°C, em liquidificadores Waring a 10X000 rpm, totalizando três homogeneizações de 30 segundos cada. As amostras foram centrifugadas a 1000 X g_{max} por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense com o mesmo volume inicial de tampão de MFI, seguindo-se mais duas centrifugações do mesmo modo, sendo que a última ressuspensão é feita com metade do volume inicial de tampão de MFI. O material é filtrado com peneira fina e armazenado em geladeira.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de biureto (GORNALL et al., 1949). A solução de miofibrilas foi diluída a 0,75 e 1,5 mg de proteína/ml de solução num volume final de 8 ml. A absorbância foi determinada com espectrofotômetro (Coleman 295) a 540 nm, de acordo com Culler et al., 1978.

4.2.1.3 Extração das frações sarcoplasmática e miofibrilar

Para extração, 2 g de músculo foram homogeneizados em 3 volumes de tampão de homogeneização (100mM de Tris-HCl, pH 8.3 a 4°C, 10mM de EDTA, 10mM de 2-mercaptoetanol e uma mistura de antiproteinasas: 6mg/L de Leupeptina, 100mg/L de Ovomucóide e 2mM de PMSF. O homogenato foi centrifugado a 37.500 X g_{max} por 120 minutos.

Após a centrifugação, amostras do sobrenadante foram coletadas para determinação da proteína total através do método do biureto. O mesmo foi feito com o precipitado. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) e depois mantidas congeladas em freezer -20°C até a sua utilização.

4.2.1.4 SDS PAGE e Imunodeteção

Para eletroforese, 50 μ g da amostra proveniente do precipitado obtido após centrifugação do homogenato do músculo, foram colocadas em cada poço do gel de poliacrilamida (37,5:1). De acordo com o tamanho da proteína a ser identificada, foram feitos géis em diferentes concentrações. Fragmentos de degradação de Troponina-T em géis a 12% e de Vinculina em géis a 9%, com “stacking” gel de 4% através do sistema Mini Protean II, (Bio-Rad). Os padrões de proteína utilizados foram: Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad), para troponina-T e Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (Bio-Rad) para a vinculina.

As amostras foram colocadas nas placas e inseridas nas cubas de corrida contendo tampão de glicina (0,192M de glicina, 0,025M de Tris base, 0,1 % de SDS a 10%, pH 8.3). A voltagem utilizada nas corridas foi de 120 V e o tempo de aproximadamente 90 min para todos os géis.

No caso da imunodeteção de vinculina, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond -P, Pharmacia Amersham Biosystem) em tampão contendo 25mM de Tris-HCl, pH 8.2, 193mM de glicina e 15% de metanol, em cubas de transferência, por 12 horas a 400 mA.

Para evitar a ligação de anticorpos inespecíficos durante a imunodeteção, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado e TBS (Tris-HCl, pH 7.0, 0,9% de NaCl e 0,02% de NaN_3). Depois foram feitas 3 lavagens, durante 1 hora com TBS puro.

As membranas foram incubadas com anticorpos primários durante 1 hora da seguinte maneira: anti-vinculina (Clone VIN-11-5, Sigma V 4505) diluído 1:75 em 5% BSA em TBS. O anticorpo secundário foi fosfatase alcalina conjugada (anti-mouse IgG, Sigma A 2418) diluído 1:10.000. O processo de incubação também durou 1 hora. Após isso, foram realizadas mais 3 lavagens com TBS por 1 hora. A ligação dos anticorpos foi observada pela exposição ao BCIP/NBT (Calbiochem, 203790), substrato que detecta a atividade da enzima fosfatase alcalina.

4.2.1.5 SDS-PAGE de fragmentos de Troponina-T

Para a detecção destes fragmentos foram usadas amostras de precipitado. Após a corrida, o gel foi colocado em corante Comassie blue (MORRISSEY, 1981), durante quatro horas, em plataforma de agitação contínua. Depois foi descorado com solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético, durante uma hora. Posteriormente o gel foi lavado com água destilada e foi feita a fotografia com câmera digital (Kodak DC120). Os fragmentos de Troponina-T, entre 27 e 35 kDa são identificados no gel através do padrão que foi colocado junto com as amostras antes da corrida.

4.2.1.7 Análise Estatística

A análise da cinética do índice de fragmentação miofibrilar durante as primeiras 24 horas pós-abate foi realizada pela seguinte função exponencial (RILEY et al., 2003):

$$\text{MFI} = \kappa_0 + \kappa_1 \exp [\kappa_2 \times t_i] + \varepsilon_i,$$

onde κ_0 representa MFI máximo 24 horas pós-abate, κ_1 representa a diferença entre MFI inicial e máximo, κ_2 representa a taxa de crescimento do MFI, t_i é o tempo (horas) pós-abate e ε_i é o erro associado com a observação dos dados. A análise foi realizada usando o procedimento NLMIXED do SAS (2000). Os dados de cada tratamento foram

separados em curvas individuais. Os parâmetros foram comparados para avaliar diferenças entre tratamento.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Cinética do índice de fragmentação miofibrilar (MFI)

Duas concentrações de proteína foram utilizadas para determinação de MFI, ambas superiores ao método padrão descrito por Culler et al. (1978). A razão para utilização destas concentrações deve-se ao fato de obtermos leituras muito abaixo dos padrões previamente observados, inclusive em ensaio preliminar. Nas amostras utilizadas neste experimento foi verificada uma fragmentação elevada, mesmo após seis horas após abate, conforme pode ser observado nas fotomicrografias (Figura 1). As leituras aumentaram de forma linear com o aumento da concentração de proteína (Figura 2).

Figura 1 - Fotomicrografia em contraste de fase da fração miofibrilar de músculo peitoral (objetiva 10X), obtidas nos tempos 0 (T0), 6 (T3) e 24 (T4) horas pós-abate de frangos de corte entre 40 e 44 dias de idade, submetidos a duas condições ambientais ET (35°C; 75-85% UR) e NET (22°C; 83±6,6% UR). Objetiva 40X - A: T0; B: T3; C: T4

Figura 2 - Leituras de valores de MFI, de acordo com a concentração de proteína

A análise dos parâmetros do modelo que descreve o comportamento do MFI, descrito por Riley et al. (2003), demonstra que a extensão de fragmentação representada por κ_0 e a diferença total do processo representada por κ_1 , não foram diferentes para aves que sofreram estresse térmico agudo (Figura 3). Todavia, quando a análise considerou os dados de MFI obtidos com 0,75 mg/mL de proteína, o parâmetro κ_2 , que representa a taxa de fragmentação, foi superior para os animais NET. Isto pode indicar que o ET prejudica a taxa de proteólise miofibrilar.

Figura 3 - Cinética do índice de fragmentação miofibrilar verificado para concentrações de proteína de 0,75 e 1,5 mg/mL de músculo peitoral de frangos de corte com idades entre 40 e 44 dias, submetidos a duas condições ambientais ET (35°C; 75-85% UR) e NET (22°C; 83±6,6% UR)

A queda acelerada de pH devido ao estresse térmico (SANDERCOCK et al., 2001) poderia interferir com o processo proteolítico. O estímulo elétrico, que causa uma queda acelerada de pH, apresentou efeito detrimental para o MFI em frangos (VEERAMUTHU; SAMS, 1999).

Por outro lado, o modelo não detectou diferenças quando a determinação utilizou dados com 1,5 mg/mL. Os modelos para as duas concentrações de proteína mostraram boa convergência e boa precisão para descrever os dados obtidos. Existe a possibilidade de saturação de fragmentos de miofibrila capazes de absorver luz que poderiam dificultar

a detecção de pequenas diferenças na concentração de proteína mais alta (1,5 mg/mL) em fases iniciais de fragmentação.

4.3.2 SDS PAGE Troponina T

A intensidade de coloração de fragmentos de degradação da troponina T aumentou nos dois tempos de coleta analisados, isto é seis e 24 horas pós abate (Figuras 4 e 5). O aparecimento deste fragmento na fração miofibrilar é considerado um bom indicador do processo de amaciamento da carne (HO et al., 1994).

Nas amostras retiradas seis horas após abate não parece ocorrer mudança consistente e significativa na presença destes fragmentos entre as diferentes condições ambientais e valores de luminosidade do peito. Entretanto, após 24 horas do abate, parece ocorrer um padrão diferenciado destes fragmentos para amostras provenientes de animais estressados e não estressados termicamente (ver detalhe figura 5), independente do valor de L^* .

Figura 4 - SDS-PAGE da fração protéica miofibrilar, nos tempos de coleta 0 e 6 horas, com valores de L^* < 49 (baixo) e > 51 (alto) de animais submetidos a duas condições ambientais ET (35°C; 75-85% UR) e NET (22°C; 83±6,6% UR)

Figura 5 - SDS-PAGE da fração protéica miofibrilar, nos tempos de coleta 0 e 24 horas, com valores de L* < 49 (baixo) e > 51 (alto) de animais submetidos a duas condições ambientais ET (35°C; 75-85% UR) e NET (22°C; 83±6,6% UR)

A análise do SDS-PAGE da fração sarcoplasmática mostrou o aparecimento de uma banda acima de 200 kDa desde seis horas pós-abate, característica dos animais que apresentaram alto valor de L*, independente da condição ambiental (ver detalhe Figura 6). Pelo tamanho das bandas é provável que seja proteína ou fragmento protéico proveniente de uma migração da fração miofibrilar para a sarcoplasmática. A migração de proteínas entre as frações musculares foi identificada em carnes com problemas de funcionalidade (PIETRZAK et al., 1997).

Figura 6 - SDS-PAGE de proteínas da fração sarcoplasmática nos tempos de coleta 0 e 6 horas, com valores de L* < 49 (baixo) e > 51 (alto) de animais submetidos a duas condições ambientais ET (35°C; 75-85% UR) e NET (22°C; 83±6,6% UR)

4.3.3 Imunodeteção de Vinculina

A vinculina aparece nas bandas de ambos os tratamentos, não sendo possível distinguir alterações devido ao estresse térmico (Figura 7). Esta proteína de 130 kDa exerce um papel importante na manutenção da estrutura miofibrilar, pela ligação que exerce entre discos Z e do disco Z com sarcolema, e sofre proteólise *post mortem*. Por esta razão tem sido utilizada como indicativo do processo de amaciamento da carne em bovinos (KOOHMARAIE et al., 1995; TAYLOR et al., 1995). No entanto, não foi uma boa candidata para se demonstrar efeito da condição ambiental sobre proteínas miofibrilares.

Figura 7 - Immunodeteccão de proteínas da fração miofibrilar nos tempos de coleta 0 e 24 horas, com valores de L* < 49 (baixo) e > 51 (alto) de animais submetidos a duas condições ambientais ET (35°C; 75-85% UR) e NET (22°C; 83±6,6% UR)

4.4 Conclusões

A taxa de fragmentação miofibrilar pode ser prejudicada pelo estresse térmico agudo. Modificações na fração sarcoplasmática são observados em carne pálida, independente da condição ambiental pré-abate.

Referências

- BARBUT, S. Color measurements for evaluating the pale, soft, exudative (PSE) occurrence in turkey meat. **Food Research International**, Ontario, v. 26, p. 39-43, 1993.
- BRISKEY, E. J. Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. **Advanced Food Research**, New York, v.13 p. 89-105, 1964.
- CULLER, R. D.; PARRISH Jr.; F.C., SMITH; G.C. e CROSS; H.R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical physical and sensory characteristics of bovine *longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 1177-1180, 1978.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR R.G.; CHRISTIANSEN, J.A. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, Paris, v. 74, p. 225-237, 1992.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.177,p. 751-760, 1949.

- HEDRICK, H.B.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. **Principles of meat science**. 3rd ed. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, 1994. 354p.
- HO, C.Y., STROMER, M.H. e ROBSON, R.M. Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. **Biochimie**, Paris, v. 76, p. 369-375, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- MacBRIDE, M.A.; PARRISH, F.C. The 30,000 dalton component of tender bovine *longissimus* muscle, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p.1627–1629, 1977.
- McCURDY, R. D.; BARBUT, S.; QUINTON, M. Seasonal effect on pale soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. **Food Research International**, Ontario, v. 29, p. 363-366, 1996.
- MORRISSEY, D.H. Silver stain for proteins in polyacrilamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, New York, v.117, p.307-310, 1981.
- OLSON, D.G.; PARRISH Jr., F.C.; STROMER, M.H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 41, p. 1036-1041, 1976.
- PIETRZAK, M.; GREASER, M. L.; SOSNICKI, A. A. Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality in *Pectoralis Major* muscle of domestic turkeys. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 75, p. 2106-2116, 1997.
- RYLEY, D. G.; CHASE Jr., C. C.; PRINGLE, T. D.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; OLSON, T. A.; HAMOND, A. C.; COLEMAN, S. W. Effect of sire on μ - and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, p. 2440-2447, 2003.
- SANDERCOCK, D. A.; HUNTER, R. R.; NUTE, G. R.; MITCHELL, M. A. ; HOCKING, P. M. Acute Heat Stress-Induced Alterations in Blood Acid-Base Status and Skeletal Muscle Membrane Integrity in Broiler Chickens at Two Ages: Implications for Meat Quality. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 418–425, 2001.
- SAS Institute **SAS Language and procedures**: usage. Version 8.1. Cary: SAS Institute, 2000.
- 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**, Trumbull, v. 9, p. 13-23, 1998.

TAYLOR, R.G. Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization **Journal of Animal Science**, Albany, v. 7, p. 1351-1367, 1995.

VEERAMUTHU, G. I.; SAMS, A. R. Postmortem pH, Myofibrillar Fragmentation, and Calpain Activity in Pectoralis from Electrically Stimulated and Muscle Tensioned Broiler Carcasses. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, p. 272-276, 1999.

WOOD, D.F., RICHARDS, J.F. Effect of some antemortem stressors on post-mortem aspects of chicken broiler pectoralis muscle. **Poultry Science**, Ithaca, v. 54, p. 528-531, 1975.