

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

**Impacto do pH final na maciez do músculo *Longissimus lumborum*
de animais zebuínos: mudanças estruturais de proteínas da carne
crua e cozida durante a maturação**

Juan Dario Rios Mera

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

**Piracicaba
2016**

Juan Dario Rios Mera
Engenheiro de Alimentos

Impacto do pH final na maciez do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos: mudanças estruturais de proteínas da carne crua e cozida durante a maturação

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof. Dra. **CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

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

**Piracicaba
2016**

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

Rios Mera, Juan Dario

Impacto do pH final na maciez do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos: mudanças estruturais de proteínas da carne crua e cozida durante a maturação / Juan Dario Rios Mera. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

67 p. : il.

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

1. *Bos indicus* 2. Força de cisalhamento Warner-Bratzler 3. Proteínas miofibrilares
4. Cozimento I. Título

CDD 663.9297
R586i

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabajo con amor, a mi familia, especialmente a mis padres e hermanos, personas que confiaron y creyeron en mí desde siempre.

AGRADECIMENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios, por la vida, por colocarme en el camino correcto, por darme la suficiente fortaleza y sabiduría para hacer frente a las dificultades presentadas en mi vida. A Ti todo mi amor y mi vida.

A mis queridos padres por darme la vida, y a mis hermanos, por todo el apoyo moral, nada hubiese conseguido sin ellos.

A la Profesora Carmen, por la confianza que me brindó para realizar la maestría sin conocerme. Más que una orientadora, un amiga que admiro demasiado.

A mis queridos amigos, mis hermanos de padres distintos, mi familia en el Brasil: Erick, Melina, Claudio, Carmen, Yemina y Rafael, muchas gracias por todo.

Al Gobierno Peruano, sin duda logró una revolución en la Educación Superior, todo mi agradecimiento al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo – Pronabec, por la beca que me otorgaron.

Al equipo del laboratorio de “Qualidade e Processamento de Carnes”, por todo el apoyo en el desarrollo del experimento.

Al equipo del “Laboratorio de Anatomia e Fisiologia Animal – LAFA”, especialmente al Profesor Eduardo y a Giuliana, por brindarme el espacio y orientación en la realización de los análisis del experimento.

A Pierre Delmorio, funcionario de Mettler-Toledo, por todo el apoyo en el análisis de DSC, fue pieza clave para la ejecución del experimento.

Al profesor Gilberto José de Moraes, por brindarme el microscopio de contraste de fase para el análisis de “comprimido de sarcômero”

A mi favela querida: Kathelyn, Miriam, Erick, Mariana, Beatriz, Bruna y Juan, muchas gracias por todos los momentos felices con ustedes.

A la república “Casa Nova”, muchas gracias por la convivencia durante más de un año en el Brasil.

A todos mis familiares y amigos que directa o indirectamente estuvieron apoyándome en el desarrollo de la maestría.

"El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino."

Nikola Tesla (1856-1943). Ingeniero e inventor.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Proteínas do músculo	19
2.2 Maciez da carne.....	20
2.2.1 Fatores proteicos que afetam a maciez da carne bovina	21
2.2.1.1 Proteólise <i>post mortem</i>	22
2.2.1.2 Tecido conjuntivo.....	24
2.2.1.3 Desnaturação térmica das proteínas.....	25
2.2.1.4 Agregação de proteínas	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Material	27
3.2 Medição de pH.....	28
3.3 SDS–PAGE e imunodeteccção de proteínas	29
3.4 Comprimento de sarcômero	31
3.5 Colágeno total e solúvel.....	32
3.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	33
3.7 Força de cisalhamento Warner–Bratzler.....	34
3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.9 Análise estatística	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 pH.....	37
4.2 Degradação da desmina e troponina T.....	38
4.3 Colágeno total e solúvel.....	40
4.4 Desnaturação térmica das proteínas	41
4.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.6 Força de cisalhamento Warner–Bratzler.....	49
5 CONCLUSÕES.....	55
6 IMPLICAÇÕES	57
REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Impacto do pH final na maciez do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos: mudanças estruturais de proteínas da carne crua e cozida durante a maturação

O objetivo do presente trabalho foi determinar a força de cisalhamento Warner–Bratzler do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos machos inteiros (*Bos indicus*) durante o período de maturação, nas faixas de pH final (pH_f 48 horas *post mortem*) normal (pH entre 5,5 e 5,8) e anormal (pH entre 5,81 e 6,19) e temperaturas internas de cozimento. Concomitante com a avaliação de força de cisalhamento, foram avaliadas também a degradação da desmina e troponina T, o comprimento do sarcômero, o teor de colágeno total e solúvel, as temperaturas máximas de desnaturação das proteínas e a morfologia geral de agregação das fibras do músculo no cozimento. A degradação da desmina e troponina T foi maior no pH_f normal, aparecendo produtos de degradação a partir do dia 7 nessa faixa de pH_f. Não houve diferenças nos valores de comprimento do sarcômero, descartando-se assim, a contribuição desse parâmetro sobre a temperatura máxima de desnaturação (T_{máx}) das proteínas, determinada utilizando calorímetro exploratório diferencial (DSC). Similarmente, não foram encontradas diferenças para os teores de colágeno total e solúvel, e os valores de colágeno total foram baixos, sugerindo que sua contribuição na segunda transição térmica e nos valores de força de cisalhamento foi mínima. As T_{máx1} e T_{máx2}, correspondentes à desnaturação da meromiosina leve e pesada, respectivamente, foram menores no pH_f normal, mas o efeito foi maior para a T_{máx2}. A T_{máx3} da actina e titina aumentou até 14 dias *post mortem* na faixa de pH_f normal, e posteriormente diminuiu significativamente após 21 dias, sugerindo possível degradação dessas proteínas nesse período de dias. Não foram encontradas diferenças nos valores de T_{máx} no pH_f anormal, em todos os dias *post mortem*, o que sugere a contribuição de um possível mecanismo de proteção que estabiliza as miofibrilas no aquecimento. Houve maior agregação das fibras do músculo no pH_f normal nas temperaturas internas de cozimento de 65 e 80°C, provavelmente devido à maior desnaturação térmica das miofibrilas. Os valores de força de cisalhamento foram maiores com o aumento da temperatura interna de cozimento, devido ao aumento da desnaturação térmica das miofibrilas do músculo. Independente da temperatura interna de cozimento, os valores de força de cisalhamento foram altos em quase todos os dias *post mortem* para ambas as faixas de pH_f, o que sugere a necessidade de utilizar métodos físicos ou químicos para aumentar a maciez do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos.

Palavras-chave: *Bos indicus*; Força de cisalhamento Warner–Bratzler; Proteínas miofibrilares; Cozimento

ABSTRACT

Ultimate pH impact on tenderness of *Longissimus lumborum* muscle of Zebu bulls: structural changes of proteins of raw and cooked meat during ageing

The aim of this work was to determine the Warner–Bratzler shear force of *Longissimus lumborum* muscle of Zebu bulls during ageing, at the normal (pH between 5.5 e 5.8) and abnormal (pH between 5.81 e 6.19) ultimate pH (pH_u) groups (pH 48 hours *post mortem*) and internal temperatures of cooking. Concomitant with the Warner–Bratzler shear force evaluation, the degradation of desmin and troponin T, sarcomere length, total and soluble collagen content, maximum temperature of proteins denaturation, and aggregation of muscle fibers during cooking were also evaluated. The degradation of desmin and troponin T was higher in the normal pH_u, appearing degradation products at day 7. There were no differences in the sarcomere length values, discarding the contribution of this parameter on the maximum temperature of proteins denaturation (T_{max}) determined by differential scanning calorimeter (DSC). Similarly, no differences were found for total and soluble collagen contents, and the total collagen values were low, suggesting that its contribution in the second thermal transition and in the shear force values was minimal. The T_{max1} and T_{max2} , corresponding to the denaturation of light and heavy meromyosin, respectively, were lower in the normal pH_u group, but the effect was higher for T_{max2} . The T_{max3} of actin and titin increased up to 14 days *post mortem* in the normal pH_u group, which subsequently significantly decreased after 21 days, suggesting the possible degradation of these proteins in that period of time. No differences were found in the T_{max} values for the abnormal pH_u group at all days *post mortem*, suggesting the contribution of a possible protective mechanism that stabilizes the myofibrils during heating. There was higher aggregation of muscle fibers in the normal pH_u, at internal temperatures of cooking of 65 and 80°C, probably due to a higher thermal denaturation of myofibrils. The shear force values were higher with the increase of the internal temperature of cooking due to the increased denaturation of the muscle myofibrils. Regardless of internal temperature of cooking, the shear force values were higher in almost all days *post mortem* for both pH_u groups, which suggest the need of physical or chemical methods to increase the tenderness of *Longissimus lumborum* muscle of Zebu bulls.

Keywords: *Bos indicus*; Warner–Bratzler shear force; Myofibrillar proteins; Cooking

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, após a Índia, é o segundo maior exportador de carne bovina do mundo, sendo responsável por 18% das exportações totais (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2015). Apenas no segundo trimestre do ano 2015, foram abatidas 7,63 milhões de cabeças de bovinos no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2015). O rebanho bovino brasileiro é composto por cerca de 80% de raças zebuínas (*Bos indicus*), sendo que a raça Nelore representa o 90% do total do gado zebuíno (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORES DE CARNE – ABIEC, 2014).

Em estudo realizado por Miller et al. (2001) nos Estados Unidos da América, foi observado que consumidores de carne estariam dispostos a pagar mais por carne mais macia, além disso, em estudo realizado no Brasil, Delgado et al. (2006) concluíram que consumidores de carne brasileiros conseguem diferenciar carnes duras de carnes macias. No entanto, a carne do gado *Bos indicus* tem sido comparada com carne de *Bos taurus*, sendo que o músculo *Longissimus* de *Bos indicus* apresenta problemas de maciez quando comparado com o mesmo músculo de raças europeias (SHACKELFORD et al., 1991; WHEELER et al., 1990; WHIPPLE et al., 1990). Isto representa um desafio para a indústria de carnes brasileira, considerando que a maciez é o atributo de qualidade mais importante por ser avaliado durante a mastigação.

A maciez tem sido relacionada com a degradação de proteínas miofibrilares, que são potenciais indicadoras desse atributo de qualidade. Como exemplo podemos citar a desmina e a troponina T, que são degradadas durante o período de maturação da carne em refrigeração (HUFF-LONERGAN et al., 1996; TAYLOR et al., 1995; WHIPPLE; KOOHMARAIE, 1991; WHIPPLE et al., 1990).

Fatores relacionados com a degradação de proteínas e a maciez da carne são a taxa e extensão de declínio do pH do músculo *post mortem*. O declínio do pH está relacionado com a produção de lactato ou com a capacidade do músculo em produzir energia na forma de ATP. Particularmente, o menor valor de pH que o músculo *post mortem* atinge é denominado pH final (pH_f). A relação de diferentes faixas de pH_f com a maciez da carne tem sido estudada durante muitos anos, mas esta ainda não foi reportada em carne de *Bos indicus*. Estudos demonstraram que a

maciez do músculo *Longissimus* tem sido aceitável com pH_f baixo ou normal com valores menores que 5,8, mas em valores entre 5,8 e 6,2 (pH_f anormal) os músculos são considerados duros (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014; LOMIWES et al., 2013; PULFORD et al., 2009, 2008; PURCHAS; YAN; HARTLEY, 1999; JEREMIAH; TONG; GIBSON, 1991).

Além disso, surgiu a hipótese de que as enzimas que degradam as proteínas do músculo e as proteínas do choque térmico que as protegem, têm ação favorecida ou desfavorecida em diferentes faixas de pH_f e estão diretamente relacionadas com a maciez (LOMIWES et al., 2014, 2013; PULFORD et al., 2009, 2008). No entanto, a primeira e principal questão a ser resolvida é se a maciez do músculo *Longissimus* de *Bos indicus* é diferente em faixas de pH_f diferenciadas, como acontece no mesmo músculo em raças europeias.

Além da proteólise *post mortem*, outros fatores determinantes na maciez são a quantidade e a solubilidade do colágeno (NISHIMURA; HATTORI; TAKAHASHI, 1995; BAILEY, 1985; HALL; HUNT, 1982). No entanto, a relação do mesmo com o pH_f ainda não foi reportada.

Outro fator que pode afetar a maciez da carne são as mudanças estruturais nas proteínas decorrentes do cozimento. A mudança imediata durante o cozimento da carne é a desnaturação térmica das proteínas, seguida pelas interações proteína-proteína, que conduzem à agregação entre elas (TORNBORG, 2005). A desnaturação térmica das proteínas tem sido amplamente estudada por calorimetria exploratória diferencial (differential scanning calorimetry, DSC). As proteínas miosina, actina e colágeno contribuem com os parâmetros de textura da carne, e a desnaturação térmica delas pode ser afetada pelo pH (BERTAZZON; TSONG, 1990; STABURSVIK; MARTENS, 1980; WRIGHT; WILDING, 1984; WRIGHT; LEACH; WILDING, 1977), condicionamento *post mortem* (FINDLAY; STANLEY, 1984a) e comprimento do sarcômero (FINDLAY; STANLEY, 1984b). A agregação de proteínas é o processo responsável pela compactação da carne durante o cozimento e formação do gel na elaboração de produtos cárneos, e a morfologia geral deste processo pode ser estudada por microscopia eletrônica (BONDOS, 2006).

Em síntese, a maciez da carne é afetada por diversos fatores. Dessa forma, o desafio da indústria de carnes é controlar fatores que estão diretamente envolvidos com a taxa de declínio e extensão do pH, e como consequência disto, evitar perdas

econômicas decorrentes da pouca valorização de cortes comerciais pelo consumidor brasileiro.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi determinar a maciez do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos machos inteiros e influenciados pelo pH_i, em função das mudanças estruturais das proteínas da carne crua e cozida, determinadas com técnicas como imunodeteção, espectrofotometria, microscopia eletrônica e de contraste de fase e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas do músculo

As proteínas constituem o segundo maior componente da carne, depois da água. Em média, constituem 19% do peso do músculo, embora possam estar na faixa de 16 a 22% (HUFF-LONERGAN, 2010). Podem ser divididas em três grupos: miofibrilares, sarcoplasmáticas e do tecido conjuntivo. As proteínas miofibrilares constituem entre 50 a 55% do conteúdo total de proteína, de 30 a 34% correspondem às proteínas sarcoplasmáticas, e o restante, de 10 a 15%, às proteínas do tecido conjuntivo. Dentre as proteínas, as miofibrilas e o tecido conjuntivo são responsáveis pelas propriedades de textura do músculo (TORNBERG, 2005).

A miosina é a mais abundante das proteínas miofibrilares, apresentando peso molecular de 500.000 Da. A molécula de miosina é formada de duas unidades aparentemente idênticas, e cada unidade tem uma “cauda” (meromiosina leve), um “colar” (meromiosina pesada ou subfragmento S-2) e uma região de cabeça (meromiosina pesada ou subfragmento S-1) (Figura 1). Além disso, a miosina está composta por duas cadeias polipeptídicas pesadas e quatro cadeias polipeptídicas leves. A meromiosina leve contém partes das duas cadeias pesadas e a meromiosina pesada consta de partes tanto das cadeias pesadas como das quatro cadeias leves (LAWRIE, 1998).

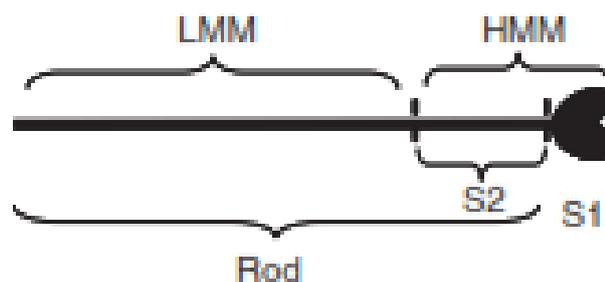


Figura 1 - Molécula da miosina (adaptado de XIONG, 2014)

A actina é a segunda maior proteína miofibrilar. No músculo está na forma fibrosa ou F-actina, formada pela polimerização dos monômeros globulares da G-actina. Cada molécula de actina tem um peso molecular de 40.000 Da (McCORMICK, 1994).

Outras duas proteínas que são importantes na contração muscular, e que estão associadas a actina, são a tropomiosina e a troponina. A tropomiosina é a segunda proteína mais abundante no filamento fino e representa cerca de 7% do total das proteínas miofibrilares. A troponina é um complexo que consiste de três subunidades que são denominadas troponina I (23.000 Da), troponina C (18.000 Da), e troponina T (37.000 Da). A troponina C tem a capacidade de ligar o cálcio livre do retículo sarcoplasmático, a troponina I pode inibir a interação entre a actina e a miosina, e a troponina T é uma proteína reguladora da contração muscular, através de sua interação com a tropomiosina (HUFF-LONERGAN, 2010; FLICKER; PHILIPS; COHEN, 1982).

Outras proteínas, tais como a titina, nebulina e desmina, suportam a estrutura miofibrilar inteira. A titina tem alto peso molecular (ao redor 3.000.000 Da), e conecta a linha Z com a linha M no sarcômero (MARUYAMA, 1994). A nebulina é outra proteína com alto peso molecular no músculo esquelético (de 600.000 a 900.000 Da), tem estrutura filamentosa e encontra-se ancorada na linha Z (McELHINNY et al., 2003). A desmina (53.000 – 54.000 Da) é uma proteína localizada na periferia da linha Z, e tem como função ligar miofibrilas adjacentes através da linha Z e as miofibrilas com o sarcolema (FUCHS; WEBER, 1994; RICHARDSON et al., 1981; GRANGER; LAZARIDES, 1978).

O tecido conjuntivo nos músculos envolve as fibras musculares individuais (endomísio), os feixes de fibras musculares (perimísio) e o músculo inteiro (epimísio) (PURSLOW, 2002). O endomísio, perimísio e epimísio são formados por uma rede de fibras de colágeno e elastina, rodeadas por uma matriz de proteoglicanos (LEPETIT, 2008). O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, seu conteúdo total pode variar de 1% a 15% do peso seco do músculo (PURSLOW, 2005) e é composta por monômeros de tropocolágeno com peso molecular de 300.000 Da (TORNBERG, 2005).

2.2 Maciez da carne

A maciez é o atributo de qualidade mais importante para o consumidor de carnes. Em estudo realizado com consumidores de carne nos Estados Unidos da América, Miller et al. (2001) demonstraram que os consumidores estariam dispostos a pagar mais por cortes de carne com maior maciez. Um dos maiores produtores de carne bovina do mundo é o Brasil, e a raça predominantemente produzida no país é

o Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos. No entanto, em termos de qualidade, a carne de *Bos indicus* é menos macia quando comparada com carne de raças europeias (*Bos taurus*) (SHACKELFORD et al., 1991; WHEELER et al., 1990; WHIPPLE et al., 1990).

Para avaliar a maciez da carne, podem ser utilizados métodos objetivos instrumentais ou sensoriais com provadores treinados, ou métodos subjetivos com um painel de consumidores (AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION – AMSA, 1995). Os métodos sensoriais são frequentemente difíceis de organizar, devido à complexidade e aos custos associados com a realização de painéis de consumidores em grande escala (PLATTER et al., 2003). Já os métodos instrumentais de avaliação de força de cisalhamento, penetração, mordida, compressão, entre outros, são uma previsão das avaliações de maciez obtida por um painel de provadores (LAWRIE, 2006).

O método instrumental mais amplamente utilizado é a força de cisalhamento Warner–Bratzler. Os menores valores de força de cisalhamento em carne foram altamente relacionados com a maciez sensorial e satisfação dos consumidores (DESTEFANIS et al., 2008; DELGADO et al., 2006).

A maciez objetiva e subjetiva da carne é avaliada no produto cozido, e durante o cozimento a maciez é afetada pela temperatura. A dureza da carne é incrementada até 50°C, seguida por uma diminuição em temperaturas por volta de 60°C; seguindo-se com o aumento da temperatura, a carne torna-se dura novamente (BEJERHOLM; TØRNGREN; AASLYNG, 2014). O primeiro aumento da dureza tem sido atribuído à desnaturação da miosina. Já a diminuição da dureza ocorre provavelmente devido à desnaturação parcial e encolhimento das fibras de colágeno do tecido conjuntivo intramuscular. Por fim, o aumento da dureza em temperaturas superiores é resultado da desnaturação da actina (BERTOLA; BEVILACQUA; ZARITZKY, 1993; MARTENS; STABURSVIK; MARTENS, 1982). Porém, Findlay, Stanley e Gullet (1986) reportaram um aumento linear da dureza com aumento da temperatura de cozimento para o músculo *Longissimus dorsi*, provavelmente devido à baixa quantidade de tecido conjuntivo presente nesse músculo.

2.2.1 Fatores proteicos que afetam a maciez da carne

Dois grandes fatores que afetam a maciez da carne são a proteólise *post mortem* e o tecido conjuntivo intramuscular, ambos determinados na carne crua. O tecido conjuntivo intramuscular está relacionado com a idade de abate do animal, sendo que a sua quantidade e solubilidade no músculo podem influenciar os parâmetros de textura final da carne cozida. Por outro lado, a desnaturação térmica do colágeno foi relacionada com a diminuição da dureza do músculo quando cozido em uma ampla faixa de temperatura (DAVEY; GILBERT, 1974). Além disso, outras proteínas da carne sofrem mudanças estruturais no aquecimento, as quais afetam a qualidade da carne cozida. Desse modo, a abordagem da presente pesquisa é mais ampla e os fatores proteicos que afetam a maciez são descritos a seguir.

2.2.1.1 Proteólise *post mortem*

A proteólise das proteínas miofibrilares é a principal causa das mudanças estruturais no músculo esquelético, resultando em perda da integridade da célula muscular, tendo impacto direto na maciez (KOOHMARAIE, 1992). A degradação das ligações entre as miofibrilas e as estruturas que ligam as miofibrilas com o sarcolema, os costâmeros, e o enfraquecimento da interação entre o filamento fino ou banda I com a linha Z, são as principais causas do amaciamento *post mortem* do músculo (TAYLOR et al., 1995).

A degradação da desmina e troponina T é um excelente indicador do amaciamento do músculo *post mortem* (HUFF-LONERGAN et al., 1996; TAYLOR et al., 1995; WHIPPLE; KOOHMARAIE, 1991; WHIPPLE et al., 1990). Tem sido reportado que a desmina produz três produtos de degradação, com pesos moleculares de 45.000, 38.000 e 35.000 Da, sendo que o maior produto de degradação é o polipeptídeo de 38.000 Da (HUFF-LONERGAN et al., 1996). Já a troponina T é degradada em dois polipeptídeos de 30.000 e 28.000 Da (HUFF-LONERGAN et al., 1996; HO; STROMER; ROBSON, 1994).

Concomitante com a degradação das proteínas do músculo, a atividade das enzimas calpaínas e catepsinas foram observadas durante a maturação, com dependência do pH (LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014; LOMIWES et al., 2014; 2013; PULFORD et al., 2009). O pH está relacionado com o acúmulo de ácido lático oriundo das mudanças no músculo *post mortem*. O menor valor de pH que o músculo *post mortem* atinge devido à falta de glicogênio é denominado pH final (pH_f), o qual tem sido relacionado com a maciez da carne bovina.

Em estudos realizados no músculo *Longissimus* de gado de raças europeias foram definidas três faixas de pH_f e sua relação com a maciez da carne. Em valores de pH_f maiores a 6,2 (pH_f alto) e menores a 5,8 (pH_f normal), a maciez da carne tem sido aceitável, e em pH_f com valores entre 5,8 e 6,2 (pH_f intermediário) o desenvolvimento da maciez durante a maturação da carne é retardado (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014; LOMIWES et al., 2013; PULFORD et al., 2009; 2008; PURCHAS; YAN; HARTLEY, 1999; JEREMIAH; TONG; GIBSON, 1991). Tem sido reconhecido que as calpaínas, especialmente a μ -calpaína, é responsável pela clivagem de proteínas, como a desmina e troponina T (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010), e que sua atividade é favorecida em valores de pH_f alto (LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014). A atividade das catepsinas é favorecida em pH ácido (LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014; PULFORD et al., 2009), porém, a contribuição da atividade das catepsinas na maciez da carne tem sido desconsiderada, uma vez que elas se encontram dentro dos lisossomos (KOOHMARAIE, 1996). Contudo, segundo Pulford et al. (2009), técnicas como a estimulação elétrica geram uma queda rápida do pH à temperaturas altas, o que pode promover a maciez através da quebra dos lisossomos e liberação das catepsinas no citoplasma da célula muscular. No entanto, tem sido observado por Ho et al. (1997) que a relação entre a estimulação elétrica e a maciez da carne está na ruptura mecânica da célula muscular, e não na ação proteolítica de enzimas.

Em pH_f intermediário, a atividade das enzimas é desfavorecida, e foi proposto que a dureza da carne nessa faixa de pH_f é decorrente da ação protetora das proteínas do choque térmico (LOMIWES et al., 2014, 2013; PULFORD et al., 2009, 2008).

O desafio das indústrias é identificar os fatores que causam a produção de carne bovina com pH_f anormal, que levam a produção de carne dura, característica de carnes com pH_f com valores entre 5,8 e 6,2 (PULFORD et al., 2008). Além disso, cortes de carne com pH_f maior a 6,2 também são defeituosos, pelo fato de serem escuros e terem sabor não desejável (VILJOEN; KOCK; WEBB, 2002).

Uma possível resposta aos defeitos dos cortes de carne são os procedimentos pré-abate em que o animal é submetido. Quando animais são submetidos ao estresse, uma queda rápida do glicogênio pode resultar em valores

de pH não desejáveis (LAHUCKY et al., 1998; McVEIGH; TARRANT; HARRINGTON, 1982).

Cortes de carne com características de maciez não desejáveis tem baixo valor comercial, e são usados para a elaboração de produtos processados, como hambúrgueres ou salsichas. Existem também casos em que cortes com alto valor comercial alcançam valores de pH_f intermediário ou alto. Desse modo, é comercialmente importante discriminar carnes com valores de pH_f intermediário e alto de carnes com pH_f baixo ou normal que possuem valores menores que 5,8 (LOMIWES et al., 2010).

2.2.1.2 Tecido conjuntivo

Tem sido reportado que a quantidade e a insolubilidade do colágeno, a maior proteína do tecido conjuntivo intramuscular, contribuem com a dureza do músculo *post mortem* (STOLOWSKI et al., 2006; RILEY et al., 2005; TORRESCANO et al., 2003; NISHIMURA; HATTORI; TAKAHASHI, 1995; BAILEY, 1985; HALL; HUNT, 1982). Em contrapartida, a solubilidade do tecido conjuntivo intramuscular ou do colágeno pode ser aumentada durante a estocagem do músculo em vários dias *post mortem*, favorecendo assim a maciez (LI; XHOU; XU, 2007; RILEY et al., 2005; PALKA, 2003; NISHIMURA et al., 1998; NISHIMURA; HATTORI; TAKAHASHI, 1995; LEWIS; PURSLOW; RICE, 1991; STANTON; LIGHT, 1987).

O aumento da solubilidade do colágeno tem sido atribuído à degradação dos proteoglicanos, proteínas responsáveis pela ligação entre as fibras de colágeno. Nishimura, Hattori e Takahashi (1996) sugeriram que a degradação dos proteoglicanos durante a maturação da carne pode ser explicada por dois fenômenos: os proteoglicanos degradam-se espontaneamente ou eles são degradados enzimaticamente. A enzima lisossomal β -glucuronidase tem ação proteolítica sobre os proteoglicanos, e sua atividade é aumentada durante a estocagem do músculo, o que pode estar relacionada com o aumento da maciez (MOELLER et al., 1976; DUTSON; LAWRIE, 1974).

O aumento da insolubilidade do colágeno é proporcional ao aumento das ligações cruzadas das fibras do colágeno (REAGAN; CARPENTER; SMITH; 1976). Além disso, o regime de manejo também é outro fator importante, apresentando função significativa na determinação das características do colágeno (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2010).

A quantidade de colágeno pode ser determinada pela quantidade de hidroxiprolina presente no músculo (BROWN; WORSFOLD; SHARP, 2001). As frações solúveis e insolúveis de hidroxiprolina referem-se às quantidades de colágeno solúvel e insolúvel, respectivamente, as quais podem afetar a maciez, a capacidade de retenção de água e o tempo de cozimento da carne (JEREMIAH et al., 2003; TORRESCANO et al., 2003).

2.2.1.3 Desnaturação térmica das proteínas

Em proteínas, a desnaturação térmica é associada com a quebra de ligações de hidrogênio ou eletrostáticas, sendo maior com o aumento da temperatura e tempo de aquecimento (PROMEYRAT et al., 2010a).

A desnaturação térmica das proteínas pode ser estudada através de calorimetria exploratória diferencial (DSC). A principal propriedade medida pela DSC é o fluxo de calor, ou seja, fluxo de energia dentro ou fora da amostra em função da temperatura ou tempo, apresentado em unidades de miliwatt (mW) (GABBOTT, 2008). A DSC usa a diferença de temperatura entre uma amostra e uma referência para o cálculo de fluxo de calor.

Na DSC, três picos de desnaturação são observados quando uma amostra de músculo é analisada. O primeiro pico de desnaturação corresponde à meromiosina leve, o segundo pico tem sido atribuído ao colágeno, meromiosina pesada e proteínas sarcoplasmáticas e o terceiro pico corresponde à actina e à titina. As temperaturas de desnaturação na DSC são referidas como temperaturas máximas de desnaturação ($T_{máx}$), onde as $T_{máx1}$, $T_{máx2}$ e $T_{máx3}$ correspondem às proteínas do músculo mencionadas (POSPIECH et al., 2002; BERTAZZON; TSONG, 1990; WRIGHT; WILDING, 1984; STABURSVIK; MARTENS, 1980; WRIGHT; LEACH; WILDING, 1977).

Em estudo com miofibrilas, Stabursvik e Martens (1980) reportaram que a primeira transição térmica correspondeu à meromiosina leve, e a segunda à meromiosina pesada. Em valores de pH maiores que 7,0, a temperatura da segunda transição térmica foi reduzida, a qual foi atribuída ao fragmento S-2 da meromiosina pesada. Isso foi confirmado por Bertazzon e Tsong (1990), que reportaram que a segunda transição térmica é sensível à mudanças no pH devido à contribuição da fração S-2. A actina tem comportamento inverso à miosina, sendo termicamente

mais estável quando o pH é reduzido. Em pH 7,9 tem-se uma $T_{máx}$ de 68°C, enquanto que em pH 5,9 a $T_{máx}$ aumenta até 74°C (BERTAZZON; TSONG, 1990). O colágeno não é afetado pelo pH, e conforme reportado por Stabursvik e Martens (1980), na faixa de pH de 5,4 a 6,1 a transição térmica do colágeno manteve-se constante.

Findlay e Stanley (1984a) estudaram o efeito da maturação na desnaturação térmica das proteínas do músculo, utilizando DSC. As mudanças nas transições térmicas para o músculo bovino *Sternomandibularis* foram observadas durante o período de maturação de 2 a 8 dias *post mortem*, à temperatura de 5°C. A $T_{máx1}$ referente a desnaturação da miosina diminuiu de 57,8 para 55,2°C, enquanto que a $T_{máx3}$ da actina aumentou de 81,8 para 83,2°C. A queda da transição da miosina pode ter ocorrido devido à liberação de frações termolábeis decorrente da proteólise *post mortem* do filamento grosso do sarcômero, conforme sugerido por aqueles autores.

Em outro estudo, Findlay e Stanley (1984b) reportaram o efeito do comprimento do sarcômero nas temperaturas de transição. A $T_{máx}$ da miosina diminuiu significativamente com o incremento do comprimento do sarcômero (de 57,0 para 55,6°C), mas a actina foi mais estável, pois sua transição aumentou quando o comprimento de sarcômero foi maior (de 82,4 para 83,0°C, de 1,4 para 2,4 μm , respectivamente).

2.2.1.4 Agregação de proteínas

A agregação de proteínas é um processo importante que está envolvido na formação do gel e compactação da carne durante a elaboração de produtos cárneos (ROBE; XIONG, 1994). O aquecimento que induz o desdobramento ou desnaturação das proteínas é acompanhado pelas interações proteína-proteína ou agregação (XIONG; BREKKE, 1990). A desnaturação induz a exposição de aminoácidos não polares na superfície das proteínas, o que favorece a interação entre elas para formar agregados com ligações não covalentes (PROMEYRAT et al., 2010b; SANTÉ-LHOUTELLIER et al., 2008).

A miosina é a maior responsável pela agregação das fibras do músculo, com a actomiosina e actina produzindo um efeito sinérgico (YASUI; ISHIOROSHI; SAMEJIMA, 1982). As proteínas miofibrilares são capazes de produzir géis no

aquecimento, influenciando o rendimento e a textura dos produtos cárneos (VERBEKEN et al., 2005; VEGA-WARNER; MERKEL; SMITH, 1999).

A morfologia geral da agregação de proteínas pode ser estudada por microscopia eletrônica. Essa técnica geralmente requer coloração ou sombreamento da imagem para manter o contraste, apesar do alto fluxo de elétrons, que pode causar dano por ionização na amostra. No entanto, os danos por radiação da amostra podem ser reduzidos, esfriando-se a amostra em nitrogênio líquido (BONDOS, 2006; MAKIN; SERPELL, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foi utilizado o músculo *Longissimus lumborum*, da 1° a 6° região lombar, corte “contra-filé”, de animais zebuínos machos inteiros (raça Nelore), de 30 a 34 meses de idade. Foram coletadas 9 peças de músculo de 9 animais, provenientes de um frigorífico comercial, localizado na cidade de Barretos, no Estado de São Paulo.

A coleta consistiu em medir o pH do músculo nas carcaças penduradas 24 horas após abate (Figura 2), utilizando pHmetro, com metodologia descrita no item 3.2. Os músculos foram selecionados em faixas de pH, sendo eles normal ($5,5 \leq \text{pH} \leq 5,8$), intermediário ($5,8 < \text{pH} < 6,2$) e alto ($\text{pH} \geq 6,2$), com 3 músculos para cada faixa de pH. Posteriormente, as peças foram desossadas, embaladas à vácuo e transportadas em caixas térmicas até a Planta de Processamento e Qualidade de Carnes da “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP.



Figura 2 - Coleta do músculo *Longissimus lumborum* pela medição de pH 24 h *post mortem*

O valor de pH mensurado 48 horas após o abate foi considerado o pH final (pH_f), que também foi realizado para confirmar os valores de pH dos músculos selecionados em 24 horas *post mortem*. Porém, houve uma queda de pH de 24 para 48 horas *post mortem* em dois músculos, tanto de pH alto como de pH intermediário, resultando em 5 músculos com pH normal, 3 com pH intermediário e 1 com pH alto.

Devido a problemas de repetibilidade, o músculo com pH_f alto foi desconsiderado do experimento, o qual teve como fatores de estudo os dias *post mortem* (2, 7, 14, e 21 d) e as faixas de pH_f normal e pH_f anormal, este último composto pelos músculos com valores de pH_f entre 5,8 e 6,2 (pH_f intermediário).

Uma vez realizada a mensuração do pH 48 horas *post mortem*, as peças foram fatiadas, embaladas à vácuo e submetidas a maturação durante 21 dias *post mortem* a $2 \pm 1^\circ\text{C}$. Nos dias *post mortem* 2, 7, 14 e 21 foram coletadas amostras e armazenadas a temperatura de -20°C para futuras análises.

3.2 Medição de pH

A medição do pH foi realizada com pHmetro da marca Mettler Toledo, modelo 1140 (Mettler Toledo, Zurich, CH), acoplado com eletrodo de punção de vidro (Figura 3). Antes de realizar a medição de pH nos músculos, foi realizada a calibração do pHmetro, em soluções tampão de pH 7 e 4, em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, de acordo com a especificação do pHmetro. Foram realizadas 5 mensurações, em diferentes pontos de cada bife, em todos os dias *post mortem*.



Figura 3 - Medição de pH dos bifés realizada no laboratório durante o processo de maturação

3.3 SDS–PAGE e imunodeteção de proteínas

Foi realizada a eletroforese em gel de policacrilamida – SDS para posterior imunodeteção de produtos de degradação de desmina e troponina T, como indicadores de maciez em todos os dias *post mortem* de cada faixa de pH_i. Foi utilizada a metodologia descrita por Kim et al. (2010), com modificações. Quantidades pequenas de amostra, livre de gordura e tecido conjuntivo visível, foram pulverizadas em nitrogênio líquido usando gral e pistilo, e armazenadas a –80°C até serem usadas para a preparação de amostra em gel. A extração da proteína e o preparo da amostra em gel para eletroforese foram feitos usando 1 g de amostra pulverizada. Foi utilizado tampão de extração do músculo (fosfato de sódio monobásico monohidratado 10 mM, fosfato de sódio dibásico heptahidratado 10 mM e SDS 2% (p/v), pH 7,0) para a extração da proteína das amostras. A seguir a mistura foi homogeneizada em ultra-turrax marca Ika modelo T25 (Ika, Freiburg, DE) e centrifugada a 1.500 × g por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi armazenado a –80°C para as etapas subsequentes da análise. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando reagentes pré-misturados (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA) e albumina de soro bovino (BSA) como referência. As amostras foram diluídas com tampão de extração do músculo na concentração de 8 mg de proteína/mL, e uma alíquota dessa diluição foi misturada em volume igual de tampão pyronin Y (tris 30 mM, EDTA 30 mM, glicerol 30% (v/v),

SDS 3% (p/v), pyronin Y 0,003% (p/v) pH 8,0, 2-mercaptoetanol 5% (v/v)) para obter uma concentração final de 4 mg de proteína/mL. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho-maria a 50°C, por 20 minutos, para posterior corrida no gel.

O gel de separação de proteínas, “resolving”, foi a poli-acrilamida 12,5% (acrilamida:bis-acrilamida = 37,5:1 (p/p), SDS 0,1% (p/v), TEMED 0,125% (v/v), APS 0,06% (p/v) e tris-HCl 1,5 M, pH 8,8). O gel de empilhamento, “stacking”, consistiu de poli-acrilamida 4% (acrilamida:bis-acrilamida = 37,5:1 (p/p), SDS 0,1% (p/v), TEMED 0,2% (v/v), APS 0,05% (p/v) e tris-HCl 0,5 M, pH 6,8). A quantidade de 40 µg de proteína foi usada para analisar a degradação da desmina e troponina T. Foi usado como referência o marcador molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA). Os géis foram corridos no sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA), aplicando voltagem de 120 V por 2 horas em condições de refrigeração (4°C).

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), usando o sistema de transferência Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA), à voltagem constante de 90 V por 1,5 horas, mantendo as condições de refrigeração (4°C). O tampão de transferência consistiu de tris 25 mM, glicina 192 mM, EDTA 2 mM e metanol 15% (v/v) (MELODY et al., 2004). Após a transferência, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente, por 1 hora, em solução de bloqueio PBS-Tween (fosfato de sódio dibásico heptahidratado 80 mM, fosfato de sódio monobásico monohidratado 20 mM, cloreto de sódio 100 mM, monolaurato de polioxietileno sorbitano 0,1% (Tween 20, v/v), e leite em pó desnatado 5% (p/v)). Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com seus respectivos anticorpos primários (desmina = diluição 1:20.000 com PBS-Tween, anticorpo monoclonal de camundongo anti-desmina, DE-U-10, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO; troponina T = diluição 1:40.000 com PBS-Tween, anticorpo monoclonal de camundongo anti-troponina T, JLT-12, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes (10 minutos para cada lavagem) em PBS-Tween à temperatura ambiente. Após a lavagem, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (desmina e troponina T = 1:10.000 com PBS-Tween, anticorpo Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate N° 1721011, Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA). As membranas foram então lavadas 3 vezes (10 minutos para cada lavagem) em

PBS-Tween à temperatura ambiente, para posterior detecção das bandas de proteína utilizando solução de quimioluminescência, conforme descrição do fabricante (ECL, Thermo Scientific) e visualizadas no fotodocumentador marca Bio-Rad modelo Universal Hood II (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA).

3.4 Comprimento do sarcômero

O comprimento do sarcômero foi determinado seguindo as metodologias de Cross, West e Dutson (1981) e Koolmees, Korteknie e Smulders (1986). Pequenos pedaços de amostra (3,0 × 3,0 × 2,0 cm) de cada faixa de pH_f e dias *post mortem*, foram fixados, durante 4 horas, em solução de glutaraldeído 5% (v/v) contendo tampão NaHPO₄ 0,1 M, a pH 7,2 e temperatura de 4°C. Posteriormente, a solução de glutaraldeído foi descartada e substituída por solução de sacarose 0,2 M contendo o mesmo tampão a pH 7,2. As amostras foram deixadas nessa solução durante a noite, à temperatura de 4°C. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas em alta velocidade em ultra-turrax (Ika, modelo T25), durante 30 segundos. Uma gota do homogeneizado e uma gota da solução de sacarose 0,2 M foram colocadas em lâmina de vidro e cobertas com lamínula para visualização no microscópio de contraste de fase com imersão de óleo (objetiva 100 ×) marca Nikon modelo Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Tokyo, JP). A média de 10 sarcômeros consecutivos por miofibrila (Figura 4), expressos em micrômetros, foi calculada com o software NIS-Elements F 4.00 (Nikon Instruments Inc., Tokyo, JP).



Figura 4 - Medição do comprimento do sarcômero por microscopia de contraste de fase. A linha vermelha representa a medição de 10 sarcômeros consecutivos por fibra, no cálculo foi considerada a média desses sarcômeros. Magnificação: 50 μm

3.5 Colágeno total e solúvel

A análise de colágeno total e solúvel foi realizada nas amostras de cada dia *post mortem* e faixas de pH_i. A metodologia empregada foi de Bergman e Loxley (1963), modificada por Brown, Worsfold e Sharp (2001). A quantidade de hidroxiprolina foi determinada para estimar o conteúdo de colágeno total. A quantidade de 350 mg de amostra liofilizada e pulverizada (em duplicata) foi misturada com 12 mL de HCl 6 M, seguido de hidrólise em placa aquecedora a 110°C por 16 horas (deixadas durante a noite). Após a hidrólise, as amostras foram resfriadas durante 15 minutos em gelo e filtradas em papel filtro Whatman N° 1, para posterior neutralização com 12 mL de NaOH 6 M. Em seguida, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente e diluídas 10 vezes com água destilada. Duas alíquotas de 250 μL de cada diluição foram oxidadas com 500 μL de solução de Cloramina T, deixando reagir por 5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 500 μL de solução dimetil (reagente Ehrlich) e a mistura foi levada em banho-maria a 60°C por 45 minutos para reação de coloração. As amostras foram resfriadas em gelo para posterior leitura da absorbância, em espectrofotômetro ajustado para comprimento de onda de 570 nm. A solução padrão de hidroxiprolina foi preparada diluindo-se 10 mg de hidroxiprolina em 10 mL de HCl 10 mM, e as concentrações da curva padrão de hidroxiprolina foram 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A concentração de colágeno total foi calculada assumindo que o colágeno é 7,14

vezes o valor da hidroxiprolina calculada. Os resultados foram expressos em gramas (g) de colágeno por 100 g de matéria seca.

Para a análise de colágeno solúvel, 500 mg de amostra liofilizada foram misturadas com 10 mL de água destilada, e a mistura foi levada para banho-maria, à 80°C, por 75 minutos. Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 15 minutos a 20°C. No sobrenadante foi adicionado 10 mL de HCl 6 M, e então levado a placa aquecedora, à 110°C por 16 horas (durante a noite). Após esse período as amostras foram resfriadas durante 15 minutos em gelo e neutralizadas com 10 mL de NaOH 6 M. A seguir, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e diluídas 3 vezes com água destilada. Posteriormente, o cálculo da hidroxiprolina foi realizado seguindo a metodologia descrita para colágeno total. O conteúdo de colágeno solúvel foi calculado a partir do conteúdo de hidroxiprolina, usando como fator de conversão o valor de 7,14. Os resultados foram expressos em % do conteúdo de colágeno total.

3.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Foram verificadas as temperaturas máximas (vértice dos endotermas) $T_{máx1}$, $T_{máx2}$ e $T_{máx3}$. Quantidades pequenas de amostra (60 mg) de cada faixa de pH_f e dias *post mortem*, foram colocadas em cadinho de alumínio com tampa e seladas hermeticamente, submetidas a aquecimento no DSC, na faixa de temperatura de 25 a 105°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min (Figura 5), utilizando água como referência e gás nitrogênio como gás de purga. O fluxo de calor diferencial foi registrado com o software STARE Evaluation (Mettler Toledo, Zurich, CH), conectado ao calorímetro exploratório diferencial, modelo DSC 1 da Mettler Toledo (Mettler Toledo, Zurich, CH).

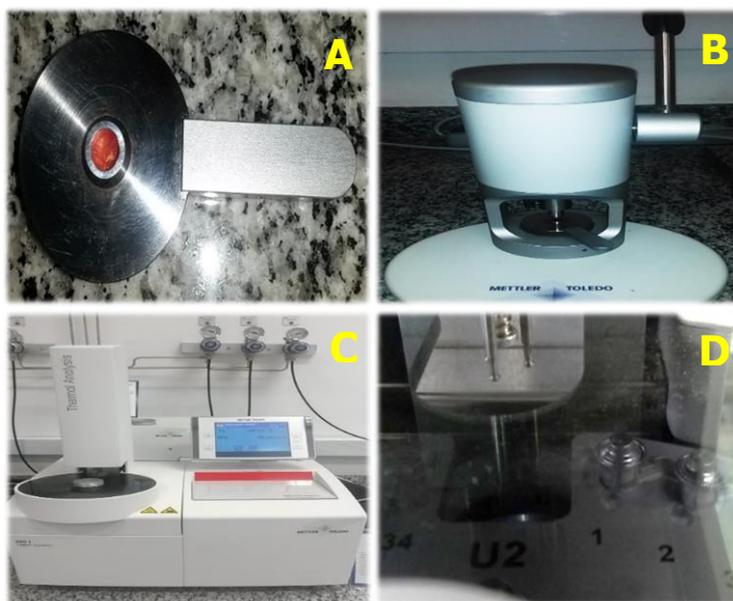


Figura 5 - Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). A) Amostra colocada em cadinho de alumínio; B) Seladora de cadinho; C) Calorímetro exploratório diferencial; D) Suporte amostrador do DSC

3.7 Força de cisalhamento Warner–Bratzler

Foi determinada a força de cisalhamento Warner–Bratzler segundo a metodologia da AMSA (1995). Bifes de 2,54 cm de espessura foram grelhados em forno elétrico até a temperatura interna dos bifes alcançar as temperaturas máximas de desnaturação das proteínas, determinadas previamente no DSC. As temperaturas internas foram monitoradas usando termômetro de punção. Foram calculadas as perdas de peso por cozimento utilizando os pesos dos bifes antes e depois de grelhados, e os resultados foram expressos como porcentagem do peso perdido. Posteriormente, os bifes foram resfriados a 2°C, por 12 horas. Após resfriamento, foram removidas de 6 a 8 peças cilíndricas de cada bife (1,27 cm de diâmetro), em sentido paralelo à orientação das fibras, e cortados à velocidade de corte de 20 cm/min, utilizado texturômetro acoplado à lâmina Warner–Bratzler (Mecmesin, Kansas, USA) (Figura 6). Os resultados foram expressos em quilograma-força (Kgf).



Figura 6 - Análise de força de cisalhamento Warner–Bratzler. A) Controle da temperatura de cozimento; B) Remoção de peças cilíndricas; C) Texturômetro acoplado a lâmina Warner–Bratzler; D) Corte das amostras com a lâmina

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta análise foi realizada para estudar o efeito da maturação e do pH_f na morfologia geral da agregação das fibras em carne cozida. A análise foi realizada em amostras nos 2 e 14 dias *post mortem*, de cada faixa de pH_f.

As temperaturas internas de cozimento foram 55, 65 e 80°C. Amostras de 6,0 × 3,0 × 3,0 mm, foram cortadas no sentido transversal da fibra e fixadas por 1,5 horas em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), preparada com pequenas modificações (glutaraldeído 2,5% (v/v) e formaldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7; e cloreto de cálcio 1 mM). Após esse período, a solução fixadora foi substituída por glicerol 30% (v/v), e após 1 hora, as amostras foram criofraturadas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (p/v) em tampão cacodilato 0,1 M, durante 1 hora. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentração crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e três vezes a 100%) durante 20 minutos em cada concentração, e em seguida, secadas ao ponto crítico do CO₂. Após a secagem, as amostras foram montadas em porta-amostras (stubs) com fita adesiva de dupla face, e metalizadas com 30 nm de camada de ouro, para posterior visualização no microscópio eletrônico de varredura, marca LEO modelo 435VP (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK). A tensão de aceleração foi 20 kV e as amostras foram fotografadas em 650 × de magnificação.

3.9 Análise estatística

O arranjo experimental incluiu medida repetida no tempo devido ao fator dias *post mortem*. Os dados das transições térmicas $T_{máx1}$, $T_{máx2}$ e $T_{máx3}$, o comprimento do sarcômero e o colágeno total e solúvel, foram analisados pelo teste F da Análise da Variância (ANOVA), considerando como fatores de estudo as faixas de pH_r (pH_r normal e anormal) e os dias *post mortem* (2, 7, 14 e 21 dias). Posteriormente, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. O software estatístico usado para a análise estatística foi o XLSTAT (Addinsoft, New York, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 pH

Um dos objetivos específicos da presente pesquisa foi selecionar os músculos por faixas de pH, medido 24 horas *post mortem*, nas carcaças penduradas no frigorífico. Nesse período, como prática industrial, é realizada a desossa e a obtenção dos cortes para posterior comercialização, motivo pelo qual foi escolhido esse tempo *post mortem*. Foram selecionados 3 músculos para cada faixa de pH (alto, intermediário e normal), com o objetivo de se obter repetições para a realização da análise estatística. No entanto, o ponto de partida do experimento ocorreu após 48 horas *post mortem*. Nesse período, foi realizada a mensuração do pH, visando confirmar os valores de pH obtidos nos músculos em 24 horas *post mortem* e definir os valores de pH final (pH_f). Porém, foi verificada variação nos níveis de cada pH_f, obtendo-se: 5 músculos com valores de pH_f baixo, 3 músculos com pH_f intermediário e 1 músculo com pH_f alto. Devido a esta alteração, foi desconsiderado o músculo com pH_f alto do experimento.

Esta alteração indica que, em 24 horas *post mortem*, os músculos que mudaram de pH estiveram na etapa de pre-rigor, e aqueles que alcançaram valores de pH_f intermediário e alto provavelmente apresentaram falta de glicogênio como reserva energética para produzir lactato e íons hidrogênio, e então alcançar os valores de pH_f baixo considerados normais (YOUNG et al., 2004). O estresse dos animais antes do abate é um fator determinante para a obtenção de valores de pH_f anormal conforme sugerido por Lahucky et al. (1998) e McVeigh, Tarrant e Harrington (1982), o que pode ter ocorrido com os animais utilizados no presente estudo.

Durante o período de maturação houve diferença significativa ($P < 0,05$) apenas entre os dias 2 e 21 na faixa de pH_f normal, mas os valores estiveram dentro das faixas de pH_f estudadas, tanto para o pH_f normal quanto para o pH_f anormal (Tabela 1). Diferenças significativas foram encontradas entre os valores de pH das faixas de pH_f em todos os dias *post mortem* (Tabela 1). Portanto, mostra-se relevante estudar a maciez do músculo bovino de acordo com a sua classificação de pH_f, uma vez que segundo Lomiwes, Farouk e Young (2014) a maciez do músculo *Longissimus dorsi* durante a maturação é influenciada de maneira diferenciada em faixas de pH_f distintas.

Tabela 1 - Valores de pH do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*

	Dia	Faixas de pH _f ¹	
		Normal	Anormal
pH	2	5,58 ± 0,06 ^{aX}	5,83 ± 0,03 ^{bX}
	7	5,63 ± 0,04 ^{aXY}	5,84 ± 0,05 ^{bX}
	14	5,67 ± 0,04 ^{aXY}	5,88 ± 0,02 ^{bX}
	21	5,69 ± 0,02 ^{aY}	5,93 ± 0,03 ^{bX}

¹Faixas de pH_f normal: 5,5 ≤ pH_f ≤ 5,8; anormal: 5,8 < pH_f < 6,2

Valores com distinta letra entre tratamentos (^{X-Z}Dia; ^{a-c}pH_f) diferem entre si ($P < 0,05$)

Uma vez que no presente experimento foram encontradas mudanças nos valores de pH_f entre 24 e 48 horas *post mortem*, sugere-se que o pH_f deve ser calculado antes de este ser atingido. Assim, Lahucky et al. (1998) utilizaram a técnica de biopsia para predizer o pH_f 48 horas *post mortem* através da quantificação do conteúdo de glicogênio no músculo, e reportaram correlações significativas entre o conteúdo de glicogênio poucas horas *post mortem* e o pH_f 48 horas. De maneira similar, Young et al. (2004) determinaram o pH_f pela hidrólise do glicogênio em glicose, através da ação da enzima amiloglucosidase. O método consistiu em utilizar medidores domésticos de controle de diabetes para determinar o conteúdo de glicose poucas horas *post mortem* visando predizer o pH_f 30 horas. Tais métodos poderiam ser aplicados para futuros estudos que envolvam o pH_f do músculo como fator de estudo.

4.2 Degradação da desmina e troponina T

A desmina é degradada em polipeptídios de 45.000 e 38.000 Da (HUFF-LONERGAN et al., 1996), referidos na Figura 7 como d1 e d2, respectivamente. Pode ser observado que o produto de degradação d1 apareceu a partir do dia 7 no grupo de pH_f normal, enquanto que no pH_f anormal apareceu a partir do dia 14. No dia 21 o segundo produto de degradação d2 apareceu no pH_f normal, indicando maior proteólise da desmina nesse dia *post mortem*.

Apesar da rápida degradação da desmina observada no pH_f normal, o padrão de degradação foi parecido ao reportado por Huff-Lonergan et al. (1996) para o músculo *Longissimus* com valores de força de cisalhamento altos. Esses autores reportaram que músculos com valores de força de cisalhamento baixos estavam relacionados com maior degradação de desmina, onde os produtos de degradação de 45.000 e 38.000 Da apareceram a partir do dia 3 *post mortem*, e que atividade da

μ -calpaína foi responsável em parte da degradação da desmina em condições de pH normais (pH 5,6).

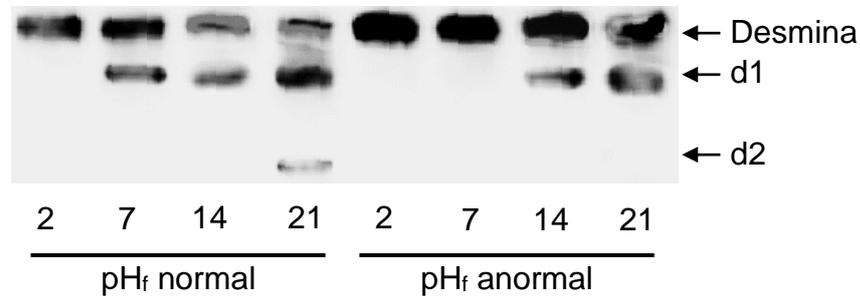


Figura 7 - Imunodeteção da desmina em função do pH final e dias *post mortem*. Os polipeptídeos de degradação de 45.000 e 38.000 Da são denominados d1 e d2, respectivamente

A troponina T é degradada em polipeptídeos de 28.000 e 30.000 Da (HUFF-LONERGAN et al., 1996; HO; STROMER; ROBSON, 1994). No pH_f baixo, a fração polipeptídica de 28.000 Da foi acentuada a partir do dia 7, e o complexo polipeptídico pp apareceu no dia 21, o qual foi observado também no pH_f anormal nesse dia *post mortem* (Figura 8).

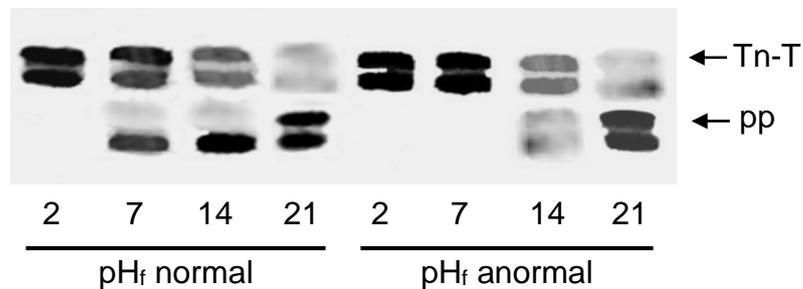


Figura 8 - Imunodeteção de troponina T em função do pH final e dias *post mortem*. O complexo polipeptídico de degradação de 30.000 – 28.000 Da é denominado pp

Similar à degradação da desmina, o padrão de degradação da troponina T também foi similar ao reportado por Huff-Lonergan et al. (1996), isto é, músculos com valores de força de cisalhamento altos alcançaram degradação da troponina T a partir do dia 7 *post mortem*, em comparação a músculos macios que tiveram maior degradação da troponina T, aparecendo o complexo polipeptídico de 28.000 – 30.000 Da desde o dia 3 *post mortem*.

Devido a que no presente estudo não foi determinado degradação da desmina e troponina T no dia 3 *post mortem*, a comparação com os resultados de

Huff-Lonergan et al. (1996) não seria direta, contudo, tais resultados podem explicar os valores de força de cisalhamento em função do pH_f do músculo.

As diferenças no padrão de degradação da desmina e troponina T nas duas faixas de pH_f corrobora com os resultados reportados na literatura, onde a degradação da proteína foi desfavorecida em valores de pH_f entre 5,8 e 6,2, possivelmente devido à ação protetora das proteínas do choque térmico (heat shock proteins – HSPs), tais como as HSP20, HSP27 e αβ-cristalina, juntamente com a ação limitada de enzimas como as calpaínas e catepsinas (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES et al., 2014, 2013; PULFORD et al., 2009, 2008).

4.3 Colágeno total e solúvel

Foram encontradas diferenças ($P < 0,05$) para colágeno total apenas entre o dia 2 e o dia 21 na faixa de pH_f normal, possivelmente devido a uma subestimação na determinação de colágeno total no dia 2 (Tabela 2). No entanto, para os outros tratamentos não houve diferenças significativas, tanto para colágeno total como para colágeno solúvel (Tabelas 2 e 3), provavelmente devido à homogeneidade das idades dos animais estudados (de 30 a 34 meses de idade), conforme reportado por Reagan, Carpenter e Smith (1976). Resultados similares foram reportados por Whipple et al. (1990) e Seideman, Koohmaraie e Crouse (1987).

Tabela 2 - Valores de colágeno total do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*

	Dia	Faixas de pH _f ¹	
		Normal	Anormal
Colágeno total (g/100g matéria seca)	2	1,46 ± 0,02 ^{aX}	1,72 ± 0,05 ^{aX}
	7	1,75 ± 0,08 ^{aXY}	1,61 ± 0,02 ^{aX}
	14	1,63 ± 0,07 ^{aXY}	1,64 ± 0,04 ^{aX}
	21	1,71 ± 0,01 ^{aY}	1,67 ± 0,04 ^{aX}

¹Faixas de pH_f normal: 5,5 ≤ pH_f ≤ 5,8; anormal: 5,8 < pH_f < 6,2

Valores com distinta letra entre tratamentos (^{X-Z}Dia; ^{a-c}pH_f) diferem entre si ($P < 0,05$)

Tabela 3 - Valores de colágeno solúvel do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*

	Dia	Faixas de pH _f ¹	
		Normal	Anormal
Colágeno solúvel (%)	2	17,34 ± 1,20 ^{aX}	14,05 ± 0,32 ^{aX}
	7	15,49 ± 0,94 ^{aX}	16,99 ± 1,11 ^{aX}
	14	16,75 ± 0,48 ^{aX}	17,11 ± 1,06 ^{aX}
	21	15,67 ± 0,19 ^{aX}	16,43 ± 1,51 ^{aX}

¹Faixas de pH_f normal: 5,5 ≤ pH_f ≤ 5,8; anormal: 5,8 < pH_f < 6,2

Valores com distinta letra entre tratamentos (^{X-Z}Dia; ^{a-c}pH_f) diferem entre si ($P < 0,05$)

Considerando todas as faixas de pH_f e dias *post mortem*, os valores de colágeno total e solúvel estiveram nas faixas de 1,46 – 1,75 g/100 g e 14,05 – 17,34% colágeno total, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Os valores de colágeno total foram menores que os reportados por Stolowski et al. (2006) e Whipple et al. (1990), que utilizaram o músculo *Longissimus* de *Bos indicus* no cruzamento com *Bos taurus*. No entanto, no estudo destes autores, os valores de colágeno total foram considerados baixos, mesmo com uma maior introdução de *Bos indicus* no cruzamento.

Os valores de colágeno solúvel foram similares aos reportados por Whipple et al. (1990), que também não encontraram diferenças durante o período de maturação. Este resultado sugere que a presença do colágeno na presente pesquisa terá uma contribuição mínima nos valores de força de cisalhamento Warner–Bratzler. Por outro lado, o colágeno solúvel não é alterado quando as idades dos animais são similares, conforme sugerido por Reagan, Carpenter e Smith (1976), os quais encontraram diminuição na solubilidade do colágeno com o aumento da idade do animal.

O fato interessante é que o pH_f não influenciou nos valores de colágeno total e solúvel. Assim, parece que o fator determinante na similaridade do colágeno total e solúvel entre os tratamentos é a idade dos animais.

4.4 Desnaturação térmica das proteínas

As transições térmicas analisadas na DSC são mostradas na Figura 9. Uma vez que os valores de força de cisalhamento serão relacionados com a desnaturação térmica das proteínas, o primeiro pico de desnaturação refere-se à meromiosina leve, o segundo ao colágeno e meromiosina pesada e o terceiro à actina e titina, conforme reportado por diversos estudos (POSPIECH et al., 2002; BERTAZZON; TSONG, 1990; WRIGHT; WILDING, 1984; STABURSVIK; MARTENS, 1980; WRIGHT; LEACH; WILDING, 1977). Os resultados da desnaturação térmica das proteínas são referidos como a temperatura máxima de desnaturação ($T_{m\acute{a}x}$), ou seja, o vértice de cada pico das curvas da Figura 9.

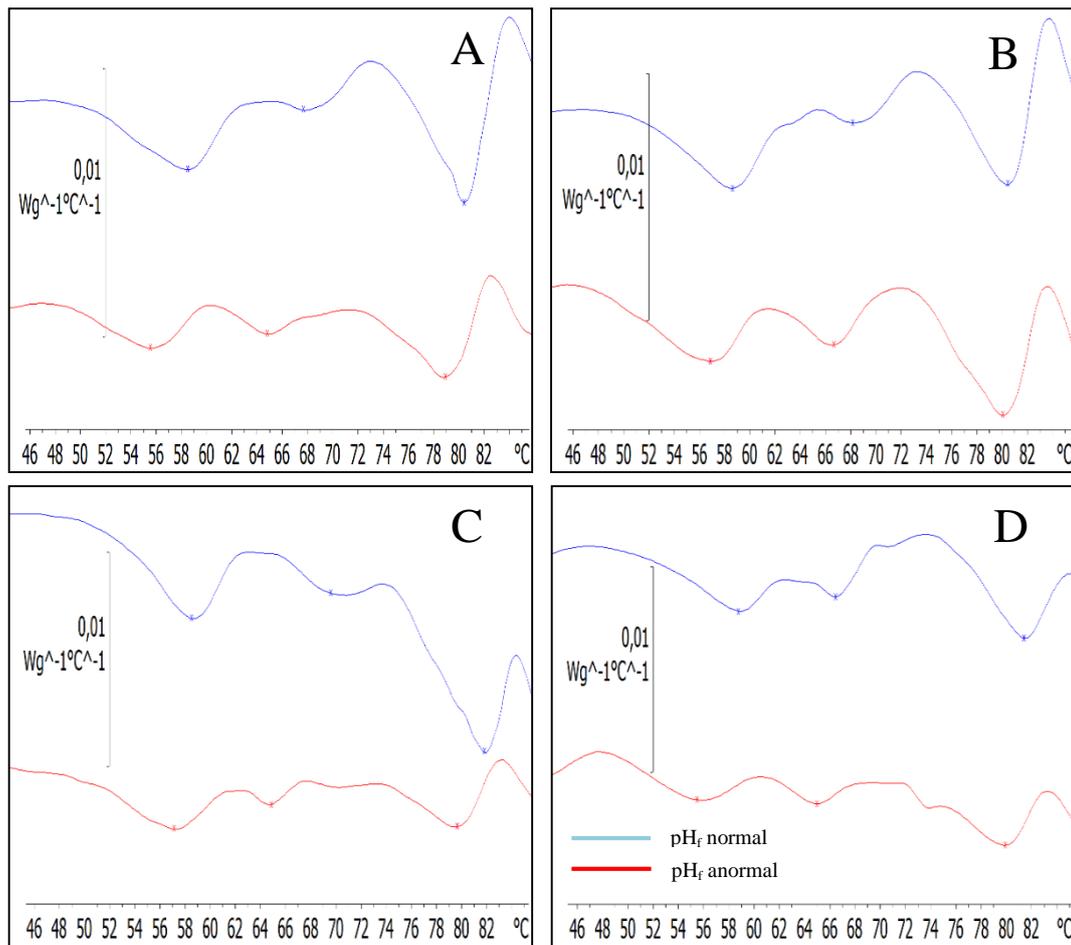


Figura 9 - Transições térmicas das proteínas do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*. A) 2 dias; B) 7 dias; C) 14 dias; D) 21 dias

Verifica-se na Tabela 4 que a $T_{máx1}$ da meromiosina leve foi menor no pH_f normal em relação ao pH_f anormal em todos os dias *post mortem*, mas a diferença significativa foi detectada apenas no dia 21 (Tabela 4). Isto ocorreu pois, em 21 dias, a $T_{máx1}$ no pH_f normal alcançou o menor valor, que provavelmente pode ser devido à liberação de frações termolábeis dos filamentos grossos do sarcômero decorrente da proteólise *post mortem*, conforme hipótese sugerida por Findlay e Stanley (1984a).

Devido a que no presente estudo a desnaturação térmica das proteínas foram determinadas no estado natural da carne, é difícil afirmar que a meromiosina leve sofre degradação proteolítica em função do menor valor encontrado de $T_{máx1}$ no dia 21 no pH_f normal, e que provavelmente outras proteínas podem contribuir nas mudanças conformacionais da meromiosina leve causando a mudança nos valores de $T_{máx}$. Por outro lado, não existem relatos de degradação da meromiosina leve ou

das cadeias pesadas nessa região da molécula de miosina, em dias de estocagem prolongados. Contudo, considerando a hipótese de Findlay e Stanley (1984a), a diminuição da $T_{máx1}$ em 21 dias *post mortem* sugere que a meromiosina leve pode sofrer degradação, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os dias *post mortem* no pH_f baixo. Outro fator importante é que as catepsinas podem estar envolvidas na degradação da miosina, uma vez que tem sido reconhecido que esse sistema enzimático é capaz de degradar esta proteína, sendo a sua atividade elevada em dias *post mortem* prolongados e em valores de pH baixos (LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014; LOMIWES et al., 2013; PULFORD et al., 2009; KOOHMARAIE, 1992).

Tabela 4 - Valores de temperatura máxima de desnaturação de proteínas do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*

	Dia	Faixas de pH_f^1	
		Normal	Anormal
$T_{máx1}$	2	55,57 ± 0,91 ^{aX}	58,03 ± 0,70 ^{aX}
	7	56,37 ± 1,42 ^{aX}	57,54 ± 0,11 ^{aX}
	14	56,66 ± 1,09 ^{aX}	58,35 ± 0,73 ^{aX}
	21	54,48 ± 1,12 ^{aX}	57,44 ± 0,24 ^{bX}
$T_{máx2}$	2	64,69 ± 1,14 ^{aX}	68,98 ± 1,15 ^{bX}
	7	65,73 ± 1,18 ^{aX}	68,78 ± 0,71 ^{bX}
	14	65,26 ± 0,72 ^{aX}	70,68 ± 1,70 ^{bX}
	21	63,93 ± 0,68 ^{aX}	69,12 ± 0,80 ^{bX}
$T_{máx3}$	2	77,92 ± 0,65 ^{aX}	79,64 ± 0,60 ^{bX}
	7	79,65 ± 0,57 ^{aYZ}	79,38 ± 0,20 ^{aX}
	14	80,33 ± 0,75 ^{aY}	81,00 ± 0,39 ^{aX}
	21	78,16 ± 0,83 ^{aXZ}	79,82 ± 0,33 ^{bX}

¹Faixas de pH_f normal: $5,5 \leq pH_f \leq 5,8$; anormal: $5,8 < pH_f < 6,2$

Valores com distinta letra entre tratamentos para cada $T_{máx}$ (^{X-Z}Dia; ^{a-b} pH_f) diferem entre si ($P < 0,05$)

Foram detectadas diferenças ($P < 0,05$) na $T_{máx2}$ entre as faixas de pH_f em todos os dias *post mortem* (Tabela 4). Os maiores valores de $T_{máx2}$ no pH_f anormal podem indicar um mecanismo de proteção da meromiosina pesada, resultando em uma temperatura de desnaturação mais elevada. Markov et al. (2008) reportaram que a proteína do choque térmico HSP27 protege a fração S-1 da meromiosina pesada da agregação induzida pela desnaturação térmica, e altos níveis de HSP27 têm sido encontrados no músculo *Longissimus dorsi* com pH_f maiores a 6,2, seguido de pH_f com valores entre 5,8 e 6,2 e por último no pH_f normal (LOMIWES et al., 2013). Combinando estes estudos, sugere-se que a desnaturação térmica da meromiosina pesada é retardada no pH_f intermediário, através do efeito protetor da

HSP27 contra a agregação da fração S-1. Além disso, foi reportado que a ação da HSP27 é diminuída no pH_f alto e baixo, pois no pH_f alto uma porção dela é degradada enzimaticamente e no pH_f baixo ela é precipitada por estar próximo a seu ponto isoelétrico (LOMIWES et al., 2013; PULFORD et al., 2008). Isto também poderia explicar os maiores valores de T_{máx2} no pH_f anormal observado neste estudo. O fragmento S-2 também pode estar envolvido nas diferenças da T_{máx2} entre as faixas de pH_f, já que foi reportada a sua susceptibilidade às mudanças no pH (BERTAZZON; TSONG, 1990; STABURSVIK; MARTENS, 1980). Já a contribuição do colágeno na segunda transição térmica pode ser considerada mínima, uma vez que foram encontrados valores baixos de conteúdo de colágeno total (Tabela 2), e sua transição não foi susceptível em valores de pH entre 5,4 e 6,1 (STABURSVIK; MARTENS, 1980).

Foram detectadas diferenças ($P < 0,05$) na T_{máx3} da actina e titina entre as faixas de pH_f, nos dias 2 e 21 *post mortem*, onde no pH_f normal foram encontradas os menores valores (Tabela 4). Entre os dias *post mortem* também houve efeito significativo na faixa de pH_f normal. Pode ser observado na Tabela 4 que a T_{máx3} em 2 dias foi significativamente menor que a T_{máx3} após 14 dias (77,92°C vs. 80,33°C), e esta foi significativamente maior que a T_{máx3} após 21 dias (80,33°C vs. 78,16°C). Findlay e Stanley (1984b) reportaram que o aumento da temperatura de transição da actina ocorre devido à dissociação da actina do complexo actomiosina conforme aumenta o tempo de estocagem do músculo, e que essa dissociação é proporcional ao aumento do comprimento do sarcômero. No entanto, na presente pesquisa não foram encontradas diferenças significativas nos valores de comprimento de sarcômero entre os tratamentos (Tabela 5), descartando-se essa hipótese para a T_{máx3}.

Tabela 5 - Valores de comprimento de sarcômero do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*

	Faixas de pH _f ¹		
	Dia	Normal	Anormal
Comprimento de sarcômero (µm)	2	1,99 ± 0,14 ^{aX}	2,00 ± 0,09 ^{aX}
	7	1,91 ± 0,07 ^{aX}	1,94 ± 0,01 ^{aX}
	14	1,91 ± 0,05 ^{aX}	1,94 ± 0,07 ^{aX}
	21	1,87 ± 0,07 ^{aX}	1,89 ± 0,05 ^{aX}

¹Faixas de pH_f normal: 5,5 ≤ pH_f ≤ 5,8; anormal: 5,8 < pH_f < 6,2

Valores com distinta letra entre tratamentos (^{X-Z}Dia; ^{a-c}pH_f) diferem entre si ($P < 0,05$)

Contudo, parece que outro mecanismo bioquímico exerce proteção contra a desnaturação da actina, sendo efetivo no pH_f anormal, e em até 14 dias no pH_f normal. Tem sido reportado que a HSP27 protege a actina desnaturada, elevando a sua temperatura de agregação (PIVOVAROVA et al., 2005). Isto sugere que a desnaturação da actina é maior em dias de estocagem prolongados, e que a HSP27 pode ser responsável pelo aumento da $T_{máx3}$ para diminuir a agregação da actina. Por outro lado, Morzel et al. (2008) observaram que, em altos níveis da HSP27, a actina tem uma proteólise limitada, o que pode explicar o resultado desta pesquisa para a faixa de pH_f normal até 14 dias *post mortem*. No entanto, a queda da $T_{máx3}$ do dia 14 para o dia 21 sugere degradação da actina nessa faixa de dias, diminuindo assim a $T_{máx3}$. Porém, na $T_{máx3}$ não deve ser desconsiderada a contribuição da titina na terceira transição térmica, uma vez que Pospiech et al. (2002) reportaram que a $T_{máx}$ da titina foi menor que $T_{máx}$ da actina.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura

A agregação das fibras musculares durante o cozimento foram visualizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As temperaturas de cozimento foram 55°C, 65°C e 80°C, correspondentes às temperaturas internas do músculo em cada faixa de pH_f e nos dias *post mortem* 2 e 14. Tais temperaturas foram utilizadas por estarem próximas das três transições térmicas encontradas na DSC.

Nas Figuras 10, 11 e 12 são apresentadas as micrografias dos músculos cozidos às temperaturas internas de 55°C, 65°C e 80°C, respectivamente. Na temperatura de cozimento de 55°C não houve formação de agregados para as duas faixas de pH_f e dias *post mortem* (Figura 10). Já na temperatura interna de 65°C houve formação de agregados principalmente no pH_f normal (setas amarelas na Figura 11), que pode ser devido ao fato de que a desnaturação térmica das

proteínas é alcançada mais rápido nessa faixa de pH_f, já que na análise de DSC foram encontrados os menores valores de T_{máx} (Tabela 4). Com maior aumento da temperatura interna de cozimento (80°C), a formação de agregados foi maior para todos os tratamentos (Figura 12). Resultados similares foram reportados por Palka (2003), no qual a temperatura interna de cozimento de 50°C provocou pequenas mudanças na estrutura do músculo bovino *Semitendinosus*, mas o aumento da temperatura entre 60 e 90°C resultou em degradação das miofibrilas e do tecido conjuntivo intramuscular.

Palka (2003) também reportou que a maturação afetou a microestrutura do músculo *Semitendinosus*, que por sua vez teve efeito positivo na diminuição dos valores de força de cisalhamento Warner–Bratzler. Pequenas modificações na estrutura são observadas entre os dias *post mortem*, em cada faixa de pH_f avaliado na presente pesquisa. Porém, houve uma perda de integridade das fibras em 2 dias no pH_f normal (setas amarelas da Figura 12A), devido ao fato de que a T_{máx3} da actina e titina foi menor que a temperatura de cozimento utilizada para a análise de MEV (77,92 vs. 80,00°C).

A desnaturação térmica tem sido relacionada com o processo de agregação das proteínas (PROMEYRAT et al., 2010a, 2010b; SANTÉ-LHOUELIER et al., 2008). Segundo Promeyrat et al. (2010b), o processo de agregação pode estar envolvido nas mudanças estruturais das miofibrilas durante o cozimento, fato que poderia explicar as mudanças na estrutura das fibras com o aumento da temperatura observados no presente trabalho.

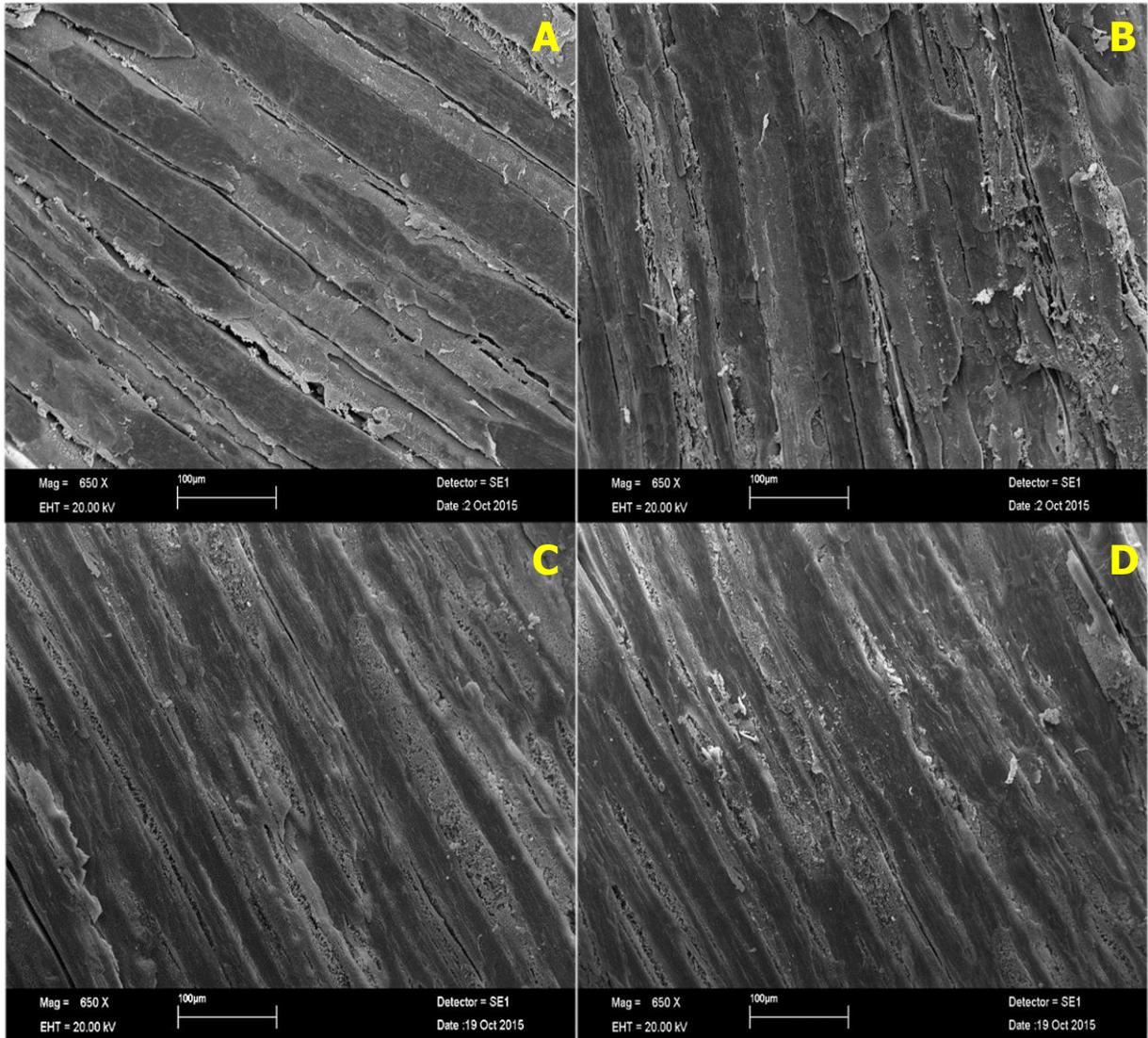


Figura 10 - Micrografias do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura interna de 55°C. A e B) pH_f normal; C e D) pH_f anormal; A e C) 2 dias; B e D) 14 dias. Magnificação: 100 µm

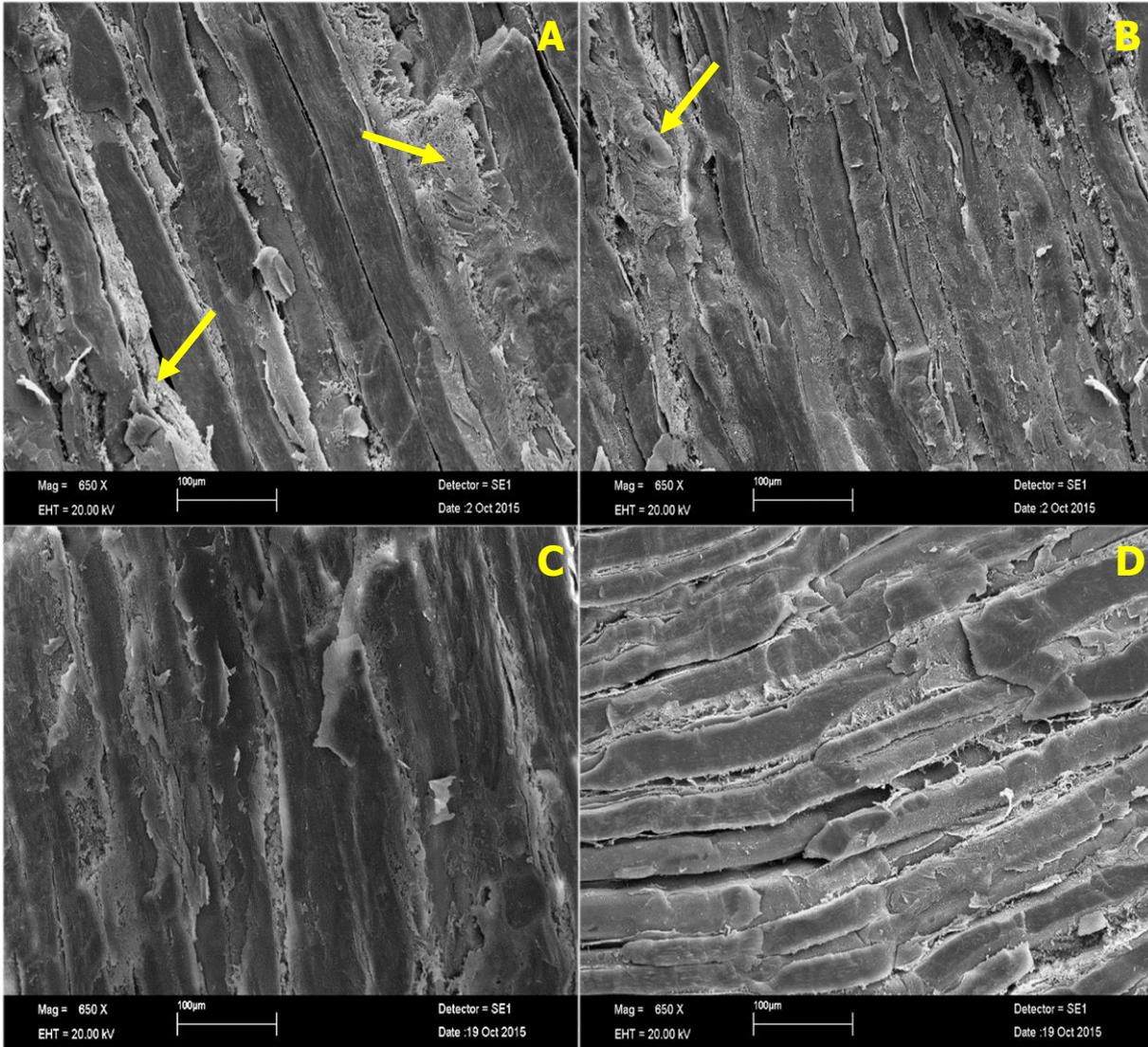


Figura 11 - Micrografias do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura interna de 65°C. A e B) pH_f normal; C e D) pH_f anormal; A e C) 2 dias; B e D) 14 dias. Magnificação: 100 µm

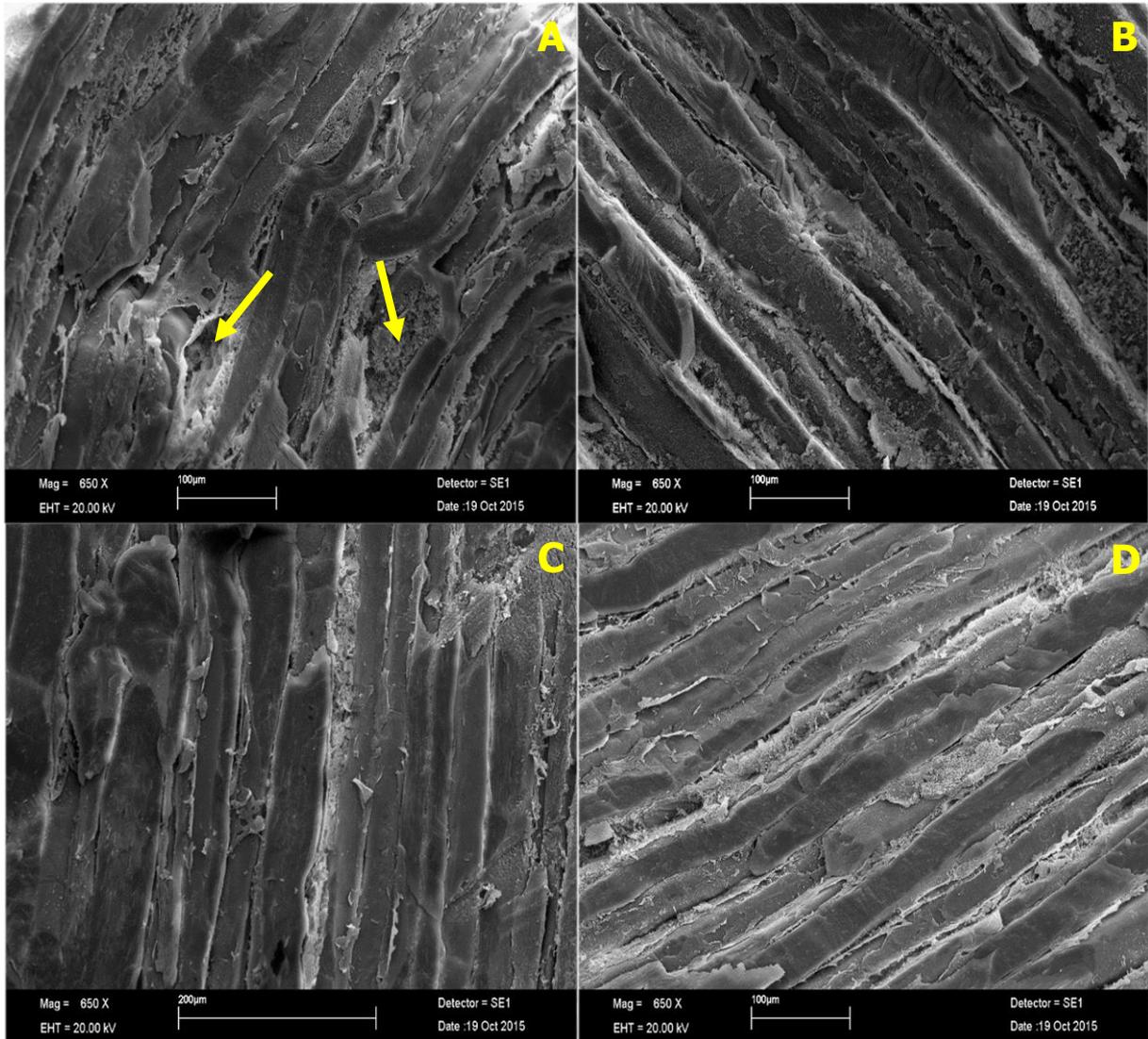


Figura 12 - Micrografias do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos em diferentes faixas de pH final e dias *post mortem*, cozidos à temperatura interna de 80°C. A e B) pH_f baixo; C e D) pH_f intermediário; E e F) pH_f alto; A, C e E) 2 dias; B, D e F) 14 dias. Magnificação: 100 μm

4.6 Força de cisalhamento Warner–Bratzler

Antes de discutir os resultados de força de cisalhamento Warner–Bratzler é necessário ter conhecimento de quais valores deste parâmetro são relacionados com a maciez da carne. Nesse sentido, Delgado et al. (2006) reportaram a percepção de maciez de consumidores brasileiros em bifes de *Longissimus dorsi* classificados em valores de força de cisalhamento como duro (> 4,8 Kgf) e macio (< 4,1 Kgf), sendo que os consumidores foram capazes de perceber diferenças entre eles.

Houve aumento nos valores de força de cisalhamento com o aumento da temperatura interna de cozimento (Figuras 13, 14 e 15), resultado este que é similar ao reportado por Findlay, Stanley e Gullet (1986) para o músculo *Longissimus dorsi*. No entanto, Bertola, Bevilacqua e Zaritzky (1993) e Martens, Stabursvik e Martens (1982) observaram diminuição na dureza quando a temperatura interna do músculo correspondeu à $T_{máx2}$, fato que foi atribuído a desnaturação térmica do colágeno. Na presente pesquisa os teores de colágeno total foram baixos (Tabela 3), e a sua contribuição nos valores de força de cisalhamento pode ser considerada mínima, o que explica o aumento nos valores de força de cisalhamento com o aumento da temperatura de cozimento.

Em termos estruturais, neste trabalho a maciez correspondeu à fração miofibrilar do músculo, constituída principalmente por miosina e actina, que também podem ter um efeito direto na formação de agregados das fibras com o aumento da temperatura interna de cozimento, conforme apresentado nas Figuras 10, 11 e 12.

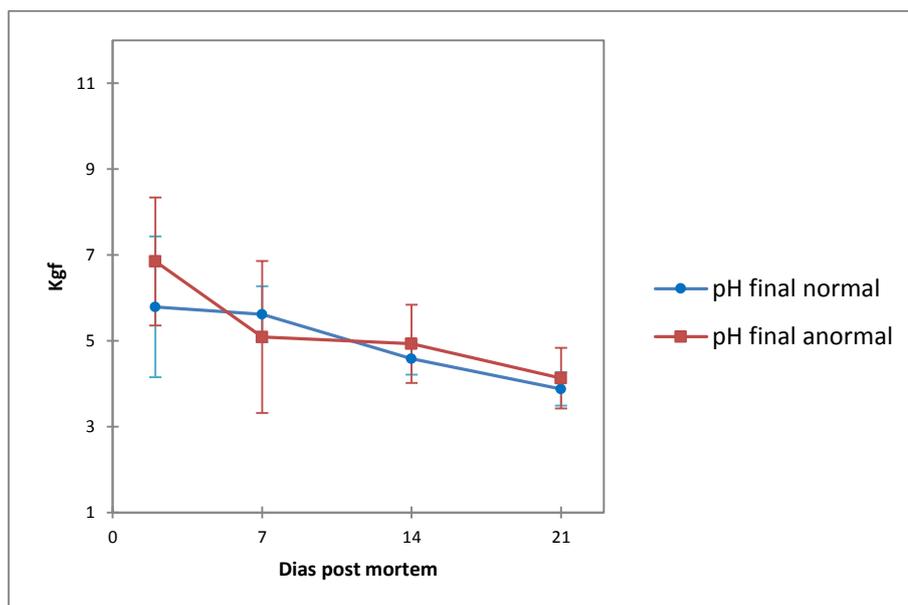


Figura 13 - Força de cisalhamento Warner-Bratzler do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura máxima de desnaturação da primeira transição térmica ($T_{máx1}$)

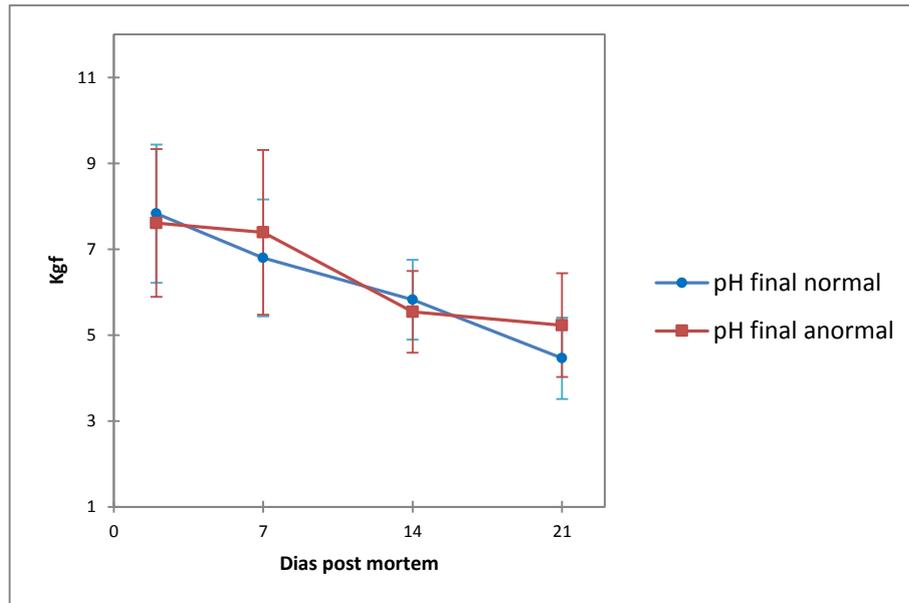


Figura 14 - Força de cisalhamento Warner–Bratzler do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura máxima de desnaturação da segunda transição térmica ($T_{máx2}$)

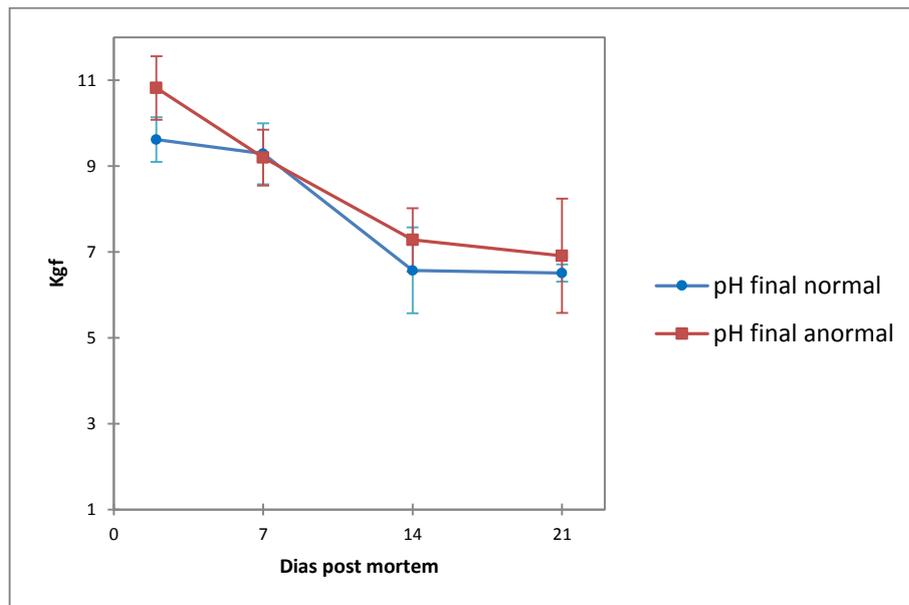


Figura 15 - Força de cisalhamento Warner–Bratzler do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura máxima de desnaturação da terceira transição térmica ($T_{máx3}$)

Os bifes podem ser considerados macios apenas após 21 dias *post mortem* na $T_{máx1}$ para ambas as faixas de pH_f , onde alcançaram os valores de 3,88 Kgf e 4,13 Kgf para o pH_f final normal e pH_f anormal, respectivamente. Na $T_{máx2}$ do pH_f normal em 21 dias *post mortem* o valor de força de cisalhamento foi de 4,46 Kgf, o

qual está no limite de maciez selecionado por Delgado et al. (2006), aqueles autores definiram o valor de 4,5 Kgf para selecionar carnes duras de carnes macias.

Por outro lado, houve uma diminuição nos valores de força de cisalhamento com o aumento do tempo de estocagem do músculo para ambas as faixas de pH_f, nas três temperaturas de cozimento, redução esta não foi suficiente para alcançar valores de classificação macia em vários tempos *post mortem* (DELGADO et al., 2006) (Figuras 13, 14 e 15).

Apesar de que a desmina e troponina T degradaram mais rápido na faixa de pH_f normal, parece ser que a degradação dessas proteínas não foi suficiente para obter carnes com valores de força de cisalhamento baixos, o qual é similar ao reportado por Huff-Lonergan et al. (1996), que encontraram músculos com valores de força de cisalhamento altos tiveram padrão de degradação da desmina e troponina T similar ao observado nesta pesquisa, ou seja, elas foram degradadas a partir do dia 7 *post mortem*.

O fator enzimático poderia estar implicado na degradação de desmina e troponina T e conseqüentemente na maciez final da carne. Assim, tem sido observado em carne de *Bos indicus* maior inibição das calpaínas pela calpastatina quando comparado com carne de *Bos taurus* (SHACKELFORD et al., 1991; WHEELER et al., 1990; WHIPPLE et al., 1990).

Outro fator interessante é que no pH_f anormal não houve diferenças significativas nas três transições térmicas das miofibrilas, em todos os dias *post mortem* (Tabela 4), indicando que, nessa faixa de pH_f, a degradação das miofibrilas não foi suficiente para diminuir as temperaturas máximas de desnaturação. Isto também poderia explicar a dureza do músculo no pH_f anormal, e abre a possibilidade de estudar os fatores que estabilizam as miofibrilas no aquecimento, e de utilizar DSC, método rápido, reproduzível e prático, para medir a degradação de proteínas no músculo *post mortem*.

Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a maciez da carne é superior no pH_f normal, sendo que bifes com valores de pH_f entre 5,8 e 6,2 são considerados menos macios (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES; FAROUK; YOUNG, 2014; LOMIWES et al., 2013; PULFORD et al., 2009, 2008; PURCHAS; YAN; HARTLEY, 1999; JEREMIAH; TONG; GIBSON, 1991). Para a presente pesquisa, a similaridade dos valores de força de cisalhamento entre ambas as faixas de pH_f indicam que o padrão de maciez é o mesmo, inclusive utilizando temperatura

interna de cozimento ($T_{m\acute{a}x1}$) menor que a temperatura utilizada para consumo, sugerindo a import\ancia da fra\c\ao miofibrilar na maciez final da carne. Em \u00faltima an\alise, os valores de for\ca de cisalhamento observados em ambas as faixas de pH_f podem ser influenciados pelo gado *Bos indicus*, j\aa que esta tem sido reconhecido pela produ\c\ao de carne pouco macia quando comparada com a carne de ra\cas europeias (SHACKELFORD et al., 1991; WHEELER et al., 1990; WHIPPLE et al., 1990).

As perdas de peso por cozimento referem-se \u00a0a elimina\c\ao de \u00e1gua e outros componentes da carne como as prote\u00ednas sarcoplasm\aticas durante o cozimento dos bifes, as quais foram maiores com o aumento da temperatura interna de cozimento (Figuras 16, 17 e 18). Este resultado pode ser atribu\u00eddo, principalmente, a uma maior desnatura\c\ao das miofibrilas decorrente das maiores temperaturas utilizadas. Resultados similares foram reportados por Bertola, Bevilacqua e Zaritzky (1993), Findlay, Stanley e Gullet (1986) e Martens, Stabursvik e Martens (1982). As perdas por cozimento foram similares para ambas as faixas de pH_f, sendo ligeiramente maior no pH_f normal em v\arios tempos *post mortem* (Figuras 16, 17 e 18) que pode ser devido aos valores de pH pr\u00f3ximos ao ponto isoel\u00e9trico das miofibrilas (pH 5.4). Houve uma ligeira queda nas perdas por cozimento dos bifes nos maiores dias *post mortem*, para todas as faixas de pH_f e temperaturas de cozimento, o que pode ser decorrente de perdas por purga durante o per\u00edodo de matura\c\ao.

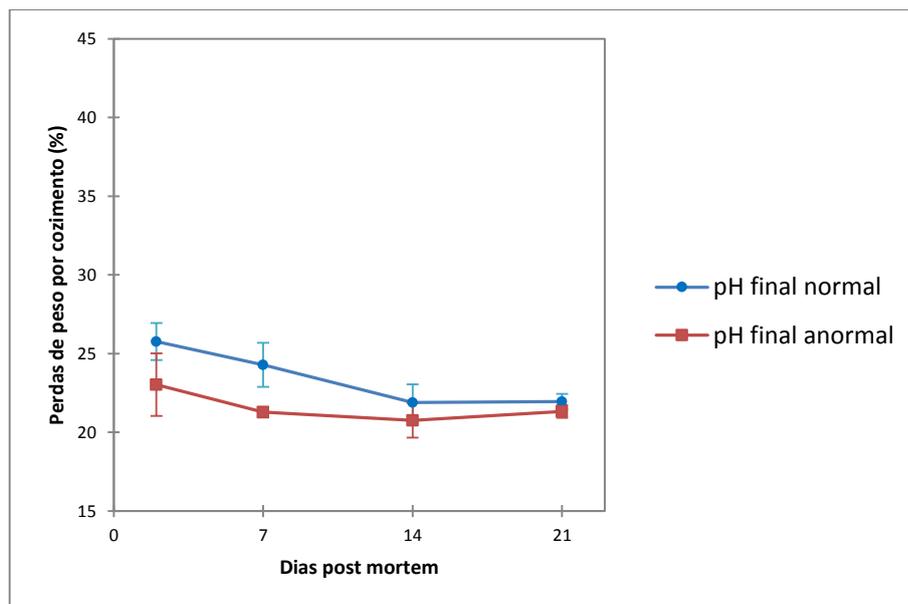


Figura 16 - Perdas de peso por cozimento do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura máxima de desnaturação da primeira transição térmica ($T_{máx1}$)

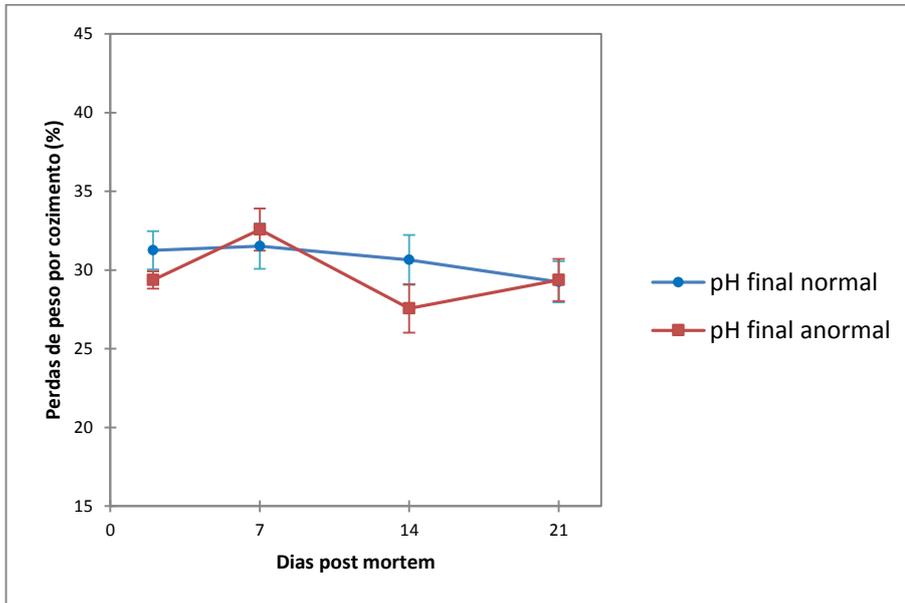


Figura 17 - Perdas de peso por cozimento do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura máxima de desnaturação da segunda transição térmica ($T_{máx2}$)

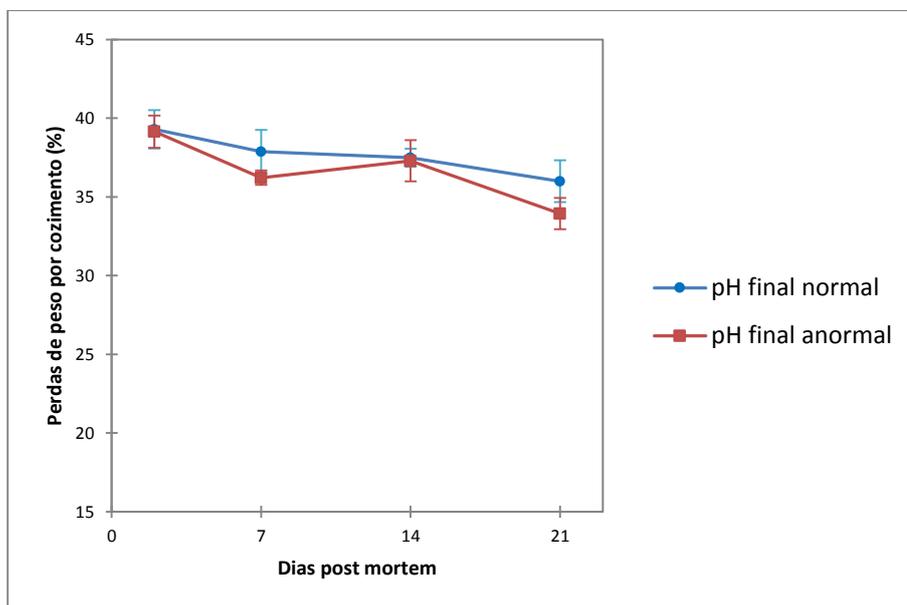


Figura 18 - Perdas de peso por cozimento do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos nas faixas de pH final normal e anormal e dias *post mortem*, cozidos à temperatura máxima de desnaturação da terceira transição térmica ($T_{máx3}$)

5 CONCLUSÕES

A presente pesquisa demonstra que a maciez do músculo *Longissimus lumborum* de animais zebuínos foi similar nas faixas de pH_f normal, com valores menores a 5,8, e anormal, com valores entre 5,8 e 6,2, mesmo quando submetidos a diferentes temperaturas internas de cozimento.

A maciez foi dependente da fração miofibrilar do músculo e não do conteúdo de colágeno, na faixa de idade estipulada dos animais utilizados.

6 IMPLICAÇÕES

A produção de carne pouco macia de *Bos indicus*, mesmo com pH_i normal, sugere a utilização de métodos para melhorar a maciez, tais como a estimulação elétrica, marinação ou outros métodos mecânicos.

A calorimetria exploratória diferencial pode ser utilizada para determinar a desnaturação térmica das proteínas da carne, e neste estudo foram deixadas hipóteses relacionadas com a degradação proteolítica *post mortem* das proteínas em função das temperaturas máximas de desnaturação. Futuros estudos devem confirmar tais hipóteses.

Desde que a carne é consumida cozida, futuros trabalhos devem estudar o comportamento térmico das proteínas da carne e a relação direta com a maciez. Nesse cenário, a desnaturação térmica e a agregação de proteínas são os processos que devem ser determinados de maneira individual para cada proteína e em forma conjunta em função da similitude das transições térmicas.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat**. Chicago, 1995. 48 p.
- ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; MANDELL, I.B.; PURSLOW, P.P. Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 2, p. 491-497, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Rebanho bovino brasileiro**, São Paulo. 2014. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 04 abr. 2016.
- BAILEY, A.J. The role of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, n. 6, p. 1580-1587, 1985.
- BEJERHOLM, C.; TØRNGREN, M.A.; AASLYNG, M.D. Cooking of meat. In: DIKEMAN, M; DEVINE, C. (Ed.). **Encyclopedia of meat sciences**. 2nd ed. Oxford: Academic Press, 2014. p. 370-376.
- 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, 1963.
- BERTAZZON, A.; TSONG, T.Y. Effects of ions and pH on the thermal stability of thin and thick filaments of skeletal muscle: high-sensitivity differential scanning calorimetric study. **Biochemistry**, Washington, v. 29, n. 27, p. 6447-6452, 1990.
- BERTOLA, N.C.; BEVILACQUA, A.E.; ZARITZKY, N.E. Heat treatment effect on texture changes and thermal denaturation of proteins in beef muscle. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 18, n. 1, p. 31-46, 1994.
- BONDOS, S.E. Methods for measuring protein aggregation. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 2, n. 2, p. 157-170, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BROWN, S.; WORSFOLD, M.; SHARP, C. Microplate assay for the measurement of hydroxyproline in acid-hydrolyzed tissue samples. **Biotechniques**, Natick, v. 30, n. 1, p. 38-41, 2001.
- CONTRERAS-CASTILLO, C.J.; LOMIWES, D.; WU, G.; FROST, D.; 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, 2016.

CROSS, H.R.; WEST, R.L.; DUTSON, T.R. Comparison of methods for measuring sarcomere length in beef *semitendinosus* muscle. **Meat Science**, Barking, v. 5, n. 4, p. 261-266, 1981.

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V. Temperature-dependent cooking toughness in beef. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 25, n. 8, p. 931-938, 1974.

DELGADO, E.F.; AGUIAR, A.P.; ORTEGA, E.M.M.; SPOTO, M.H.F.; CASTILLO, C.J.C. Brazilian consumers' perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 232-239, 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, n. 3, p. 153-156, 2008.

DUTSON, T.R.; LAWRIE, R.A. Release of lysosomal enzymes during post mortem conditioning and their relationship to tenderness. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 43-50, 1974.

FINDLAY, C.J.; STANLEY, D.W. Differential scanning calorimetry of beef muscle: influence of postmortem conditioning. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 1513-1516, 1984a.

_____. Differential scanning calorimetry of beef muscle: influence of sarcomere length. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 1529-1531, 1984b.

FINDLAY, C.J.; STANLEY, D.W.; GULLETT, E.A. Thermomechanical properties of beef muscle. **Meat Science**, Barking, v. 16, n. 1, p. 57-70, 1986.

FLICKER, P.F.; PHILLIPS JR., G.N.; COHEN, C. Troponin and its interactions with tropomyosin: an electron microscope study. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 162, n. 2, p. 495-501, 1982.

FUCHS, E.; WEBER, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 63, n. 1, p. 345-382, 1994.

GABBOTT, P. A. Practical introduction to differential scanning calorimetry. In: _____. (Ed.). **Principles and applications of thermal analysis**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. chap. 1, p. 1-50.

GRANGER, B.L.; LAZARIDES, E. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. **Cell**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 1253-1268, 1978.

HALL, J.B.; HUNT, M.C. Collagen solubility of a-maturity bovine *Longissimus* muscle as affected by nutritional regimen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 55, n. 2, p. 321-328, 1982.

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, n. 5, p. 369-375, 1994.

HO, C.Y.; STROMER, M.H.; ROUSE, G.; ROBSON, R.M. Effects of electrical stimulation and *postmortem* storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T, and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbred cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 366-376, 1997.

HUFF-LONERGAN, E. Chemistry and biochemistry of meat. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Handbook of meat processing**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. chap. 1, p. 5-24.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S.M. Biochemistry of *postmortem* muscle: lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 1, p. 184-195, 2010.

HUFF-LONERGAN, E.; MITSUHASHI, T.; BEEKMAN, D.D.; PARRISH, F.C. Jr.; OLSON, D.G.; ROBSON, R.M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 993-1008, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE**: estatística da produção pecuária, Brasília. 2015. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201502_publ_completa.pdf>. Acesso em: 21 out. 2015.

JEREMIAH, L.E.; TONG, A.K.W.; GIBSON, L.L. The usefulness of muscle color and pH for segregating beef carcasses into tenderness groups. **Meat Science**, Barking, v. 30, n. 2, p. 97-114, 1991.

JEREMIAH, L.E.; DUGAN, M.E.R.; AALHUS, J.L.; GIBSON, L.L. Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups. **Meat Science**, Barking, v. 65, n. 3, p. 1013-1019, 2003.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138.

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, 2010.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, Paris, v. 74, n. 3, p. 239-245, 1992.

_____. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, Barking, v. 43, suppl. 1, p. 193-201, 1996.

KOOLMEES, P.A.; KORTEKNIE, F.; SMULDERS, F.J.M. Accuracy and utility of sarcomere length assessment by laser diffraction. **Food Microstructure**, Chicago, v. 5, n. 1, p. 71-76, 1986.

LAHUCKY, R.; PALANSKA, O.; MOJTO, J.; ZAUJEC, K.; HUBA, J. Effect of preslaughter handling on muscle glycogen level and selected meat quality traits in beef. **Meat Science**, Barking, v. 50, n. 3, p. 389-393, 1998.

LAWRIE, R.A. **Ciencia de la carne**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1998. 367 p.

_____. The eating quality of meat. In: LAWRIE, R. A.; LEDWARD, D.A. (Ed.). **Lawrie's meat science**. 7th ed. Cambridge: Woodhead Publ., 2006. chap. 10, p. 279-341.

LEPETIT, J. Collagen contribution to meat toughness: theoretical aspects. **Meat Science**, Barking, v. 80, n. 4, p. 960-967, 2008.

LEWIS, G.J.; PURSLOW, P.P.; RICE, A.E. The effect of conditioning on the strength of perimysial connective tissue dissected from cooked meat. **Meat Science**, Barking, v. 30, n. 1, p. 1-12, 1991.

LI, C.B.; XHOU, G.H.; XU, X.L. Comparisons of meat quality characteristics and intramuscular connective tissue between beef *Longissimus dorsi* and *Semitendinosus* muscles from chinese yellow bulls. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 18, n. 2, p. 143-161, 2007.

LOMIWES, D.; FAROUK, M.M.; YOUNG, O.A. The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v. 96, n. 1, p. 646-651, 2014.

LOMIWES, D.; FAROUK, M.M.; FROST, D.A.; DOBBIE, P.M.; YOUNG, O. A. Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. **Meat Science**, Barking, v. 95, n. 3, p. 472-479, 2013.

LOMIWES, D.; REIS, M.M.; WIKLUND, E.; YOUNG, O.A.; NORTH, M. Near infrared spectroscopy as an on-line method to quantitatively determine glycogen and predict ultimate pH in pre rigor bovine M. *longissimus dorsi*. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 4, p. 999-1004, 2010.

LOMIWES, D.; HURST, S.M.; DOBBIE, P.; FROST, D.A.; HURST, R.D.; YOUNG, O.A.; FAROUK, M.M. The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins. **Meat Science**, Barking, v. 97, n. 4, p. 548-557, 2014.

MAKIN, O.S.; SERPELL, L.C. Examining the structure of the mature amyloid fibril. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 30, n. 4, p. 521-525, 2002.

MARKOV, D.I.; PIVOVAROVA, A.V.; CHERNIK, I.S.; GUSEV, N.B.; LEVITSKY, D.I. Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, n. 10, p. 1407-1412, 2008.

MARTENS, H.; STABURSVIK, E.; MARTENS, M. Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. **Journal of Texture Studies**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 291-309, 1982.

MARUYAMA, K. Connectin, an elastic protein of striated muscle. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 73-85, 1994.

McCORMICK, R.J. Structure and properties of tissues. In: KINSMAN, D.M.; KOTULA, A.W.; BREIDENSTEIN, B.C. (Ed.). **Muscle foods**. New York: Chapman & Hall, 1994. chap. 2, p. 25-62.

McELHINNY, A.S.; KAZMIERSKI, S.T.; LABEIT, S.; GREGORIO, C.C. Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 13, n. 5, p. 195-201, 2003.

McVEIGH, J.M.; TARRANT, P.V.; HARRINGTON, M.G. Behavioral stress and skeletal muscle glycogen metabolism in young bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 54, n. 4, p. 790-795, 1982.

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**, Champaign, v. 82, n. 4, p. 1195-1205, 2004.

MILLER, M.F. CARR, M.A.; RAMSEY, C.B.; CROCKETT, K.L.; HOOVER, L.C. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 12, p. 3062-3068, 2001.

MOELLER, P.W.; FIELDS, P.A.; DUTSON, T.R.; LANDMANN, W.A.; CARPENTER, Z.L. Effect of high temperature conditioning on subcellular distribution and levels of lysosomal enzymes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 41, n. 1, p. 216-217, 1976.

MORZEL, M.; TERLOUW, C.; CHAMBON, C.; MICOL, D.; PICARD, B. Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: a central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 3, p. 297-304, 2008.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef. **Meat Science**, Barking, v. 42, n. 3, p. 251-260, 1996.

_____. Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. **Meat Science**, Barking, v. 39, n. 1, p. 127-133, 1995.

NISHIMURA, T.; LIU, A.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef.

Journal of Animal Science, Champaign, v. 76, n. 2, p. 528-532, 1998.

PALKA, K. The influence of post-mortem ageing and roasting on the microstructure, texture and collagen solubility of bovine *semitendinosus* muscle. **Meat Science**, Barking, v. 64, n. 2, p. 191-198, 2003.

PIVOVAROVA, A.V.; MIKHAILOVA, V.V.; CHERNIK, I.S.; CHEBOTAREVA, N.A.; LEVITSKY, D.I.; GUSEV, N.B. Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 331, n. 4, p. 1548-1553, 2005.

PLATTER, W.J.; TATUM, J.D.; BELK, K.E.; CHAPMAN, P.L.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef strip loin steaks. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 11, p. 2741-2750, 2003.

POSPIECH, E.; GREASER, M.L.; MIKOLAJCZAK, B.; CHIANG, W.; KRZYWDZINSKA, M. Thermal properties of titin from porcine and bovine muscles. **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 2, p. 187-192, 2002.

PROMEYRAT, A.; GATIELLER, P.; LEBRET, B.; KAJAK-SIEMASZKO, K.; SANTÉ-LHOUELIER, V. Evaluation of protein aggregation in cooked meat. **Food Chemistry**, Easton, v. 121, n. 2, p. 412-417, 2010a.

PROMEYRAT, A.; BAX, M.L.; TRAORÉ, S.; AUBRY, L.; SANTÉ-LHOUELIER, V.; GATIELLER, P. Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature. **Meat Science**, Barking, v. 85, n. 4, p. 625-631, 2010b.

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, n. 1, p. 1-9, 2009.

PULFORD, D.J.; FRAGA VAZQUEZ, S.; FROST, D.F.; FRASER-SMITH, E.; DOBBIE, P.; ROSENVOLD, K. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 4, p. 623-630, 2008.

PURCHAS, R.W.; YAN, X.; HARTLEY, D.G. The influence of a period of ageing on the relationship between ultimate pH and shear values of beef m. *longissimus thoracis*. **Meat Science**, Barking, v. 51, n. 2, p. 135-141, 1999.

PURSLOW, P.P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 133, n. 4, p. 947-966, 2002.

_____. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 3, p. 435-447, 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**, Champaign, v. 43, n. 6, p. 1198-1205, 1976.

RICHARDSON, F.L.; STROMER, M.H.; HUIATT, T.W.; ROBSON, R.M. Immunoelectron and immunofluorescence localization of desmin in mature avian muscles. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 26, n. 1, p. 91-101, 1981.

RILEY, D.G.; JOHNSON, D.D.; CHASE, C.C. Jr.; WEST, R.L.; COLEMAN, S.W.; OLSON, T.A.; HAMMOND, A.C. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 2, p. 347-356, 2005.

ROBE, G.H.; XIONG, Y.L. Kinetic studies of the effect of muscle fiber type and tripolyphosphate on the aggregation of porcine salt-soluble proteins. **Meat Science**, Barking, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1994.

SANTÉ-LHOUELIER, V.; ASTRUC, T.; MARINOVA, P.; GREVE, E.; GATELLIER, P. Effect of meat cooking on physicochemical state and *in vitro* digestibility of myofibrillar proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 4, p. 1488-1494, 2008.

SEIDEMAN, S.C.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J.D. Factors associated with tenderness in young beef. **Meat Science**, Barking, v. 20, n. 4, p. 281-291, 1987.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. An evaluation of tenderness of the *longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 171-177, 1991.

STABURSVIK, E.; MARTENS, H. Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 31, n. 10, p. 1034-1042, 1980.

STANTON, C.; LIGHT, N. The effects of conditioning on meat collagen: part 1: evidence for gross *in situ* proteolysis. **Meat Science**, Barking, v. 21, n. 4, p. 249-265, 1987.

STOLOWSKI, 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, n. 3, p. 475-483, 2006.

TAYLOR, R.G.; GEESINK, G.H.; THOMPSON, V.F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL, D.E. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1351-1367, 1995.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins? implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 3, p. 493-508, 2005.

TORRESCANO, G.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; GIMÉNEZ, B.; RONCALÉS, 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, n. 1, p. 85-91, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, Washington, 2015. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 21 out. 2015.

VEGA-WARNER, V.; MERKEL, R.A.; SMITH, D.M. Composition, solubility and gel properties of salt soluble proteins from two bovine muscle types. **Meat Science**, Barking, v. 51, n. 3, p. 197-203, 1999.

VERBEKEN, D.; NEIRINCK, N.; MEEREN, P. van der; DEWETTINCK, K. Influence of κ -carrageenan on the thermal gelation of salt-soluble meat proteins. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 1, p. 161-166, 2005.

VILJOEN, H.F.; DE KOCK, H.L.; WEBB, E.C. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. **Meat Science**, Barking, v. 61, n. 2, p. 181-185, 2002.

WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROSS, H.R.; LUNT, D.K.; SMITH, S.B. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 4206-4220, 1990.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 11, p. 2716-2728, 1991.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect *longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2716-2728, 1990.

WRIGHT, D.J.; WILDING, P. Differential scanning calorimetric study of muscle and its proteins: myosin and its subfragments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 35, n. 3, p. 357-372, 1984.

WRIGHT, D.J.; LEACH, I.B.; WILDING, P. Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, n. 6, p. 557-564, 1977.

XIONG, Y.L. Muscle proteins. In: YADA, R.Y. (Ed.). **Proteins in food processing**. Woodhead Publ., 2004. chap. 5, p. 100-121.

XIONG, Y.L.; BREKKE, C.J. Physicochemical and gelation properties of pre- and postrigor chicken salt-soluble proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1544-1548, 1990.

YASUI, T.; ISHIOROSHI, M.; SAMEJIMA, K. Effect of actomyosin on heat-induced gelation of myosin. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 46, n. 4, p. 1049-1059, 1982.

YOUNG, O.A.; WEST, J.; HART, A.L.; OTTERDIJK, F.F. van. A method for early determination of meat ultimate pH. **Meat Science**, Barking, v. 66, n. 2, p. 493-498, 2004.