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

**Influência do pH final na bioquímica e qualidade do músculo
Longissimus dorsi de animais *Bos taurus indicus* machos inteiros**

Clara Lucia Contreras Barón

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

Clara Lucia Contreras Barón
Engenheira Agrônoma

Influência do pH final na bioquímica e qualidade do músculo *Longissimus dorsi* de animais *Bos taurus indicus* machos inteiros
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. **CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Contreras Barón, Clara Lucia

Influência do pH final na bioquímica e qualidade do músculo *Longissimus dorsi* de animais *Bos taurus indicus* machos inteiros / Clara Lucia Contreras Barón. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

81 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Carne bovina 2. Grupo de pH 3. Maciez 4. Maturação 5. Proteólise I. Título

CDD 664.92
C764i

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

DEDICATÓRIA

A Juan Camilo, Paulo Fernando, Angela, Pablo, Angela Patricia e Diana María.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação PEC-PG (CNPq), pela bolsa de estudos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), pela excelência na minha formação.

Ao grupo Minerva Foods, pela doação das matérias-primas, elementos indispensáveis para a realização deste trabalho, e pela confiança que depositaram no mesmo.

Aos projetos que apoiaram financeiramente a presente pesquisa.

À minha Prof^a. Dra. Carmen J. Contreras Castillo, meu eterno agradecimento pelo tempo, dedicação, confiança e oportunidade para desenvolver meus estudos sob sua orientação.

A toda a equipe do Laboratório de Qualidade e Processamento de Carnes, funcionários e alunos que o formam ou formaram, especialmente ao Sr. Jair, Marcio, Felipe, Anirene, Priscila, Amanda e Thais, pela amizade e apoio incondicional.

A toda a equipe do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal, pela amizade e apoio incondicional.

A todos os professores, funcionários e alunos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” que me auxiliaram para o desenvolvimento desta pesquisa.

EPÍGRAFE

"Existem muitas hipóteses em ciência
que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável,
eles são a abertura para achar
as que estão certas"

Carl Sagan

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Características de animais machos inteiros.....	23
2.2 Qualidade de carne.....	25
2.3 Influência do pH _f na qualidade da carne.....	25
2.4 Parâmetros de qualidade de carne.....	30
2.4.1 Cor.....	30
2.4.2 Maciez.....	34
2.4.3 Capacidade de retenção de água.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Estudo preliminar (Etapa I)	37
3.2 Amostragem e Análises de laboratório (Etapa II).....	38
3.2.1 pH.....	40
3.2.2 Perda por gotejamento.....	40
3.2.3 Cor instrumental.....	41
3.2.4 Força de cisalhamento (FC).....	41
3.2.5 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI).....	42
3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	42
3.2.6.1 Extração da fração protéica.....	42
3.2.6.2 Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida.....	43
3.2.7 Imunodeteção.....	44
3.2.7.1 Preparação das amostras.....	44
3.2.7.2 Análise de Imunodeteção.....	44
3.2.8 Colágeno.....	45
3.2.8.1 Colágeno total	45
3.2.8.2 Colágeno solúvel.....	46
3.3 Análise estatística.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

4.1 Estudo preliminar.....	49
4.2 pH.....	50
4.3 Perda por gotejamento.....	51
4.4 Cor instrumental.....	53
4.5 Força de cisalhamento (FC).....	56
4.6 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI).....	58
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	60
4.8 Análise de Imunodeteção.....	63
4.9 Colágeno total e solúvel.....	66
5 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIA.....	71

RESUMO

Influência do pH final na bioquímica e qualidade do músculo *Longissimus dorsi* de animais *Bos taurus indicus* machos inteiros

O pH final (pH_f) no músculo *post mortem* é amplamente utilizado como um indicador potencial de maciez e é um fator importante associado à qualidade de carne. O Brasil é líder mundial nas exportações de carne bovina, porém não são conhecidos os valores de pH_f do músculo pós-abate e seu impacto na qualidade da carne de animais machos inteiros *Bos taurus indicus*. Baseado no exposto, objetivou-se com este trabalho identificar o atual “status” dos valores de pH_f 24 h *post mortem* apresentados no frigorífico comercial, e a influência do pH_f na proteólise muscular e parâmetros de qualidade como perda por gotejamento, cor e maciez de machos inteiros avaliados aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação. Foi realizado um estudo preliminar, com 399 carcaças em abatedouro comercial, para conhecer a ocorrência pH_f de animais machos inteiros abatidos no Brasil, podendo-se identificar três faixas de pH_f: pH_f 5,5 até 5,8 (baixo-normal); pH_f 5,81 até 6,3 (intermediário); pH_f > 6,3. Músculos *Longissimus dorsi* (n=12) foram porcionados em bifes, embalados a vácuo, classificados nos três diferentes grupos de pH_f e maturados a 2°C por 0 (48h), 7, 14, 21 e 28 dias. Foram avaliadas características de perda por gotejamento, cor, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar, colágeno total e solúvel, assim como proteólise miofibrilar. Carnes pertencentes ao grupo de pH_f alto, apresentaram maior maciez (P<0,05) desde o início do experimento, quando comparado aos outros grupos do estudo. Bifes de pH_f intermediário apresentaram os valores de força de cisalhamento mais elevados (P<0,05), o que indica um processo de maciez mais lento quando comparado com os outros grupos de pH_f. Perdas por gotejamento, diminuem com o aumento nos valores de pH_f (P< 0,05). Valores de L*, a*, b*, não apresentam diferenças entre os grupos de pH. O índice de fragmentação miofibrilar (MFI) foi maior em carne de pH_f alto, seguido pelo grupo de pH_f baixo-normal, e os menores valores pertenceram ao grupo de pH_f intermediário (P<0,05) através do tempo de maturação. A degradação das proteínas como desmina e troponina-T foi maior e mais visível no pH_f alto e baixo-normal desde as 48 h *post mortem* em comparação com o pH_f intermediário, onde foram observadas as bandas de sua degradação quase ao final do período experimental. Proteínas chave como filamina e nebulina apresentaram maior degradação desde as 48 horas *post mortem* no pH_f alto e mais lenta no pH_f intermediário. Não foram observadas diferenças (P> 0,05) nos valores de colágeno total e solúvel nos diferentes grupos de pH_f e nem através do tempo de maturação. Em geral, o grupo de pH_f intermediário (5,8-6,3) apresentou maior inconsistência quanto às características de maciez e fragmentação miofibrilar, consequência de uma proteólise tardia.

Palavras-chave: Carne bovina; Grupo de pH; Maciez; Maturação; Proteólise

ABSTRACT

Influence of ultimate pH in the biochemistry and quality of muscle *Longissimus dorsi* of *Bos taurus indicus* bulls

The ultimate pH (pH_u) of the *postmortem* muscle is broadly use as a potential meat tenderness indicator and is an important factor related to meat quality. Brazil is the bovine meat exporter world leader; nevertheless the values of the *postmortem* pH_u of the muscle and its impact on the meat quality of *Bos indicus taurus* bulls, are unknown. Therefore, the objective of this research was to establish the values of pH_u after 48 hours *postmortem* and its impact over the meat quality through the characterization of the biochemical processes that occurs in the muscle *Longissimus dorsi* of *Bos taurus indicus* bulls. In order to know the actual pH_u of the Brazilian bulls, a preliminary study were made, using 399 carcasses of a commercial slaughter house and resulting three levels of pH_u : pH_u 5,5 to 5,8 (low-normal); pH_u 5,81 to 6,3 (intermediate); $pH_u > 6,3$ (high). Twelve muscles *Longissimus dorsi* were cut into steaks, classified into the three groups of pH_u , vacuum packed up and matured at 2°C for 0 (48h), 7, 14, 21 and 28 days. Drip loss, color, shear force, myofibril fragmentation index, total and soluble collagen and miofibrillar proteolysis were evaluated. The high pH_u meat presented more tenderness from the beginning of the experiment ($P < 0,05$) when compared with the other groups. The medium pH_u steaks presented the highest shear force values ($P < 0,05$), indicating a slower tenderization process in relation to the other pH_u groups. The drip loss values diminished as the value of pH_u rised ($P < 0,05$). The values of L^* , a^* , b^* did not show significant differences within the groups of pH_u . The highest miofibrillar fragmentation index (MFI) through the maturation time, was found in the high pH_u meat, followed by the low pH_u group and then by the intermediate pH_u group ($P < 0,05$). At 48 hours *postmortem*, degradation of proteins, like desmin and troponin-T, was higher and more evident in the high and low-normal pH_u when compared to the intermediate pH_u , where the bands and its degradation were only observed by the end of the experiment. Key proteins like filamin and nebulin, showed higher degradation rate from the 48 h *postmortem* in the high pH_u group, and a slower degradation in the intermediate pH_u group. No differences were observed through the pH_u groups, nor through the maturation time ($P < 0,05$), for total and soluble collagen values. Then, it is possible to say that the meat quality of *Bos taurus indicus* bulls, especially the tenderness, is related to the pH_u , and can be affected by the proteolytic systems activity. In general, the tenderness and the MFI were more inconsistent in the medium pH_u group (5,8-6,3) than in the two other pH_u groups, as a consequence of a late proteolysis.

Keywords: Beef; pH group; Tenderness; Ageing time; Proteolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações da mioglobina (deoximioglobina) com o oxigênio.....	32
Figura 2 - Animais machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i> da produção regular do frigorífico utilizado nesta pesquisa.....	38
Figura 3 - Músculos <i>Longissimus dorsi</i> de meia carcaça usados nesta pesquisa.....	39
Figura 4 - Músculos de média carcaça classificados segundo faixas de pH _f identificados (A); Músculo sendo porcionado (B); Bifes obtidos por cada músculo para o desenvolvimento das análises (C); Embalagem e estocagem (2°C) dos bifes obtidos para cada faixa de pH _f (D).....	40
Figura 5 – Influência do pH _f na perda por gotejamento no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de animais machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i>	52
Figura 6 - Influência do pH _f no valor de L* no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de animais machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i>	54
Figura 7 - Influência do pH _f no valor de a* no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de animais machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i>	55
Figura 8 - Influência do pH _f no valor de b* de no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de animais mchos inteiros <i>Bos taurus indicus</i>	55
Figura 9 – Gel de poliacrilamida (5%) em função do pH _f e tempos de maturação, mostrando degradação progressiva das proteínas de alto peso molecular.....	61
Figura 10 - Degradação da Desmina apresentada no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i> em diferentes faixas de pH _f nos diferentes tempos de maturação.....	64
Figura 11 - Degradação da Troponina-T apresentada no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i> em diferentes pH _f nos diferentes tempos de maturação.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos grupos segregados de acordo com os valores de pH_f mensurados após 24 h <i>post mortem</i> no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de animais machos inteiros <i>Bos taurus indicus</i> em abatedouro comercial.....	49
Tabela 2 – Valores de pH do músculo <i>Longissimus dorsi</i> bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação.....	50
Tabela 3 – Valores de força de cisalhamento (kgf) do músculo <i>Longissimus dorsi</i> bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação.....	57
Tabela 4 – Valores de índice de fragmentação miofibrilar do músculo <i>Longissimus dorsi</i> bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação.....	58
Tabela 5 – Valores de coágено total ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) e solúvel (%) do músculo <i>Longissimus dorsi</i> de bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação.....	66

1 INTRODUÇÃO

As raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) são utilizadas na maioria das regiões tropicais do planeta contribuindo significativamente no mercado mundial da carne. Segundo o United States Department of Agriculture (USDA, 2015) o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo com aproximadamente 213 milhões de bovinos, sendo 80% composto por raças da sub espécie *Bos taurus indicus*. Os animais de raças zebuínas são conhecidos pela ótima adaptabilidade, rusticidade, eficiência reprodutiva, habilidade materna e resistência a ectoparasitas e por isso tem se adaptado totalmente às condições tropicais do Brasil, país onde a raça Nelore compõe a maioria do rebanho (ABIEC, 2015).

O total da produção brasileira de carne bovina para o ano 2015 foi de 9,4 bilhões de toneladas (USDA, 2015) posicionando este país como o segundo exportador de carne do mundo obtendo receitas de 7,2 bilhões de dólares com mais de 1,56 milhões de toneladas comercializadas para mais de 150 países (ABIEC, 2015, USDA 2015). Essa enorme diversidade de compradores tem levado os produtores brasileiros a incrementar seus esforços em prol de uma melhoria das produções atingindo os padrões de qualidade exigidos pelo consumidor final (LUCHIARI FILHO, 2006).

O consumidor (interno e externo) decide sua compra não somente tendo em conta fatores nutricionais, mas também baseados nas características que associam a alta qualidade. Este padrão de qualidade buscado pelo consumidor pode ser definido como a interação entre a satisfação do consumidor e características do produto (BARCELLOS, 2007), como sabor, suculência, cor e maciez, sendo esta última característica a de maior incidência na decisão de compra, mas também a de maior variabilidade na produção de carne (DELGADO et al., 2006; MALTIN et al., 2003).

As características da carne bovina associadas à qualidade requerida pelo consumidor dependem de vários fatores intrínsecos dos animais, dentre eles pode-se citar a precocidade, sexo e raça (LADEIRA; OLIVEIRA, 2006; NOGUEIRA, 2007). A raça é um dos fatores altamente relacionados com maciez e evolutivamente os animais *Bos taurus indicus* em relação aos *Bos taurus taurus*, tem sido identificados como animais de carne menos macia (WHIPPLE et al., 1990) o que torna a carne de

“qualidade inferior”, situação que se traduz em menores preços no mercado por parte do consumidor.

As carnes bovinas no Brasil provêm de animais zebuínos machos inteiros, castrados e fêmeas de descarte, alimentados a pasto em sistemas extensivos, o que resulta em elevada idade ao abate, produção de carcaças heterogêneas e de carne de baixa qualidade (COUTINHO FILHO; PERES; JUSTO, 2006).

Os animais machos inteiros são os de maior participação na produção de carne brasileira, com 56,1% (IBGE, 2015), pela maior eficiência na produção de carne, pois apresentam superioridade em peso, pela conformação, e proporção de músculo:osso, quando comparados às carcaças de bovinos castrados (ARTHAUD, 1977).

Embora esta vantagem no desempenho dos bovinos machos inteiros seja de preferência para o pecuarista, trazendo aumento da eficiência econômica do seu sistemas de produção (VAZ; RESTLE; PEROTTONI, 1999), este grupo de animais são mais reativos, brigam, sofrendo maior estresse no transporte, jejum prolongado ou por outras condições pré-abate que se traduzem em uma queda de pH variável no período *post mortem*, modificando as características de qualidade da carne (cor, perda por gotejamento e maciez) (UNRUH, 1986). Em geral, carcaças oriundas de bovinos machos inteiros, freqüentemente é observado valores intermediários de pH de 5,8 a 6,7 (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016), diferindo dos valores considerados normais e observados para carcaças de machos castrados 5,5 a 5,8 (VAZ; RESTLE, 2000).

Neste contexto, um dos fatores que podem ser utilizados como preditores da qualidade da carne é a avaliação do pH final (pH_f) (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; PULFORD et al., 2009; YOUNG et al., 2004). O animal recém abatido, apresenta em seus músculos ATP, fofosfocreatina e seu pH está perto da neutralidade (7,2). Após o abate, o fornecimento de oxigênio é suspenso iniciando no músculo um processo anaeróbico no qual o glicogênio é transformado em lactato e íons H^+ (ENGLAND, 2013; SCHEFFLER et al., 2015) e seu acúmulo no músculo, resulta na queda do pH final em torno de 5,5-5,7 (SCHEFFLER et al., 2015). Taxas relativamente lentas de glicólise e pH_f moderadamente baixo (5,5) caracterizam carne usualmente macia (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; ENGLAND, 2013)

Devido os valores de pH_f na carne de animais machos inteiros da raça *Bos taurus indicus* abatidos no Brasil e seu impacto sobre a qualidade da carne serem

desconhecidos, objetivou-se com este trabalho identificar o atual “status” dos valores de pH, 24 h *post mortem* apresentados no frigorífico comercial, e a influência deste na proteólise muscular e parâmetros de qualidade, como perda por gotejamento, cor e maciez de machos inteiros avaliados aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de bovinos machos inteiros

Devido ao dimorfismo sexual, o desenvolvimento dos tecidos é diferente entre os gêneros (macho inteiro, macho castrado e fêmea). Em todas as espécies, os machos apresentam uma taxa anabólica de deposição de tecido muscular superior a aquela observada em fêmeas e castrados, inclusive com deposição de tecido adiposo tardia. No abate, em idades semelhantes, os animais castrados apresentam maior quantidade de tecido adiposo em relação aos touros (UNRUH, 1986) pelo fato da redução das concentrações de testosterona. Enquanto que em machos inteiros, as concentrações de testosterona são maiores e relacionada com o balanço positivo do nitrogênio, incrementando o conteúdo de proteína e o decréscimo da gordura na carcaça (BRANDSTETTER; PICARD; GEAY, 1998; UNRUH, 1986).

A deposição de gordura na carcaça é importante porque, enquanto a gordura intramuscular (marmoreio) contribui para melhorar satisfação do provador na degustação da carne, afetando positivamente maciez, palatibilidade e suculência (COSTA et al., 2002), a gordura subcutânea previne as perdas de rendimento de carcaça durante o resfriamento *post mortem*.

Em função da gordura de cobertura nas carcaças ser deficiente, estas podem perder valor comercial e serem classificadas como de baixa qualidade (EMBRAPA, 1997). Nas carcaças de machos inteiros é frequentemente observado deficiência de gordura de cobertura, 2,5mm para 4,6mm de castrados. Uma carcaça bem acabada e com uma espessura de gordura maior que 3 mm, evita o encurtamento das fibras musculares (sarcômero) pelo frio, pois a gordura serve como um isolante térmico, reduzindo a velocidade de resfriamento das carcaças (LAWRIE, 2005; VAZ; RESTLE, 2000). Assim o baixo grau de acabamento em machos inteiros pode afetar a maciez da carne.

Em estudo, Restle et al. (2000), constataram que animais bovinos inteiros apresentaram maiores valores de peso vivo ao abate (425 kg) quando comparados com castrados (399 kg), e de carcaça (238 kg) versus castrado (223 kg), assim como maior porcentagem de dianteiro, melhor conformação e maior porcentagem de músculo na carcaça quando comparados aos castrados. Segundo Lee et al. (1990), estas diferenças no desempenho entre animais inteiros e castrados são mais acentuadas, com melhores resultados para os bovinos machos inteiros, devido à

maior ação hormonal proveniente dos hormônios androgênicos produzidos nos testículos, como a testosterona (FIELD, 1971; UNRUH, 1986)

Embora, exista maior síntese protéica o que favorece a deposição muscular e maior atividade de hormônios beta adrenérgicos em animais inteiros. Por outro lado, do ponto de vista de qualidade de carne, a ação destes hormônios beta adrenérgicos pode influenciar negativamente no processo de amaciamento da carne pelo aumento na atividade de calpastatina, o inibidor natural das calpaínas (KOOHMARAIE, 1992; MORGAN et al., 1993).

No estudo Morgan et al. (1993), comparando a atividade das calpaínas entre um grupo de animais inteiros em referencia a castrados verificou que esta foi maior em músculos de bovinos machos inteiros. Além disso, foi observado um menor índice de fragmentação miofibrilar, indicando menor proteólise quando comparado aos animais do grupo de animais castrados durante os primeiros 7 dias *post mortem*. Desta forma, uma maior atividade de capastatina 24 h *post mortem* pode ser associada com um aumento da força de cisalhamento, resultando em carnes mais duras em bovinos inteiros. A testosterona também é envolvida na síntese, a acumulação e maturação do colágeno no músculo, o que também pode explicar as diferenças na maciez de machos inteiros e castrados (SOARES, 2005; UNRUH, 1986).

Alterações metabólicas decorrentes do estresse do animal durante o manejo pré-abate comprometem a qualidade da carne. Os animais inteiros são mais propensos a este estado por serem mais ativos, montam uns nos outros, brigam, são mais agitados durante o transporte e repetem esse comportamento inquieto nos currais do frigorífico. Quando o animal sofre o estresse, ocorre a queima da reserva de glicogênio presente no músculo (LAWRIE, 2015). Após o abate, o fornecimento de oxigênio é suspenso iniciando no músculo um processo anaeróbico no qual o glicogênio é transformado em lactato e íons H^+ (ENGLAND, 2013; SCHEFFLER et al., 2015) e seu acúmulo no músculo, resulta na queda do pH final em torno de 5,5-5,7 (SCHEFFLER et al., 2015). Na ocorrência da depleção total do glicogênio antes do abate, não ocorrerá a queda adequada do pH para o processo de transformação de músculo em carne (MALTIN et al., 2003)

Devido à condição de maior estresse pré-abate em bovinos machos inteiros é freqüentemente observado valores pH_i alto entre 5,8 a 6,7 (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016), diferindo dos valores normais de machos castrados, 5,5 a 5,8 (VAZ; RESTLE, 2000).

No Brasil, o abate de bovinos machos inteiros é de relevância, portanto, aumento na incidência de carne escura e de maciez variável tem sido atribuído ao abate crescente deste tipo de animais mais propensos ao estresse pré-abate (LUCHIARIFILHO, 2006)

2.2 Qualidade da carne

A qualidade da carne é um termo usado para descrever propriedades e percepções da carne por parte do consumidor. Ele inclui atributos como a conformação e maturidade da carcaça (HALE; GOODSON; SAVEL, 2013), atender a questões como a satisfação visual; organoléptico, nutricional, de segurança (ao ter sido obtida de forma higiênica e sanitária, ou seja, não causar doenças) (DUCLOS; BERRI; LE BIHAM-DUVAL, 2007) e por fim as propriedades físico-químicas traduzidas em sabor, cor, odor, suculência e maciez, sendo esta última característica a de maior incidência na decisão de compra, por parte do consumidor, mas também a de maior reclamação por sua variabilidade na produção (MALTIN et al., 2013)

Sendo o músculo uma estrutura altamente organizada e complexa, é de esperar que as propriedades da carne sejam susceptíveis de serem determinadas sob diferentes níveis, desde o molecular até o mecânico. Embora outros fatores possam ser usados *in vivo*, após o abate uma série de modificações bioquímicas e estruturais ocorrem para desencadear o processo que pode ser chamado de “conversão de músculo em carne”, e o entendimento da seqüência dos eventos bioquímicos no músculo *post mortem* é o centro do desenvolvimento das práticas pós-abate, ou poderão ser designadas para aperfeiçoar a qualidade da carne (MALTIN et al., 2003).

2.3 Influência do pH na qualidade de carne

Imediatamente após a morte do animal, com temperaturas musculares entre 38-40 °C, sem estímulo nervoso, com uma quantidade suficiente de ATP presente,

os íons de cálcio são ativamente transportados ao retículo sarcoplasmático pelo sistema bomba de cálcio-ATP, localizado na membrana do mesmo. As mitocôndrias também armazenam cálcio no músculo vivo que é proveniente do sarcoplasma em presença de oxigênio. O músculo tenta manter homeostase, portanto, o glicogênio é metabolizado via anaeróbica (glicólise) e inicia a fosforilação de ADP para suprir ATP. O processo de glicólise anaeróbica produz e acumula ácido láctico nos tecidos produzindo queda no pH intracelular (LAWRIE, 2005; HUFF- LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; MALTIN et al., 2003).

A velocidade de queda do pH, bem como o pH_f da carne após 24 - 48 h, é muito variável e é definida pela depleção do glicogênio muscular, o qual, por sua vez, é influenciado pela raça, idade, sexo, e suscetibilidade ao estresse sofrido pelos animais no transporte, jejum prolongado ou por outras condições pré-abate. Esta depleção reduz a produção de ácido láctico durante o período *post mortem*, resultando em carne menos macia, com mudanças na cor e alterações na capacidade para reter água (JELENIKOVA; PIPEK; STARUCH, 2008; MALTIN et al., 2003; SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999).

Contudo, quando ocorre uma depleção muscular de glicogênio, o pH permanece acima de 6,2 após 24 h do abate, resultando em uma carne de coloração muito escura e a sua superfície exposta é muito seca, uma vez que a água está fortemente ligada às proteínas miofibrilares, assim tem-se o indício de uma carne tipo *Dark, Firm, Dry* (DFD), ou seja, escura, consistente e não exsudativa (VAZ; RESTLE, 2000).

A evolução do pH em bovinos se desenvolve lentamente começando com o pH inicial do músculo que está em torno de 7,0. No entanto, após o abate o músculo perde o aporte de oxigênio e na tentativa de manter a homeostase utiliza suas reservas energéticas o que ocasiona mudanças na etapa *post mortem*, as quais dependerão das condições *ante mortem* e do glicogênio disponível. Um dos resultados deste processo é a queda do pH que cai para 6,4 a 6,8 após 5 h e para 5,5 a 5,9 após 24 h (PEARCE et al., 2011).

O pH final (pH_f) pode variar dependendo das fibras que compõem o músculo avaliado. Segundo Talmant et al. (1986), a velocidade de acidificação pode ser mais rápida nos músculos de fibras glicolíticas (brancos) quando comparados com os de fibras oxidativas (vermelhas) . Isto é consequência das fibras musculares oxidativas terem menor conteúdo de glicogênio, quando comparadas às fibras glicolíticas ou de

contração rápida. Baseados neste fato, e conhecendo a importância do conteúdo de glicogênio no metabolismo *post mortem*, os músculos glicolíticos geralmente apresentam pH_f baixos (TALMANT et al., 1986)

Por outro lado, quando a queda do pH ocorre rapidamente, há desnaturação das proteínas, provocando redução da solubilidade e da capacidade de retenção de água e a intensidade da cor, favorecendo assim o estabelecimento da condição de carne *Pale, Soft, Exudative* (PSE) ou seja, palida, mole e exsudativa (SCHÄFER et al., 2002).

Na conversão de músculo em carne ocorrem mudanças no ambiente da célula muscular que incluem modificações estruturais das proteínas sarcoplasmáticas, proteínas do estroma, proteínas da miofibrila e recentemente as proteínas de defesa que integram as fibras do músculo (LOMIWES et al., 2013; PULFORD; VAZQUEZ et al., 2008; ZAPATA; SERVI; WICK, 2009).

No processo de maturação da carne, a ação de enzimas endógenas responsáveis pela maciez é prolongada. É no período de 24 h após o abate que começa uma ruptura das proteínas ligadas ao sarcolema de cada miofibrila (TAYLOR et al., 1995).

As principais enzimas endógenas são as calpaínas e as catepsinas, que hidrolisam as proteínas miofibrilares (KOOHMARAIE, 1994; VOLPELLI et al., 2004), e mais recentemente pesquisadas, caspases e proteosoma associadas com processo de apoptose celular (OUALI et al., 2006; PULFORD et al., 2009; SENTANDREU; COULIS; OUALI, 2002).

O principal mecanismo ou sistema proteolítico relacionado com a maciez é o das calpaínas. Estas são enzimas cálcio dependentes e apresentam três componentes principais: calpaína tipo I ou μ -calpaína, calpaína tipo II ou m-calpaína e calpastatina. A calpaína tipo I ou μ -calpaína é ativada na queda de pH de 6,8 para aproximadamente pH 5,7; calpaína tipo II ou m-calpaína é ativada quando o pH está em torno de 5,7 e é responsável pela continuidade do processo de amaciamento, estando ativa em torno das 16 h *post mortem* e assim permanecendo por longos períodos; e calpastatina, que tem como principal função inibir as calpaínas (KOOHMARAIE, 1994; VOLPELLI et al., 2005).

As calpaínas não atuam diretamente sobre a miosina e a actina, porém degradam as linhas-Z e digerem as proteínas desmina, titina, nebulina, tropomiosina, troponina e proteína C, desestruturando o sarcômero, que é a unidade funcional do

músculo. A hidrólise de tropomiosina e troponina facilita a perda de estrutura e a liberação dos filamentos finos, resultando nos monômeros de actina, enquanto que a digestão de proteína C em um mecanismo semelhante desestabiliza e libera os filamentos grossos, resultando nos monômeros de miosina. As proteínas titina e nebulina reforçam transversalmente a estrutura miofibrilar e a ação da μ -calpaína e m-calpaína sobre estas enzimas ajudando a debilitar esta estrutura. Por último, a degradação da desmina e das linhas-Z (estruturas necessárias para manter unidos os sarcômeros) debilita a estrutura miofibrilar (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN; 2010; WU et al., 2014), resultando em uma textura de carne macia.

Segundo Lomiwes et al. (2014), a filamina, nebulina e titina, em conjunto constituem no músculo aproximadamente 10% do total das proteínas miofibrilares e sua degradação influencia o processo de maciez da carne. Este processo de degradação depende principalmente do pH_f presente no músculo *post mortem*. Assim, em pH_f alto ($>6,2$) apresenta-se um rápido amaciamento atribuído à degradação destas proteínas pela ativação imediata da μ -calpaína. No caso de pH_f baixo ($<5,8$) a maciez da carne também é o resultado da degradação destas proteínas pela ação das calpaínas e das catepsinas, principalmente catepsinas B, D e L. Em faixa de pH_f intermediário (5,8 a 6,7), tem sido sugerido que a dureza da carne apresenta-se como resultado do pH se distanciar do valor ótimo para a atuação dos sistemas de enzimas proteolíticas (CONTRERAS et al., 2014; KEMP et al., 2010; WATANABE et al., 1996), adicionado à ação protetora que as *Heat Shock Proteins* (HSP) provovem às miofibrilas (LOMIWES et al., 2013).

As calpastatinas fazem parte do complexo sistema calpaína, como já mencionado, sua principal função é inibir a ação das calpaínas, desta forma diminuindo a degradação das proteínas miofibrilares durante o processo de maturação, reduzindo assim a maciez. As calpastatinas agem e influenciam na maciez da carne desde as primeiras 24 h e só cessam seu efeito quando não há mais calpaína ou o sistema é destruído pelo cozimento. Carnes com alta atividade de calpastatina, no primeiro dia *post mortem*, necessitam de maior força para serem cortadas, ou seja, são menos macias (KOOHMARAIE, 1994).

Existe a hipótese de que a carne proveniente de *Bos taurus indicus* é menos macia que a carne de *Bos taurus taurus* em função da proteólise reduzida das proteínas miofibrilares, associadas à alta atividade da calpastatina nos músculos, que inibe a ação das calpaínas. A genética possui contribuição significativa para a

variação total da maciez, que é diferente entre e dentro das raças. Ao considerar a variabilidade genética existente entre os animais em relação à concentração de calpastatina nos músculos. (SHACKELFORD; KOOHMARAIE; CUNDIFF, 1994).

Embora o sistema das calpaínas/calpastatinas ocupem função principal no processo de proteólise *post mortem*, outras enzimas proteolíticas podem estar envolvidas nesses processos. Dentro deste processo multi-enzimático, são inclusas então, as calpaínas/calpastatina, catepsinas, proteossoma e o sistema das caspases (KEMP; PARR, 2012).

As catepsinas são citadas como coadjuvantes deste processo. São proteínas intracelulares dos tecidos animais, ativas em pH_f ácido. Essas enzimas se localizam na fração lisossômica da célula o que as distingue das outras proteases, como a tripsina e a quimotripsina, que são excretadas pelas células. Foram descritas cinco catepsinas designadas com as letras A, B, C, D e E. As catepsinas B e D degradam a actina e miosina nativa e as catepsinas B e L degradam o colágeno (KOOHMARAIE; SCHOLLMEYER; DUTSON, 1986).

Outras proteínas recentemente estudadas no processo de amaciamento da carne são as proteínas associadas à defesa dos tecidos, conhecidas como HSP (*Heat Shock Proteins*). Estas proteínas são ativadas em resposta ao estresse desencadeado no momento do abate do animal, tentando manter a homeostase da célula. No tecido muscular e na carne, a HSP mais estudada é uma *Small Heat Shock Protein* (sHSP) denominada $\alpha\beta$ -cristalina que está ligada aos filamentos da desmina (PULFORD et al., 2009).

Por sua vez, o proteasoma é um complexo de proteases multicatalítico envolvido na regulação de uma série de vias nos processos celulares básicos, por sua degradação de proteínas no citosol e núcleo. Proteasomas estão presentes em todo o corpo e são abundantes no músculo esquelético. O proteasoma (26S) é constituído por uma subunidade reguladora (19S) e uma estrutura multicatalítica (20S) que contem a atividade das enzimas proteolíticas. O proteosoma 20S, também conhecido como complexo de proteinase multicatalítica (MCP) é o núcleo catalítico do complexo de proteasoma. (DAHLMANN et al., 2001; KEMP et al., 2010; SENTOANDREU; COULIS; OUALI, 2002). Em um estudo prévio, Dutau et al. (2006), ao incubar fibras musculares com proteasoma 20S, houve mudanças estruturais específicas no sarcômero, incluindo um aumento na largura da linha-Z que se estende para a banda-I, observação que não foi encontrada em fibras tratadas com

calpaína ou catepsina. No entanto, Koohmaraie e Geesink (2006), enfatizaram que o padrão de degradação de proteínas miofibrilares em incubações de proteasoma 20S, não é o mesmo que é observado em músculo *post mortem*, embora isso não pareça excluir ao proteasoma de fazer uma contribuição para o processo de proteólise no tecido muscular *post mortem*. sarcômero

As caspases são uma família de peptidases de cisteína caracterizada pela sua capacidade de clivar proteínas nos resíduos do ácido aspártico. Sua função principal é a sua contribuição para a morte celular programada ou apoptose (KEMP et al., 2010; OUALI et al., 2006; SENTANDREU; COULIS; OUALI, 2002). A apoptose prossegue de acordo com um programa preciso, caracterizado por um fase de iniciação, por meio de caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e dependendo da natureza do estímulo e do tipo de célula, segue-se uma fase de execução por caspases efetivadas (caspases 3, 6 e 7) (OUALI et al., 2006). Assim, as caspases podem ser ativadas no início de eventos patológicos associados a hipóxia/isquemia (GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2003). Este processo, a hipóxia, também é observado após a sangria dos animais no abate, e resulta em células e tecidos exauridos de nutrientes e oxigênio. Segundo Sentandreu, Coulis e Ouali (2002), após a morte o músculo continua seu processo metabólico e, portanto, as células musculares estarão presumivelmente envolvidas no processo de morte celular considerando a via mais provável a apoptose e não a necrose. Por isso Sentandreu, Coulis e Ouali (2002) e Ouali et al. (2006), apresentaram a hipótese de que o processo de abate e sangria poderia iniciar as vias de apoptose pela ativação das caspases contribuindo para o processo de proteólise *post mortem* e assim na maciez da carne.

2.4 Parâmetros de qualidade de carne

2.4.1 Cor

A cor vermelha da carne fresca é um atributo de qualidade importante utilizado pelos consumidores para avaliar o frescor e salubridade, influenciando substancialmente a aceitabilidade e decisão de compra dos cortes e produtos cárneos (ABRIL et al., 2001; CARPENTER; CORNFORTH; WHITTIER, 2001; MANCINI, HUNT 2005).

A cor da carne *in natura* é dependente da concentração e do estado químico dos pigmentos do músculo (mioglobina e hemoglobina) sobre as características físicas da carne, como as propriedades de absorver e refletir a luz são relacionadas ao seu pH final (ABRIL et al., 2001). O brilho da carne aumenta à medida que o músculo acidifica. Isto faz com que as miofibrilas se encolham e a reflexão da luz da superfície aumente (HULOT; OUHAYOUN, 1999).

A concentração de mioglobina do músculo varia entre e dentro das espécies e é afetada por aspectos como sexo, idade, dieta do animal, o tipo do músculo além de fatores genéticos e ambientais (LAWRIE, 2005).

Segundo Brewer (2004), a mioglobina é uma metaloproteína, formada por um grupo prostético ou grupo heme e um polipeptídeo chamado de globina. Esse grupo heme consiste de um átomo central de ferro e de um anel porfirínico plano composto por quatro anéis pirrólicos, unidos por pontes metilênicas. A cor da carne fresca é particularmente dependente do estado de oxigenação e do estado de oxidação do ferro dentro do anel porfirínico da mioglobina (INSAUSTI et al., 1999; SIEDEMAN et al., 1984). O íon ferroso (Fe^{+2}) dos pigmentos heme pode aceitar 6 elétrons em seu orbital mais externo e formar seis ligações covalentes, quatro com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos do grupo heme e uma com a histidina, que liga o grupo heme à globina. O sexto elétron está disponível para ligação covalente com o oxigênio molecular (MacDOUGALL, 1981; SIEDEMAN et al., 1984).

A mioglobina pode ser encontrada em carnes vermelhas *in natura* em três formas: deoximioglobina, oximioglobina e metamioglobina (MANCINI; HUNT, 2005), dependendo da natureza do ligante no sexto elétron e do estado de oxidação da molécula de ferro na matriz heme (KIM; HUNT, 2011).

A carne fresca, imediatamente após o corte na ausência de oxigênio (O_2), tem uma cor púrpura da deoximioglobina ou mioglobina reduzida que contém o íon ferro no seu estado ferroso (Fe^{+2}), e se caracteriza pela ausência de ligante na sexta posição coordenada do grupo heme. Após a exposição da carne fresca ao O_2 , a mioglobina ferrosa é oxigenada, formando-se a oximioglobina pela ligação do O_2 molecular ao sexto elétron disponível para ligação covalente do grupo heme (BREWER, 2004, MANCINI; HUNT, 2005). A oximioglobina confere uma coloração vermelho-cereja brilhante às carnes frescas e está diretamente associada com a cor de carnes vermelhas de maior aceitação pelos consumidores (INSAUSTI, 1999; CARPENTER; CORNFORTH; WHITTIER, 2001).

Segundo Mancini e Hunt (2005), a cor vermelha da carne é relativamente instável e ambas, oximioglobina (vermelho-cereja) e deoximioglobina (vermelho-púrpura), podem ser oxidadas a metamioglobina (marrom) (Figura 1). Sobre baixa pressão de O_2 , a oxidação de íon ferroso à forma férrica (Fe^{+3}), resulta na formação de metamioglobina (MacDOUGALL, 1981; SIEDEMAN et al., 1984). A metamioglobina, de cor marrom, é associada pelos consumidores a falta de frescor e salubridade no produto (CARPENTER; CORNFORTH; WHITTIER, 2001). Segundo Bekhit e Faustman (2005), a metamioglobina pode ser reduzida à deoximioglobina pela ação de enzimas redutoras endógenas NADH dependentes. Este fenômeno é chamado de *Metmyoglobin reducing activity* (MRA).

Figura 1 - Reações da mioglobina (deoximioglobina) com o oxigênio
Fonte - GUILHERME et al., 2008.

A coloração da carne depende em grande parte da fisiologia e da bioquímica dos músculos nas horas que antecedem e logo após o abate. Qualquer situação extrema, tal como o estresse, produz variações das reservas de glicogênio, o que vai causar variabilidade no pH final do tecido muscular, gerando defeitos graves como carnes pálidas e carnes de cor escura.

Assim, a palidez da carne é devida a uma grande proporção de água livre nos tecidos, combinada com o efeito direto do baixo pH nos pigmentos (aceleração da taxa de oxidação da mioglobina) e uma desnaturação excessiva das proteínas durante o período inicial *post mortem*. A água influencia na cor à medida que se localiza entre as células musculares quando deveria localizar-se dentro delas. Então, o tecido muscular fica com uma superfície refletora maior que espalha a luz antes

que entre na carne, reduzindo assim a intensidade da cor (KIM; HUNT, 2011; SIEDEMAN, 1984).

Em casos extremos e um pH muito elevado, a completa depleção das reservas de glicogênio leva a carnes que são caracterizadas por apresentarem uma cor escura. Há duas possíveis razões para o escurecimento da cor. As proteínas miofibrilares da carne com pH alto tem uma maior capacidade de se ligar à água do que a carne com pH normal (5,6-5,8), resultando em uma estrutura fechada que inibe a difusão do oxigênio e apresenta baixa dispersão da luz quando comparada na mesma extensão com a superfície mais aberta da carne com um pH_f inferior (HULOT; OUHAYOUN, 1999; ABRIL et al., 2001). A segunda possibilidade para uma aparência mais escura da carne em pH elevado está relacionada com a maior atividade da citocromo oxidase mitocondrial. Neste tipo de carne não é formada a oximioglobina, pois no pH_f alto o oxigênio não se liga à esta molécula. Além disso, no pH_f alto a atividade respiratória do tecido muscular pode ser acelerada, resultando em uma visibilidade maior da cor púrpura da mioglobina reduzida tanto quanto da cor vermelha da oximioglobina (SIEDEMAN, 1984).

Existem diversos sistemas de cores capazes de descrever como a cor é percebida. Colorímetros e espectrofotômetros são utilizados, apresentando grande variação entre os sistemas de cor (Hunter e CIELAB, CIE-triestímulos), nos quais pode-se usar diferentes iluminantes (A, C, D65) e diferentes ângulos de observação (2° e 10°). Com o objetivo de facilitar a comparação entre as variáveis de cor, a CIE (Commission Internationale d'Éclairage) recomendou a utilização da escala de cor CIE $L^* a^* b^*$. Este método baseia-se em um esquema tridimensional no qual a escala que é representada por L^* ou luminosidade, tem variação de valores entre 0 (preto) e 100 (branco), enquanto as variáveis a^* e b^* não tem escalas numéricas associadas. Em eixos perpendiculares à luminosidade, valores positivos de a^* representam a maior intensidade de vermelho e valores negativos, contribuição de verde; em outro eixo os valores positivos de b^* representam maior intensidade de amarelo e valores negativos, contribuição de azul (AMSA, 2012).

Qualquer tentativa para explicar a percepção visual da carne deve considerar não somente as características espectrais do pigmento, mas também outros valores como a tonalidade (ângulo-hue), a luminosidade e a saturação (croma). A tonalidade é entendida como a percepção dos comprimentos de onda específicos refletidos de uma superfície de carne ($a^* b^*$) recebidos de volta para o detector e é a descrição da

cor como é comunicada em linguagem (vermelho, amarelo, verde, azul, etc.). A luminosidade descreve o brilho ou escuridão da cor e a saturação refere-se a como a cor é viva ou opaca (AMSA, 2012).

2.4.2 Maciez

O padrão de qualidade buscado pelo consumidor pode ser definido como a interação entre sua satisfação e as características do produto (BARCELLOS, 2007) como sabor, suculência, cor e maciez, sendo esta última característica a de maior incidência na decisão de compra, mas também a de maior variabilidade na carne (MALTIN et al., 2003). A cor e a maciez são atributos de qualidade sensorial difíceis de serem definidos, porque como a cor, as propriedades da maciez de uma mesma amostra podem ter diferentes significados para cada consumidor. Assim, a opinião do consumidor é a chave para estabelecer o valor da carne e justificar a decisão da compra (DESTEFANIS et al., 2008).

O processo de amaciamento da carne é afetado e determinado por inúmeros fatores como o potencial proteolítico, a degradação miofibrilar, o pH_f (LOMIWES et al., 2014) o tamanho das fibras e dos feixes, a espécie, a idade do animal, a raça, condições de estresse *ante mortem*, o sexo, o tipo de músculo, o comprimento do sarcômero e a força iônica (KOOHMARAIE, 1994; PEARCE et al., 2011). O método de cocção e a temperatura de cozimento também podem afetar consideravelmente a maciez (YANCEY et al., 2011) assim como a quantidade e solubilidade do tecido conjuntivo (PURSLOW, 2005).

Em geral, a concentração do colágeno total é estável no período *post mortem* e a concentração no músculo não é modificada desde o nascimento até o abate do animal (BAILEY; LIGHT, 1989). Por sua vez, a concentração do colágeno solúvel decresce com o aumento do peso e a idade do animal, sendo esta característica diretamente relacionada com a maciez da carne (TORRESCANO et al., 2003). No entanto, estudos prévios não acharam correlação entre maciez e o conteúdo de colágeno solúvel e colágeno total em diferentes pH_f (SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999).

Alguns autores têm relatado a relação entre o pH_f e a maciez da carne. Nestes estudos existe uma relação linear (SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999; LI et al., 2014), e outra curvilínea (WATANABE; DALY; DEVINE, 1996; JELENÍKOVÁ;

PIPEK; STARUCH, 2008; LOMIWES et al., 2014) onde o máximo de dureza ocorre na faixa de 5,8 e 6-2.

De acordo com Yu e Lee (1986), quando o pH_f encontra-se próximo a neutralidade há uma maior atividade de enzimas proteolíticas que são as calpaínas, resultando em uma importante relação entre pH e maciez.

Para avaliar a maciez da carne, um dos métodos mais empregados denomina-se força de cisalhamento (FC) (HONIKEL, 1998). Este tem alta correlação com a satisfação dos consumidores e avalia a resistência da deformação ao corte de uma amostra ao aplicar uma força. Este método associado à classificação de carcaças apresenta alto potencial para predizer a maciez do músculo *Longissimus dorsi* (KOOHMARAIE et al., 1998). Por sua vez, o índice de fragmentação miofibrilar (MFI) é um teste objetivo que avalia as alterações das estruturas musculares durante o processo de proteólise *post mortem*. Segundo Silva, Patarata e Martins (1999), este índice pode explicar mais de 45% da variação na maciez da carne, apresentando contribuições importantes quando comparado com os resultados obtidos em solubilidade de colágeno ou comprimento do sarcômero. Para Whipple et al. (1990), aos três dias *post mortem* o MFI foi considerado um dos indicadores de maior correlação com força de cisalhamento após 14 dias de maturação da carne bovina.

2.4.3 Capacidade de retenção de água

O principal constituinte da carne fresca é a água (75%). A habilidade da carne em reter esta água e converte-se em um parâmetro essencial para a satisfação do consumidor e a indústria. Para o consumidor, uma baixa capacidade de retenção de água afeta a aparência da carne *in natura*, seu comportamento durante o cozimento e a suculência durante a mastigação (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005). Na indústria causa perdas econômicas, particularmente em carnes processadas, em que a estrutura do tecido foi destruída e não está mais apta para impedir a saída do fluido liberado pelas proteínas (SHÄFER et al., 2002).

Nas células musculares a água esta localizada nas miofibrilas, entre as miofibrilas e o sarcolema (membrana celular), entre as células do músculo e entre os grupos de feixes musculares (OFFER; TRINICK, 1983; HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005). Têm-se observado que o espaço entre os filamentos varia entre

320 Å e 570 Å em relação ao pH, comprimento do sarcômero, força iônica, pressão osmótica e se o músculo está em pré-rigor ou post-rigor (OFFER; TRINICK, 1983; PUOLANNE; HALONNE, 2010).

A água no tecido muscular existe de três formas: fortemente “ligada” à proteína, outra fração está “imobilizada” no tecido muscular e outra fração esta “livre” (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

A água “ligada” está presente em uma quantidade muito pequena no músculo, têm pouca mobilidade e resiste ao congelamento e expulsão pelo aquecimento (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005). A perda da água “livre” tem a maior importância no resfriamento e estocagem das carcaças, a perda desta água ocorre por evaporação ou gotejamento. A água “imobilizada” é a de maior mudança no processo de conversão do músculo em carne. Nas mudanças das estruturas nas células do músculo e a queda do pH, a água pode ser perdida pelo gotejamento (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

Outra mudança na conversão do músculo em carne é a proteólise miofibrilar (KRISTENSEN; PULFORD, 2001) que pode contribuir na redução da capacidade de retenção de água, particularmente em condições de queda rápida do pH no período pré-rigor. Uma vez que o pH tenha atingido o ponto isoelétrico (PI) das proteínas, principalmente miosina (PI = 5,4), a carga líquida da proteína é zero, ou seja, as cargas positivas e negativas sobre as proteínas são essencialmente iguais (PUOLANNE; HALONNE, 2010). Estes grupos positivos e negativos dentro da proteína são atraídos um para o outro, resultando em uma redução na quantidade de água que pode ser atraída e retida por essa proteína. Além disso, uma vez que cargas iguais se repelem, a carga líquida das proteínas que fazem à miofibrila se aproximarem de zero, reduz a repulsão de estruturas dentro da miofibrila, permitindo que essas estruturas se aproximem mais estreitamente. O resultado final disso é a redução de espaço dentro da miofibrila. A desnaturação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares em pH baixo (especialmente se a temperatura ainda está alta) principalmente da cabeça da miosina, desmina e vinculina (MELODY et al., 2004; ZHANG et al., 2006) pode ser responsável pelo recolhimento no espaçamento da rede miofibrilar reduzindo-se a capacidade de reter água pela formação de canais de gotejamento (KRISTENSEN; PULFORD, 2001; SHÄFER et al., 2002; HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo preliminar (Etapa I)

O presente estudo foi idealizado para obter uma visão do atual “status” do pH_f (24 h *post mortem*) de animais machos inteiros abatidos no Brasil, uma vez que tais levantamentos não têm sido reportados no país.

Esta etapa foi desenvolvida para identificar a ocorrência do pH_f nas carcaças produzidas nos frigoríficos comerciais. O estudo foi conduzido durante 6 meses (jul-dez) usando bovinos machos inteiros da produção regular do frigorífico em diferentes abates (Figura 2). Os animais avaliados apresentavam a mesma condição pré-abate (criados em sistemas de pastagem, distancia percorrida (média 80 Km), peso (média 295 kg), idade (média 30 meses) e terminados em confinamento 45 dias antes do abate) tanto pós abate (tempo de jejum, abate, temperatura e tempo de armazenamento).

Após 24 horas *post mortem* (tempo estabelecido pelo frigorífico para o armazenamento das carcaças em câmara fria a 4-5 °C) foram realizadas medições de pH_f diretamente no músculo *Longissimus dorsi* de meias carcaças entre a 12^a e 13^a costelas.

Para definir o tamanho da amostragem, foi utilizada a fórmula para populações infinitas $n = \left[z \cdot \frac{\alpha}{e} \right]^2$ ($\alpha = 0,05$, $e = 5\%$). No total foram mensuradas 399 meias carcaças 24 h *post mortem*.

Figura 2 - Animais machos inteiros *Bos taurus indicus*,) da produção regular do frigorífico utilizado nesta pesquisa.

3.2 Amostragem e Análises de laboratório (Etapa II)

Após o abate convencional no frigorífico com os padrões do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal – RIISPOA 1987, em frigorífico comercial, as carcaças foram armazenadas em câmaras frias a 3 - 4°C por 24 h.

Logo após este período, foram mensurados os valores de pH_f , utilizando um pHmetro portátil (modelo HI99163 marca HANNA INSTRUMENTS), diretamente no músculo *Longissimus dorsi* entre a 12^a e 13^a costelas, e classificados segundo as 3 faixas de pH_f identificadas na primeira etapa deste estudo. No total foram removidos 12 músculos *Longissimus dorsi* de meia carcaça, 4 por cada faixa de pH_f (Fig.3)

Figura 3 – Músculos *Longissimus dorsi* de meia carcaça usados nesta pesquisa.

No frigorífico, os músculos *Longissimus dorsi* foram embalados à vácuo e mantidos refrigerados para serem transportados à planta piloto do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, Piracicaba/SP onde permaneceram refrigerados em câmara fria a 2°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 h.

Após 48 h do abate, foi mensurado novamente o pH_f dos músculos no laboratório e verificou-se sua classificação segundo as faixas de pH_f.

Logo após, em ambiente climatizado a 15°C, os músculos foram porcionados em corte transversal para obtenção de bifes de 1,5 e 2,5 cm de espessura para o desenvolvimento das análises de laboratório. O total dos bifes separados por cada grupo de pH_f foram embalados a vácuo utilizando uma máquina seladora (300b, Selovac) e foram estocados em câmara fria a 2°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 28 dias (Fig. 4).

Nos bifes de 1,5 cm foram obtidas amostras para as análises de índice de fragmentação miofibrilar (MFI), colágeno total (CT) e colágeno solúvel (CS), eletroforese em gel de poliacrilamida e imunodeteção. Por sua vez, nos bifes de 2,5

cm foram realizadas análises de cor, pH e força de cisalhamento (FC). Os períodos avaliados correspondem a 0 (48h), 7, 14, 21 e 28 dias de maturação.

Para cada dia de avaliação foram retirados da câmara de refrigeração bifes de 1,5 cm que foram destinados as análises citadas acima, sendo que, para análise de MFI as amostras foram congeladas e mantidas a -80°C , para as análises de CT e CS, as amostras foram liofilizadas e mantidas congeladas a -20°C , para as análises de eletroforese e imunodeteção, as amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e mantidas armazenadas a -80°C . Por sua vez os bifes de 2,5 cm que foram destinados as análises de cor, pH e FC foram analisados no próprio dia em que foram retiradas da câmara de refrigeração.

Figura 4 – Músculos de média carcaça classificados segundo faixas de pH_i identificados (A); Músculo sendo porcionado (B); Bifes obtidos por cada músculo para o desenvolvimento das análises (C); Embalagem e estocagem (2°C) dos bifes obtidos para cada grupo de pH_i (D)

3.2.1 pH

A avaliação do pH no interior de cada bife foi realizada após a abertura das embalagens nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação. Foi utilizado um pHmetro portátil (modelo HI99163 marca HANNA INSTRUMENTS), calibrado com solução tampão de pH 4,0 e 7,0. Os valores de pH foram obtidos movimentando o pHmetro em três pontos.

3.2.2 Perda por gotejamento

Para determinar a perda por gotejamento foi utilizada a metodologia descrita por Honikel (1998), sendo realizada após a abertura da embalagem nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação. Foram pesados aproximadamente 100 g do músculo *Longissimus dorsi*, envoltos em embalagem plástica reticulada e foi suspenso por um fio de modo que o exsudado não permaneceu em contato com a carne. Cada amostra foi mantida em câmara fria à temperatura de $2 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 72 h foi retirada a amostra da embalagem plástica e removida a umidade superficial com o auxílio de papel absorvente. Os pesos antes e após foram utilizados e o resultado foi expresso em porcentagem.

3.2.3 Cor instrumental

A cor instrumental foi determinada na superfície dos bifes após a abertura da embalagem nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação. Foi utilizado um espectrofotômetro portátil MiniScan®XE Plus (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) conectado a um computador equipado com o sistema Universal Software V4.10. Esse equipamento foi calibrado e padronizado para operar com as seguintes especificações: geometria ótica 45/0, 25 mm de diâmetro de abertura, com ângulo de observação de 10° e iluminante D65 (AMSA, 2012). O instrumento foi calibrado contra uma placa cerâmica branca ($L^* = 97,29$, $a^* = -0,07$, $b^* = 0,12$) segundo especificações do fabricante. A estabilidade da cor foi avaliada após a abertura da embalagem e exposição ao ar atmosférico por 60 minutos, em ambiente refrigerado (INSAUSTI, et al., 1999). As coordenadas CIE L^* , a^* , b^* foram obtidas pela movimentação do aparelho, em cinco posições diferentes, de tal forma que toda a superfície disponível da carne foi amostrada.

3.2.4 Força de cisalhamento (FC)

Foram utilizados bifes de carne *in natura* de 2,5 cm de espessura e assados em grelha elétrica (Edanca), com aquecimento na parte inferior e superior das chapas à temperatura média de 160°C . Quando os bifes atingiam temperatura interna geométrica de 50°C foram virados e a cocção era concluída quando a temperatura atingia 71°C , conforme recomendações do AMSA (1995). Após o cozimento os bifes foram mantidos em câmara fria sob-refrigeração a 2°C por 24 h.

Logo após foram obtidos cortes de bifes cilíndricos de 1,27 cm de diâmetro, empregando um vazador acoplado a uma furadeira elétrica. Os cilindros foram cortados transversalmente às fibras musculares com o uso de um texturômetro marca Macmesin BFG-500N com lâmina Warner-Bratzler a velocidade de 5 mm/s. A força empregada no corte foi expresso em kgf. Esta análise foi desenvolvida nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação

3.2.5 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI)

A determinação do MFI foi baseada na metodologia descrita por Culler et al. (1978). Amostras de carne obtidas após a abertura da embalagem nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação e armazenadas congeladas, (-80°C como descrito previamente), foram descongeladas, pesadas (1 g) e homogeneizadas em 10 mL de tampão de índice de fragmentação miofibrilar (TMFI) (100 mM KCl; 20 mM de fosfato de potasio pH 7,0; 20 mM EDTA, 1 mM Mg Cl₂ e 1mM NaN₃ pH 7,0) a 4 °C em homogeneizador Ultra-Turrax (Modelo T18, marca IKA) a 18.000 rpm, totalizando três homogeneizações de 30 segundos cada. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 1000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com o mesmo volume inicial de TMFI seguindo-se duas centrifugações sucessivas, sendo a última ressuspensão feita com a metade do volume inicial de TMFI (5mL). O material foi filtrado em peneira fina e armazenado a 4°C. A quantificação de proteína total foi feita pelo método de Biureto (GORNALL, BARDAWILL & DAVID, 1949). Para a determinação de MFI as amostras foram diluídas em TMFI para obtenção de um volume final de 5 mL e concentração de proteína de 0.5 mg/mL. Os valores de MFI foram obtidos após a leitura da absorbância da suspensão miofibrilar a qual foi medida a 540 nm e multiplicada por um fator de 200.

3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

3.2.6.1 Extração da fração protéica

Amostras de carne congeladas e que foram obtidas após a abertura da embalagem nos 0, 14 e 28 dias de maturação e pulverizadas em nitrogênio líquido

(1,0 g) (como descrito previamente) foram homogeneizadas em 10 mL de Tampão de Extração Total (TET) (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS e 2% 2-mercaptoetanol) a 4 °C, em homogeneizador Ultra-Turrax (modelo T18, marca IKA) a 20.000 rpm, por 20 segundos. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C em Ultrafreezer (modelo NUA1-NU-9483GC, marca Nuaire) até o momento das análises. A quantificação de proteína total foi determinada usando reagente de Bradford (Quick Start Bradford Dye Reagente 1X- Bio Rad-catalog # 500-0205) e como proteína padrão para preparação da curva padrão a albumina de soro bovina (BSA) (GORNALL, 1949).

3.2.6.2 Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida

Uma alíquota de 200 µl de cada uma das amostras foi diluída em 200 µl de tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glicerol, 2% SDS; 5% 2-mercaptoetanol; 0,02% Bromofenol). Posteriormente, a solução foi aquecida a 50 °C por 20 min e centrifugada a 7000 g por 15 min a 20 °C. De acordo com o tamanho das proteínas a serem identificadas, foram confeccionados Géis de Resolução (Resolving Gel) de concentração 5,0 % (1,5M Tris-HCl, pH 8,8; 40% Acrilamida/Bisacrilamida [35,1:1]; 10% SDS; 10% APS e 0,1 % Temed) e géis de Empacotamento (Stacking Gel) a 4,0 % (0,5M Tris-HCl - pH 6,8; 40% Acrilamida/Bisacrilamida [35,1:1]; 10% SDS; 10% APS e 0,1% Temed). Alíquotas dos homogenatos contendo 100 µg de proteína total foram carregadas em cada poço dos géis. Os géis (8cm x 9cm x 1.5mm) foram corridos no sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell da Bio-Rad a 5 mA por 14 h, utilizando Tampão de Corrida (Tampão Glicina) (25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 0,5% SDS, pH 8,3). Os padrões de peso moleculares utilizados foram HiMark™ Pre-stained Protein Standards (Invitrogen, LC 5699) e Pre-stained Kaleidoscope Molecular Weight Standards (Bio-Rad, 161-0375) num volume total de 20,0 µl/poço e 10,0 µL/poço, respectivamente, permitindo a identificação de fragmentos protéicos de peso molecular de 10 a 500 kDa. Após a corrida os géis foram corados em solução de coloração (17% Sulfato de Amônia; 2% Ácido Fosfórico; 30% Metanol; 0,04% Coomassie blue G-250) por 48 h (FAROUK et al., 2014). Posteriormente os géis foram lavados em água destilada por

três horas e as imagens foram obtidas em equipamento fotodocumentador (ChemiDoc MP da Bio-Rad).

3.2.7 Imunodeteção

3.2.7.1 Preparação das amostras

Aproximadamente 1,0 g de carne congelada que foram obtidas após a abertura da embalagem nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação e pulverizada em nitrogênio líquido (como descrito previamente) foi homogeneizada em 10 mL de tampão de extração (10 mM (NaH₂PO₄, Na₂PO₄); 0,2% SDS, pH 7,0) a 4 °C em homogeneizador Ultra-Turrax (modelo T18, marca IKA) a 20.000 rpm, por 20 segundos. Os homogenatos foram centrifugados a 1.500 g por 15 minutos a 20°C. A quantificação de proteína total foi determinada usando reagente de Bradford (Quick Start Bradford Dye Reagente 1X- Bio Rad- catalog # 500-0205) e como proteína padrão para preparação da curva padrão a albumina de soro bovina (BSA) (GORNALL, 1949). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento da análise.

3.2.7.2 Análise de Imunodeteção

Os sobrenadantes das amostras tiveram sua concentração de proteínas ajustado para 8 mg/mL com a adição de tampão de extração. Uma alíquota de 200 µl foi diluída em 200 µL de tampão Pironin-Y (30 mM Tris-HCl; 30 mM EDTA; 30% Glicerol; 3% SDS; 0,003% Pironin-Y; pH 8,0), reduzindo a concentração de proteínas das amostras a 4 mg/mL, posteriormente aquecida a 50 °C por 20 min. Para determinação da proteína miofibrilar desmina e/ou troponina foram utilizados géis de Resolução (Resolving Gel) de concentração 12 % (1,5M Tris-HCl, pH 8,8; 40% Acrilamida/Bisacrilamida [35,1:1]; 10% SDS; 10% APS e 0,1 % Temed) e géis de empacotamento (Stacking Gel) a 4,0 % (0,5M Tris-HCl - pH 6,8; 40% Acrilamida/Bisacrilamida [35,1:1]; 10% SDS; 10% APS e 0,1% Temed). Alíquotas do sobrenadante contendo 30 µg de proteína total (15 µL) foram carregadas em cada poço do gel (8cm x 9cm x 1mm). Os géis foram corridos no sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell a 120 mA por 2 h, utilizando tampão Glicina (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). O padrão molecular utilizado (7 µl por poço)

para identificar as bandas de cada gel foi o Pre-stained Kaleidoscope Molecular Weight Standards (Bio-Rad, 161-0375).

Após a corrida do gel, as bandas proteicas foram transferidas para membranas imuno-blot PVDF (9 cm x 13,5 cm - AmershamTM HybondTM ECL, GE Healthcare), com a utilização de um cassete, contendo espuma, papel filtro, membrana PVDF e gel. A corrida foi realizada a 90 V, 180 mA e 90 min, usando o sistema Mini Protean II da Bio-Rad e tampão de transferência (Tris-HCl, glicina, metanol). Terminado a corrida a membrana foi colocada em solução bloqueadora (5% leite em pó desnatado; solução PBS-Tween (0,08M Na₂HPO₄.2H₂O; 0,02M NaH₂PO₄.H₂O; 0,1M NaCl; 0,1% Tween 20) por 60 minutos. Após o bloqueio foi feita a lavagem em solução PBS-Tween (4 vezes/10 minutos) e assim as membranas foram incubadas com o anticorpo primário Anti-Desmina (Sigma-Aldrich, D1033) e/ou Anti-Troponina (Sigma-Aldrich, T) overnight, diluídos 1:5.000 em PBS-Tween. As membranas foram lavadas mais 4 vezes/10 min em solução PBS-Tween e colocadas em contato com o anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate (BioRad, 172-1011) diluído 1:5.000 em solução PBS-Tween por 60 minutos. Após lavagem das membranas 4 vezes/10 min com solução PBS-Tween, depositou-se sobre elas o reagente de quimioluminescência (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, 32209) (KIM, et al., 2010). As imagens das bandas luminescentes foram capturadas em equipamento fotodocumentador (ChemiDoc MP da Bio-Rad).

3.2.8 Colágeno

A análise de colágeno total e solúvel foi realizada segundo Bergman e Loxley (1961) modificado por Brown; Worsfold e Sharp (2001) no músculo estudado nos tempos 0 dias e 28 dias *post mortem*.

3.2.8.1 Colágeno total (CT)

Para a análise de colágeno total, amostras de carne (350 mg) e que foram obtidas após a abertura da embalagem nos 0 e 28 dias de maturação e armazenadas liofilizadas (como descrito previamente) foram hidrolisadas com 12 ml de HCl 6 N em placa aquecedora a 110 °C por 16 h. Em seguida o hidrolisado foi

deixado até chegar a temperatura ambiente onde foi filtrado em papel filtro WHATMAN nº1 e neutralizados com 12 ml de NaOH 6 N. Cada amostra foi diluída 10 vezes em água MilliQ. Em seguida 250 µl do hidrolisado foi oxidado com 500 µl de Cloramina-T trihidrato (Merck Millipore) preparada na hora e deixou-se em reação por 5 minutos. Logo após este tempo, 500 µl de 4-(dimetilamino)-benzaldeído (Sigma) foi adicionado, e deixou-se reagir por 5 minutos. Em seguida, as amostras com os reagentes foram colocados em banho-maria por 45 minutos a 60°C. Após esse tempo, as amostras foram retiradas do banho e resfriadas em gelo por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV 1800) a 570 nm de comprimento de onda. O teor de colágeno e suas frações foram avaliados pela quantificação do aminoácido hidroxiprolina após a hidrólise do material. Os resultados foram calculados mediante uma curva de resposta. A expressão dos resultados refere-se aos valores de hidroxiprolina que foram obtidos a partir das leituras da absorbância realizadas em espectrofotômetro. O teor de colágeno total foi calculado assumindo que o peso do colágeno é 7,25 vezes a concentração da hidroxiprolina (PALKA, 1999) e foi expresso em g de colágeno total/100 g de amostra em base seca.

3.2.8.2 Colágeno Solúvel (CS)

Para a análise de colágeno solúvel, amostras de carne (500mg) e que foram obtidas após a abertura da embalagem nos 0 e 28 dias de maturação e armazenadas liofilizadas (como descrito previamente), foram misturadas com 10 ml de água MilliQ e levadas ao banho-maria a 80 °C por 75 minutos. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos a 20 °C. Logo após, o sobrenadante foi misturado com 10 ml de HCl 6 N e hidrolisado em placa aquecedora a 110 °C por 16 h. O hidrolisado foi resfriado até atingir a temperatura ambiente e foi neutralizado com igual volume de NaOH 6 N. Após a neutralização, o conteúdo de hidroxiprolina para cada amostra foi determinado usando a mesma metodologia descrita previamente para colágeno total. O teor de colágeno solúvel e suas frações foram avaliados pela quantificação do aminoácido hidroxiprolina após a hidrólise do material. Os resultados foram calculados mediante uma curva de resposta. A expressão dos resultados refere-se aos valores de hidroxiprolina que foram obtidos a partir das leituras da absorbância realizadas em espectrofotômetro.

O teor de colágeno solúvel foi calculado assumindo que o peso do colágeno é 7,25 vezes a concentração da hidroxiprolina (PALKA, 1999) e foi expresso em %.

3.3 Análise estatística

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado e sua técnica de modelos mistos com medidas repetidas no tempo. O modelo utilizado foi $y_{ij} = \mu + \eta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$, onde, y_{ij} corresponde ao valor da variável resposta do i-ésimo tempo sob o j-ésimo tratamento (faixa de pH_f); μ é a média geral; η_i é o efeito aleatório do i-ésimo tempo; α_j é o efeito do j-ésimo nível do tratamento (faixa de pH_f). ε_{ij} é o erro experimental. A análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. Nos testes estatísticos foram considerados níveis de significância a 5% usando teste de Tukey. Correlações de Pearson foram realizadas entre as variáveis. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do procedimento PROC MIXED do software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Todas as figuras foram desenhadas usando o software SigmaPlot (versão 12.0, Systat, San Jose, CA, USA).

Para identificar as faixas de pH_f a serem utilizadas nesta pesquisa, a análise de agrupamento (cluster) foi baseado na quantificação de similaridade/semelhança entre os dados de pH_f obtidos e os grupos (níveis) pré-estabelecidos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do procedimento DISCRIM do software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo Preliminar

Após a análise de agrupamento (*cluster*), de acordo a ocorrência dos pH, os grupos obtidos foram três: A = pH_f 5,5 até 5,8 (baixo-normal); B = pH_f 5,81 até 6,3 (intermediário); C = pH_f > 6,3 (alto) como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos grupos segregados de acordo aos valores de pH_f mensurado após 24 h *post mortem* no músculo *Longissimus dorsi* de animais machos inteiros *Bos taurus indicus* em abatedouro comercial

Grupo	pH _f	N	Média	DP
A	5,5 – 5,8	187	5,68	0,07
B	5,81 – 6,3	190	5,96	0,12
C	>6,3	22	6,46	0,12

N = número de meias carcaças.

DP = Desvio Padrão.

Atendendo a menor ocorrência de pH_f apresentado no grupo C (22 meias carcaças), foi definido que no grupo de 100 animais que se teria a disposição para este estudo no frigorífico, no mínimo deveríamos selecionar 4 carcaças por cada faixa de pH_f.

A carne é o resultado de alterações sofridas pelo músculo *post mortem*, caracterizada por dois eventos bioquímicos: o início, estabelecimento e resolução do *rigor mortis* e pelo processo de maturação. O primeiro evento e sua principal expressão, a acidificação muscular, atualmente é amplamente estudado. O estudo do pH_f do músculo *post mortem* é importante porque, primeiro, age como um estimador geral do tipo de fibra, é um preditor geral do balanço no metabolismo energético e o nível de reservas de energia nos músculos (ENGLAND, et al., 2011; SCHEFFLER et al., 2007), sendo este último de interesse para o manejo *ante mortem* dos animais. Em segundo lugar, esta medida permite prever certas características qualitativas da carne, como maciez, cor e capacidade de reter água (MALTIN et al., 2003).

As três faixas de pH_f identificadas para este estudo, coincidem com as reportadas por Lomiwes et al. (2013); Pulford et al. (2008); Silva, Patarata e Martins (1999); Watanabe, Daly, Devine (1995) no estudo da influência do pH_f na qualidade da carne.

4.2 pH

O tempo de maturação inicial (dia 0) foi utilizado para caracterizar a matéria prima às 48 h *post mortem* e verificar se os pH_f nos diferentes músculos continuavam nas faixas selecionadas no frigorífico 24 horas *post mortem*.

Tabela 2 – Valores de pH do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação

Variável	Tempo (dias)	pH final (pH _f)						Total	± DP
		pH (5,5-5,8)		pH (5,81-6,3)		pH (>6,3)			
		Média	±DP	Média	±DP	Média	± DP		
pH	0	5,76 ^{CA}	0,04	6,09 ^{BA}	0,04	6,44 ^{AA}	0,07	6,08^A	0,05
	7	5,67 ^{CA}	0,16	5,85 ^{BB}	0,06	6,32 ^{AB}	0,12	5,95^B	0,11
	14	5,73 ^{CA}	0,14	5,79 ^{BB}	0,08	6,32 ^{AB}	0,11	5,94^B	0,11
	21	5,79 ^{CA}	0,13	5,84 ^{BB}	0,10	6,34 ^{AB}	0,11	5,99^B	0,11
	28	5,69 ^{CA}	0,13	5,80 ^{BB}	0,08	6,27 ^{AB}	0,11	5,91^B	0,10
Total		5,73^c	0,13	5,86^b	0,11	6,33^a	0,13		
Significância		pH final (0.0013); Tempo (0.0008); pH final*Tempo (0.1272)							

^{A-C} Valores na coluna seguidos de diferentes letras subscritas diferem estatisticamente dentro de cada tempo de maturação

^{a-c} Valores na linha seguidos de diferentes letras sobrescritas diferem estatisticamente dentro das faixas de pH_f

DP= Desvio Padrão

Durante o tempo de maturação não houve diferença ($P < 0,05$) nos valores do grupo pertencente à faixa de pH_f baixo-normal até o final do período experimental (Tabela 2) significando que 48 h *post mortem* estes músculos poderiam ter atingido seu pH final (BOUDJELLAL et al., 2008; CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; YOUNG et al., 2004).

O tempo de maturação afetou o comportamento do pH observado para os bifes originários do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros nos grupos de pH_f alto e intermediário (Tabela 2) do dia 0 para o sétimo dia de maturação, onde permanece sem mudanças ($P > 0,05$) até o final do período experimental (28 dias). No entanto, esta diferença de pH não afetou a classificação por faixa feita para cada tratamento no frigorífico nas 24 horas *post mortem*.

Esta diminuição do pH nos bifes de *Longissimus dorsi* embalados a vácuo pode ser atribuída a um provável crescimento de bactérias lácticas, devido às condições anaeróbicas e o seu metabolismo tenderem a reduzir o pH (BORCH, KANT-MUERMANS, BLIX, 1999; BLIXT, BORCH, 2002). Carnes com pH mais elevado são mais susceptíveis à deterioração bacteriana. Segundo Blixt e Borch (2002) o maior desenvolvimento de bactérias lácticas foi observado às 3 semanas em

pH_f alto quando comparadas ao desenvolvimento observado às 8 semanas em bifes de carne bovina embalada a vácuo em pH_f baixo. Igualmente relatam a queda do pH de 5,6 (na semana 1 de refrigeração) para 5,3 durante o período de armazenamento (8 semanas) de carne embalada a vácuo, devido à presença de ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas. No entanto, a influência do pH_f no comportamento microbiológico da carne sob armazenamento não foi o foco deste estudo, por isso não foram feitas análises específicas, entretanto o comportamento do pH poderia ser explicado através do tempo.

O pH_f (Tabela 2), dos três grupos de músculos (baixo, intermediário e alto), apresentaram diferenças ($P < 0.05$) como esperado. As diferenças de pH entre os grupos musculares foram observadas ao longo de todo o período experimental. No período inicial, (dia 0 ou 48 h *post mortem*) o valor médio do pH_f baixo-normal foi de 5,76 o pH_f intermediário 6,09 e o pH_f alto 6,44 (Figura 5). Estes resultados podem ser atribuídos à alta variabilidade dos animais, o sistema de produção usado, a susceptibilidade ao estresse pré-abate, sexo, efeito de dominância, restrição alimentar, menor quantidade de gordura intramuscular e de cobertura, fatores genéticos e de manejo pós-abate (JELENÍKOVÁ; PIPEK; STARUCH, 2008; PULFORD et al., 2008).

Estudos mostram que o pH final apresenta relação direta com o estresse *ante mortem* sofrido pelo animal. O estresse é a resposta biológica desencadeada pelo animal ao estímulo provocado por um agente estressor, como o transporte, o contato com animais desconhecidos na área de espera e atordoamento (HERNANDEZ, et al., 2010). Devido o macho inteiro ser mais suscetível ao estresse pré-abate, este fator pode ter influenciado nos valores altos de pH obtidos neste estudo, pois em um estado de estresse há o aumento da temperatura corporal somado a rápida mobilização do glicogênio muscular, que se for reduzido ou esgotado no momento do abate, o grau de acidificação *post mortem* será menor, acarretando em uma carne de pH maior (JELENÍKOVÁ; PIPEK; STARUCH, 2008; PULFORD et al., 2008; SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999).

4.3 Perda por gotejamento

A avaliação da perda por gotejamento de bifes do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros após 48 h *post mortem*, reflete que entre os três grupos

de pH_f existem diferenças ($P < 0,05$) sendo, que no pH_f alto ($> 6,3$) o menor valor (1%) foi observado quando comparado as perdas por gotejamento observadas no pH_f baixo-normal (3%) e pH_f intermediário (2,7%) (Figura 5).

Figura 5 - Influência do pH_f na perda por gotejamento no músculo *Longissimus dorsi* de animais machos inteiros *Bos taurus indicus*.

O maior valor da perda por gotejamento no pH_f baixo-normal (3%) e no pH_f intermediário (2,7%) poderia estar associado à degradação das proteínas do músculo *post mortem*.

Estudos prévios têm indicado que a degradação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares influenciam não só a maciez da carne, mas também determina a quantidade da água perdida por gotejamento durante o armazenamento. Inicialmente a desnaturação das cabeças de miosina no período *post mortem*, acarreta um encolhimento lateral das miofibrilas. Este fenômeno de desnaturação da miosina reduz a habilidade desta proteína de se ligar à água resultando em decréscimo da capacidade de reter água no interior do tecido e, portanto, incrementa o gotejamento (PEARCE et al., 2011).

Para Boles e Swan (2002), o resultado de carnes de animais inteiros apresentar menor perda por gotejamento em pH_f alto pode ser o resultado da miosina estar longe do seu ponto isoelétrico, por tanto a sua capacidade de reter água é maior.

Por outro lado, Pearce et al. (2011) e Huff-Lonergan e Lonergan (2005), descreveram que um alto nível de degradação da desmina, com consequente ruptura dos filamentos intermediários, está associada ao aumento na capacidade de reter água do músculo durante o armazenamento, pois esta proteína está relacionada com o afrouxamento da estrutura miofibrilar resultando em diminuição dos canais de gotejamento. No presente estudo foi observado que, no pH_f alto, a degradação da desmina foi acelerada, conforme apresentado no item 4.8., o que pode explicar a maior capacidade de reter água e portanto o menor valor de perda por gotejamento (1%) quando comparado aos outros grupos de pH_f.

4.4 Cor Instrumental

Os bifes obtidos do músculo *Longissimus dorsi* de machos inteiros nos diferentes grupos de pH_f não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) no valor de luminosidade (L^*) (Figura 6), assim como também não apresentaram diferenças entre os grupos de pH_f do 0 ao 21 dias de armazenamento. Segundo Taylor et al. (1990), esta estabilidade na cor pode ser considerada uma vantagem, e que a carne ainda será capaz de oxigenar quando exposta ao ar, após um período prolongado de maturação.

Observou-se, porém, no dia 28 *post mortem* diferença ($P < 0,05$) em comparação aos outros períodos, com incremento dos valores de L^* em todos os grupos de pH_f, apresentando no pH_f alto um valor de 42,81, no pH_f intermediário 42,43 e no pH_f baixo-normal 41,53.

O comportamento nos valores de L^* são similares aos reportados por Insausti et al.(2001), provavelmente devido às mudanças que ocorrem na carne durante a maturação, principalmente a degradação da proteína, o que resulta em uma maior dispersão e o aumento de luminosidade.

Figura 6 - Influência do pH_f no valor de L* no músculo *Longissimus dorsi* de animais machos inteiros *Bos taurus indicus*.

Em geral, os valores de luminosidade L* observados para os bifes de *Longissimus dorsi* de machos inteiros nos diferentes grupos de pH_f até o dia 28 de armazenamento, podem ser classificados como característicos de carne fresca, encontrando-se na faixa de 34 a 43 (ABRIL et al., 2001; PAGE; WULF; SCHWOTZER, 2001; WULF et al., 2002).

Pela análise da Figura 7 pode-se observar que a evolução no parâmetro a* (intensidade de vermelho), ao longo do período experimental, apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) aos 0, 7 e 28 dias de maturação. Por sua vez, entre os grupos de pH_f aos 7, 21 e 28 dias apresentou-se diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos de pH_f baixo-normal e pH_f intermediário em relação ao pH_f alto que apresentou os menores valores ao longo do período do experimento.

Figura 7 - Influência do pH_f no valor de a* no músculo *Longissimus dorsi* de animais machos inteiros *Bos taurus indicus*.

Como apresentado na Figura 8, em relação aos valores de b* (intensidade de amarelo) não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os níveis de pH_f durante o período de maturação (28 dias). No entanto, diferenças significativas foram observadas entre os tempos de maturação. Estes valores foram aumentando com o tempo sendo de maior valor no pH_f baixo-normal e pH_f intermediário, quando comparado com os valores de pH_f alto.

Figura 8 - Influência do pH_f no valor de b* no músculo *Longissimus dorsi* de animais machos inteiros *Bos taurus indicus*.

Os resultados obtidos nesta pesquisa referentes aos valores de a^* e b^* revelam que a carne com pH_f alto tem uma menor componente vermelha (a^*) e amarela (b^*) do que carnes com pH_f baixo-normal e pH_f intermediário, situação que é referida por vários autores (PURCHAS, 1990; WULF et al., 2002). A cor mais escura da carne com pH_f alto é devida essencialmente a dois fatores. Por um lado, devido ao pH_f elevado, as proteínas miofibrilares da carne tem uma maior capacidade de se ligar à água do que a carne com pH_f normal, resultando numa estrutura fechada com poucos espaços extracelulares e uma maior capacidade de reter água, inibindo a difusão do oxigênio, permitindo desta forma uma maior absorção da luz incidente e baixa dispersão da luz na superfície da carne (HULOT; OUHAYOUN, 1999; ABRIL et al., 2001). Por outro lado, a formação de oximioglobina de cor vermelho brilhante está reduzida devido ao consumo de oxigênio pelas mitocôndrias ser favorecido a pH_f elevado. Desta forma, a camada vermelha brilhante de oximioglobina que se forma na superfície é reduzida, predominando a mioglobina de cor púrpura (SIEDEMAN, 1984). Embora a carne com pH_f alto seja mais escura que a carne com um pH_f baixo-normal, estudos prévios (LEDWARD et al., 1986) fazem referência à uma menor tendência para a formação de metamioglobina, e logo uma melhor estabilidade da cor. No entanto, devido à maior taxa de consumo de oxigênio destas carnes, a camada de metamioglobina poderá ser formada mais na superfície e a descoloração ser visível mais rapidamente (RENERRE, 1990).

4.5 Força de Cisalhamento

Diferenças ($P < 0,05$) foram encontradas desde o dia 0 de maturação entre o pH_f intermediário que apresentou os maiores valores, quando comparado com o pH_f baixo-normal e o pH_f alto (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de força de cisalhamento (kgf) do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação

Variável	Tempo (dias)	pH final (pH _f)						Total	± DP
		pH (5,5-5,8)		pH (5,81-6,3)		pH (>6,3)			
		Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP		
Força de cisalhamento (kgf)	0	6,04 ^{Aa}	1,2	6,52 ^{aAB}	0,86	5,16 ^{bA}	0,62	5,91^A	0,89
	7	5,39 ^{bA}	1,48	7,19 ^{aA}	0,89	4,76 ^{bAB}	0,67	5,79^A	1,01
	14	3,65 ^{Bb}	0,72	5,91 ^{aB}	0,68	4,11 ^{bB}	0,33	4,56^B	0,58
	21	4,15 ^{Ab}	0,88	4,65 ^{aC}	0,41	3,85 ^{aBC}	0,5	4,22^{BC}	0,60
	28	3,82 ^{abB}	1,21	4,63 ^{aC}	1,15	2,85 ^{bC}	0,41	3,77^C	0,92
Total		4,61^b	1,10	5,78^a	0,80	4,15^c	0,51		
Significância		pH final (<.0001); Tempo (<.0001); pH final*Tempo (0.0010)							

^{A-C} Valores na coluna seguidos de diferentes letras sobrescrito diferem estatisticamente dentro de cada tempo de maturação

^{a-c} Valores na linha seguidos de diferentes letras sobrescrito diferem estatisticamente dentro das faixas de pH_f

DP= Desvio Padrão

Estudos indicam que carnes macias apresentam valores de força de cisalhamento abaixo de 4,5 kgf, e o limiar de valores médios de força de cisalhamento que separa uma carne dura da macia para animais *Bos taurus indicus* é igual a 6 kgf (WHEELER; CUNDIF; KOCH, 1994; WHEELER et al., 1994). A carne de animais com contribuição genética de *Bos taurus indicus* superiores a 25% precisam de períodos extensos de maturação, com tempo mínimo de 14 dias de estocagem (KOOHMARAIE, 1994; SHACKELFORD et al., 1991). A partir dos valores de FC obtidos neste estudo, as carnes de pH_f baixo-normal (5,16) e pH_f alto (6,02) podem ser classificadas como macias desde o dia 0 de maturação, enquanto que as carnes que apresentam pH_f intermediário (5,91) seriam consideradas macias a partir de 14 dias de maturação.

O amaciamento tardio da carne no grupo de pH_f intermediário, poderia indicar uma ação dos sistemas de defesa *small Heat Shock Protein* (sHSP) onde se tem hipotetizado que em um pH_f entre > 5,7 e < 6,3 encontram-se expressados nos músculos os maiores níveis de sHSP solúveis e até 22 horas *post mortem* (PULFORD et al., 2008) sendo requerido um maior tempo de maturação para obter uma maciez aceitável (LOMIWES et al., 2013).

O amaciamento natural da carne em condições refrigeradas está relacionado a um processo da fragmentação e mudanças na estrutura miofibrilar, devido à proteólise das proteínas inter miofibrilares (desmina, vinculina), intra miofibrilares (titina, nebulina) e de outras proteínas que vinculam as miofibrilas ao sarcolema. As principais enzimas endógenas associadas neste processo de amaciamento são os

sistemas das calpaínas e as catepsinas (KEMP et al., 2010; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006), e suas atividades dependem do pH final do tecido muscular *post mortem* (KOOHMARAIE, 1994; WATANBE et al., 1996). Baseado nos resultados obtidos nesta pesquisa, poderia se dizer que a maior maciez observada no pH_f alto, refletida nos baixos valores de FC desde o início do experimento, pode ser devido ao resultado da proteólise das proteínas estruturais presentes na banda-I do sarcômero como são a titina, filamina e nebulina, resultados estes em concordância com os obtidos por Contreras-Castillo et al. (2016), Lomiwes et al. (2014) e Wu et al. (2014), e no caso dos valores de FC no pH_f baixo-normal poderia ser devido à proteólise da desmina combinada com a degradação um pouco mais tardia de titina e nebulina, como propôs Lomiwes et al. (2014)

A participação das enzimas calpaina, catepsina e sHSP, importantes no processo de degradação muscular, e que atuam preferencialmente em diferentes faixas de pH_f, serão discutidas nos itens 4.7. e 4.8.

4.6 Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

Foram encontradas diferenças ($P < 0,05$) nos valores de MFI da carne *in natura* após 48 h *post mortem* (dia 0) no pH_f intermediário (32,90) quando comparado com os outros grupos de pH_f. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre o pH_f baixo-normal (59,62) e o pH_f alto (59,81) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de índice de fragmentação miofibrilar do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação

Variável	Tempo (dias)	pH final (pH _f)						Total	± DP
		pH (5,5-5,8)		pH (5,81-6,3)		pH (>6,3)			
		Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP		
MFI	0	59,62 ^{aC}	8,54	32,90 ^{bC}	4,38	59,81 ^{aC}	23,43	50,78 ^D	12,12
	7	64,92 ^{aC}	5,9	48,25 ^{bBC}	10,86	71,82 ^{aC}	12,01	61,67 ^D	9,59
	14	85,75 ^{aB}	13,63	61,09 ^{bB}	7,82	102,70 ^{aB}	18,75	83,18 ^C	13,40
	21	100,63 ^{aAB}	16,29	73,83 ^{bAB}	14,59	117,69 ^{aB}	21,03	97,38 ^B	17,30
	28	112,05 ^{bA}	10,01	89,01 ^{cA}	12,66	144,31 ^{aA}	27,17	115,1 ^A	16,61
Total		84,60 ^b	10,87	61,02 ^c	10,06	99,27 ^a	20,48		

Significância pH final (<.0001); Tempo (<.0001); pH final*Tempo (0.0142)

^{A-C} Valores na coluna seguidos de diferentes letras sobrescrito diferem estatisticamente dentro de cada tempo de maturação

^{a-c} Valores na linha seguidos de diferentes letras sobrescrito diferem estatisticamente dentro das faixas de pH_f

DP= Desvio Padrão

Estes resultados indicam que a fragilização natural das miofibrilas é dependente do pH_f e que como previamente relatado pode coincidir com a proteólise miofibrilar pela ação das enzimas endógenas. Estudos prévios mostraram que quase 50% das mudanças nas miofibrilas ocorrem 24 h *post mortem*, sendo o período durante o qual a μ -calpaína apresenta sua máxima atividade. Neste período o pH (7,0) e temperatura (37°C) do músculo são ideais para o sistema das calpaínas induzir alterações máximas nas miofibrilas (KOOHMARAIE et al., 1987).

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) nos diferentes grupos de pH_f avaliados ao longo do período experimental (Tabela 4).

Após 28 dias de maturação, os bifes de machos inteiros apresentaram um aumento significativo nos valores de MFI, característico do processo proteolítico da carne. Alterações nos valores de MFI são um indicativo da degradação de proteínas que deve ter acontecido nas faixas de pH_f alto e pH_f baixo-normal na banda I (TAYLOR et al., 1985) e da linha-Z (WHIPPLE, 1990) do sarcômero, região na qual a nebulina e titina, proteínas citoesqueléticas assim como a desmina, são degradadas, o que pode ter acontecido nas carnes dos grupos de pH_f alto e pH_f intermediário como descrito previamente.

Neste mesmo período, diferenças ($P < 0,05$) foram observadas entre os grupos de pH, sendo os maiores valores de MFI no pH_f alto (média 144,31) e no pH_f baixo-normal (média 112,05). O menor valor de MFI foi apresentado no pH_f intermediário (média 89,01). Confirmando com os resultados do presente estudo, Silva, Patarata e Martins (1999), avaliando bifes de *Longissimus dorsi* de machos inteiros, observaram que o MFI aumentou significativamente desde o primeiro dia de maturação até o dia 13 em todos os grupos e entre os grupos de pH_f avaliados, e aquele com o maior valor foi o grupo de pH_f alto (128 ± 12). O mesmo comportamento foi observado por Li et al. (2014), em bifes de *Longissimus dorsi* durante 9 d de maturação em diferentes grupos de pH_f , sendo fortemente correlacionados com os valores de FC.

Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo revelam que desde o dia 0 (48 h *post mortem*) o grupo de pH_f alto apresenta uma atividade proteolítica elevada, principalmente nas proteínas estruturais de alto peso molecular, como a titina e nebulina (WU et al., 2014), e de baixo peso molecular como a desmina, podendo ser a consequência da ativação da μ -calpaína em pH perto da neutralidade

(KOOHMARAIE; GEESINK, 2006), evidenciado pelos altos valores de FC e também pelos baixos valores de MFI para esta faixa.

4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise dos géis (5%) (SDS-PAGE) das amostras de *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f, objetivou revelar o comportamento da estrutura muscular altamente organizada pela degradação de algumas proteínas miofibrilares chaves. Estas proteínas de alto peso molecular (titina, nebulina e filamina) têm sido amplamente estudadas, pois sua degradação contribui com o processo de amaciamento e outros aspectos da qualidade da carne (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; LOMIWES et al., 2014; WU et al., 2014; WU; CLARENS; FAROUK, 2014) por serem as primeiras proteínas ligadas à linha-Z, tal degradação desestabiliza o sarcômero (TAYLOR et al., 1995; HO et al., 1994; HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010).

No presente estudo, e como apresentado na Figura 9, foi possível observar algumas bandas com peso molecular superior a 250 kDa, associadas à filamina principalmente na faixa de pH_f alto. Estas bandas identificadas nas diferentes faixas de pH_f aparecem como uma banda logo abaixo, o que provavelmente seria a sua degradação (F2). Também é possível notar que as mesmas são mais visíveis desde o início do período de maturação (dia 0 ou 48 h *post mortem*) no pH_f alto quando comparadas às bandas presentes aos 14 e 28 dias de maturação. Para os outros grupos de pH_f, a degradação da filamina (F2) é observada no dia 28 de maturação. A degradação da filamina pode ser atribuída a um processo de proteólise miofibrilar, devido a ação das proteases endógenas (μ -calpaínas) em períodos prolongados de armazenamento (HUFF LONERGAN et al., 1996; GEESINK et al., 2006).

Estudos prévios também encontraram mudanças estruturais nas proteínas de alto peso molecular como a filamina e com ocorrência mais rápida e intensa em carnes de pH_f alto quando comparados com pH_f baixo-normal (FAROUK et al., 2012).

No mesmo sentido, foi observada a degradação da filamina no pH_f baixo e intermediário a partir dos 14 dias *post mortem*, sendo mais lenta do que os músculos de animais de pH_f alto, onde a quebra começou no primeiro dia *post mortem*, sendo estes resultados similares aos achados por WU et al. (2014).

Figura 9 - Gel de poliácridamida (5%) em função do pH_f e nos 0, 14 e 28 dias de maturação, mostrando a degradação progressiva das proteínas de alto peso molecular. O produto da degradação da Nebulina é indicado com N2 e da Filamina é indicado com F2. **P1**: padrão de peso molecular (até 500 kDa); **P2**: padrão de peso molecular (até 250 kDa)

Como observado na Figura 9, acima dos 500 kDa, pode-se observar uma proteína associada à nebulina. Estas bandas identificadas nas diferentes faixas de pH_f aparecem com uma banda logo abaixo, o que provavelmente seria a sua degradação (N2). Também é possível notar que a nebulina é visível desde o início do período de maturação (dia 0 ou 48 h *post mortem*) em todos os grupos de pH_f . Da mesma forma no pH_f alto são observadas as bandas da possível degradação da nebulina (N2), desde o dia 0, quando comparadas com os outros grupos de pH_f onde foi observada a partir do dia 14 de maturação.

A degradação *post mortem* da nebulina poderia abrandar as ligações do filamento fino na linha-Z e/ou dos filamentos finos nas regiões próximas da banda-I do sarcômero, enfraquecendo assim a estrutura da célula do músculo (TAYLOR et al., 1995). Segundo Root e Wang (2001), porções de nebulina que abrangem a junção I-A do sarcômero tem a capacidade para se ligar à actina e miosina e até podem inibir a atividade da ATPase actomiosina. Recentemente, o estudo de WU et al. (2014) revelou que a degradação da miosina é um importante fenômeno que

influencia o processo de amaciamento da carne. A mudança nas isoformas da cadeia pesada da miosina é associada a presença de proteínas como nebulina e titina em tempos iniciais *post mortem* e sugere que a ruptura estrutural do tecido muscular é iniciada na região da banda A do sarcômero, mais do que na linha-Z próxima da banda-I.

Estudos prévios também encontraram como nesta pesquisa, mudanças estruturais nas proteínas de alto peso molecular como a nebulina (Figura 9) e com ocorrência mais rápida e intensa em carnes de pH_f alto quando comparados com os outros grupos de pH_f (WU, et al., 2014). Isto poderia ser a consequência da ativação da μ -calpaína em pH perto da neutralidade (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

Resultados obtidos neste estudo demonstram que a degradação de proteínas miofibrilares como a nebulina e filamina coincide e poderia explicar os resultados de maciez obtidos para cada faixa de pH_f. Assim, os baixos valores de FC no pH_f alto, apresentados desde o início do experimento poderiam ser atribuídos à proteólise da nebulina e filamina pela ativação imediata do sistema das calpaínas. As calpaínas não atuam diretamente sobre a miosina e actina, porém, degradam as linhas-Z e a banda-I do sarcômero pela proteólise específica de proteínas do citoesqueleto como nebulina, titina (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; KEMP, et al., 2010). Este sistema tem sido amplamente estudado pela sua estreita relação com o processo da maciez, porém, não sendo objeto desta pesquisa, poderia explicar o comportamento da degradação dessas proteínas. As calpaínas tipo I ou a μ -calpaína são ativadas quando o pH cai de 6,8 para aproximadamente 5,7 (KOOHMARAIE, GEESINK, 2006). A m-calpaína é ativada quando o pH está em torno de 5,7 e é responsável pela continuidade do processo de amaciamento, estando ativa em torno das 16 horas *post mortem* e assim permanecendo por longos períodos (GEESINK, et al., 2006, WHEELER, SHACKELFORD, KOOHMARAIE, 2000). Proteínas como a nebulina são proteínas que atuam como suporte para a deposição dos filamentos finos de actina e ancoragem na linha -Z e é a ação da μ -calpaína e m-calpaína sobre estas proteínas que auxiliam o enfraquecimento da estrutura do sarcômero. Sendo assim poderia ser explicado os altos valores do MFI neste grupo de pH_f, levando em conta que este índice indica da fragmentação do tecido muscular.

No caso dos valores de FC no grupo pH_f baixo-normal, a maciez da carne pode ser o resultado da proteólise da filamina (Figura 9) pela ação das catepsinas.

Segundo O'Halloran et al. (1997), principalmente as catepsinas B e L tem sido correlacionadas com maciez de carne bovina, agindo às 8 h *post mortem* em carcaças de pH baixo.

Em pH_f intermediário, os maiores valores de FC obtidos podem ser o resultado do pH estar fora do valor ótimo para a atuação dos sistemas de enzimas proteolíticas previamente descritas para as outras faixas de pH_f (KOOHMARAI, GEESINK, 2006; LOMIWES, et al., 2014; WATANABE, et al., 1996; WU, et al., 2014). Segundo Lomiwes et al. (2013), carnes com pH_f intermediário apresentam maior dureza quando comparadas com carnes pH_f baixo-normal e pH_f alto, devido à atividade e precipitação das sHSP (*Small Heat Shock Protein*). No músculo *post mortem*, na queda do suprimento de oxigênio, inicia-se a morte ou apoptose das células musculares (OULI, 2006). Em resposta ao início desta morte celular são ativadas as proteínas de defesa, denominadas *small Heat Shock Protein* (sHSP), numa tentativa de manter a homeostase celular. Estas proteínas atuam como chaperonas moleculares ligando as proteínas danificadas ou que perderam seu arranjo espacial, impedindo seu dano irreversível (LOMIWES, et al., 2013). Os menores valores de MFI obtidos neste estudo para este grupo de pH_f intermediário poderiam ser explicados por este fenômeno de proteção das sHSPs, onde pode estar associado com a degradação retardada da desmina no pH_f 5,81 até 6,3 e outras proteínas miofibrilares, assim como a atividade restringida da μ -calpaína e a catepsina B (LOMIWES, et al., 2013), como descrito previamente.

4.8 Análise de Imunodeteção

Dado o efeito da proteólise na ultraestrutura do músculo *post mortem*, proteínas como desmina e troponina-T são também consideradas proteínas-chave na determinação da maciez da carne (KOOHMARAI; GEESINK, 2006). Assim, sendo a desmina que interliga discos Z transversalmente, e estes à membrana plasmática, sua proteólise causa uma importante fragilização no sarcômero (TAYLOR et al., 1995). A proteólise *post mortem* da desmina foi visualizada pela análise de imunodeteção (Figura 10).

A partir dos resultados apresentados na Figura 10, pode-se observar que em geral as bandas de desmina (54kDa) são mais visíveis desde o início do período de maturação (dia 0 ou 48 h *post mortem*) nos grupos de pH_f baixo-normal e

intermediário quando comparado com o pH_f alto. Isto indica que a degradação da desmina começou aos 7 dias no pH_f baixo, aos 14 dias no pH_f intermediário e desde o início do experimento no pH_f alto, indicando a ação das enzimas endógenas, principalmente das calpaínas, que agem em pH perto da neutralidade como previamente descrito. Por outro lado, estes resultados coincidem com os altos valores de MFI obtidos nesta pesquisa para o grupo do pH_f alto e baixo-normal e baixos valores de FC para as mesmas faixas.

As bandas identificadas da desmina nas diferentes faixas de pH_f aparecem com uma banda logo abaixo, o que provavelmente seria o produto da sua degradação. No pH_f alto são observadas as bandas da possível degradação da desmina (37kDa) desde o dia 0 *post mortem*. No entanto, mesmo que produtos de degradação da desmina (50kDa) no pH_f baixo-normal e pH_f intermediário são visíveis no dia 7 *post mortem*, não foi visível a banda de 37 kDa para o pH_f intermediário até quando comparado com o pH_f baixo-normal, a qual foi mais expressiva a partir do dia 14 de maturação.

A maior degradação da desmina pode estar relacionada com a diminuição nos valores de FC ao longo do período de maturação, ou seja, significativamente afetada pela maturação. Deste modo, se intensificam os resultados obtidos nas análises físicas e bioquímicas realizadas nesta pesquisa anteriormente, onde se observou menor maciez ou amaciamento mais lento dos bifes de pH_f intermediário em comparação com os outros grupos de pH_f (LOMIWES et al., 2014), o que possivelmente está relacionado à diminuição da ação das proteínas cálcio-dependentes (μ -calpaínas) responsáveis pela proteólise de algumas proteínas miofibrilares e o amaciamento natural da carne (PULFORD et al., 2009).

Figura 10 – Degradação da Desmina apresentada no músculo *Longissimus dorsi* de machos inteiros *Bos taurus indicus* em diferentes pH_f nos diferentes tempos de maturação. Os produtos da degradação da desmina são indicados nos 54kDa e 37kDa

A proteólise *post mortem* da troponina-T foi visualizada pela análise de imunodeteção (Figura 11).

A partir dos resultados apresentados na Figura 11, pode-se observar que, em geral, as bandas de troponina-T (40kDa) são mais expressivas (visíveis) desde o início do período de maturação (dia 0 ou 48 h *post mortem*) em todos os grupos de pH_f, apresentando uma menor visibilidade no dia 28 de maturação no pH_f baixo-normal e alto quando comparado com o pH_f intermediário, o que indicaria a proteólise total desta proteína neste período. Da mesma forma é observado que no pH_f alto os produtos da degradação da troponina-T (37kDa e 30kDa) são visíveis a partir do dia 0 *post mortem*.

No pH_f baixo-normal, produtos de degradação da troponina-T (37kDa) são visíveis a partir do 7d *post mortem*. Bandas de 30, 25 e 20 kDa são visíveis desde o início da maturação no pH_f alto quando comparado com o pH_f intermediário, neste ultimo os produtos de degradação são observados apenas no dia 21 *post mortem*.

O comportamento da troponina-T e sua degradação com aproximadamente 37 e 28 kDa são comumente observados em carnes com valores de FC baixos, (HUFF-LONERGAN et al., 1996; LI et al., 2014) o que sugere à ação das proteases μ -calpaínas, que consideram a troponina-T como um substrato da proteólise (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006) como observado, neste estudo, com maior maior intensidade no pH_f alto, seguido do pH_f baixo-normal.

Figura 11 – Degradação da Troponina-T apresentada no músculo *Longissimus dorsi* de machos inteiros *Bos taurus indicus* em diferentes pH_f nos diferentes tempos de maturação. Os produtos da degradação da Troponina-T são indicados nos 40kDa, 37kDa e 25 kDa

A troponina-T integra o filamento fino no músculo esquelético e participa ativamente na regulação da contração e relaxamento muscular (HUFF-LONERGAN et al., 1996). A degradação da troponina-T no período *post mortem* e o rompimento de suas interações com o filamento fino e grosso na região da banda-I no

sarcômero, pode ocasionar a desintegração da estrutura miofibrilar e o aparecimento de polipeptídios de 30 kDa, ambos indicadores de maciez da carne (TAYLOR et al., 1995).

Neste estudo, a degradação da troponina-T foi desfavorecida no pH_f intermediário, posivelmente devido à ação protetora das *Heat Shock Proteins* (SHP) somada à ação limitada das calpínas e catepsinas em valores de pH entre 5,8 e 6,2 (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES et al., 2014, PULFORD et al., 2008).

4.9 Colágeno Total e Solúvel

No presente estudo não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) nos valores de colágeno total (g. 100 g⁻¹) nem nos valores de colágeno solúvel (%) ao longo do período experimental (28 dias) para os diferentes grupos de pH_f, ou entre os grupos de pH_f e em concordância com o apresentado por Whipple et al. (1990); Silva, Patarata e Martins (1999); Li, Zhou, Xu (2008), provavelmente pela homogeneidade nas idades dos animais utilizados nesta pesquisa (REGAN; CARPENTER; SMITH, 1976).

Tabela 5 – Valores de coágono total (g 100 g⁻¹) e solúvel (%) do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos machos inteiros em diferentes faixas de pH_f e tempos de maturação

Variável		Tempo (dias)	pH final (pH _f)						Total	± DP
			pH (5,5-5,8)		pH (5,81-6,3)		pH (>6,3)			
			Média	±DE	Média	±DE	Média	±DE		
Colágeno total (g 100 g ⁻¹)	0	1,93 ^{aA}	0,35	1,62 ^{aA}	0,38	2,15 ^{aA}	0,57	1,90 ^A	0,43	
	28	1,90 ^{aA}	0,26	1,76 ^{aA}	0,26	2,05 ^{aA}	0,69	1,91 ^A	0,40	
Total		1,92 ^a	0,31	1,69 ^a	0,32	2,10 ^a	0,63			
Significância		pH final (0.1817); Tempo (0.8463); pH final*Tempo (0.7187)								
Colágeno solúvel (%)	0	12,82 ^{aA}	3,2	7,70 ^{aA}	1,16	14,44 ^{aA}	2,58	11,66 ^A	2,31	
	28	13,64 ^{aA}	2,57	8,79 ^{aA}	2,19	14,12 ^{aA}	3,42	12,19 ^A	2,73	
Total		13,23 ^a	2,89	8,25 ^a	1,68	14,29 ^a	3,00			
Significância		pH final (0.6589); Tempo (0.6589); pH final*Tempo (0.8575)								

^{A-C} Valores na coluna seguidos de diferentes letras sobrescrito diferem estatisticamente dentro de cada tempo de maturação

^{a-c} Valores na linha seguidos de diferentes letras sobrescrito diferem estatisticamente dentro das faixas de pH_f

DP= Desvio Padrão

O teor de colágeno total para os bifes obtidos de machos inteiros usados nesta pesquisa variam entre 1,62 e 2,15 g.100 g⁻¹ (com base na matéria seca) como apresentados na Tabela 5. Os valores encontrados na literatura para o músculo

Longissimus dorsi variam entre 1,8 a 3,1 g. 100 g⁻¹ (com base na matéria seca) (WHIPPLE et al., 1990; RHEE et al., 2004; STOLOWSKY et al., 2006). Existe pouca variação na concentração de colágeno total durante o crescimento do animal (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2005) e as variações estão associadas ao uso de animais de diferentes raças, dieta do animal, idade, conformação da carcaça, tipo de músculo, região de amostragem, congelamento e descongelamento da amostra, assim como a metodologia empregada onde pode acontecer uma subestimação do teor de hidroxiprolina e/ou superestimação do colágeno (WHIPPLE et al., 1990; RHEE et al., 2004; ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2005; STOLOWSKY et al., 2006).

Embora existam estudos de correlação entre o conteúdo de colágeno total e dureza da carne (DRANSFIELD, 1997; TORRESCANO et al., 2003; STOLOWSKY, et al., 2006) nesta pesquisa esses resultados não foram obtidos, sendo similares aos resultados obtidos por Avery et al. (1996); Silva; Patarata; Martins, (1999); Archile-Contreras; Mandell; Purslow, (2005); Li; Zhou; Xu, (2008), indicando que a degradação do colágeno é limitada mas que podem ser pesquisados outros parâmetros associados a esta variável.

Como era esperado pela idade dos animais utilizados para este estudo, relativamente jovens, o teor de colágeno solúvel em bifes de animais machos inteiros usados nesta pesquisa não apresentou diferenças ($P > 0,05$), tanto entre os tempos avaliados nem entre os diferentes grupos de pH. Os valores obtidos variam entre 7,7 e 14,4% como apresentados na Tabela 5, e corroboram os valores encontrados na literatura para o músculo *Longissimus dorsi*, que variam entre 6,6 e 17,39% (WHIPPLE et al., 1990; SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999; STOLOWSKY et al., 2006). Ao contrário do que ocorre com o teor de colágeno total, a alteração mais significativa com o avanço da idade do animal relaciona-se com a insolubilidade do colágeno. A solubilidade do colágeno encontrado na carne de animais jovens foi relatada por Cross, Schanbacher, Crouse (1984), que acharam 20,73% do colágeno intramuscular solubilizado em animais jovens de 9 meses, chegando a apenas 9% em animais de 18 meses.

Embora a modificação das propriedades físicas do colágeno seja bem estabelecida, resultados contraditórios tem sido obtidos em relação à solubilidade do colágeno e maciez da carne *in natura* (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2005; PURSLOW, 2005).

Poucos trabalhos foram encontrados relacionando o teor do colágeno com o pH_f *post mortem*. No entanto, os resultados médios de colágeno total e solúvel apresentados neste trabalho corroboram os resultados obtidos por Pierson e Fox (1984) e Silva, Patarata, Martins, (1999).

5 CONCLUSÕES

Foram estabelecidas 3 faixas de pH_f a 24 horas *post mortem* na carcaças avaliadas no frigorífico.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o pH_f é um preditor das características de qualidade da carne de animais zebuínos machos inteiros, como a perda por gotejamento e maciez.

O grupo de pH_f intermediário (5,8 - 6,3) apresentou maior inconsistência quanto às características de maciez e fragmentação miofibrilar, consequência de uma proteólise tardia.

Embora a qualidade da carne *in natura* seja assunto exaustivamente estudado, futuras pesquisas são certamente necessárias para a compreensão dos diferentes aspectos chave que continuam sem esclarecimento, o que permitirá desenvolver estratégias e tecnologias mais eficazes na conservação dos atributos que são desejáveis ao consumidor.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Exportações Brasileiras de carne Bovina**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/Jan%20-%20Dez%20-%202014.pdf>>. Acesso em: 02 Abril 2015.
- ABRIL, M.; CAMPO, M.M.; ÖNENÇ, A.; SAÑUDO, C.; ALBERTI, P.; NEGUERUELA, A.I. Beef colour evolution as a function of ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v. 58, p.69-78, Oct. 2001.
- AMSA – AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurement of fresh meat**. Chicago, 1995. 48p.
- AMSA – AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Meat color measurement guidelines**. Champaign, Illinois, Aug. 2012. 125p.
- ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; MANDELL, J.B.; PURSLOW, P.P. Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. **Meat Science**, Barking, v. 86, p.491- 497, May. 2010.
- ARTHAUD, V.H.; MANDIGO, R.W.; KOCH, R.M.; KOTULA, A.W. Carcass composition, quality and palatability attributes of bulls and steers fed different energy levels and killed at four ages. **Journal of Animal Science**. Albany, v.44, n.1, p.53-64, 1977
- AVERY, N.C.; SIMS, T.J.; WARKUP, C.; BAILEY, A.J. Collagen cross-linking in porcine M *longissimus dorsi*: absence of a relationship with variation in texture at pork weight. **Meat Science**, Barking, v. 42, p.355-369, Apr. 1996.
- BLIXT, Y.; BORCH, E. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. **Meat Science**, Barking, v. 60, p.371-378, Jan. 2002.
- BARCELLOS, M.D. **“BeefLovers” um estudo cross-cultural sobre o comportamento de consumo de carne bovina** . 329p. Tese (Doutorado na Area de Agronegócios) - Universidad Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- BEKHIT, A.E.D; FAUSTMAN, C. Metmyoglobin reducing activity. **Meat Science**, Barking, v. 71, n.1, p.407- 439, Nov. 2005.
- BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 35, n. 12, p. 1961-1965, Nov. 1963.
- BOLES, J.A.; SWAN, J.E. Processing and sensory characteristics of cooked roast beef: effect of breed, age, gender and storage conditions. **Meat Science**, Barking, v. 62, n.4, p.419- 427, Dec. 2002.
- BORCH, E.; KANT-MUERMANS M.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Meat Science**, Barking, v. 33, p.103-120, Nov. 1996.

BOUDJELLAL, A.; BECILA, S.; COULIS, G.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; AUBRY, L.; LEPETIT, J.; HARHOURA, K.; SANTANDREU, M.A.; AÏT-AMAR, H.; OUALI, A. Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 3, n.3, p. 195-204, Mar, 2008.

BREWER, S. Irradiation effects on meat color – a review. **Meat Science**, Barking, v.68, p. 1-17, Feb. 2004.

BROWN, S.; WORSFOLD, M.; SHARP, C. Microplate assay for the measurement of hydroxyproline. **Biotechniques**, New York, v. 30, n. 1, p. 38-41, Jan. 2001.

CARPENTER, C.E.; CORNFORTH, D.P.; WHITTIER, D. Consumer preferences for beef color and packaging did not effect eating satisfaction. **Meat Science**, Barking, v.57, p.359-363, Aug. 2001.

CONTRERAS-CASTILLO, C.J.; LOMIWES, D.; WU, G.; FAROUK, M.M. The effect of electrical stimulation on post mortem myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. **Meat Science**, Barking, v.113, p.65-72, Nov. 2016.

COUTINHOFILHO, J.L.V.; PERES, R.M.; JUSTO, C.L. Produção de carne de bovinos contemporâneos, machos e fêmeas, terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 35, n.5, p. 2043-249, Maio. 2006.

CROSS, H.R.; SCHANBACHER, B.D.; CROUSE, J.D. Sex, age and breeds related changes in bovine testosterone and intramuscular collagen. **Meat Science**, Barking, v.10, p.187-195, Jan. 1984.

CULLER, R.D.; PARRISH, F.C.Jr.; SMITH, G.C.; CROSS, H.R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 4, p. 1177-1180, Jul. 1978.

DALHMANN, B. ; RUPPERT, T. ; KLOETZEL, P.M. ; KUEHN, L. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. **Biochimie**, Paris, v. 83, n.3/4, p.295-299, 2001.

DELGADO, E.; AGUIAR, A.P.; ORTEGA, E.; SPOTO, M.; CONTRERAS, C. Brazilian consumer's perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.3, May/Jun. 2006

DESTEFANIS, G.; BRUGIAPAGLIA, A.; BARGE, M.T.; DAL MOLIN, E. Relationship between beef consumer tenderness perception and warner-bratzler shear force. **Meat Science**, Barking, v.78, p. 153-156, 2008.

DUCLOS, M.J.; BERRI, C.; LE BIHAM-DUVAL, E. Muscle growth and meat quality. **Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, U.K. v. 16, n. 1, p. 107-112, 2007.

DUTAUD, D.; AUBRY, L.; SANTANDREU, M.A.; OUALI, A. Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in

relation with postmortem conditions. **Meat Science**, Barking, v. 74, n.2, p.327-336, 2006.

EMBRAPA. **Castração de bovinos de corte: A decisão é do produtor**. n. 22. 1997. 4p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105127/1/Gado-de-Corte-Divulga22.pdf>>. Acesso em: 18 Jan 2016.

ETHERINGTON, D.J. The contribution of proteolytic enzymes to postmortem changes in muscle. **Journal of Animal Science**. Albany, v.59, n.6, p.1644-1650, 1976.

FAROUK, M.M.; MUSTAFA, N.MD.; WU, G.; KRSINIC, G. The sponge effect hypothesis: An alternative explanation of the improvement in the water holding capacity of meat with ageing. **Meat Science**, Barking, v. 90, p. 670-677, Jan. 2012.

FAROUK, M.M; WU, G.; FROST, D.A.; CLERENS, S.; KNOWLES, S.O. The in vitro digestibility of beef varies with its inherent ultimate pH. **Food & Function**, London, v. 5, n.11, p. 2759-2767, Jul. 2014.

FIELD, R.A. Effect of castration on meat quality and quantity. **Journal of Animal Science**, Albany, v.32, n.5, p.849-856, 1971

GEESINK, G.H. ; KOOHMARAIE. M. Effect of calpastatinon degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 77, p.2685-2692, 1999.

GEESINK,G.H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A.H.; KOOHMARAIE, M. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 84, p. 2834-2840, 2006.

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

HALE, D.S.; GOODSON, K.; SAVELL, J.W. USDA beef quality and yield grades. 2013. Disponível em: <<http://meat.tamu.edu/beefgrading/>>. Acesso em: 18 Jan. 2016

HERNANDEZ, I; ARENAS, O.; LEZAMA, C.; SIMON, A.; HERNADEZ, F.; HUERTA, G. Manejo pré-abate e qualidade de carne. **REDVET**, Málaga, v. 11, n. 8, p. 1-11, Aug. 2010.

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.

HONIKEL, K.O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, London, v.49, n. 4, p. 447-457. Mar. 1998.

HUFF-LONERGAN, E.; PARRISH, Jr, F.C.; ROBSON, R.M. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 1064-1073, 1995.

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

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

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, S.; LONERGAN, S.M. Biochemistry of postmortem muscle- Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, Barking, v. 86, p. 184-195, Nov. 2010.

HONIKEL, K.O. E HAMM, R. Measurement of water-holding capacity and juiciness. In: Ed. Pearson A.M. and Dutson T.R. Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. **Advances in Meat Research Series**, Westport, v. 9, p. 125-161, 1994.

HULOT, F.; OUHAYOUN, J. Muscular pH and related traits in rabbits: a review. **World Rabbit Science**, Valencia, v. 7, n.1, p. 15-36, 1999.

IBGE. **Indicadores IBGE**: Estatística da produção pecuária Junho 2015. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201501_publ_completa.pdf>. Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

INSAUSTI, K.; BERIAIN, M.J.; PURROY, A.; ALBERTI, P.; LIZASO, L.; HERNANDEZ, B. Colour stability of beef from different spanish native cattle breeds stored under vacuum and modified atmosphere. **Meat Science**, Barking, v. 53, p. 241-249, Apr. 1999.

INSAUSTI, K.; BERIAIN, M.J.; PURROY, A.; ALBERTI, P.; GORRAIZ, C.; ALZUETA MJ. Shelf life of beef from local spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. **Meat Science**, Barking, v. 57, p. 273-281, Jan. 2001.

JELENÍKOVÁ, J.; PIPEK, P.; STARUCH, L. The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. **Meat Science**, Barking, v. 80, p. 870-874, Sept. 2008.

KEMP, C. M.; SENSKY, P.L.; BARDSLEY, R.G.; BUTTERY, P.J.; PARR, T. Tenderness- An enzymatic view. **Meat Science**, Barking, v. 84, n.2, p.248-256, 2010.

KEMP; C.M.; PARR, T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. **Meat Science**, Barking, v. 92, p.252-259, 2012.

KNOX, B.L.; VAN LAACK R.L.; DAVIDSON, P.M. Relationships between ultimate pH and microbial, chemical, and physical characteristics of vacuum-packaged pork loins **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 3, p. M104–M110, April. 2008.

KIM, Y.H.; HUFF-LONERGAN; E.; SEBRANEK; J. G.; LONERGAN, S.M. High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. **Meat Science**, Barking, v.85, n.4, p.759-767. Aug. 2010.

KIM, Y.H.; HUNT, M.C. Advance technology to improve meat color. In: Seon-Tea Joo (Ed.). **Control of Meat Quality**. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, 2011, chap. 2, p.31 – 60.

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

KOOHMARAIE, M; SCHOLLMAYER, J.E.; DUTSON, T.R. Effect of low-calcium-requiring activated factor on myofibrils under varying pH and temperature conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, p. 28-32, 1986.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, Barking, v. 36, p. 93-104, Jan. 1994.

KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D.; WHELLER, T.L. Effect of prerigor freezing and postrigor calcium chloride injection on the tenderness of callipyge longissimus. **Journal of Animal Science**, Albany, v.76, p. 1427-1432, May. 1998.

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

LADEIRA, M.; OLIVEIRA, R. Estratégias Nutricionais para melhoria da carcaça bovina. In: SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 2., Brasília-DF, 2006. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/nepec/new/download/Ladeira8.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2013.

LAWRIE, R. **Ciência da Carne**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384p.

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

LEE, C.Y.; HENRICKS, D.M.; SKELLY, G.C.; GRIMES, L.W. Growth and hormones Response of intact castrate male cattle to trenbolone acetate and estradiol. **Journal of Animal Science**, Albany, v.8, n.9, p.2682–2689, 1990.

LI, P.; WANG, T.; MAO, Y.; ZHANG, Y.; NIU, L.; LIANG, R.; ZHU, L.; LUO, X. Effect of ultimate pH on postmortem myofibrillar protein degradation and meat quality characteristics of chinese yellow crossbreed cattle. **The Scientific World Journal**, New York, v.2014, p. 1-8, Aug. 2014.

LI, C.; ZHOU, G.; XU, X. Changes of meat quality characteristics and intramuscular connective tissue of beef semitendinosus muscle during postmortem aging for chinese yellow bulls. **Journal of Food Science and Technology**, Cambridge, v.43, p.838-845, 2008.

LISTRAT, A.; HOCQUETTE J.F. Analytical limits of total and insoluble collagen content measurement and of type I and III collagens analysis by electrophoresis in bovine muscles. **Meat Sciences**, Barking, v.68, p.127-136, 2004.

LOMIWES, D.; FAROUK, M.M.; FROST, D.A.; DOBBIE, P.M.; TOUNG, O.A. The Small heat shock proteins and toughness in intermediate pH_u beef. **Meat Sciences**, Barking, v.95, p.472-479, May. 2013.

LOMIWES, D.; FAROUK, M.M.; WU, G.; YOUNG, O.A. The development of meat tenderness is likely to be compartmentalized by ultimate pH. **Meat Sciences**, Barking, v.96, p.646-651, Aug. 2014.

LUCHIARIFILHO, A. **Produção de carne Bovina no Brasil qualidade, quantidade ou ambas?**. In: SIMPOSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 2., 2011, Brasília D-F, 2006. Disponível em: <<http://www.upis.br/simboi/anais/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20Carne%20Bovina%20no%20Brasil%20-%20Albino%20Luchiari%20Filho.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2015.

MACDOUGALL, D.B. Changes in the colour and opacity of meat. **Food Chemistry**, London, v. 9, p. 75-88, Jan.1982.

MALTIN, C.; BALCERZAK, D.; TILLEY, R.; DELDAYET M. Determination of meat quality: tenderness. **Rouett Institute of Nutrition and Health**, Aberdeen, U.K., v. 62. p.337-347, 2003.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, Barking, v.71, p. 100-121, Sep. 2005.

MARINO A.; VILCA G.; RAMOS D. Evaluación del pH en canales de toros Holstein (Bos taurus) y Nelore (Bos indicus). **Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú**, Lima v.16, no.1, p.90-95. Jan. 2005.

MECIER, Y.; GATELLIER, P.; RENERRE, M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture in mixed diet. **Meat Science**, Barking, v. 66, p. 467-473, Feb. 2004.

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

MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J.D.; SAVELL, J.W. Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 71, p.408-414, Feb.1993.

NOGUEIRA, K. **A influencia da raça, sexo e idade ao abate sobre a qualidade de carne de nelore e Braford**. 2007. 50p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2007.

OFFER, G.; TRINICK, J. On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils. **Meat Science**, Barking, v. 8, n. 4, p. 245–281, 1983.

O'HALLORAN, G.R.; TROY, D.J.; BUCKLEY, D.J.; REVILLE, W.J. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. **Meat Science**, Barking, v.47, p.187–210, 1997

OTEMBRA, M.M.; DIKEMAN, M.E.; BOYLE, E.A.E. Refrigerated shelf life of vacuum-packaged, previously frozen ostrich meat. **Meat Sciences**, Barking, v.52, n. 3, p. 279-283, Jul. 1999.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M.A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Sciences**, Barking, v.74, n. 1, p. 44-58, May. 2006.

PAGE, J.K.; WULF, D.M.; SCHWOTZER, T.R. A survey of beef muscle color and pH. **Journal of Animal Science**, Albany, v.79, p. 678-687, 2001.

PALKA, K. Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine m. semitendinosus during retorting. **Meat Sciences**, Barking, v.53, n. 3, p. 189-194, Nov. 1999.

PEREZ, M.L.; ESCALONA, H.; GUERRERO, I. Effect of calcium chloride marination on calpain and quality characteristics of meat from chicken, horse, cattle and rabbit. **Meat Sciences**, Barking, v.48, n.1-2, p. 125-134, Jan. 1998.

PEARCE, K.L.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H.J.; HOPKINS, D.L. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes – A review. **Meat Sciences**, Barking, v.89, p. 111-124, Oct. 2011.

PIERSON, C.J.; FOX, J.D. Effect of postmortem aging time and temperature on pH, tenderness and soluble collagen fractions in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.43, n.6, p. 1206-1210, 1984.

PUOLANNE, E.; HALONEN, M. (2010). Theoretical aspects of water holding in meat. **Meat Science**, Barking, v.86, p.151–165. Apr. 2010.

PULFORD, D.J.; FRAGA VAZQUEZ, S.; FROST, D.F.; FRASER-SMITH, E.; DOBBIE, P.; ROSENVOLT, K. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determinate of ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v.79, p. 623-630, Jul. 2008.

PULFORD, D.J.; DOBBIE, P.; FRAGA VAZQUEZ, S.; FRASER-SMITH, E.; FROST, D.F.; MORRIS, C.A. Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. **Meat Science**, Barking, v. 83, p. 1-9, Sept. 2009.

PURSLOW, P.P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 70, p. 435-447, Jan. 2005.

REAGAN, J.O.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C. Age-related traits affecting the tenderness of the bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.43, n.6, p. 1198-1205, 1976.

RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C.; FATURI, C.; PEREIRA ROSA, J.R.; PASCOAL, L.L.; CARVALHO BERNARDES, R. A.; KUSS, F. Desempenho na Fase de Crescimento de Machos Bovinos Inteiros ou Castrados de Diferentes Grupos Genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 29, n.4, p. 1036-1043, Abr. 2000.

RHEE, M.S.; WHEELER, T.L. ;SHACKELFORD, S.D.; KOOHMRAIE, M. variation in palatability and biochemical traits within nad among eleven beef muscles. **Journal of Animal Science**, Albany, v.82, p. 534-550, 2004.

ROOT, D.D. WANG, K. High-affinity actin-binding nebulin fragments influence the actoS1 complex. **Biochemistry**, Whashington, v. 40, p.1171–1186, 2001.

SENTANDREU, M.A; COULIS, G; OUALI, A. Role of muscle endopetidases and their inhibitors in meat tenderness. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 13, n.12, p.400-421, 2002.

SIEDEMAN, S.C.; CROSS, H.R.; SMITH, G.C.; DURLAND, P.R. Factors associated with fresh meat color: a review. **Journal of Food Quality**, Westport, v.6, n.3, p. 211-237. March. 1989.

SILVA, J.A.; PATARATA, L.; MARTINS, C. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. **Meat Science**, Barking, v.52, p.453-459, Feb. 1999.

SCHÄFER, A.; ROSENVOLD, K.; PURSLOW, P.P.; ANDERSEN, H.J.; HENCKEL, P. Physiological and structural events post mortem of importance for drip loss in pork. **Meat Science**, Barking, v.61, n.4, p.355-366, May. 2002.

SHACKELFORD, S.D; MORGAN, J.B.; CROSS, H.R. ; SAVELL, J.W. Identification of threshold levels for warner-bratzler shear force in beef top loin steaks. **Journal of Muscle Food**, Malden, v.2, p. 289-296, 1991.

SHACKELFORD, S.D; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Brazler shear force, retail product yield and growth rate. **Journal of Animal Science**, Albany, v.72, n.4, p. 857-863, Nov. 1994.

SCHEFFLER, Y.L.; MATARNEH, S.K.; ENGLAND, E.M.; GERRARD, D.E. Mitochondria influence postmortem metabolism and pH in an in vitro model. **Meat Science**, Barking, v.110, p.118-125, Jul. 2015

STOLWOUSKY, G.D. ; BAIRD, B.E.; MILLER, R.K.; SAVELL, J.W.; SAMS, A.R.; TAYLOR, J.F.; SANDERS, J.O.; SMITH, S.B. factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three angus and brahman breed crosses. **Meat Science**, Barking, v.73, p.475-483, Jan. 2006

TALMANT, A.; MONIN, G. Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscle. **Meat Science**, Barking, v. 18, p. 23-40, Jan. 1986.

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

TORRESCANO, G.; SÁNCHEZ-ESCALANETE, A.; GIMÉNEZ,B.; RONCÁLES, P.; BELTRÁN, J.A. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. **Meat Science**, Barking, v.64, p.85-91, May. 2003.

UNRUH, J.A. Effects of endogenous and exogenous growth-promoting compounds on carcass composition, meat quality and meat nutritional value. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 62, p.1441-1448, 1986.

United States Department of Agriculture USDA. **Livestock and poultry: world markets and trade**. 2015. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF>. Acesso em: 18 janeiro de 2016.

VAZ, F.N.; ROSO, C.; VAZ, R.Z. Gerenciamento visando a eficiência econômica da pecuária de corte. In: RESTLE, J. (Ed.) **Confinamento, pastagens e suplementação para produção de bovinos de corte**. Santa Maria: Imprensa Universitária. 1999. p.232-258.

VAZ, F.N.; RESTLE, J. Aspectos qualitativos de carcaça e de carne de machos hereford, inteiro ou castrado, abatidos aos quatorze meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 29, n.6, p. 1894-1901, 2000.

VENTURINI, A.C.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J.; FARIA, J.A.F. Sistemas de embalagem para carne bovina fresca em atmosfera modificada. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.12, p.128-137, Apr./Jun. 2009.

VOLPELLI L.A.; FAILLA, S.; SEPULCRI, A.; PIASSENTIER, E. Calpain system in vitro activity and miofibril fragmentation index in fallow deer (Damadama): effects of age and supplementation feeding. **Meat Science**, Barking, v.69, p. 579-582, March. 2005.

WATANABE, A.; DALEY, C.C.; DEVINE, C. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. **Meat Science**, Barking, v.42, p. 67-78, Jan. 1996.

WHEELER, T.L.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M. Effect of marbling degree on beef palability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.72, p.3145-3151, 1994.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; DIKEMAN, M.E. Effects of cooking and shering methodology on variation in Warner-Bratzler shear force values in beef. **Journal of Animal Science**, Albany, v.72, p.2325-2330, 1994.

WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. Relationship of beef longissimus tenderness classes to tenderness of gluteus medius, semimembranosus and biceps femoris. **Journal of Animal Science**, Albany, v.78, p.2856-2861, 2000.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, D.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus muscle* tenderness in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.68, p.2716-2728, Sept. 1990.

WU, G.; FAROUK, M.M.; CLERENS, S.; ROSENVOLD, K. Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. **Meat Science**, Barking, v. 98, p. 637-646, Jun., 2014.

WU, G.; CLERENS, S.; FAROUK, M.; CLERENS, S. LC MS/MS identification of large structural proteins from bull muscle and their degradation products during *post mortem* storage. **Food Chemistry**, London, v.150, p. 137-144, 2014.

WULF, D.M.; EMMETT, R.S.; LEHESKA, J.M.; MOELLER, S.J. Relationship among glycolysis potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palability. **Journal of Animal Science**, Albany, v.80, p.1895-1903, 2002.

YANCEY, J.W.S.; WHARTON, M.D.; APPLE, J.K. Cooking method and end-point temperature can affect the Warner-Bratzler shear force, cooking loss and internal cooked color of beef longissimus steaks. **Meat Science**, Barking, v. 88, p. 1-7, May. 2011.

YOUNG, O.A.; WEST, J.; HART, A.L.; VAN OTTERDISK, F.F.H. A method for the early determination of meat ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v. 66, p. 493-498, Feb. 2004.

YU, L.P.; LEE, Y.B. Effect of postmortem pH and temperature on bovine muscle structure and meat tenderness. **Journal of Food Sciences**, Chicago, v.51, p.774-780, May. 1986.

ZAPATA, I.; ZERBY, H.; WICK, M. Functional proteomic analysis predict beef tenderness and the tenderness differential. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, p.4956-4963, 2009.

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