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

**Estabilidade da cor de músculos *Longissimus lumborum* de
bovinos machos inteiros injetados com lactato embalados em
atmosfera modificada**

Kathelyn Araújo Guimarães

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

**Piracicaba
2015**

Kathelyn Araújo Guimarães
Médica Veterinária

**Estabilidade da cor de músculos *Longissimus lumborum* de bovinos machos
inteiros injetados com lactato embalados em atmosfera modificada**

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
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

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

Guimarães, Kathelyn Araújo

Estabilidade da cor de músculos *Longissimus lumborum* de bovinos machos inteiros injetados com lactato embalados em atmosfera modificada / Kathelyn Araújo Guimarães. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015. 66 p. : il.

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

1. Nelore cruzado 2. *Bos indicus* 3. Lactato de potássio 4. Alto oxigênio 5. pH da carne
6. Aumento da vida útil I. Título

CDD 636.291
G963e

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

*Dedico este trabalho à minha linda e
amada família, principalmente aos meus
pais, ao meu irmão e à minha avó.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e principalmente agradeço a Deus, pois sem Ele nada sou e tudo o que conquistei até hoje sei que foi por Tuas mãos, a Ti meu eterno amor e minha gratidão.

Aos meus pais, Maria Elizabeth Gomes Araújo Guimarães e Luiz Cezar Guimarães, por todo amor e carinho que me deram durante toda a vida e por serem meu esteio, mesmo à distância.

Ao meu irmão, Luiz Cezar Guimarães Júnior, por me apoiar em minhas decisões, por ser meu ombro amigo e aquele com quem sei que posso contar sempre.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pelas portas abertas, pela grande contribuição na minha formação e por possibilitarem a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudos e por possibilitar a realização deste trabalho.

À minha querida orientadora, professora Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo, minha grande gratidão pela grande oportunidade, pela orientação, conselhos, pró-atividade, aprendizado, incentivo, dedicação, confiança, paciência e amizade. Sem isto, seria impossível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Melvin C. Hunt, pela paciência, bom humor e gentileza com que nos ajudou a elaborar o esboço do projeto, por ter aceitado a nossa parceria e por ter recebido um dos alunos da nossa equipe tão bem no Kansas.

Ao Prof. Cláudio Rosa Gallo e sua equipe, Rosalina e Cleomar, pela ajuda nas análises microbiológicas.

Ao Dr. Tiago Zanett Albertini, pelos ensinamentos, paciência, amizade e auxílio nas análises estatísticas.

À toda equipe do frigorífico Minerva Foods (planta de Barretos-SP), principalmente ao Jhonatas Moraes, por todo apoio, paciência, serenidade, e por fazer com que a coleta dos materiais para este trabalho fosse muito mais divertida e eficiente.

À Cryovac do Brasil Ltda., principalmente ao Claudino Mendes por possibilitarem a realização deste trabalho por meio da doação das embalagens necessárias.

À Purac, principalmente ao Paulo Sakamoto, por ter nos doado tão gentilmente o lactato de potássio utilizado neste trabalho.

À Multisorb, pela parceria, doação de materiais e empréstimo de equipamentos, além de possibilitar um grande aprendizado com os experimentos em conjunto durante o mestrado.

Ao meu namorado, Vinicius Lelis Giglio, pelo amor, carinho, confiança e parceria, por fazer a minha vida mais alegre em Piracicaba e por ter me feito uma pessoa muito mais forte.

À toda equipe do Laboratório de Qualidade e Processamento de Carnes, ao Felipe Ribeiro e à Amanda Martin, pelo auxílio na coleta da matéria prima. Ao Caio, pela ajuda em análises e durante todo o período experimental. À minha querida Favela: Dario, Erick, Bruna de Neve, Bia, Tião e Mima, por toda ajuda, companheirismo, risadas, por tornarem minha vida muito mais divertida enquanto trabalhava.

Aos amigos em Piracicaba, principalmente à Veridiana, por ser minha parceira pra todos os momentos, sejam eles tristes ou felizes. Ao Daniel, por todos os conselhos, risadas, paciência e carinho. Ao Tião, por me mostrar que podemos encontrar um irmão mesmo fora de casa. À Mima por todo auxílio pessoal, profissional, pelos conselhos, paciência, parceria, amizade e carinho com que sempre me tratou. Vocês me acolheram no momento em que eu mais precisei e agradeço muito a Deus por tê-los colocado em meu caminho.

Ao pessoal da Casinha, principalmente à Rafa, pela amizade, carinho e disposição em qualquer momento que precisei; à Glau, pela sua alegria, amizade e confiança; ao Marcos, por ser o homem da casa, sempre nos ajudando e cuidando da gente; à Dako, pela parceria e amizade em vários momentos.

Aos meus amigos e família em Campo Grande e em São Paulo. Principalmente à Carlinha, à Xu e à Katê, por se fazerem sempre presentes, por rezarem sempre por mim e me mostrarem que a distância não significa nada quando a amizade é verdadeira. À minha prima, melhor amiga e irmã, Ariane, por estar sempre de braços abertos para me acolher, escutar, aconselhar, chorar comigo e tudo mais o que eu poderia precisar, você é um anjo na minha vida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, principalmente ao Fábio, pela amizade, grande ajuda (“salvando” minha vida mais de uma vez) e conselhos; à Ana, pela amizade e disposição; à Mariana,

pela ajuda, amizade, alegria, parceria, conselhos e conversas durante todo o período de mestrado; à Regina, pela serenidade, simpatia, calma, ajuda e por trazer a palavra de Deus para minha vida em vários momentos.

Ao Cursilho de Campo Grande, pela base que me permitiu ficar distante e a ser mais forte em Deus; ao grupo Deus Pai e Deus Filho, por toda confiança, partilha e amizade; aos Vicentinos de Piracicaba, pela ajuda, carinho e por me receberem sempre de braços abertos; ao Padre Edinaldo pela amizade e conselhos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se realizasse e concretizasse.

Meus mais sinceros agradecimentos.

“Sejam alegres na esperança, pacientes na tribulação e perseverantes na oração.”

Rm 12, 12.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Cor da carne	21
2.2 pH da carne	23
2.3 Formas de mioglobina na carne fresca.....	24
2.4 Atividade redutora da metamioglobina.....	25
2.5 Taxa de consumo de oxigênio	26
2.6 Embalagens em atmosfera modificada.....	27
2.7 Lactato de potássio.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Matéria prima e processamento.....	31
3.2 Embalagem.....	34
3.3 Condições do expositor refrigerado	36
3.4 Composição gasosa	36
3.5 pH	36
3.6 Composição centesimal.....	37
3.7 Sensorial de odor.....	37
3.8 Avaliação microbiológica	37
3.9 Cor instrumental.....	38
3.10 Oxidação lipídica.....	38
3.11 Análises estatísticas	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Composição gasosa	41
4.2 pH	43
4.3 Composição centesimal.....	44
4.4 Sensorial de odor.....	45
4.5 Avaliação microbiológica	46
4.6 Cor instrumental.....	47
4.7 Pigmentos cárneos	52
4.8 Oxidação lipídica.....	54

5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Estabilidade da cor de músculos *Longissimus lumborum* de bovinos machos inteiros injetados com lactato embalados em atmosfera modificada

O efeito da injeção do lactato de potássio associado ao uso de atmosfera modificada com alto oxigênio sobre músculos *Longissimus lumborum* de bovinos machos inteiros foi avaliado. Foram utilizados animais anelorados (com características fenotípicas de Nelore) com diferentes faixas de pH final (pH_f – 48h *post mortem*). Foram coletados 18 músculos e divididos em 3 grupos, sendo eles: baixo (controle; $5,4 < \text{pH}_f < 5,8$), intermediário ($5,81 < \text{pH}_f < 6,3$) e alto ($\text{pH}_f > 6,3$). Na primeira etapa, foi injetada em cada músculo uma solução de lactato de potássio a 2,5%, em seguida foram cortados em bifes, embalados em atmosfera modificada contendo 80% de oxigênio e 20% de gás carbônico e estocados no escuro a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias. Posteriormente, estes seguiram para um expositor refrigerado com iluminação e temperatura controlada ($2 \pm 1^\circ\text{C}$), onde permaneceram por 9 dias, completando 14 dias de vida útil. Análises de composição gasosa, pH, composição centesimal, sensorial de odor, avaliação microbiológica, oxidação lipídica e cor instrumental foram realizadas nos dias: 0, 5, 8, 11 e 14. Os resultados estatísticos obtidos foram analisados pelo método de medidas repetidas no tempo e também utilizando análise não-paramétrica. A oxidação lipídica foi menor ($P < 0,05$) e apresentou maior estabilidade em músculos com pH_f alto. Não houveram diferenças ($P > 0,05$) na análise sensorial de odor entre os grupos. A contagem microbiana permaneceu dentro dos limites aceitáveis para consumo humano. Os grupos de pH_f intermediário e alto apresentaram uma maior ($P < 0,05$) estabilidade da cor (maiores valores de a^* , croma e oximioglobina). Nas condições do presente estudo, a injeção do lactato de potássio associada à atmosfera com alto oxigênio atuou benéficamente na estabilidade da cor e vida útil de músculos de pH_f intermediário e alto. Pode-se concluir que a injeção desta solução é uma alternativa viável para tornar a aparência de bifes provenientes de músculos *L. lumborum* mais atrativa para o consumidor por meio da estabilização da cor, sem prejudicar a vida útil mesmo nas condições de embalagem utilizadas.

Palavras-chave: Nelore cruzado; *Bos indicus*; Lactato de potássio; Alto oxigênio, pH da carne; Aumento da vida útil

ABSTRACT

Color stability of *Longissimus lumborum* muscles from bulls enhanced with lactate packaged in modified atmosphere

The effect of potassium lactate enhancement in a high oxygen modified packaging on bulls' *Longissimus lumborum* was studied. Zebu animals (with phenotypic characteristics of Nellore) animals with different range of ultimate pH (pH_u - 48h *post mortem*) were used. Eighteen muscles were collected and segregated into three groups, which were: low (control; $5.4 < pH_u < 5.8$), intermediate ($5.81 < pH_u < 6.3$) and high ($pH_u > 6.3$). In the first stage, a 2.5% potassium lactate solution was injected into each muscle, then they were cut into steaks, packaged in a modified atmosphere containing 80% oxygen and 20% carbon dioxide and stored in the dark at $2 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 days. Later, they were displayed with light and controlled temperature ($2 \pm 1^\circ\text{C}$), where remained for 9 days, completing 14 days of shelf life. Gas composition, pH, proximate analysis, odor sensory, microbiological evaluation, lipid oxidation and instrumental color analysis were performed on days: 0, 5, 8, 11 and 14. The statistical results were analyzed by the method of repeated measurements over time and also using non-parametric analysis. The lipid oxidation decreased ($P < 0.05$) and showed greater stability on high pH_u treatment. There were no differences ($P > 0.05$) between the treatments on odor sensory analysis. Microbial counts remained within acceptable limits for human consumption. The intermediate and high pH_u groups had a higher ($P < 0.05$) color stability (higher values of a^* , chroma and oxymyoglobin). Under the conditions of this study, the potassium lactate enhancement associated with high oxygen atmosphere (Hi-Ox MAP) can be an alternative to increase color stability and shelf life of intermediate and high pH_u muscles. It can be concluded that the injection of this solution is a viable alternative to make *L. lumborum* steaks appearance more attractive to the consumer through the color stabilization, without sacrificing shelf life even under packaging conditions used.

Keywords: Nellore-crossbred; *Bos indicus*; Potassium lactate; High oxygen; Meat pH; Increase of shelf-life

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente como produtor e maior exportador mundial de carne bovina (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2014). Apenas no 1º trimestre de 2014, foram abatidas 8,367 milhões de cabeças em todo o país em frigoríficos sob inspeção sanitária. Estados como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás lideram os abates (38,9% do abate nacional), o que correspondeu a aproximadamente 2,0 milhões de toneladas neste período (INSITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014). A previsão é que em outubro de 2015 a produção exceda 10 milhões de toneladas em equivalente peso de carcaça (USDA, 2014).

Atualmente, não existem dados acurados sobre a quantidade de animais abatidos anualmente de acordo com a sua categoria animal (fêmeas, machos inteiros ou castrados). Diversos fatores contribuem com esta inadequada estimativa, tais como a extensão territorial, a falta de rastreabilidade das fazendas de bovinos de corte e frigoríficos, entre outros.

O IBGE (2014) divulgou uma estimativa que no primeiro trimestre de 2014, do número total de abates informados, 53,1% dos animais eram machos e 46,9% fêmeas. Este alto percentual de fêmeas se deve ao fato de que o primeiro trimestre é caracterizado por um maior número de descarte de matrizes improdutivas, enquanto isso os machos esperam a engorda. Apesar desta falta precisão nas informações, está crescendo no país o número de touros abatidos anualmente.

Nos últimos anos, o número de touros abatidos vem crescendo no Brasil. Entretanto, esses animais apresentam uma grande incidência de músculos com pH final (pH_f) considerado intermediário (entre 5,8 e 6,3) e alto (acima de 6,3; PULFORD et al., 2008).

As carnes de pH_f alto tem uma maior probabilidade de serem consideradas macias, porém possuem sabor inferior (sabor de velho) quando comparada à carne de pH_f normal (baixo) (VILJOEN; KOCK; WEBB, 2002) e são mais susceptíveis à degradação microbiana (SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999). Em músculos com pH_f intermediário, a maciez da carne é inconsistente, com uma proporção significativa considerada como dura (PULFORD et al., 2008), provavelmente pelo nível de atividade proteolítica *post mortem* ser mínimo nesta faixa de pH_f (YU; LEE, 1986).

Inseridas neste contexto, as indústrias produtoras e processadoras de carnes e derivados têm tido interesse crescente no âmbito do desenvolvimento de tecnologias que permitam estender a vida útil de seus produtos, melhorando a aceitação dos consumidores, mantendo sua qualidade nutricional e assegurando a inocuidade do alimento produzido (CHIAVARO et al., 2008). Atualmente, diversas alternativas visam essa extensão, no entanto, devido ao aumento na demanda de produtos minimamente processados por parte dos consumidores, o uso de embalagens em Atmosfera Modificada (AM) tem se tornado uma alternativa bastante atrativa (PARAMITHIOTIS; SKANDAMIS; NYCHAS, 2009).

Nos Estados Unidos, a adição do lactato como ingrediente não cárneo em carnes *in natura* é amplamente utilizada com o objetivo de que este aditivo aja como antimicrobiano, além de atuar como estabilizante da cor na carne fresca (LAWRENCE et al., 2003).

Estudos recentes apresentaram que a adição do lactato promoveu a manutenção do ferro da mioglobina (Mb) na forma reduzida (MANCINI; HUNT, 2005; KIM et al., 2006; MANCINI; RAMANATHAN, 2008), aumentou a vida útil do produto por inibir o crescimento bacteriano (BREWER et al., 1995) e minimizou a descoloração e desenvolvimento de sabor desagradável causado pela oxidação de lipídios e da Mb (KIM et al., 2010a).

A cor da Mb e, conseqüentemente, a cor da carne, pode influenciar na decisão de compra do consumidor. Apesar deste parâmetro não ser considerado uma referência segura quanto à qualidade do produto, o comprador tem uma tendência a dar preferência para a cor vermelho-brilhante da carne fresca. Conseqüentemente, o consumidor tende a rejeitar a coloração marrom durante a sua aquisição por considerar esta carne de qualidade inferior (KIM; HUNT, 2011).

Portanto, as indústrias e os varejistas têm buscado constantemente prolongar a cor vermelho-brilhante do músculo, tendo em mente que a cor e a estabilidade da cor da carne são influenciados por muitos fatores intrínsecos e reações bioquímicas que ocorrem no período *post mortem*. Além disso, alguns fatores extrínsecos (Ex.: composição gasosa e temperatura) e condições de processamento também têm impacto sobre a cor da carne e a cor durante a sua exposição na prateleira (KIM; HUNT, 2011).

Ao final deste trabalho espera-se obter dados que enriqueçam a base de informações sobre a carne bovina *in natura* produzida no Brasil, já que é um

mercado de alto impacto no setor interno e de exportação mundial. Além disso, busca-se aumentar a estabilidade da cor e a vida útil de bifes de *L. lumbarum* de diferentes faixas de pH_f de bovinos machos inteiros anelados por meio da injeção de uma solução de lactato de potássio associada ao uso de AM com alto O₂, uma vez que, devido ao grande desafio implicado no uso desta atmosfera, um resultado positivo neste tipo de embalagem pode viabilizar seu uso em diversas outras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cor da carne

A cor da carne é indicada como o fator mais importante de qualidade, que influencia na decisão de compra do consumidor, uma vez que a avaliação visual é o único método para estimar a qualidade da carne que os consumidores podem fazer antes de adquirir o produto (SUMAN et al., 2011). A descoloração em cortes cárneos é responsável por uma perda anual de mais de US\$ 1 bilhão para a indústria de carnes nos Estados Unidos, pois produtos com descoloração geralmente são destinados ao processamento em carne moída ou, quando a extensão do defeito é muito grande, são destinados ao descarte. Entre os cientistas de alimentos, há um consenso de que cortes cárneos frescos perdem sua “cor desejável” antes de se tornarem, de fato, impróprios para consumo, do ponto de vista microbiológico (SMITH et al., 2000).

A cor da carne que os consumidores assumem como desejável varia de acordo com a espécie animal. No caso de carne bovina, o considerado desejável é uma coloração vermelho-brilhante (BEKHIT; FAUSTMAN, 2005). Existem dois fatores intrínsecos que são descritos como os principais determinantes da cor do produto: a concentração e o estado de oxidação e oxigenação dos pigmentos heme, Mb e hemoglobina (Hb), e a micro-estrutura do músculo (VENTURINI, 2003). Com relação aos pigmentos, a coloração da carne é principalmente influenciada pela concentração de Mb no músculo (KIM; HUNT, 2011).

A Mb é uma proteína (Figura 1) com um único polipeptídeo, chamado globina e um grupo prostético, chamado heme. O grupo heme é composto por um átomo central de ferro, localizado no centro de um anel porfirínico, que pode formar seis ligações. Quatro delas são formadas com os anéis pirrólicos em um mesmo plano, enquanto os outros dois sítios de ligações estão em um plano perpendicular a este. A quinta ligação é formada com a histidina, que liga o grupo heme à molécula globina. Já o sexto sítio de ligação é um local livre, que pode formar ligações com vários compostos, como: oxigênio (O₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), água e óxido nítrico (NO). Essa variedade de possibilidade de ligações na sexta posição é responsável pelas diferenças que observamos na coloração da carne. Além disso, a globina é uma proteína que protege o ferro do grupo heme da oxidação, portanto, a desnaturação de parte da globina, devido a

Além disso, a concentração de Mb de um músculo varia de acordo com a espécie animal e é afetada também por fatores como sexo, idade, dieta, além de fatores genéticos e ambientais (LIVINGSTON; BROWN, 1981). Geralmente, animais com maior atividade física apresentam teores mais altos de Mb. O tipo de fibra muscular presente também influencia nas diferenças de cor que existem entre músculos diferentes do mesmo animal, explicando também a diferença na coloração entre as diferentes espécies animais (VENTURINI, 2003). Músculo vermelho (fibras de contração lenta) tem maior atividade metabólica oxidativa, portanto, tem uma concentração de Mb mais alta quando comparado com as fibras brancas (contração rápida, metabolismo glicolítico; RUUSUNEN; PUOLANNE, 2004). Animais machos tendem a ter maior concentração de Mb e carne mais escura que as fêmeas, além disso, a carne de animais castrados tem uma coloração mais clara do que de animais inteiros. À medida que os animais envelhecem, a quantidade de Mb aumenta, no entanto a afinidade do O₂ pela molécula diminui, portanto, eles precisam sintetizar mais Mb para estocar o O₂. Isso explica porque a carne de animais mais velhos aparece mais escura do que a de animais mais jovens (KIM; HUNT, 2011).

2.2 pH da carne

O declínio do pH e o pH_f no músculo *post mortem* têm grande influência em muitos atributos da qualidade da carne como: cor, CRA, maciez, solubilidade das proteínas e taxa ou extensão do crescimento microbiano. As carnes de pH_f baixo (5,4 a 5,8) geralmente aparecem com coloração vermelho-brilhante, o que é atrativo para os consumidores. No entanto, o pH mais baixo faz com que ocorra desnaturação na molécula globina (desestabilização da ligação heme-proteína) resultando em aceleração na oxidação da Mb e, conseqüentemente, reduzindo a estabilidade da cor da carne (LIVINGSTON; BROWN, 1981).

Quando os animais sofrem estresse físico antes do abate ocorre depleção do glicogênio muscular, o que limita o metabolismo no músculo *post mortem*, impedindo que este alcance um pH_f menor do que 6,0, podendo resultar em carne de coloração escura. Esta carne é indesejável pois acaba perdendo a aparência apelativa ao consumidor (vermelho-brilhante) e também, devido ao seu alto pH,

permite o crescimento de bactérias deteriorantes, levando à redução da vida útil (HOLDSTOCK et al., 2014).

Em um estudo conduzido por Ledward et al. (1985) foi concluído que um músculo com pH_f maior que 5,8 tem maior estabilidade na cor do que uma carne com um pH_f de 5,6. Carnes com pH_f alto ($> 6,2$) aparecem com uma coloração vermelha-púrpura mais escura, o que é justificado pelo fato desta carne possuir maior CRA, que causa redução na passagem da luz pela microestrutura do músculo, dando à carne aparência mais escura. Além disso, o músculo com esse pH_f tem a atividade mitocondrial acelerada, o que também ajuda a resultar na coloração descrita acima (KIM; HUNT, 2011).

2.3 Formas de mioglobina na carne fresca

Três formas primárias da Mb podem ser encontradas na carne vermelha fresca: deoximioglobina, oximioglobina e metamioglobina, dependendo da natureza da ligação no sexto sítio da porção heme e do estado de oxidação do átomo de ferro na matriz heme (KIM; HUNT, 2011).

A deoximioglobina (DeoxiMb) é um pigmento natural da carne que contém o ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). Tem uma coloração vermelho púrpura, típica de carnes a vácuo (RENERRE, 1990). Requer níveis de O_2 muito baixos para se formar (inferior a 1,4 mm Hg). Esses baixos níveis deste gás são difíceis de obter e manter durante o processamento e distribuição da carne, já que equivale a menos de 2.000 ppm de O_2 , o que significa 0,2% de O_2 em uma embalagem a vácuo (KIM; HUNT, 2011).

A oximioglobina (OxiMb) é um pigmento que se forma quando há ligação do O_2 ao sexto ligante do grupo heme, oxigenando a DeoxiMb, formando um pigmento de cor vermelho-brilhante. O estado do ferro permanece ferroso (Fe^{2+}). Além disso, a histidina interage com o O_2 ligado resultando na alteração da estrutura e estabilidade da Mb. Essa oxigenação, chamada de *blooming* pela indústria cárnea, é facilitada em baixas temperaturas e ocorre em cerca de 30 minutos após a exposição ao ar a uma pressão parcial de O_2 maior que 25 mm Hg. A profundidade da penetração do O_2 e a espessura da camada de OxiMb dependem de fatores extrínsecos como: condições de estocagem, temperatura, pressão do O_2 e de fatores intrínsecos como: pH e competição por O_2 devido a outros processos respiratórios (KIM; HUNT, 2011).

Sob baixa pressão de O_2 (1,4 e 25 mm Hg), há uma rápida oxidação do íon ferroso à forma férrica (Fe^{3+}), resultando na formação de metamioglobina (MetaMb; MANCINI; HUNT, 2005). Neste pigmento, o sexto ligante está covalentemente ligado a uma molécula de água e apresenta coloração marrom (KIM; HUNT, 2011). É o maior responsável pela descoloração da carne, discriminação ou rejeição do produto por parte do consumidor, que associa a coloração à falta de frescor e salubridade (TROY; KERRY, 2010). O início visual da descoloração para a cor marrom ocorre quando pelo menos 60% da DeoxiMb ou OxiMb da superfície do músculo se oxida para MetaMb (LAWRIE, 1966). Quando há baixa tensão de O_2 na carne, a MetaMb forma uma terceira camada entre as camadas de OxiMb e DeoxiMb. Esta camada intermediária se torna mais grossa e cresce em direção à superfície da carne, enquanto a camada de OxiMb fica cada vez mais fina. Sob condições normais de estocagem em supermercado, a carne geralmente contém uma grande variedade de pressões parciais de O_2 e, portanto, é uma mistura de DeoxiMb, OxiMb e MetaMb (KIM; HUNT, 2011).

2.4 Atividade redutora da metamioglobina

O músculo está constantemente reduzindo e consumindo O_2 (MANCINI; HUNT, 2005), no entanto, tem uma capacidade limitada de converter o ferro no estado oxidado (férrico, Fe^{+3}) para o estado reduzido (ferroso, Fe^{+2}), o que é feito por meio de sua atividade redutora endógena conhecida como Atividade Redutora de Metamioglobina (ARM). A ARM é responsável pela conversão da MetaMb para a DeoxiMb, a qual pode ser reoxigenada para formar a OxiMb, resultando em uma coloração mais atraente. Isto influencia positivamente na decisão de compra do consumidor (KIM et al., 2006), no entanto, a ARM diminui à medida que o tempo de estocagem aumenta, diminuindo, conseqüentemente, a estabilidade da cor do músculo (KIM; HUNT, 2011).

Ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre o papel da ARM na manutenção da cor da carne. Enquanto alguns sustentam a hipótese de que a ARM é um dos principais fatores que influencia na estabilidade da cor do músculo (LEDWARD, 1985; REDDY; CARPENTER, 1991), outros afirmam que não há correlação entre eles (RENERRE; LABAS, 1987; ECHEVARNE; RENERRE; LABAS,

1990). Esse conflito entre os estudos se deve provavelmente a falta de uniformidade nas metodologias para mensuração da ARM (SAMMEL et al., 2002).

O que é amplamente aceito no meio científico é que a redução da MetaMb ocorre primariamente por meio de uma reação enzimática, utilizando o NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) como coenzima no músculo (KIM; HUNT, 2011). A MetaMb pode ser convertida, enzimática ou não enzimaticamente, na presença de NADH em DeoxiMb ou OxiMb (BEKHIT; FAUSTMAN, 2005). A falta do NADH atua como fator limitante da ARM e, conseqüentemente, da estabilidade da cor da carne (BEKHIT et al, 2003).

Um estudo conduzido por O'Keefe e Hood (1982) comparou o músculo *Psoas major*, conhecido por ter menor quantidade de Mb e o *Longissimus dorsi*, que possui maior quantidade de Mb, e concluíram que músculos com maior pigmentação têm uma maior ARM. Além disso, Levy et al. (1985) propuseram que a mitocôndria é o local mais provável para que aconteça a redução da MetaMb pois, próximo a essa estrutura a tensão de O₂ é mais baixa, o que favorece a oxidação da Mb, além disso, a mitocôndria funciona como uma fonte de energia para a redução da MetaMb no músculo.

O fato é que a exaustão da ARM faz com que o músculo fique marrom, finalizando a viabilidade do produto para o consumidor, antes mesmo das bactérias causarem de fato uma deterioração na carne (SMITH et al., 1995).

2.5 Taxa de consumo de oxigênio

A estabilidade da cor da carne pode ser influenciada pela quantidade de mitocôndrias presentes no tecido muscular e pela Taxa de Consumo de Oxigênio (TCO; LANARI; CASSENS, 1991). Esta última, é considerada um fator determinante da cor, tendo um papel muito importante na descoloração da carne (TANG et al., 2005). Músculos com menor estabilidade da cor têm maior densidade de mitocôndrias e maior TCO quando comparados a músculos de maior estabilidade da cor (LANARI; CASSENS, 1991).

A atividade mitocondrial também aumenta em altas temperaturas de estocagem e altos valores de pH (pH > 6,6; ASHMORE; PARKER; DOERR, 1972). Nestas situações, as enzimas respiratórias utilizam mais O₂, limitando a penetração e difusão deste no músculo. Conseqüentemente, músculos que possuem uma fina camada de OxiMb na superfície apresentam coloração mais escura, devido ao

aparecimento da DeoxiMb que estava embaixo da camada superficial da carne (KROPF, 1993).

Quando aumentamos a profundidade da penetração de O_2 no músculo, a camada de OxiMb permanece por um tempo mais prolongado, o que retém a camada de MetaMb abaixo da superfície, deixando a carne com uma coloração mais atraente. Esta profundidade de penetração do O_2 é altamente dependente da pressão parcial de O_2 na superfície, da difusão do O_2 e da TCO (O'KEEFE; HOOD, 1982).

2.6 Embalagens em atmosfera modificada

As embalagens com Atmosfera Modificada (AM) são um tipo de embalagem onde é feita a remoção e alteração da atmosfera ao redor do produto antes que esta seja selada. A embalagem a vácuo é um tipo de AM, onde o produto é embalado por material impermeável e passa por remoção do ar ao redor do produto antes de ser selado. Além disso, pode ser feita também alteração da atmosfera, removendo-se o ar por meio da aplicação de vácuo e insuflando uma mistura gasosa de eleição antes da selagem do invólucro. Os gases mais utilizados para esta mistura são: O_2 , CO_2 , nitrogênio (N_2) e CO. Esses gases estabilizam a cor da Mb, tem efeito bacteriostático (CO_2) ou servem apenas para enchimento (MCMILLIN, 2008).

Um tipo de AM que tem sido amplamente utilizada emprega uma atmosfera com alto O_2 (70-80%) combinado com CO_2 (30-20%), o que resulta em uma camada mais grossa de OxiMb na superfície da carne, prolongando a cor vermelho-cereja brilhante durante a vida útil (4-10 dias, enquanto nas embalagens em bandejas de poliestireno expandido envoltas com filme de PVC essa cor se mantém por horas ou, no máximo, alguns dias) (KIM; HUNT, 2011), sendo que, do ponto de vista sensorial, é o tipo de AM que mais atrai o consumidor (O'SULLIVAN et al., 2015). Esses níveis elevados de O_2 também ajudam a diminuir ou suprimir o crescimento de bactérias anaeróbicas, enquanto o CO_2 também suprime um grande número de micro-organismos, principalmente bactérias gram-negativas, as quais costumam crescer rapidamente na carne *in natura*. No entanto, essa atmosfera tem algumas desvantagens como indução de oxidação lipídica, o que causa alguns defeitos de qualidade como desenvolvimento de *off-flavour*, descoloração mais rápida durante a exposição na prateleira causada pela oxidação lipídica e da Mb e diminuição na

maciez e suculência, por acelerar a oxidação e polimerização proteica (KIM; HUNT, 2011).

As AM anaeróbicas utilizam o CO_2 para inibir bactérias deteriorantes e também prevenir esses defeitos de oxidação em carnes que ocorrem em atmosferas com alto teor de O_2 , por meio da redução máxima da quantidade deste gás na embalagem. Para isso, o N_2 é incorporado na atmosfera como gás de enchimento, para manter a forma da embalagem. O N_2 não tem nenhum efeito direto na cor da carne ou efeitos bacteriostáticos (KIM; HUNT, 2011).

2.7 Lactato de potássio

A adição de água e ingredientes não cárneos em carne fresca tem sido amplamente utilizada mundialmente (GROBBEL et al, 2008a, 2008b). A adição de soluções contendo lactato melhora a suculência, maciez, sabor, vida útil e o rendimento do produto final (LAWRENCE et al., 2003). Além disso, a adição do lactato resulta numa estabilização da cor tanto da carne crua, quanto cozida (KNOCK et al., 2006), no entanto, pode levar ao escurecimento da carne crua (KIM et al., 2006). Esse escurecimento pode ser associado à relação entre o lactato e o consumo de O_2 mitocondrial (RAMANATHAN; MANCINI; KONDA, 2009).

A adição de salmouras contendo lactato de potássio aumenta a estabilidade da cor de bifes estocados em atmosferas modificadas com alto oxigênio (Kim et al., 2006). Kim et al. (2006) conduziram um estudo com base na suposição de que a estabilização da cor proveniente da adição do lactato está relacionada à reposição de NADH via atividade do lactato desidrogenase (LDH), por meio da redução do NAD^+ e que o sistema de redução NADH-dependente, tanto enzimático quanto não enzimático, é capaz de reduzir a MetaMb, por meio da reação abaixo (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Esquema proposto do sistema lactato desidrogenase (LDH) para a geração de NADH para uso na reação da Atividade Redutora da Metamioglobina (ARM) (adaptado de KIM et al., 2006)

Figura 3 - Outra perspectiva do esquema proposto do sistema lactato-lactato desidrogenase (LDH) para a geração de NADH para uso na reação da ARM (adaptado de RODRÍGUEZ et al., 2010)

A ARM diminui ao longo do tempo de estocagem por vários fatores, incluindo a queda do pH do tecido, depleção de substratos e co-fatores necessários e perda total da integridade estrutural e propriedades funcionais da mitocôndria. No entanto, o principal fator limitante para a perda da ARM durante a vida útil parece ser a depleção do NADH, daí a importância da adição de uma fonte que permita essa reposição, no caso, o lactato (KIM; HUNT, 2011).

Algumas características metabólicas inerentes ao músculo como: concentração de pigmento, consumo mitocondrial de O_2 e ARM por meio de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos têm sido apontadas como reguladoras da estabilidade da cor (MANCINI; HUNT, 2005). Considerando a influência genética sobre a taxa de crescimento e percentual de carne magra, é provável que este fator também possa influenciar em algumas dessas características metabólicas, contribuindo para que haja variação na estabilidade da cor (KING et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria prima e processamento

Para este estudo foram utilizados músculos *Longissimus lumborum* de animais machos inteiros anelados (com grande participação da raça Nelore; Figura 4). Os animais eram criados em um regime de engorda a pasto, com dois a quatro dentes incisivos (30-36 meses). O abate foi realizado de forma convencional no frigorífico Minerva Foods – Ltda., localizado na cidade de Barretos – SP. Os lotes foram selecionados de acordo com a presença de animais anelados, sendo descartados os lotes com muitos animais taurinos. As carcaças dos lotes selecionados foram armazenadas em câmaras frias a 4°C por 48 horas.

Figura 4 - Lote selecionado no frigorífico de animais anelados (grande participação da raça Nelore).

No 2º dia (48h) *post mortem*, foram feitas medidas de pH dos músculos *L. lumborum* (parte do *L. dorsi* localizada entre a 1ª e a 6ª vértebra lombar) utilizando pHmetro portátil (modelo pH1140, Mettler-Toledo®) dentro das câmaras frias. As carcaças foram então agrupadas em 3 grupos diferentes, de acordo com a faixa de pH_f, sendo eles: baixo (controle; n = 6; 5,4 < pH_f < 5,8), intermediário (n = 6; 5,81 < pH_f < 6,3) e alto (n = 6; pH_f > 6,3). Após esta triagem, os músculos foram devidamente identificados e seguiram para a desossa, sendo posteriormente embalados a vácuo (VSA 211, Cryovac®) no frigorífico e transportados sob refrigeração em temperatura de aproximadamente 2°C.

Na planta piloto do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, localizada em Piracicaba – SP, os músculos foram mantidos na câmara em temperatura de $2 \pm 1^\circ\text{C}$. No 3º dia *post mortem* ocorreu o refile e manipulação dos músculos em ambiente com temperatura de $10 \pm 2^\circ\text{C}$.

Todos as peças passaram por remoção da gordura superficial prévia aos tratamentos. Os 18 músculos (direito ou esquerdo) foram randomicamente divididos em dois tratamentos: sem lactato = sem adição de lactato de potássio (SL; destinado a outro projeto) e lactato = com adição de uma solução de 2,5% de lactato de potássio (TL). Cada grupo de pH era constituído de 6 animais (repetições), totalizando assim 18 repetições (3 grupos de pH x 6 repetições por grupo).

O TL foi feito por meio da injeção de uma solução de lactato de potássio (PURASAL HiPure P, 60% L-lactato de potássio/40% de água; PURAC America, Inc., Lincolnshire, IL) + sódio tripolifosfato (Chem Alert®, Fisher Scientific, New Jersey) no músculo (Tabela 1; Figura 5). A injeção foi feita com o uso de uma injetora (Super Inject Max Power Flavor, modelo Stander). Cada músculo foi pesado individualmente antes e 30 minutos após a injeção da solução (pH 8,1) para calcular a absorção efetiva da salmoura para cada amostra (injeção de média de 8% do peso do músculo, resultando numa concentração final de 2,5% de lactato/0,3% fosfato) (tabela 2).

Tabela 1 - Composição da salmoura no tratamento com Lactato de Potássio (TL)

Ingredientes	Ingredientes no produto final, % estimado	Ingredientes na salmoura, %
Lactato de Potássio	2,5	27,5
Cloreto de Sódio	0,3	3,30
Tripolifosfato de Sódio	0,3	3,30
Extrato de Alecrim	0,06	0,64
Água gelada	5,93	65,26
Total	9,09	100,00

Figura 5 - Injeção da salmoura de lactato de potássio nos músculos *L. lumbarum*

Tabela 2 - Taxa média de injeção de salmoura para cada tratamento

Tratamento ¹ (pH _f)	Taxa de injeção média (%)
Baixo (controle)	7,86
Intermediário	8,32
Alto	8,41

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): $5,4 < \text{pH}_f < 5,8$; intermediário: $5,81 < \text{pH}_f < 6,3$; e alto: $\text{pH}_f > 6,3$.

Cada músculo foi então dividido em bifes de 2 cm de espessura (15 bifes por cada músculo, sendo que cada bife constituiu uma unidade experimental) em uma plataforma encomendada especificamente para diminuir o erro no corte dos bifes (Figura 6), sendo que o mesmo foi feito com a outra metade do *L. lumbarum* para fazer o TC.

Figura 6 - Plataforma de corte de acrílico encomendada com a finalidade de diminuir o erro ao corte dos bifes de espessura específica (2 cm)

3.2 Embalagem

Os bifes foram então acondicionados individualmente em bandejas próprias para AM (modelo 13D65, 24 x 16 x 65 cm, polipropileno branco com barreira de EVOH, permeabilidade ao $O_2 < 0,5 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$ a 50% de umidade relativa, Cryovac®; Figura 7); as embalagens foram evacuadas e em seguida foi injetada uma mistura gasosa com alto teor de O_2 (80% O_2 /20% CO_2 ; Air Liquide Ltda.) e seladas com um filme de alta barreira (Tampa 4532-G, com espessura nominal de 70 μm , permeabilidade ao $O_2 < 5 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h}$ a 23°C, 66% de UR e permeabilidade ao vapor de água $< 5 \text{ g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ a 38°C e 90% UR, Bemis Company® - Dixie Toga) utilizando uma máquina termosseladora (modelo T200, marca Multivac®). O controle automático do ciclo de vácuo/injeção/fechamento do filme tampa foi programado para operar nas seguintes condições: pressão de evacuação de 10 mbar; pressão de injeção de atmosfera de 950 mbar e selagem a 135°C por 5 segundos.

Figura 7 - Bifes de *L. lumbarum* de 2 cm de espessura acomodados nas bandejas antes da injeção da atmosfera modificada

As bandejas com AM foram mantidas no escuro (Figura 8) a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias consecutivos e posteriormente seguiram para um expositor refrigerado com iluminação e temperatura controlada, onde permaneceram por 9 dias, completando 14 dias de vida útil. As análises foram feitas nos dias: 0, 5, 8, 11 e 14 para composição gasosa, pH e cor instrumental. A composição centesimal foi realizada em amostra congelada. A análise sensorial de odor foi realizada nos dias 5 e 14. As análises de oxidação lipídica e avaliação microbiológica foram realizadas nos dias 0, 5 e 14.

Figura 8 - Cronograma de execução do projeto, onde MP = Matéria-Prima; AM = Atmosfera Modificada

3.3 Condições do expositor refrigerado

As bandejas permaneceram em um expositor refrigerado com temperatura de $2 \pm 1^\circ\text{C}$ do dia 5 ao dia 14 do experimento sob iluminação fluorescente de 1980 lux (MLM-1010, Minipa®) com descongelamento em intervalos de 4 horas.

3.4 Composição gasosa

Foi feita a avaliação dos teores de O_2 e CO_2 no espaço livre das bandejas para verificar a composição gasosa da AM durante o período de vida útil. Esta avaliação foi realizada logo após a selagem da bandeja no primeiro dia (dia 0) e nos outros períodos de avaliação (5, 8, 11 e 14 dias) antes da abertura da mesma. As medidas foram realizadas por meio do uso de um analisador de gases portátil (CheckPoint®, PBI Dansensor A/S, Ringsted, Denmark).

3.5 pH

A avaliação do pH no interior de cada bife foi feita utilizando um pHmetro de punção (HI 99163, Hanna Instruments®) com um eletrodo de penetração de corpo de vidro acoplado, calibrado com soluções padrão (pH 4,0 e 7,0). A mensuração foi

feita em 3 pontos do bife e foi utilizada uma média destes valores para a análise estatística.

3.6 Composição centesimal

A composição centesimal foi realizada em triplicata a partir das amostras congeladas a - 20°C. Foram compostas 3 amostras (pH baixo, intermediário e alto), a partir de 3 bifes provenientes de 3 animais diferentes de cada tratamento, que foram utilizadas para as análises.

Os ensaios para cada determinação (umidade, proteínas, extrato etéreo e cinzas) foram feitos em triplicata e determinados segundo a Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (2005). A umidade foi determinada por gravimetria em estufa a 105°C, até peso constante. O teor de proteínas foi quantificado mediante a determinação de nitrogênio total, pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator 6,25 para conversão do valor do nitrogênio em proteína. As cinzas foram determinadas por incineração da matéria orgânica em mufla a 550°C. O teor de lipídeos totais foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando o hexano como solvente. Os carboidratos foram calculados por diferença (Eq. 1):

$$\text{Carboidratos: } 100\% - (\text{umidade} + \text{proteínas} + \text{cinzas} + \text{lipídeos}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Os resultados foram calculados em base úmida e expressos em g·100 g⁻¹.

3.7 Sensorial de odor

Foi realizada análise sensorial de odor com 5 provadores treinados para odor desagradável utilizando uma escala de 5 pontos, onde: 1: nenhum; 2: leve; 3: pequeno; 3,5: limite da vida útil para os provadores; 4: moderado e 5: odor desagradável extremo.

3.8 Avaliação microbiológica

A análise microbiológica foi feita com base na contagem total de mesófilos aeróbios. A metodologia descrita por Silva et al. (2007) foi utilizada com adaptações. Para viabilizar a análise, foi feito um *pool* de cada tratamento (faixa de pH), para tanto, foram removidos pouco mais de 4g de cada bife de cada tratamento (total de 6) para compor a amostra de 25g e homogeneizar em 225mL de água peptonada 0,1%. A homogeneização foi realizada em sacos plásticos próprios em um

equipamento tipo Stomacher MK 1204 (ITR) por 8 minutos. As diluições apropriadas foram plaqueadas em meio Plate Count Agar Difco™ (BD, Maryland, USA) e encubadas em estufas a 35°C a 48h. A contagem microbiana está expressa em log de UFC/g de amostra.

3.9 Cor instrumental

A cor instrumental dos bifes de *L. lumbrorum* foi medida imediatamente após a remoção do mesmo da AM com espectrofotômetro portátil MiniScan®XE Plus (modelo 45/0-LV, 2,54 cm de diâmetro de abertura, ângulo de observação de 10°; Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) integrado a um sistema Easy Match QC. O aparelho foi calibrado utilizando padrões de preto e branco fornecidos pelo fabricante. As coordenadas CIE L*, a*, b* (Iluminante A) foram medidas e utilizadas para calcular os valores de croma (C*) = $[(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}]$ e ângulo-hue (h*) = $\text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$ das amostras. O percentual de cada pigmento (DeoxiMb, OxiMb e MetaMb) foi calculado utilizando comprimentos de ondas selecionados descritos em American Meat Science Association - AMSA (2012), ou seja:

$$\%MetaMb: \left\{ 1.395 - \left[\frac{A_{572}-A_{700}}{A_{525}-A_{700}} \right] \right\} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\%DeoxiMb: \left\{ 2.375 \times \left[1 - \frac{A_{473}-A_{700}}{A_{525}-A_{700}} \right] \right\} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\%OxiMb: 100 - (\%MetaMb + \%DeoxiMb) \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: $A = \log \frac{1}{R}$; R = reflectância.

Os bifes foram avaliados em 5 locais diferentes e as médias foram utilizadas para a análise estatística. As medidas de reflectância pelo espectrofotômetro são realizadas entre 400 e 700 nm em intervalos de 10 nm. Os valores de comprimentos de onda que não foram dados pelo instrumento (473, 525, 572 nm) foram calculados utilizando interpolação linear.

3.10 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi determinada utilizando a metodologia que determina o valor das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) descrita por Vynche (1970, 1975) e Sorensen e Jorgensen (1996). A determinação foi feita em triplicata por amostra.

Inicialmente, para a obtenção de uma curva padrão, foi utilizado o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), cuja hidrólise ácida gera malonaldeído na proporção de 1mol:1mol. A curva construída continha 9 pontos com diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol/L}$ de TEP).

Posteriormente, a amostra foi triturada em processador (Walita Master, 600 watts) para iniciar a análise. Para a extração dos aldeídos, foi feita homogeneização em Ultra Turrax (IKA T18 Basic, Willmington, North Carolina) de 5 g da amostra com 15 mL de uma solução de ácido tricloroacético (7,5%) / Propil Galato (0,1%) / EDTA (0,1%). Em seguida, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo (12,5 mm) e 5 mL do filtrado foram adicionados de 5 mL da solução de TBA (0,02 M), agitados em Vortex (IKA MS1 Minishaker, Willmington, North Carolina) e colocados em banho-maria a 100°C durante 40 minutos para reação da mistura. Após retirar do banho e esfriar, foi feita a leitura em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV mini 1240) em comprimentos de onda de 532 e 600 nm.

A concentração da amostra foi obtida por meio do uso da equação de reta de uma regressão linear determinada pelos cálculos da curva padrão, onde a concentração e a absorbância foram plotados nos eixos x e y, respectivamente. Os resultados foram expressos em “valor de TBARS”, definidos como mg de malonaldeído (MDA)/kg de carne.

3.11 Análises estatísticas

O estudo foi conduzido no esquema fatorial (3×5), considerando 3 faixas de pH_f (baixo ou controle, pH_f entre 5,4 e 5,8; intermediário, entre 5,81 e 6,3; alto, maior que 6,3) em 5 tempos de armazenamento (0, 5, 8, 11 e 14 dias). A unidade experimental no estudo foi o músculo amostrado do animal, sendo constituída por seis repetições dentro de cada faixa de pH_f. Nas comparações das interações foi utilizado um $P < 0,05$.

As variáveis representadas por dados contínuos (composição gasosa, pH, cor da carne, oxidação lipídica e pigmentos) foram analisadas utilizando o procedimento Univariate do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC). Nessa etapa o procedimento Univariate foi utilizado no cálculo do número de observações, soma, média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo, e na identificação de dados atípicos (auxiliado

pelo procedimento Boxplot). As variáveis não paramétricas ou qualitativas (análise sensorial: odor da carne) foram analisadas utilizando o procedimento Freq do SAS.

As variáveis contínuas também foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS, sendo o tempo (dias de armazenamento) considerado como a medida repetida no modelo. Todos os efeitos do modelo foram assumidos como fixos (faixas de pH_f, tempo e suas interações, Eq. 5). Foram testadas várias estruturas de covariância [type = cs, ar(1) e toep], sendo a cs a mais adequada. Após ANOVA, foram estimadas as médias de quadrados mínimos, bem como os respectivos erros-padrão (EP). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças médias entre as faixas de pH_f, tempo e suas interações.

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + T_j + (FT)_{ij} + e_{ijk} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que: μ é a média da população, F o efeito fixo da faixa de pH_f, sendo i = baixo ou controle (pH_f entre 5,4 e 5,8); intermediário (entre 5,81 e 6,3); alto (maior que 6,3); T o efeito fixo do tempo de armazenamento, sendo j = 0, 5, 8, 11 e 14 dias; (FT) o efeito da interação entre F e T ; e e_{ijk} é o erro do modelo, em que e_{ijk} é $\sim \text{NID}(0; \sigma^2)$.

Já a variável contínua avaliada somente em um momento (composição centesimal) fez o uso do procedimento MIXED do SAS, contudo, sem considerar o fator tempo, somente o efeito fixo faixa de pH_f (Eq. 6).

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + e_{ijk} \quad (\text{Eq. 6})$$

Utilizando o procedimento NPAR1WAY do SAS foi verificada diferença para dados não paramétricos Kruskal-Wallis (PAPPAS; DEPUY, 2004). Utilizando este procedimento foi avaliado a diferença da percepção do odor da carne com base na mediana populacional dos provadores entre os dias 5 e 14, bem como entre as faixas de pH_f.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição gasosa

As bandejas com AM apresentaram em média $81,1 \pm 0,44\%$ (EP) de O_2 e $20,0 \pm 0,22\%$ de CO_2 no início do experimento (dia 0). No final do estudo (dia 14), os valores obtidos foram $78,9 \pm 0,35\%$ de O_2 e $20,9 \pm 0,26\%$ de CO_2 . Apesar de haver diferença ($P < 0,05$) na composição gasosa inicial (dia 0) e final (dia 14), a diferença percentual foi pequena, indicando que o volume de gás injetado foi suficiente para saturar a bandeja com o gás e manter-se sem variações que pudessem prejudicar a composição da atmosfera inicial injetada (80% de O_2 + 20% de CO_2) durante todo o período de estocagem.

Tabela 3 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para composição gasosa de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) das bandejas para acondicionar os bifes provenientes de músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_i de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore

Variável	Tratamento ¹			Valor de P		
	Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)	B vs. I	B vs. A	A vs. I
O_2 , %	$79,7 \pm 0,22$	$79,7 \pm 0,22$	$79,3 \pm 0,22$	0,98	0,41	0,33
CO_2 , %	$20,4 \pm 0,23$	$20,6 \pm 0,23$	$21,3 \pm 0,23$	<0,01	<0,01	<0,01

¹ Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): $5,4 < pH_i < 5,8$; intermediário: $5,81 < pH_i < 6,3$; e alto: $pH_i > 6,3$.

Não houve diferença ($P > 0,05$) do percentual de O_2 entre os tratamentos (Tabela 3). No entanto, com relação ao período de estocagem, houve uma diminuição ($P < 0,05$) em todos os tratamentos (Tabela 4). A menor variação (Tabela 4) ocorreu nos grupos de pH_i baixo e intermediário em comparação com os músculos de pH_i alto (2,3% e 3,3% *versus* 3,8%, respectivamente).

Tabela 4 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para composição gasosa de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) das bandejas para acondicionar os bifes provenientes de músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto O_2 nos dias 0, 5, 8, 11 e 14

Composição Gasosa	Dia	Tratamento ¹		
		Baixo	Intermediário	Alto
O_2 , %	0	80,4 $\pm$ 0,35 ^{ax}	81,1 $\pm$ 0,35 ^{ax}	81,1 $\pm$ 0,35 ^{ax}
	5	80,1 $\pm$ 0,35 ^{axy}	80,3 $\pm$ 0,35 ^{axy}	79,6 $\pm$ 0,35 ^{axy}
	8	78,8 $\pm$ 0,35 ^{ay}	78,5 $\pm$ 0,35 ^{az}	78,8 $\pm$ 0,35 ^{ayz}
	11	80,2 $\pm$ 0,35 ^{axy}	79,8 $\pm$ 0,35 ^{axyz}	78,8 $\pm$ 0,35 ^{ayz}
	14	78,9 $\pm$ 0,35 ^{axy}	78,9 $\pm$ 0,35 ^{ayz}	78,0 $\pm$ 0,35 ^{az}
CO_2 , %	0	19,9 $\pm$ 0,27 ^{ax}	20,0 $\pm$ 0,27 ^{ay}	19,8 $\pm$ 0,27 ^{az}
	5	20,7 $\pm$ 0,27 ^{ax}	20,6 $\pm$ 0,27 ^{axy}	20,7 $\pm$ 0,27 ^{ay}
	8	20,6 $\pm$ 0,27 ^{ax}	20,7 $\pm$ 0,27 ^{axy}	21,5 $\pm$ 0,27 ^{ax}
	11	20,4 $\pm$ 0,27 ^{bx}	20,9 $\pm$ 0,27 ^{ax}	22,2 $\pm$ 0,27 ^{ax}
	14	20,4 $\pm$ 0,27 ^{bx}	20,9 $\pm$ 0,27 ^{ax}	22,2 $\pm$ 0,27 ^{ax}

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

Médias na mesma linha entre tratamentos com letras diferentes (a-b) diferem entre si ($P < 0,05$). Médias na coluna dentro do mesmo tratamento com letras diferentes (x-z) diferem entre si ($P < 0,05$).

A maior variação da composição gasosa nos músculos de pH_f alto pode estar associada ao fato deste possibilitar o crescimento de um maior número de bactérias, uma vez que o pH dos músculos deste grupo se aproxima mais do 7,0, o qual é o pH ótimo para a maior parte dos micro-organismos deteriorantes da carne (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A diminuição do percentual de O_2 e consequente aumento no percentual de CO_2 no espaço livre das bandejas observados nas amostras com pH_f intermediário e alto, pode ser atribuída à atividade de bactérias aeróbias deteriorantes como *Pseudomonas* spp. e *Achromobacter* spp., que são conhecidas por diminuir a tensão de O_2 e aumentar a descoloração de carne fresca em ambientes com ar atmosférico (ROBACH; COSTILLOW, 1961).

A partir do 5º dia de estocagem, a concentração de CO_2 foi maior nos tratamentos com pH_f alto ($P < 0,05$; Tabela 4), podendo esta diferença ser atribuída ao maior número de bactérias produtoras de CO_2 nesta faixa de pH. Isto também pode ser observado na Tabela 3, onde média do percentual deste gás diferiu ($P < 0,01$) entre os tratamentos. No entanto, a diferença foi menor entre os pH's baixo e intermediário (20,4 versus 20,6%), sendo que no pH alto foi maior (21,3%). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos com relação ao percentual de CO_2 até o oitavo dia de estudo, no entanto, a partir desse período houve um aumento deste percentual nos tratamentos de pH_f intermediário e alto com relação ao tratamento de pH_f baixo.

4.2 pH

Os valores do pH_f do estudo apresentaram comportamento similar a estudos realizados em diferentes condições experimentais (PULFORD et al., 2008; LOMIWES et al., 2013; LOMIWES et al., 2014; Tabela 5).

Tabela 5 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para pH de músculos *L. lumbarum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore

Variável	Tratamento ¹			Valor de P		
	Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)	B vs. I	B vs. A	A vs. I
pH	5,6 $\pm$ 0,04	5,8 $\pm$ 0,04	6,3 $\pm$ 0,04	0,01	<0,01	<0,01

¹ Os tratamentos foram definidos como: Baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; Intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e Alto: pH_f > 6,3.

O lactato de potássio é uma solução básica, conseqüentemente, o esperado era obter aumento do pH dos músculos (KIM et al., 2010b). No entanto, os valores de pH_f, mesmo aumentando ($P < 0,05$; Tabela 6) se mantiveram nas mesmas faixas que as classificadas no frigorífico.

Tabela 6 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para pH de músculos *L. lumbarum* injetados com lactato de potássio de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore, embalados em atmosfera com alto oxigênio nos dias 0, 5, 8, 11 e 14

Variável	Dia	Tratamento ¹		
		Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)
pH	0	5,5 $\pm$ 0,07 ^y	5,8 $\pm$ 0,07 ^x	6,3 $\pm$ 0,07 ^x
	5	5,6 $\pm$ 0,07 ^{xy}	5,9 $\pm$ 0,07 ^x	6,3 $\pm$ 0,07 ^x
	8	5,5 $\pm$ 0,07 ^y	5,8 $\pm$ 0,07 ^x	6,3 $\pm$ 0,07 ^x
	11	5,8 $\pm$ 0,07 ^{xy}	6,0 $\pm$ 0,07 ^x	6,2 $\pm$ 0,07 ^x
	14	5,8 $\pm$ 0,07 ^x	6,0 $\pm$ 0,07 ^x	6,4 $\pm$ 0,07 ^x

¹ Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

Médias na coluna dentro do mesmo tratamento com letras diferentes (x-y) diferem entre si ($P < 0,05$).

Kim et al. (2006) avaliaram o lactato de potássio e verificaram que no 2º dia, o pH das carnes não injetadas com a solução foi maior quando comparado com o pH das carnes injetadas com a solução na concentração de 2,5% (6,0 *versus* 5,9, respectivamente), a mesma utilizada no presente trabalho. Porquanto, segundo estes autores ao final do período de armazenamento (dia 14) os valores de pH aumentaram, similarmente aos resultados obtidos no presente estudo (Tabela 6).

O pH do grupo baixo aumentou apenas no 14º dia de armazenamento ($P < 0,05$, Tabela 6). Este resultado está de acordo com outros estudos (KIM et al., 2006; KIM et al., 2009a; KIM et al. 2010b), os quais apresentaram aumento nos valores de

pH ao final do experimento, independente do músculo ou da atmosfera utilizada. Devemos considerar o pH dos músculos destes trabalhos mencionados em uma faixa de pH semelhante ao de pH_f baixo do presente estudo.

Kim et al. (2009a) apontaram a injeção de lactato de potássio como responsável pelo aumento do pH do músculo, pelo fato do pH da solução de lactato de potássio ser alcalino. No entanto, este aumento não ocorreu nos grupos de pH_f intermediário e alto ($P > 0,05$), o que pode ser atribuído ao fato de que nestes tratamentos o aumento no percentual de CO₂ foi maior e este gás pode ter levado ao declínio do pH ao se dissolver na carne (BAĞDATLI; KAYAARDI, 2015). Consequentemente, pode ter ocorrido um equilíbrio entre o efeito da adição do lactato (tornar o pH alcalino) e o efeito do aumento no percentual de CO₂ (tornar o pH ácido), mantendo o pH estável nos grupos intermediário e alto.

4.3 Composição centesimal

A composição centesimal dos músculos dos três tratamentos não diferiu ($P > 0,05$), mostrando que a diferença dos pH_f não influenciou nesta análise (Tabela 7).

Tabela 7 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para composição centesimal média de músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore

Variável	Tratamento ¹			TACO ²
	Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)	
Umidade, %	73,7 $\pm$ 0,45	74,2 $\pm$ 0,45	72,7 $\pm$ 0,45	69,1
Proteínas, %	20,6 $\pm$ 0,45	20,3 $\pm$ 0,45	20,1 $\pm$ 0,37	24,0
Cinzas, %	2,6 $\pm$ 0,15	3,1 $\pm$ 0,15	3,0 $\pm$ 0,15	1,0
Lipídeos, %	2,4 $\pm$ 0,09	2,3 $\pm$ 0,07	2,7 $\pm$ 0,09	6,0
Carboidratos, %	0,4 $\pm$ 0,27	0,2 $\pm$ 0,27	0,5 $\pm$ 0,27	0,0

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

²Dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (UNICAMP, 2011) para contra-filé sem gordura cru.

Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

A comparação da composição centesimal do contra-filé sem gordura cru do presente estudo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO; UNICAMP, 2011, Tabela 7) indica que os músculos usados nesta avaliação apresentaram maior umidade, provavelmente devido ao uso da injeção da salmoura.

O menor percentual de proteínas observado, comparado com a TACO, pode ser devido à maior umidade dos músculos do presente experimento. A adição de sais na salmoura, como lactato de potássio, tripolifosfato de sódio e cloreto de sódio,

podem ter ocasionado o aumento no percentual de cinzas. Ruiz et al. (2005) observaram que bovinos machos Nelore do Brasil apresentaram um percentual de proteínas que variou de 19,9 a 21,1%, indicando que os valores de proteína encontrados no presente estudo estão dentro do esperado.

O percentual de lipídeos obtido foi menor quando comparado com a TACO. No entanto, estes valores são intermediários entre os apresentados na TACO e por Ruiz et al. (2005). Estes analisaram a composição centesimal de três categorias de bovinos cruzados Nelore: imunocastrados, castrados e inteiros, e encontraram valores para extrato etéreo que variaram de 1,2 (machos inteiros) a 2,2 % (imunocastrados). Consequentemente, pode haver grande variação neste parâmetro, portanto, os resultados obtidos desta variável estão dentro do esperado.

4.4 Sensorial de odor

A análise sensorial de odor foi feita com o objetivo de verificar se a manutenção da estabilidade da cor e da qualidade microbiológica seria acompanhada ou não de alterações sensoriais de odor (odor desagradável).

Não houveram diferenças entre os tratamentos ou entre os dias de análise ($P > 0,05$, Tabelas 8 e 9). As medianas dos tratamentos não excederam 2,0 em nenhum momento, indicando que o odor estava aceitável para todos os pH_f.

Tabela 8 – Teste de múltiplas amostras entre os grupos de pH_f (Kruskal Wallis) para o atributo sensorial de odor avaliado em músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto oxigênio

Variável	Tratamento ¹			Valor de <i>P</i>
	Baixo	Intermediário	Alto	
Odor	0,7 ± 0,62	0,7 ± 0,44	0,7 ± 0,44	0,16

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

Tabela 9 – Teste de múltiplas amostras entre os períodos de avaliação (Kruskal Wallis) para o atributo sensorial de odor avaliado em músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto oxigênio nos dias 5 (início do período de exposição à luz) e 14 (final do período de exposição à luz)

Variável	Dia		Valor de <i>P</i>
	5	14	
Odor	0,7 ± 0,46	0,7 ± 0,54	0,37

Seguindo a mesma linha de resultados da presente pesquisa, onde a solução de lactato não teve efeito indesejável quanto ao odor nos três grupos de pH_f, um

trabalho desenvolvido por Knock et al. (2006) utilizando músculos *L. thoracis* injetados com misturas de lactato de potássio (1,5% de lactato de potássio + 0,3% de sal + 0,3% de tripolifosfato) e misturas dessa solução com outros sais, embalados em atmosferas com alto O₂, fizeram análises nos dias 2, 9 (os músculos ficaram no escuro neste período) e 14 (os músculos ficaram 5 dias em exposição à luz) e observaram aumento nas notas de odor desagradável ($P < 0,05$).

No entanto, nunca excederam 2,5, que está abaixo do limite do inaceitável (3,5). Além disso, verificaram que os bifes injetados apenas com a solução de lactato de potássio (sem adição dos outros sais, semelhante à que utilizamos neste trabalho) tiveram as menores notas quando comparados com os músculos injetados com as outras misturas.

4.5 Avaliação microbiológica

Como esperado, a contagem total de micro-organismos mesófilos aeróbios foi menor no tratamento de pH_f baixo (Tabela 10). A contagem mais baixa neste tratamento foi mantida até o término do experimento, sendo que a contagem mais alta ao final do período foi no tratamento de pH alto. Aparentemente, enquanto as carnes estavam no escuro (do dia 0 ao dia 5), houve pouco crescimento bacteriano no tratamento com pH_f alto, o que pode indicar um bom efeito bacteriostático do lactato neste grupo e nestas condições.

Estas menores contagens microbianas em produtos cárneos adicionados de lactato, tanto de potássio como outros, têm sido estudadas e reportadas há muitos anos (GRAU, 1981; SHELEF 1994; SEYFERT et al., 2006). Apesar dos estudos específicos de como o lactato age na célula microbiana serem limitados, existem dois mecanismos propostos para explicar esta diminuição nas contagens de células. No entanto, como uma se refere especificamente ao lactato de sódio, cita-se apenas o mais provável para o caso de lactato de potássio, que foi o utilizado neste trabalho, que é a habilidade de ácidos lipofílicos fracos (ácido láctico) atravessarem a membrana da célula na forma indissociada, dissociarem dentro da célula e acidificar o seu interior (FREESE; SHEU; GALLIERS, 1973; HUNTER; SEGAL, 1973; SALMOND; KROLL; BROOTH, 1984).

Tabela 10 - Contagem total de mesófilos aeróbios obtidos por meio de um *pool* para cada tratamento de músculos *L. lumbrorum* de diferentes faixas de pH_i de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto oxigênio nos dias 0, 5 e 14 expressos em log UFC/g de carne

Variável	Dia	Tratamento ¹		
		Baixo	Intermediário	Alto
Mesófilos	0	2,7	2,9	3,1
aeróbios,	5	4,1	3,2	3,4
log UFC/g	14	4,7	6,6	6,7

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): $5,4 < \text{pH}_i < 5,8$; intermediário: $5,81 < \text{pH}_i < 6,3$; e alto: $\text{pH}_i > 6,3$.

O L-lactato (mesmo tipo de lactato utilizado neste trabalho), quando em uma concentração de 100mM (encontrada em músculos de pH baixo) inibiu o crescimento aeróbio de bactérias gram-negativas fermentativas (*Serratia liquefaciens*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae* e *Aeromonas hydrophila*) em caldo tamponado em pH 5,55 (faixa de pH que está dentro do nosso grupo de pH_i baixo) reportado por Grau (1981). Nenhuma diminuição no crescimento foi observada em pH 6,1, o que pode ajudar a justificar o maior crescimento de micro-organismos no pH alto no presente trabalho, já que este valor está dentro do grupo de pH_i alto.

A contagem bacteriana final observada neste experimento (6,0 logs UFC/g) está dentro do limite aceitável descrito por Bomar (1985), o qual utilizou 3 níveis para classificar a contagem total da superfície (log UFC/g): 1 - até 6,7 (bom); 2 - 6,7 - 7,7 (tolerável) e 3 - > 7,7 (impróprio para consumo), onde, de acordo com sua classificação, nossos bifes até o final do experimento são considerados como “bom”, estando aptos para o consumo humano.

4.6 Cor instrumental

Com relação à cor instrumental, não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) para os valores de L* (luminosidade), a*, b* e croma (Tabela 11).

Tabela 11 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para características de cor da carne de músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore

Variável	Tratamento ¹			Valor de <i>P</i>		
	Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)	B vs. I	B vs. A	A vs. I
L*	43,9 $\pm$ 0,66	43,6 $\pm$ 0,79	42,4 $\pm$ 1,50	0,95	0,65	0,78
a*	21,3 $\pm$ 0,54	23,6 $\pm$ 0,65	23,3 $\pm$ 1,22	0,07	0,35	0,97
b*	14,7 $\pm$ 0,43	15,9 $\pm$ 0,52	15,1 $\pm$ 0,96	0,24	0,95	0,70
Hue ²	34,6 $\pm$ 0,24	33,8 $\pm$ 0,28	32,7 $\pm$ 0,51	0,18	0,03	0,19
Croma ³	25,9 $\pm$ 0,68	28,5 $\pm$ 0,81	27,8 $\pm$ 1,52	0,10	0,55	0,90

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

²Ângulo Hue: ArcoTangente (b*/a*). Medido em graus (°).

³Croma: (a*² + b*²)^{1/2}.

Tabela 12 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para características de cor da carne de músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto oxigênio nos dias 0, 5, 8, 11 e 14

Variável	Dia	Tratamento ¹		
		Baixo	Intermediário	Alto
L*	0	45,6 $\pm$ 0,82 ^{ax}	44,6 $\pm$ 0,93 ^{ax}	42,2 $\pm$ 1,58 ^{ax}
	5	45,5 $\pm$ 0,93 ^{ax}	43,8 $\pm$ 1,03 ^{ax}	42,9 $\pm$ 1,64 ^{ax}
	8	42,7 $\pm$ 0,82 ^{ayz}	42,0 $\pm$ 0,93 ^{ax}	43,0 $\pm$ 1,58 ^{ax}
	11	42,0 $\pm$ 0,82 ^{az}	43,9 $\pm$ 0,93 ^{ax}	41,1 $\pm$ 1,58 ^{ax}
	14	43,6 $\pm$ 0,82 ^{axyz}	43,5 $\pm$ 0,93 ^{ax}	42,7 $\pm$ 1,58 ^{ax}
a*	0	23,9 $\pm$ 0,68 ^{ax}	21,2 $\pm$ 0,77 ^{ay}	19,2 $\pm$ 1,29 ^{ay}
	5	23,2 $\pm$ 0,78 ^{ax}	24,1 $\pm$ 0,86 ^{ax}	25,0 $\pm$ 1,35 ^{ax}
	8	20,4 $\pm$ 0,68 ^{ay}	23,1 $\pm$ 0,77 ^{axy}	23,7 $\pm$ 1,29 ^{ax}
	11	19,4 $\pm$ 0,68 ^{by}	24,3 $\pm$ 0,77 ^{ax}	24,8 $\pm$ 1,29 ^{ax}
	14	19,8 $\pm$ 0,68 ^{by}	25,3 $\pm$ 0,77 ^{ax}	23,9 $\pm$ 1,29 ^{abx}
b*	0	15,7 $\pm$ 0,57 ^{ax}	13,3 $\pm$ 0,64 ^{aby}	11,3 $\pm$ 1,02 ^{by}
	5	15,8 $\pm$ 0,66 ^{ax}	16,1 $\pm$ 0,72 ^{ax}	16,0 $\pm$ 1,08 ^{ax}
	8	14,1 $\pm$ 0,57 ^{ax}	16,3 $\pm$ 0,64 ^{ax}	15,4 $\pm$ 1,02 ^{ax}
	11	13,9 $\pm$ 0,57 ^{ax}	16,4 $\pm$ 0,64 ^{ax}	16,6 $\pm$ 1,02 ^{ax}
	14	14,2 $\pm$ 0,57 ^{bx}	17,7 $\pm$ 0,64 ^{ax}	16,0 $\pm$ 1,02 ^{abx}
Ângulo Hue ²	0	33,1 $\pm$ 0,34 ^{ay}	31,8 $\pm$ 0,37 ^{aby}	30,4 $\pm$ 0,56 ^{by}
	5	34,1 $\pm$ 0,41 ^{ax}	33,6 $\pm$ 0,43 ^{ax}	32,6 $\pm$ 0,60 ^{ax}
	8	34,5 $\pm$ 0,34 ^{ax}	35,0 $\pm$ 0,37 ^{ax}	32,9 $\pm$ 0,56 ^{ax}
	11	35,6 $\pm$ 0,34 ^{ax}	33,9 $\pm$ 0,37 ^{ax}	33,7 $\pm$ 0,56 ^{ax}
	14	35,6 $\pm$ 0,34 ^{ax}	34,8 $\pm$ 0,37 ^{ax}	33,7 $\pm$ 0,56 ^{ax}
Croma ³	0	28,6 $\pm$ 0,87 ^{ax}	25,0 $\pm$ 0,98 ^{aby}	22,2 $\pm$ 1,62 ^{by}
	5	28,1 $\pm$ 1,00 ^{axy}	29,0 $\pm$ 1,10 ^{ax}	29,7 $\pm$ 1,69 ^{ax}
	8	24,8 $\pm$ 0,87 ^{ayz}	28,3 $\pm$ 0,98 ^{ax}	28,3 $\pm$ 1,62 ^{ax}
	11	23,9 $\pm$ 0,87 ^{bz}	29,3 $\pm$ 0,98 ^{ax}	29,8 $\pm$ 1,62 ^{abx}
	14	24,3 $\pm$ 0,87 ^{bz}	30,9 $\pm$ 0,98 ^{ax}	28,8 $\pm$ 1,61 ^{abx}

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

²Ângulo Hue: ArcoTangente (b*/a*).

³Croma: (a*² + b*²)^{1/2}.

Médias na mesma linha entre tratamentos com letras diferentes (a-b) diferem entre si ($P < 0,05$).

Médias na coluna dentro do mesmo tratamento com letras diferentes (x-z) diferem entre si ($P < 0,05$).

Com relação aos dias de análise (Tabela 12), o valor de L* não sofreu efeito do tempo de estocagem no escuro (até o dia 5; $P > 0,05$). Entretanto, após a exposição à luz ocorreu uma diminuição ($P < 0,05$), que oscilou durante o período de

exposição à luz, apenas nos músculos de pH_f baixo, indicando escurecimento da cor. Os valores de L* não apresentaram aumento nos músculos de pH_f intermediário e alto ($P > 0,05$) durante todo o período de armazenamento. Este fato indica que o lactato de potássio associado à AM com alto O₂ tem efeito melhor na estabilidade deste atributo nestes tratamentos, diferente do observado no pH baixo anteriormente citado.

Com relação aos valores de a*, pode-se observar que no dia 0 os valores não diferiram ($P > 0,05$) entre as três faixas de pH_f. Quanto ao pH_f baixo, houve diminuição ($P < 0,05$) a partir do dia 8, que se manteve estável até o final do tempo de armazenamento. Já no caso dos pH_f intermediário e alto, ocorreu um aumento ($P < 0,05$) nos valores de a*, que pode ser observado a partir do 5º dia de armazenamento até o final do período total, sendo que esses valores se mantiveram sem variação significativa até o final do período de exposição à luz, mostrando que o lactato atuou benéficamente na estabilidade da cor desses dois tratamentos.

Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Kim et al. (2006), Kim et al. (2009a), os quais usaram uma composição de salmoura similar à da presente pesquisa. A maior estabilidade é atribuída ao fato de aumentar a ARM e à potente capacidade antioxidante atribuída à mistura lactato de potássio + tripolifosfato de sódio (KIM et al., 2009a), ambos produtos também utilizados nesta pesquisa.

Resultados semelhantes foram apresentados por Saraiva (2008), o qual comparou músculos *L. dorsi* de três faixas de pH diferentes, denominando-as: normal (pH_f ≤ 5,8); DFD moderado (5,8 < pH_f < 6,2) e DFD (pH_f ≥ 6,2). No estudo feito pela autora citada, apenas no primeiro dia de análise os valores de a* foram similares ($P > 0,05$) para os 3 grupos. Em todos os outros dias, os valores de a* para o grupo “normal” foram menores ($P < 0,05$) que para os outros dois grupos.

Quando se trata da variável b*, os valores para o pH_f baixo não apresentaram variações ($P > 0,05$) ao longo do período de armazenamento. Os grupos de pH_f intermediário e alto apresentaram um aumento ($P < 0,05$) a partir do 5º dia e mantiveram-se estáveis ($P > 0,05$) até o final da exposição de exposição à luz. O que indica que o lactato atuou benéficamente, independente da faixa de pH_f.

O ângulo Hue indica a tonalidade da amostra posicionando-a, de acordo com o valor, no diagrama tridimensional do sistema de cor CIE L*a*b* (AMSA, 2012), a

partir do eixo +a, onde: 0° (vermelho), 90° (amarelo), 180° (verde) e 270° (azul; QUEIROZ et al., 2005). Houve de diferença entre os tratamentos baixo e alto ($P < 0,05$; Tabela 11). A tonalidade do tratamento baixo está mais próxima do amarelo e menos próxima do vermelho do que a cor do músculo de pH alto. Aparentemente, isso ocorreu apenas no 1º dia de análise (dia 0; Tabela 12). Nos outros dias de avaliação não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

O croma é o índice de saturação da amostra, indicando a pureza da cor da amostra (AMSA, 2012). Os valores de croma sofreram variação ($P < 0,05$) nos músculos de pH baixo, ocorrendo diminuição deles, indicando piora na coloração dos músculos. Por outro lado, novamente os pH_f intermediário e alto se comportaram de maneira diferente do pH_f baixo, ocorrendo aumento no croma do dia 0 para o dia 5. Posteriormente, se manteve estável até o final do período de armazenamento, demonstrando novamente o efeito benéfico da injeção do lactato de potássio nesses tratamentos.

No presente trabalho, foi utilizada a atmosfera com alto O₂, que apesar de atuar benéficamente proporcionando uma coloração vermelho-brilhante, pode causar altos índices de descoloração na carne ao longo do período de armazenamento. Grobbel et al. (2008b), ao comparar músculos *L. lumborum* em diferentes sistemas de embalagens, entre eles, atmosferas com alto O₂, observaram alta descoloração dos músculos neste tipo de embalagem, tanto quando feita a análise de cor instrumental quanto na análise sensorial. No entanto, a adição de lactato pode funcionar como alternativa para combater os efeitos negativos deste tipo de atmosfera (CRUZEN et al., 2015).

A presente pesquisa apresenta a estabilização da cor vermelha que ocorreu em parâmetros importantes como os valores de a* e croma, principalmente nos tratamentos de pH_f intermediário e alto, que provavelmente se deve ao fato do lactato de potássio ter servido como substrato para a reposição de NADH, para que ocorresse aumento da ARM (KIM et al., 2006). Este comportamento principalmente nestes dois grupos pode ser devido ao fato da metamioglobina redutase, responsável pela redução da MetaMb para DeoxiMb, que tem seu pH ótimo de 6,5 e ponto isoelétrico entre 5,6 – 5,8 (REDDY; CARPENTER, 1991).

No presente trabalho, o grupo de carnes com pH_f baixo tem valores de pH que se afastam do valor ótimo para ação da enzima. Além disso, Rodríguez et al. (2011), observaram um aumento na ARM em um experimento *in vitro* com MetaMb

equina, quando adicionados de lactato, com uma elevação do pH de 5,1 para 6,1, faixa de pH que entraria na faixa do tratamento de pH intermediário da presente pesquisa.

Os resultados positivos obtidos nos valores de cor instrumental, provavelmente devem-se a uma teoria explicada detalhadamente por Mohan et al. (2010), que utilizaram mitocôndrias isoladas de diferentes músculos, adicionadas de lactato e/ou malato de sódio, propondo um esquema mais detalhado para a redução da MetaMb que ocorre com o uso do lactato (Figura 9). Segundo descrito, transportadores mitocondriais de monocarboxilato (mMCT) são responsáveis por facilitar a entrada do lactato e do piruvato na matriz mitocondrial. O LDH mitocondrial (m-LDH) faz com que o lactato seja oxidado em piruvato, resultando na regeneração *post-mortem* do *pool* de NADH. Esta regeneração, faz com que o potencial de redução da mitocôndria seja alterado, sendo que o NADH produzido é posteriormente oxidado por meio da cadeia de transporte de elétrons, culminando com a redução da MetaMb localizada próximo à parede externa da organela.

Figura 9 - Esquema proposto para as alterações bioquímicas enzimáticas e não enzimáticas de redução da MetaMb (Fonte: MOHAN et al., 2010)

4.7 Pigmentos cárneos

A cor da carne fresca está associada à proporção e distribuição da Mb em três formas químicas: OxiMb (vermelho-brilhante), DeoxiMb (ou Mb reduzida – vermelho-púrpura) e MetaMb (marrom; KIM; HUNT, 2011).

Com relação aos tratamentos, houve diferença ($P < 0,05$; Tabela 13) apenas no percentual de MetaMb, do pH_f baixo com os pH_f intermediário e alto, sendo que o primeiro grupo apresentou maior percentual do que ambos os grupos (29,5; 26,6; 24,1%, respectivamente).

Tabela 13 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para pigmentos cárneos de músculos *L. lumborum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore

Variável	Tratamento ¹			Valor de P		
	Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)	B vs I	B vs A	A vs I
OxiMb ² , %	61,5 $\pm$ 0,92	64,7 $\pm$ 1,12	66,4 $\pm$ 2,16	0,13	0,16	0,77
DeoxiMb ³ , %	8,9 $\pm$ 0,55	8,7 $\pm$ 0,66	9,4 $\pm$ 1,21	0,95	0,94	0,87
MetaMb ⁴ , %	29,5 $\pm$ 0,53	26,6 $\pm$ 0,65	24,1 $\pm$ 1,24	0,02	0,01	0,26

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): $5,4 < \text{pH}_f < 5,8$; intermediário: $5,81 < \text{pH}_f < 6,3$; e alto: $\text{pH}_f > 6,3$.

²Oximoglobina: $100 - (\% \text{MetaMb} + \% \text{DeoxiMb})$

³Deoximioglobina: $\left\{ 2,375 \times \left[1 - \frac{(A_{473} - A_{700})}{(A_{525} - A_{700})} \right] \right\} \times 100$

⁴Metamioglobina: $\left\{ 1,395 - \left[\frac{(A_{572} - A_{700})}{(A_{525} - A_{700})} \right] \right\} \times 100$

Em que: $A = \log \frac{1}{R}$; R = refletância

A OxiMb é o pigmento mais desejável na superfície do músculo, pois confere à carne a coloração vermelho-cereja, que atrai bastante o consumidor. Com relação ao tempo de armazenamento, inicialmente (dia 0; Tabela 14), podemos observar maior percentual de OxiMb no grupo do pH_f baixo, quando comparadas aos músculos dos grupos de pH_f alto ($P < 0,05$).

Ao longo do período de exposição à luz (Tabela 14), o percentual da OxiMb diminui significativamente no grupo de pH_f baixo ($P < 0,05$), enquanto há um aumento ($P < 0,05$) importante no grupo de pH_f alto e estabilização ($P > 0,05$) neste percentual nos pH_f intermediário e alto até o final do período de exposição à luz e um aumento.

Tabela 14 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para pigmentos cárneos avaliados em músculos *L. lumbarum* de diferentes faixas de pH_f de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto oxigênio nos dias 0, 5, 8, 11 e 14

Variável	Dia	Tratamento ¹		
		Baixo	Intermediário	Alto
OxiMb ² , %	0	68,7 $\pm$ 1,06 ^{ax}	64,7 $\pm$ 1,23 ^{abx}	59,1 $\pm$ 2,22 ^{by}
	5	63,2 $\pm$ 1,17 ^{ay}	65,3 $\pm$ 1,33 ^{ax}	69,9 $\pm$ 2,27 ^{ax}
	8	60,8 $\pm$ 1,06 ^{ay}	64,3 $\pm$ 1,23 ^{ax}	69,1 $\pm$ 2,22 ^{ax}
	11	57,7 $\pm$ 1,06 ^{bz}	64,8 $\pm$ 1,23 ^{ax}	67,3 $\pm$ 2,22 ^{ax}
	14	57,2 $\pm$ 1,06 ^{bz}	64,4 $\pm$ 1,23 ^{ax}	66,7 $\pm$ 2,22 ^{ax}
DeoxiMb ³ , %	0	8,2 $\pm$ 0,74 ^{cx}	12,1 $\pm$ 0,83 ^{bx}	19,1 $\pm$ 1,31 ^{ax}
	5	8,0 $\pm$ 0,88 ^{ax}	8,3 $\pm$ 0,95 ^{ay}	5,9 $\pm$ 1,39 ^{ayz}
	8	8,4 $\pm$ 0,74 ^{ax}	7,9 $\pm$ 0,83 ^{ay}	5,5 $\pm$ 1,31 ^{az}
	11	10,2 $\pm$ 0,74 ^{ax}	6,9 $\pm$ 0,83 ^{ay}	8,4 $\pm$ 1,31 ^{ay}
	14	10,0 $\pm$ 0,74 ^{ax}	8,4 $\pm$ 0,83 ^{ay}	8,1 $\pm$ 1,31 ^{ayz}
MetaMb ⁴ , %	0	23,2 $\pm$ 0,63 ^{az}	23,2 $\pm$ 0,73 ^{ay}	21,8 $\pm$ 1,30 ^{ay}
	5	28,7 $\pm$ 0,70 ^{ay}	26,4 $\pm$ 0,79 ^{ax}	24,2 $\pm$ 1,33 ^{ax}
	8	30,8 $\pm$ 0,63 ^{axy}	27,8 $\pm$ 0,73 ^{abx}	25,4 $\pm$ 1,30 ^{bx}
	11	32,0 $\pm$ 0,63 ^{awx}	28,3 $\pm$ 0,73 ^{bx}	24,3 $\pm$ 1,30 ^{bx}
	14	32,8 $\pm$ 0,63 ^{aw}	27,2 $\pm$ 0,73 ^{bx}	25,1 $\pm$ 1,30 ^{bx}

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): 5,4 < pH_f < 5,8; intermediário: 5,81 < pH_f < 6,3; e alto: pH_f > 6,3.

²Oximoglobina: 100 – (% MetaMb + % DeoxiMb)

³Deoximioglobina: $\left\{ 2,375 \times \left[1 - \frac{(A473-A700)}{(A525-A700)} \right] \right\} \times 100$

⁴Metamioglobina: $\left\{ 1,395 - \left[\frac{(A572-A700)}{(A525-A700)} \right] \right\} \times 100$

Em que: $A = \log \frac{1}{R}$; R = reflectância

Médias na mesma linha entre tratamentos com letras diferentes (a-c) diferem entre si ($P < 0,05$). Médias na coluna dentro do mesmo tratamento com letras diferentes (w-z) diferem entre si ($P < 0,05$).

Nos músculos de pH_f intermediário (Tabela 14), podemos observar maior percentual de DeoxiMb no dia 0, que diminui ($P < 0,05$) e se estabiliza ($P > 0,05$) a partir do 5º dia de análise. Concomitantemente, com relação à MetaMb, há menor percentual no dia 0, que aumenta ($P < 0,05$) e se estabiliza ($P > 0,05$) até o final do período de exposição à luz, indicando que, provavelmente, neste tratamento ocorreu a transformação da DeoxiMb para MetaMb.

Quanto ao grupo de pH_f alto, o percentual de DeoxiMb sofreu variação durante o período de armazenamento (Tabela 14), iniciando-se alto (19,1%) e diminuindo ao final do período de exposição à luz (8,1%). Enquanto o percentual de OxiMb, que é o mais desejável, sofreu um aumento e o percentual de MetaMb, que é o indesejável, sofreu uma diminuição, novamente demonstrando que o efeito da adição do lactato de potássio associado à atmosfera com alto oxigênio foi extremamente benéfico neste tratamento.

Li et al. (2012) utilizando *L. lumbarum* em várias atmosferas, incluindo alto O₂ (80% de O₂ e 20% de CO₂) e cálculos dos pigmentos observaram que os

percentuais de MetaMb nesta atmosfera se mantiveram estáveis durante o período de armazenamento (14 dias). Apesar de terem utilizado apenas músculos de $\text{pH}_i < 5,8$, o que se classificaria na faixa de pH_i baixo do presente trabalho, que foi onde este percentual sofreu maior alteração (Tabela 14). Isso pode ser devido ao fato do lactato de potássio ter atuado de forma mais benéfica nos pH_i alto e intermediário, podendo ter prejudicado os músculos de pH_i baixo em consequência da distância do pH destes músculos da faixa ótima da metamioglobina redutase (6,5) (REDDY; CARPENTER, 1991).

4.8 Oxidação lipídica

A qualidade e aceitabilidade de músculos cárneos podem ser afetadas pela oxidação lipídica, sendo um fator limitante neste produto por ocasionar descoloração, perda de peso por gotejamento e desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis (CHAIJAN, 2008).

Neste trabalho, com relação aos tratamentos, pode-se observar que não houveram diferenças nos valores de TBARS.

Tabela 15 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de músculos *L. lumbarum* de diferentes faixas de pH_i de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore

Variável	Tratamento ¹			Valor de <i>P</i>		
	Baixo (B)	Intermediário (I)	Alto (A)	B vs. I	B vs. A	A vs. I
TBARS, mg de MDA/kg de carne	0,91 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,08	0,10	0,23	0,86

¹Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): $5,4 < \text{pH}_i < 5,8$; intermediário: $5,81 < \text{pH}_i < 6,3$; e alto: $\text{pH}_i > 6,3$.

Tabela 16 - Média de quadrados mínimos ($\pm$ EP) para Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de músculos *L. lumbarum* de diferentes faixas de pH_i de 18 animais machos inteiros cruzados Nelore injetados com lactato de potássio, embalados em atmosfera com alto oxigênio nos dias 0, 5 e 14

Variável	Dia	Tratamento ¹		
		Baixo	Intermediário	Alto
TBARS, mg de MDA/kg de carne	0	0,29 $\pm$ 0,11 ^{ay}	0,47 $\pm$ 0,13 ^{ay}	0,54 $\pm$ 0,11 ^{ax}
	5	1,21 $\pm$ 0,11 ^{ax}	0,45 $\pm$ 0,11 ^{by}	0,72 $\pm$ 0,11 ^{ax}
	14	1,24 $\pm$ 0,11 ^{ax}	1,05 $\pm$ 0,11 ^{ax}	0,89 $\pm$ 0,11 ^{ax}

¹ Os tratamentos foram definidos como: baixo (controle): $5,4 < \text{pH}_i < 5,8$; intermediário: $5,81 < \text{pH}_i < 6,3$; e alto: $\text{pH}_i > 6,3$.

Médias na mesma linha entre tratamentos com letras diferentes (a-b) diferem entre si ($P < 0,05$).

Médias na coluna dentro do mesmo tratamento com letras diferentes (x-y) diferem entre si ($P < 0,05$).

Inicialmente (dia 0), o valor de TBARS é maior ($P < 0,05$) no tratamento de pH_f alto, enquanto nos outros dois tratamentos (baixo e intermediário) os valores não diferem entre si ($P > 0,05$; Tabela 16). No entanto, podemos observar que neste grupo (pH_f alto), os valores de TBARS não sofrem variação ($P > 0,05$) até o final do período de experimento (dia 14), mostrando novamente que a atuação do lactato de potássio associada à atmosfera com alto oxigênio foi muito benéfica neste tratamento.

Os resultados de oxidação lipídica (Tabelas 15 e 16) estão de acordo com prévios estudos que avaliaram as propriedades antioxidantes do lactato de potássio em carnes frescas (WANG; BREWER, 1999; KIM et al., 2009a; KIM et al., 2010b). Kim et al. (2010b) analisaram 3 músculos diferentes (*L. lumborum*, *Semimembranosus* e *Adductor*) injetando uma salmoura similar ao presente estudo e embalando em uma atmosfera com alto O₂ (80% O₂ e 20% CO₂). Os autores observaram que o lactato de potássio estabilizou a oxidação lipídica, enquanto no tratamento controle (sem lactato de potássio) e no tratamento com injeção apenas de água houve aumento significativo nos valores de TBARS.

O'Grady, Monahan e Bruton (2001) apontaram relação entre a oxidação lipídica e a oxidação da Mb (formação de MetaMb), onde há uma relação proporcional onde o aumento da oxidação lipídica causa aumento na oxidação do pigmento, em consequência da liberação de radicais livres pela oxidação lipídica, causando aumento na oxidação da OxiMb e descoloração da carne, o que também foi observado no presente trabalho, uma vez que o maior percentual de MetaMb também ocorreu no tratamento de pH_f baixo, onde ocorreu a maior oxidação lipídica.

Ao observar o trabalho de Kim et al. (2010b), em que o tratamento controle apresentava uma faixa de pH semelhante ao grupo de amostras de pH_f baixo (variando de 5,44 a 5,52) e o tratamento com lactato apresentava uma faixa de pH semelhante ao de pH_f intermediário (variando de 5,69 a 5,75), pode-se sugerir a mesma hipótese de que a melhor atuação do lactato de potássio à medida que aumentava o pH, se dá pelo fato de que a proximidade do pH ótimo da metamioglobina redutase faz com que atue melhor como antioxidante tanto quando se trata da oxidação lipídica quanto da oxidação do pigmento da cor.

5 CONCLUSÕES

A adição da solução de lactato de potássio mostrou ser uma estratégia eficaz para melhorar e estabilizar a cor dos músculos *L. lumbarum* sem prejudicar a vida útil em atmosfera modificada com alto oxigênio das faixas definidas como pH_r intermediário e alto, o que pode fazer com que a aparência de bifes provenientes destes músculos seja mais atrativa para o consumidor.

Os músculos de pH_r intermediário alto apresentaram aumento na formação de oximioglobina e diminuição na formação de metamioglobina, sem apresentar alterações na oxidação lipídica ou sensorial, chegando ao final da vida útil com contagem microbiana aceitável.

Em estudos futuros seria interessante verificar a ação da atividade redutora da metamioglobina, bem como a atividade enzimática nas diferentes faixas de pH_r, além disso, a avaliação da maciez instrumental e sensorial e a oxidação proteica nestes músculos permitiria maior abrangência das propriedades da carne que podem influenciar na qualidade e apreciação pelo consumidor final.

REFERÊNCIAS

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Meat Color Measurement Guidelines**. Illinois, 2012. 124p.

ASHMORE, C. R.; PARKER, W.; DOERR, L. Respiration of mitochondria isolated from dark-cutting beef: postmortem changes. **Journal of Animals Science**, Champaign, v. 34, n. 1, p. 46-48, 1972.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 18th ed. Washington, 2005.

BAĞDATLI, A.; KAYAARDI, S. Influence of storage period and packaging methods on quality attributes of fresh beef steaks. **CyTA – Journal of Food**, Reynosa, v. 13, n. 1, p.124-133, 2015.

BEKHIT, A. E. D.; FAUSTMAN, C. Metmyoglobin reducing activity. **Meat Science**, Barking, v. 71, p. 407-439, 2005.

BEKHIT, A. E. D.; GEESINK, G. H.; ILLIAN, M. A.; MORTON, J. D.; BICKERSTAFFE, R. The effects of natural antioxidants on oxidative process and metmyoglobin reducing activity in beef paties. **Food Chemistry**, London, v. 81, p. 175-187, 2003.

BOMAR, M. T. Rapid method for the determination of bacterial surface contamination in carcasses. **Alimenta**, Zurich, v. 24, n. 3, p. 55-57, 1985.

BREWER, M. S.; ROSTOGI, B. K.; ARGOUDELIS, L.; SPROULS, G. K. Sodium lactate/sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n.1, p. 58-62, 1995.

CHAIJAN, M. Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v. 30, n. 1, p.47-53, 2008.

CHIAVARO, E.; ZANARDI, E.; BOTTARI, E.; IANIERI, A. Efficacy of different storage practices in maintaining the physicochemical and microbiological properties of fresh pork sausage. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 19, p. 157-174, 2008.

CRUZEN, S. M.; KIM, Y. H. B.; LONERGAN, S. M.; GRUBBS, J. K.; FRITCHEN, A. N.; HUFF-LONERGAN, E. Effect of early postmortem enhancement of calcium lactate/phosphate on quality attributes of beef round muscles under different packaging systems. **Meat Science**, Barking, v. 101, p. 63-72, 2015.

ECHEVARNE, C; RENERRE, M.; LABAS, R. Metmyoglobin reductase activity in bovine muscles. **Meat Science**, Barking, v. 27, n. 2, p. 161-172, 1990.

FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, London, v. 241, p. 321-325. 1973.

GRAU, F. H. Role of pH, lactate and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative gram-negative bacteria on beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 1043-1050, 1981.

GROBBEL, J. P.; DIKEMAN, M. E.; HUNT, M. C.; MILLIKEN, G. A. Effects of different packaging atmospheres and injection-enhancement on beef tenderness, sensory attributes, desmin degradation, and display color. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2697-2710, 2008a.

GROBBEL, J. P.; DIKEMAN, M. E.; HUNT, M. C.; MILLIKEN, G. A. Effects of packaging atmospheres on beef instrumental tenderness, fresh color stability and internal cooked color. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 1191-1199, 2008b.

HOLDSTOCK, J.; AALHUS, J. L.; UTTARO, B. A.; LÓPEZ-CAMPOS, Ó.; LARSEN, I. L.; BRUCE, H. L. The impact of ultimate pH on muscle characteristics and sensory attributes of the *Longissimus thoracis* within the dark cutting (Canada B4) beef carcass grade. **Meat Science**, Barking, v. 98, p. 842-849, 2014.

HUNTER, D. R.; SEGAL, I. H. Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence of proton or charge gradients as the driving force. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 113, p. 1184-1192, 1973.

HUTCHINGS, J. B. Instrumental specification. In: **Food colour and appearance**. New York: Chapman & Hall, 1994. Chap.7, p.199-237.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE**: Estatística da produção pecuária, Brasília. 2014. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2015.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**, 7th edition. New York: Springer, 2005. 789 p.

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, p. 759-767, 2010a.

KIM, Y. H.; HUFF-LONERGAN, E.; SEBRANEK, J. G.; LONERGAN, S. M. Effects of lactate/phosphate injection enhancement on oxidation stability and protein degradation in early postmortem beef cuts packaged in high oxygen modified atmosphere. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 3, p. 852-858, 2010b.

KIM, Y. H.; HUNT, M. C. Advance technology to improve meat color. In.: JOO, S. T. (Ed.) **Control of meat quality**. India: Research Signpost, 2011. p. 31-60.

KIM, Y. H.; HUNT, M. C.; MANCINI, R. A.; SEYFERT, M.; LOUGHIN, T. M.; KROPF, D. H.; SMITH, J. S. Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef. **Journal of Food Chemistry**, v. 54, p. 7856-7862, 2006.

KIM, Y. H.; KEETON, J. T.; SMITH, S. B.; MAXIM, J. E.; YANG, H. S.; SAVELL, J. W. Evaluation of antioxidant capacity and color stability of calcium lactate enhancement on fresh beef under highly oxidizing condition. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 1, p. 272-278, 2009a.

KIM, Y. H.; KEETON, J. T.; YANG, H. S.; SMITH, S. B.; SAWYER, J. E.; SAVELL, J. W. Color stability and biochemical characteristics of bovine muscle when enhanced with L- or D-potassium lactate in high-oxygen modified atmospheres. **Meat Science**, Barking, v. 82, p. 234-240, 2009b.

KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; KUEHN, L. A.; KEMP, C. M.; RODRIGUEZ, A. B.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L. Contribution of genetic influences to animal-to-animal variation in myoglobin content and beef lean color stability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 1160-1167, 2010.

KNOCK, R. C.; SEYFERT, M.; HUNT, M. C.; DIKEMAN, M. E.; UNRUH, J. A.; HIGGINS, J. J.; MONDEREN, R. A. Effects of potassium lactate, sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium acetate on colour, colour stability, and oxidative properties of injection enhanced beef rib steaks. **Meat Science**, Barking, v. 74, p. 312-318, 2006.

KROPF, D. H. Colour stability: factors affecting the colour of fresh meat. **Meat Focus International**, Wallingford, v. 1, p. 269-275, 1993.

LANARI, M. C.; CASSENS, R. G. Mitochondrial activity and beef muscle color stability. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, p. 1476–1479, 1991.

LAWRENCE, T. E.; DIKEMAN, M. E.; HUNT, M. C.; KASTNER, C. L.; JOHNSON, D. E. Effects of calcium salts on beef longissimus quality. **Meat Science**, Barking, v. 64, p. 299-308, 2003.

LAWRIE, R. A. The eating quality of meat. In: LAWRIE, R. A.; LEDWARD, D. A. (Ed.) **Lawrie's Meat Science**. 7th ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1966. p. 270-322.

LEDWARD, D. A. Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. **Meat Science**, Barking, v. 15, n. 3, p. 149-171, 1985.

LEVY, M. J.; LIVINGSTON, D. J.; CRIDDLE, R. S.; BROWN, W. D. Isolation and characterization of metmyoglobin reductase from yellowfin tuna (*Thunnus Albacares*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 81, p. 809-814, 1985.

LI, X.; LINDAHL, G.; ZAMARATSKAIA, G.; LUNDSTRÖM, K. Influence of vacuum skin packaging on color stability of beef *longissimus lumborum* compared with vacuum and high-oxygen modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Barking, v. 92, p. 604-609, 2012.

LIVINGSTON, D. J.; BROWN, W. D. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technology**, Chicago, v. 35, p. 244-252, 1981.

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

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

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

MANCINI, R. A.; RAMANATHAN, R. Sodium lactate influences myoglobin stability in vitro. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 529-532, 2008.

McMILLIN, K. W. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. **Meat Science**, Barking, v. 80, n. 1, p. 43-65, 2008.

MOHAN, A.; HUNT, M. C.; MUTHUKRISHNAN, S.; BARSTOW, T. J.; HOUSER, T. A. Myoglobin redox form stabilization by compartmentalized lactate and malate dehydrogenases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 7021-7029, 2010.

O'KEEFFE, M; HOOD, D. E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. **Meat Science**, Barking, v. 7, n. 3, p. 209-228, 1982.

O'GRADY, M. N.; MONAHAN, F. J.; BRUNTON, N. P. Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle – mechanistic studies. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 386-392, 2001.

O'SULLIVAN, M. G.; FLOCH, S. L.; KERRY, J. P. Resting of MAP (modified atmosphere packed) beef steaks prior to cooking and effects on consumer quality. **Meat Science**, Barking, v. 101, p. 13-18, 2015.

PAPPAS, P. A.; DEPUY, V. An overview of non-parametric tests in SAS®: when, why and how. **Duke Clinical Research Institute**, Durham, paper TU04, p. 1-5, 2004.

PARAMITHIOTIS, S.; SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Insights into fresh meat spoilage. In: TOLDRA, F (Ed.). **Safety of meat and processed meat**. New York: Springer, 2009. p. 55-82.

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.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; MITTERER, M. L.; GOLDBECK, R.; PINTO, L. A. A.; TREPTOW, R. O. Avaliação da cor da cianobactéria *Aphanethece microscopica năgeli* em diferentes condições de secagem. **Vetor**, Rio Grande, v. 15, n. 1, p. 33-40, 2005.

RAMANATHAN, R.; MANCINI, R. A.; KONDA, M. R. Effects of lactate on beef heart mitochondrial oxygen consumption and muscle darkening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1550-1555, 2009.

REDDY, I. M.; CARPENTER, C. E. Determination of metmyoglobin reductase activity in bovine skeletal muscles. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, p. 1161-1164, 1991.

RENERRE, M. Review: factors involved in the discoloration of beef meat. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 25, p. 613-630, 1990.

RENERRE, M.; LABAS, R. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. **Meat Science**, Barking, v. 19, n. 2, p. 151-165, 1987.

ROBACH, D. L.; COSTILOW, R. N. Role of bacteria in the oxidation of myoglobin. **Applied Microbiology**, Washington, v. 9, p. 529-533, 1961.

RODRÍGUEZ, G.; KIM, Y. H. B.; FAGET, S.; ROSAZZA, C.; KEETON, J. T. Lactate-mediated enzymatic reduction of metmyoglobin *in vitro*. **Food Chemistry**, London, v. 125, p. 732-735, 2011.

RUIZ, M. R.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V.; HERNANDEZ, J. A.; RIBEIRO, E. L. de A.; SHIMOKOMAKI, M.; REEVES, J. J.; SOUZA, N. E. de. Proximate chemical composition and fatty acid profiles of *Longissimus thoracis* from pasture fed LHRH immunocastrated, castrated, and intact *Bos indicus* bulls. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 35, n. 1, p. 13-18, 2005.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Histochemical properties of fibre types in muscles of wild and domestic pigs and the effect of growth rate on muscle fibre properties. **Meat Science**, Barking, v. 67, n. 3, p. 533-539, 2004.

SAMMEL, L. M.; HUNT, M. C.; KROPF, D. H.; HACHMEISTER, K. A.; JOHNSON, D. E. Comparison of assays for Metmyoglobin Reducing Ability in beef inside and outside semimembranous muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 978-984, 2002.

SALMOND, C. V.; KROLL, R. G.; BOOTH, I. R. The effects of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, p. 2845-2850, 1984.

SARAIVA, C. M. T. **Influência do pH final e do tipo de embalagem na conservação de carne de bovino da raça Maronesa**: parâmetros microbiológicos, físico-químicos, sensoriais e fração volátil. 2008. 297p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2008.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: guide of personal computers. Version 9.3. Cary, 2015.

SEYFERT, M.; HUNT, M. C.; GROBBEL, J. P.; RYAN, S. M.; JOHNSON, D. E.; MONDEREN, R. A. Potassium lactate and fresh-pork-sausage formulation effects on shelf life in lighted and unlighted display. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 7, 2006.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.5, p.445-450, 1994.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

SØRENSEN, G.; JØRGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, New York, v. 2002, p. 205-210, 1996.

SMITH G. C.; BELK, K. E.; SOFOS, J. N.; TATUM, J. D.; WILLIAMS, S. N. Economic implications of improved color stability in beef. In: DECKER, E. A.; FAUSTMAN, C.; LOPEZ-BOTE, C. J. **Antioxidants in muscle foods**: nutritional strategies to improve quality. New York: Wiley-Interscience, 2000. chap. 15, p. 397-426.

SMITH, G. C., MORGAN, J. B.; SOFOS, J. N.; TATUM, J. D.; SCHMIDT, G. R. Vitamin E and meat quality. **Proceedings of Victam International Symposium From Feed to Food**, Utrecht, The Netherlands, p. 105-115, 1995.

SUMAN, S. P.; MANCINI, R. A.; RAMANATHAN, R.; JOSEPH, P. Improving meat color and color stability. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 6., 2011, São Pedro. **Anais...** Campinas: ITAL/CTC, 2011. p. 177-183.

TANG, J.; FAUSTMAN, C.; HOAGLAND, T. A.; MANCINI, R. A.; SEYFERT, M. HUNT, M. C. Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p.1223–1230, 2005.

TROY, D. J.; KERRY, J. P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. **Meat Science**, Barking, v. 86, p. 214-226, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, Washington – DC, October, 2014. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2015.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4ª ed., Campinas, 2011.

VENTURINI, A. C. **Embalagens de transporte (Masterpack) com atmosfera modificada e absorvedores de oxigênio para aumento da vida útil de carne bovina**. 2003. 103p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, Leinfelden-Echterdingen, v. 72, p. 1084-1087, 1970.

VYNCKE, W. Evaluation of direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette Seifen Anstrichmittel**, Leinfelden-Echterdingen, v. 77, p. 239-240, 1975.

WANG, C; BREWER, M. S. Sodium lactate/sodium polyphosphate effects on oxidation in precooked frozen pork patties. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 10, n. 2, p. 147-162, 1999.

YU, L. P.; LEE, Y. B. Effects of postmortem pH and temperature muscle structure and meat tenderness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 3, p. 774-780, 1986.