UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANNELISE AILA GOMES LOBO

**Estudo da relação entre indicadores de estresse pré-abate com
características qualitativas e metabolismo muscular pós-morte
de bovinos terminados a pasto**

Pirassununga

2019

ANNELISE AILA GOMES LOBO

**Estudo da relação entre indicadores de estresse pré-abate com
características qualitativas e metabolismo muscular pós-morte
de bovinos terminados a pasto**

(VERSÃO CORRIGIDA)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L799e Lobo, Annelise Aila Gomes
 Estudo da relação entre indicadores de estresse
 preabate c/ características qualitativas e
 metabolismo muscular posmorte de bovinos terminados
 a pasto / Annelise Aila Gomes Lobo; orientador Saulo
 da Luz e Silva. -- Pirassununga, 2019.
 47 f.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
 em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. corte escuro. 2. cortisol. 3. pastagem. 4.
 pH. 5. potencial glicolítico. I. Silva, Saulo da Luz
 e, orient. II. Título.

ANNELISE AILA GOMES LOBO

Estudo da relação entre indicadores de estresse pré-abate com características qualitativas e metabolismo muscular pós-morte de bovinos terminados a pasto

(VERSÃO CORRIGIDA)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data de aprovação: 27 / 02 / 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva – Instituição: USP/Pirassununga – SP
(Presidente da banca examinadora)

Prof. Dr. Domingos Marcelo Cenachi Pesce – Instituição: PUC/Poços de Caldas - MG

Prof.(a) Dr.(a) Marina de Nadai Bonin Gomes – Instituição: UFMS/Campo Grande - MS

Prof.(a) Dr.(a) Polyana Pizzi Rotta – Instituição: UFV/Viçosa - MG

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Annelise Aila Gomes Lobo – nascida em 19 de junho de 1989, na cidade de Ibiá/MG - Brasil, filha de Andrea Cristina Gomes e Harley Hyley Lobo Dias. Em janeiro de 2015, concluiu a graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa. Durante sua graduação foi bolsista de extensão (PROEXT), estagiária no Laboratório de Nutrição Animal/Setor de Ruminantes, estagiária na empresa Agroceres Nutrição Animal e também foi bolsista do Departamento de Agricultura e Pecuária de Viçosa (MG). Atuou como Diretora Administrativa do Centro Acadêmico de Zootecnia e trainee da Empresa Júnior de Zootecnia. Possui experiência em manejo de sistemas agroflorestais, silvipastoris, avaliação de fontes alternativas para a alimentação de bovinos, análise bromatológica, avaliação química e física de carcaça bovina, manejo nutricional de gado de leite e gado de corte, qualidade de produtos de origem animal e assistência direta ao produtor rural. Foi *trainee* na empresa Siemers Holstein Farm, Inc. na cidade de Newton, estado de Wisconsin nos Estados Unidos da América (2015-2016) pela University of Minnesota através do Minnesota Agricultural Student Trainee Program (MAST). Participou da prática profissionalizante: Produção de Bovinos de Leite, um programa da pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) e atualmente é Mestranda em Qualidade e Produtividade Animal pela Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) e cumpre desde 2017 Estágio Supervisionado em Docência nas áreas de bem-estar animal e biologia molecular.

DEDICATÓRIA

À minha mãe ANDREA pelas incansáveis batalhas e conquistas para fazer com que eu chegasse até aqui e além; aos meus avós NIRMA e JOÃO pela educação, ao meu irmão ARTHUR pelo exemplo de persistência, aos meus tios PAULO GOMES e ANDRÉIA pela inspiração e muito incentivo, ao amor da minha vida, DANIELE por todo o amor dedicado todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao grandioso Deus e à incansável fé que me guia todos os dias.

À família Gomes e Lobo pela sólida base na qual pude me sustentar para subir cada degrau das conquistas em minha vida.

Aos sábios mestres pelos ensinamentos sem os quais seria impossível evoluir e crescer perante tantos desafios.

Ao meu querido professor e orientador Saulo por acreditar no meu potencial e dedicar a mim trabalhos por meio dos quais conheci pessoas com quem pude aprender e com isso crescer cada vez mais.

À Professora Luciane pela leveza, boas energias e também por ter confiado a mim um trabalho donde veio vários aprendizados e realizações.

Ao Thiago Neto pela parceria e por acreditar na confiabilidade do meu trabalho.

Ao professor Heidge e ao LOCT por me ensinar a pensar e agir de uma forma mais evoluída perante toda e qualquer situação.

À equipe LAAQC pela persistência em nossos experimentos e incansável dedicação a este trabalho, em especial aos meus colegas que tanto me ajudaram aos quais dedico a minha gratidão: Nara, Mariane, Juan, Daniel e Bruna.

À minha antiga colega Taiane pela positividade e à minha querida Tamy pelas palavras de incentivo e pelo árduo trabalho dedicado.

À minha querida amiga Ju Silva pelas orações e pela amizade essencial nesta difícil etapa.

Aos estagiários pelo esforço e dedicação aos nossos experimentos.

Aos funcionários que trabalham duro para que nossos experimentos possam se realizar.

À Fernanda Altieri, por ter me mostrado um caminho o qual fez eu chegar até aqui.

À minha sempre e querida amiga professora Polyana Rotta por ter valorizado o meu trabalho e que por meio deste me fez ter uma conquista como esta. Sou e serei eternamente grata a você, Poly!

Aos amigos e professores de Viçosa. Levarei seus ensinamentos por toda a minha vida.

À UFV pela minha ética formação.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos que sempre oferece o melhor para a realização de cada etapa.

À FRIGOL pela doação de amostras e por abrir suas portas para que fizéssemos nossos experimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Às minhas eternas amigas Andrea, Luiza, Raissa e Sarah pela fiel amizade.

À Família (que agora é minha família) que me acolheu com tanto carinho: Dayse, Douglas, Deividi, Vó Laura e Vô Zé.

Aos queridos amigos de Rio Claro que me proporcionaram momentos de sabedoria e reflexão.

Ao meu querido Robson pelos ótimos momentos.

Aos colegas Thiago e Iuli pelas ótimas conversas.

À minha enorme trupe de peso: Caio, Thales, Leo, João, Érika, Drika, Wendel, Sodré, Raul, Paulinho, André, Gustavo e Paulo, por proporcionar sempre momentos inesquecíveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que, de qualquer forma, contribuiu com o presente trabalho o meu MUITO OBRIGADA!

“Tudo é ousado para quem nada se atreve”

Fernando Pessoa

RESUMO

LOBO, A. A. G. **Estudo da relação entre indicadores de estresse pré-abate com características qualitativas e metabolismo muscular pós-morte de bovinos terminados a pasto**. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre indicadores de estresse pré-abate com características de qualidade e metabolismo pós-morte de bovinos terminados em pastagem. Foram colhidas amostras do músculo *Longissimus de* 55 bovinos da raça Nelore (*bos indicus*), não castrados, terminados exclusivamente em pasto. Do total de animais abatidos, foram selecionadas 29 carcaças, de acordo com o pH e classificadas em dois tratamentos: DFD ($\text{pH} \leq 5.8$; $n=13$) e normal ($\text{pH} > 5.8$; $n=16$). Durante a sangria, foram colhidas amostras de sangue para as análises de cortisol e de lactato plasmáticos. Foram colhidas amostras do músculo *Longissimus thoracis* no dia do abate para as análises de metabólitos e pH e 48h após foram retirados dois bifes de 2,5 cm de espessura cada um, para análises instrumentais de qualidade de carne após 0 ou 14 dias de maturação. Não foi observada diferença entre os tratamentos para lactato e cortisol sanguíneos. O pH reduziu com o tempo pós-morte para ambos o tratamentos, porém o tratamento DFD apresentou maiores valores em relação a carne com pH normal. Foi observada uma interação entre os tratamentos e os tempos avaliados para glicogênio ($P = 0,006$), lactato ($P < 0,0001$), G-6-P ($P < 0,0001$) e glicose ($P < 0,0001$). A concentração de glicogênio diminuiu ao longo do tempo. Os valores de perdas por cocção e força de cisalhamento foram maiores para o tratamento DFD ($P = 0,01$). Com relação à cor, foi observado maiores valor de L^* ($P = 0,01$) e b^* ($P = 0,01$) para carne DFD. O valor de a^* foi maior para a carne normal na carne não maturada, porém após 14 dias o tratamento DFD apresentou maior valor. Foram observadas maiores concentrações de glicogênio muscular nos tempos 8h e 24h, assim como maiores valores de glicose, glicose-6-fosfato e menores concentrações de lactato para o tratamento DFD ($P < 0,01$). Os indicadores de estresse pré-abate não foram adequados para diferenciar carnes pelo pH final. Diferenças nos valores de pH final não recapitulam o mecanismo esperado de cortes mais escuros para as amostras de alto pH, enquanto que os metabólitos foram associados com diferenças encontradas no pH final, porém o mecanismo responsável por essa diferença não foi determinado.

Palavras-chave: corte escuro, cortisol, pastagem, pH, potencial glicolítico, qualidade de carne.

ABSTRACT

LOBO, A. A. G. **Study of the relationship between pre-slaughter stress indicators with qualitative characteristics and postmortem muscle metabolism of beef cattle**. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The objective of the present study was to evaluate the relationship between pre-slaughter stress indicators with quality characteristics and post-mortem metabolism of cattle grazing. Samples of the *Longissimus* muscle were collected from 55 Nellore (*Bos indicus*) bovines, non-castrated, exclusively grassfed. From the total of slaughtered animals, 29 carcasses were selected according to pH and classified into two treatments: DFD (pH $\leq$ 5.8, n = 13) and normal (pH > 5.8, n = 16). During slaughter, blood samples were collected for plasma cortisol and lactate analyzes. Samples of the *Longissimus thoracis* muscle were collected on the day of slaughter for metabolite and pH analyzes and 48 hours after two steaks of 2.5 cm thickness were removed for instrumental analyzes of meat quality after 0 or 14 days of maturation. No difference was observed between treatments for blood lactate and cortisol. The pH reduced with the time after death for both treatments, however the DFD treatment presented higher values in relation to the meat with normal pH. It was observed an interaction between the treatments and the times evaluated for glycogen (P = 0.006), lactate (P < 0.0001), G-6-P (P < 0.0001) and glucose (P < 0.0001). The glycogen concentration decreased overtime. The values of cooking losses and shear force were higher for DFD treatment (P = 0.01). Regarding color, a higher value of L * (P = 0.01) and b * (P = 0.01) was observed for DFD meat. The value of a * was higher for normal meat in the unmated meat, but after 14 days the DFD treatment presented higher value. Higher concentrations of muscle glycogen were observed in 8h and 24h times, as well as higher glucose, glucose-6-phosphate and lower lactate concentrations for DFD treatment (P < 0.01). The pre-slaughter stress indicators were not adequate to differentiate meats by the final pH. Differences in the final pH values did not recapitulate the expected mechanism of darker cuts for the high pH samples, while the metabolites were associated with differences found in the final pH, but the mechanism responsible for this difference was not determined.

Keywords: cortisol, dark cutting, glycolytic potential, meat quality, pasture, pH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostra do músculo Longissimus com coloração escura (anormal – esquerda) ou normal (direita)	21
Figura 2 - Médias dos valores de pH avaliado 48h após o abate de acordo com os tratamentos.....	33
Figura 3 - Média dos valores do croma a^* de em função do tratamento e tempo de maturação	35
Figura 4 - Valores médios do pH muscular avaliado no sistema in vitro, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.....	36
Figura 5 - Valores médios das concentrações de glicogênio muscular avaliado no sistema in vitro, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.....	37
Figura 6 - Valores médios das concentrações de glicose muscular avaliado no sistema in vitro, em função dos tratamentos e tempo de avaliação	37
Figura 7 - Valores médios das concentrações de glicose-6-fosfato muscular avaliado no sistema in vitro, em função dos tratamentos e tempo de avaliação...	38
Figura 8 - Valores médios das concentrações de lactato muscular avaliado no sistema in vitro, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidade ($Pr > F$) dos valores de cortisol e lactato plasmáticos, em função dos tratamentos.....	33
Tabela 2 - Médias, erro padrão da média ($\pm$) e probabilidade ($Pr > F$) dos valores de cortisol e lactato plasmáticos, em função dos tratamentos	34

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

a* - intensidade de vermelho

ADP – adenosina difosfato

b* - intensidade de amarelo

CRA – capacidade de retenção de água

CS – citrato cintase

DFD – escura, dura e seca

DC – dark cutting

FC – força de cisalhamento

G-6-F – Glicose-6-fosfato

LT – *Longissimus thoracis*

PFK – fosfofrutoquinase

PPC – perdas de peso por cocção

WBSF – Warner-Bratzler Shear Force

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	ATRIBUTOS DE QUALIDADE DE CARNE	20
2.2	COR	21
2.3	MACIEZ	23
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVO	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	ANIMAIS, SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS	28
5.2	ANÁLISES INSTRUMENTAIS DE QUALIDADE DE CARNE	29
5.2.1	AVALIAÇÕES DA COR	29
5.2.2	PERDAS POR COCÇÃO E FORÇA DE CISALHAMENTO	29
5.3	ANÁLISES DAS CARACTERÍSTICAS SANGUÍNEAS	30
5.3.1	CORTISOL E LACTATO	30
5.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	30
5.4.1	GLICÓLISE IN VITRO	30
5.4.2	MENSURAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (ph)	31
5.4.3	AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS	31
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	31
7	RESULTADOS	29
7.1	pH 48 HORAS	33
7.2	VARIÁVEIS SANGUÍNEAS	33
7.3	QUALIDADE DA CARNE	34
7.4	pH E METABÓLITOS IN VITRO	35
8	DISCUSSÃO	39
9	CONCLUSÃO	42

1 INTRODUÇÃO

A indústria da carne gera grande parte dos recursos financeiros do setor agroindustrial. Com o constante aumento da demanda dos consumidores por produtos de maior qualidade, é fundamental a melhoria das características qualitativas da carne para que possa alcançar mercados mais exigentes e capazes de pagar um melhor preço. As diferenças nas características qualitativas, como cor, odor, podem ser reflexos de alterações sistemáticas na composição e condição do tecido muscular, além de outros fatores relacionados ao sistema de produção.

A produção de carcaças com pH elevado (≥ 5.8), que levam a uma carne de coloração mais escura, também conhecida como carne DFD (do inglês *dark, firm and dry*) ou corte escuro - *dark cutting* (DC), é um dos principais problemas enfrentados pela indústria da carne bovina, pois produtos com essa aparência são rejeitados pelos consumidores, que normalmente à associam essa característica a um produto de má qualidade.

Esse problema tem sido normalmente associado ao sistema de terminação a pasto e ao estresse pré-abate, que estão relacionados a baixas reservas glicogênio muscular antes do abate, que resultam na queda inadequada do pH. O alto valor do pH final das carcaças, além de resultar em uma carne mais escura, também torna o produto mais susceptível às alterações microbianas, reduzindo assim sua vida útil.

Devido ao impacto que a cor tem sobre o valor do produto, funcionalidade e aceitação do consumidor e a grande disparidade nos mecanismos que dão origem à carne escura e DFD, a compreensão das bases bioquímicas e moleculares para o desenvolvimento da carne escura deve ser mais explorada. Embora os animais terminados à base de forragens produzam carne escura, nem sempre esse fato recapitula a bioquímica subjacente ao DFD e, portanto, pode resultar de alterações no músculo em resposta a diferentes paradigmas de produção.

Desta forma, é importante entender como diferentes fatores estão relacionados com a qualidade da carne, visando propor alternativas para solucionar este problema.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ATRIBUTOS DE QUALIDADE DE CARNE

A carne é um alimento fundamental na dieta humana, devido ao seu alto valor nutricional. Além disso, os consumidores estão em busca de alimentos que atendam suas expectativas quanto a experiência sensorial e de segurança alimentar. No mercado globalizado, a satisfação total das exigências dos consumidores não é opcional, e sim requisito básico para o crescimento e desenvolvimento de qualquer organização.

A qualidade da carne é influenciada por uma série de fatores pré e pós-abate, que afetam, isoladamente ou em conjunto, características como maciez, cor, sabor e suculência, entre outros.

Em condições normais, os animais utilizam processos biológicos para manter o organismo em equilíbrio, ou seja, dentro de limites estreitos de variação, onde os processos vitais apresentam melhor desempenho. Esse processo é chamado de homeostasia. Durante o processo de abate dos animais, após a sangria, uma grande quantidade de sangue é perdida, causando um desequilíbrio no funcionamento normal do organismo, que desencadeia uma série de processos biológicos que visam manter a homeostasia.

A interrupção da circulação sanguínea, que era responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos para produção de energia, desencadeia o processo de produção anaeróbico de energia e continua a sintetizar e utilizar ATP através do glicogênio e compostos de fosfato de alta energia armazenados no músculo, resultando na produção de energia (ATP), ácido lático e H^+ . O acúmulo dos ions H^+ no tecido muscular, leva a uma redução gradual do pH (ENGLAND et al. 2013), até que as reservas de glicogênio muscular se esgotem e todo o processo seja paralizado, quando ocorre então, o estabelecimento do *rigor mortis*. Esse processo é conhecido como transformação do músculo em carne.

Em condições normais o pH cai até atingir valores entre 5,6 a 5,8 resultando em uma carne de coloração vermelha cereja brilhante, a qual os consumidores associam a um produto de qualidade (TARRANT, 1989; SAWYER et al., 2009).

Por outro lado, quando um animal é submetido a circunstâncias estressantes no período pré-abate, há uma rápida resposta de luta-ou-fuga, o que resulta em

depleção de glicogênio muscular, causando alto pH final na carne (LACOURT e TARRANT, 1985 apud LU, 2018). Da mesma forma, animais terminados em pastagem apresentam menores reservas de glicogênio muscular em comparação à animais confinados (GERRARD, 2016), que em última instância, implicam em uma pequena queda do pH muscular no período pós-abate.

Elevados valores de pH da carne ($> 5,8$) estão relacionados a uma maior retenção de água, coloração mais escura e menor vida útil, além de ser associada, pelos consumidores, a um produto de menor maciez.

Em função do impacto que essas características exercem sobre a cadeia produtiva da carne, é importante a compreensão das bases bioquímicas e moleculares envolvidas na cor e maciez da carne de animais produtores de carne

2.2 Cor

Segundo Lawrie (2005) no momento da decisão da compra do produto o consumidor avalia vários atributos, sendo a cor um dos principais, pois está associada com o frescor e qualidade da mesma (FAUSTMAN e CASSENS 1990; PONNAMPALAM et al., 2017). Em um segundo momento, após a compra a decisão de voltar a consumi-lo é influenciada por fatores como sabor, suculência, maciez, experimentadas durante o processo de preparo e consumo.

As diferenças de coloração observadas na carne são reflexos da interação de diversos fatores como espécie, sexo, idade do animal, estresse pré-abate, forma de resfriamento das carcaças, sistema de terminação, queda do pH e pH final da carne, embalagem, entre outros. (Abril et al., 2001; Mancini e Hunt, 2005).

A cor da carne está relacionada à concentração de pigmentos (principalmente mioglobina) dentre outros, como o potencial antioxidante (principalmente vitaminas e carotenóides), a estrutura das fibras e ao estado físico das proteínas musculares e ao tipo e nível de gordura intramuscular (BEKHIT e FAUSTMAN, 2005; BODAS et al., 2007; PONNAMPALAM et al., 2012a).

A taxa de declínio de pH e a temperatura, durante o desenvolvimento do rigor, são dois dos mais importantes fatores *post mortem* que afetam as características de qualidade da carne, como a cor e a maciez (MARSH et al., 1981; MANCINI e HUNT, 2005; SAVELL et al., 2005; THOMPSON et al., 2006; HUFF- LONERGAN e LONERGAN, 2007; KIM e HUNT, 2011, apud KIM, 2014).

Elevados valores de pH da carne ($> 5,8$) faz com que o estado das proteínas miofibrilares fique acima do seu ponto isoelétrico, levando a uma maior retenção de água no músculo e, conseqüentemente, uma maior compactação das fibras musculares, resultando em uma cor mais escura (ABRIL et al., 2001). Dessa forma, a água se mantém dentro da célula, associada às proteínas miofibrilares, fazendo com que a luz incidente seja pouco refletida conferindo uma aparência escura à carne, uma vez que a estrutura da carne confere às suas habilidades em absorver e, ou, dispersar a luz incidente (RAMOS & GOMIDE, 2017). Esse tipo de carne aumenta os riscos de contaminação bacteriana, diminuindo a vida de prateleira e a capacidade de transformação industrial.

A carne caracterizada como DFD tem uma cor escura a preta (MILLER et al., 2007), como mostrado na figura 1.

Figura 1: Amostra do músculo Longissimus com coloração escura (anormal – esquerda) ou normal (direita). Fonte: acervo pessoal.

O espaço $L^* a^* b^*$ - também conhecido como CIELAB, foi desenvolvido pelo CIE em 1976 e é muito utilizado em todas as áreas onde a mensuração de cor é necessária. Neste espaço, L^* indica luminosidade e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade, onde o eixo $-a^* \text{-----} +a^*$ vai de verde a vermelho, e $-b^* \text{-----} +b^*$ vai de azul a amarelo. Em cada uma dessas direções (eixos a e b), quando se caminha para as extremidades tem-se maior saturação da cor (FELICIO, 1999), além do espaço DE^* , onde tem-se a diferença total da cor.

A oxidação do pigmento de oximioglobina leva à redução em ambas as coordenadas a^* e b^* , porém com aumento nos valores de L^* .

A oxidação do pigmento que dá cor à carne, a mioglobina, provoca a descoloração da carne devido à formação do pigmento metamioglobina de cor marrom indesejável. Assim, os valores desejáveis da cor de uma carne normal se dizem de $a^*=24,02$; $b^*=17,59$ e $L^*=39,92$ (RAMOS E GOMIDE, 2017).

2.3 MACIEZ

Segundo Sañudo (2004), os valores de maciez mudam com a maturação; e maturação compreende uma série de fenômenos bioquímicos e físico-químicos que ocorrem com o armazenamento refrigerado da carne e que conduzem à melhoria progressiva da sua qualidade, especialmente da maciez. Uma vez que as propriedades mecânicas do colágeno não parecem ser significativamente alteradas no período *post mortem*, o aumento da maciez é devido a modificações bioquímicas e ultraestruturais do componente miofibrilar, sendo o mecanismo de natureza enzimática o principal responsável pela maturação *post mortem* (RAMOS e GOMIDE, 2017).

Koohmaraie (1995), estudando diferentes raças de bovinos, observaram que aproximadamente 46% das variações na maciez da carne são por causa da genética, enquanto que 54% das variações são explicadas pelo efeito de ambiente. Quando a análise é feita dentro de uma mesma raça, a genética explica 30% das variações na maciez, enquanto que 70% são dependentes do efeito de ambiente.

Dentro dos fatores que modificam a qualidade da carne, o sexo encontra-se como um dos principais (ESTRADA, 2014). Berg e Butterfield (1976) indicaram que o desenvolvimento dos componentes corporais dos bovinos é diferente conforme ao sexo. Segundo Di Marco (1994), as carcaças de machos são mais pesadas que as provenientes de fêmeas por ter maior velocidade de crescimento causado principalmente pela concentração de testosterona que reflete numa maior quantidade de deposição de proteínas.

Em um estudo realizado em diversos países da Europa avaliando carcaças bovinas, foi notada diferença na ocorrência de carne DFD entre diferentes sexo e idade; encontrando-se de 1 a 5% para novilhos e novilhas, de 6 a 10% para vacas e, de 11 a 15% para machos adultos não-castrados; resultados que pode ser devido ao estresse ocasionado pelo abate, sendo maior em machos (ROÇA, 2001).

O transporte é um dos estressores mais comuns experimentados pelo gado, especialmente com o aumento do movimento nacional e internacional de animais.

Uma observação frequente após o transporte é um aumento transitório da concentração de cortisol no sangue. Muitos fatores podem contribuir para essa resposta ao estresse, incluindo interações homem-animal imediatamente antes e depois do transporte (CHEN et al., 2015).

Nos animais submetidos ao estresse antes do abate, as reservas de energia (glicogênio) serão utilizadas e após o abate não haverá uma queda normal do pH, ocasionando carne DFD (LUCHIARI FILHO, 2000).

O estresse induz a mudança na secreção de hormônios no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, gerando alterações metabólicas, endócrinas, alterações na resposta imunológica e no comportamento dos animais. O eixo tem início no hipotálamo, responsável pela liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez estimula a adrenal a produzir e secretar cortisol (MCDONALD, 1989; RANDALL et al., 2000). O nível de cortisol eleva-se rapidamente após aplicação de estímulos estressantes e caracteriza-se como um excelente indicador de estresse agudo (RANDALL et al., 2000).

Por conseguinte, alguns métodos clássicos para o estudo do estresse nos bovinos consistem em submetê-los ao transporte em caminhões, reagrupá-los em novos currais e lotes e mensurar a elevação dos níveis séricos de cortisol, adrenalina e noradrenalina (KENNY e TARRANT, 1987). Em se tratando de transporte é preciso levar em conta que o tempo total da viagem, desde o embarque até o desembarque, não deve ultrapassar 12 horas. Em viagens com duração maior que 12 horas os animais devem ser desembarcados, oferecendo um local adequado para que descansem, além de alimento e água à vontade (MAPA, 2013)

O transporte e o manejo dos animais estimulam um aumento no cortisol circulante (COCKRAM e CORLEY, 1991). Esta observação é consistente com as descobertas relatadas de outros eventos coincidentes conduzidos pelo cortisol em bovinos transportados, como respostas de linfócitos neutrofílicos e respostas estimuladas por outros hormônios indicativos de estresse, tais como beta-endorfina e tiroxina (SCOTT; SCHAEFER; JONES; MEARS e STANLEY, 1993). Além do precedente, uma série de mudanças metabólicas significativas também foram observadas devido ao estresse por transporte em bovinos.

Estas incluem um aumento nas enzimas tais como a creatina fosfoquinase (TARRANT e MCVEIGH, 1979; KENNY e TARRANT, 1988; COCKRAM e CORLEY, 1991), a qual catalisa a conversão da creatina em fosfocreatina que serve como reservatório de energia para regeneração rápida *in situ*, lactato desidrogenase e aminotransferase (SCOTT et al., 1993), enzimas fundamentais do processo de transformação da glicose em energia para o tecido muscular e na detecção de lesões no fígado, respectivamente.

O sistema de produção predominante no Brasil é o extensivo, em que animais não-castrados, geralmente sem suplementação e mantidos em pasto, são abatidos em uma idade média de 30 a 36 meses (GONDIM, 2013).

Normalmente, as pastagens apresentam uma grande variabilidade, em relação a quantidade e qualidade dos nutrientes disponíveis, durante o ano. De acordo com Lanna et al. (2004), cerca de 80% da produção de forragem ocorre no período das chuvas (outubro a maio), mas no período da seca é comum se observar grande déficit de alimentos para o gado no final da entressafra. Segundo Loudon et al. (2018), o aumento da adubação de magnésio das pastagens, acima de 0,24%, diminuiu o risco de cortes escuros da carne de bovinos terminados a pasto.

A produção de bovinos de corte no Brasil tem como base a utilização de animais de origem zebuína, principalmente da raça Nelore e suas cruzas. O Nelore é a raça mais representativa tanto em produção quanto em produtividade nas pastagens tropicais, principalmente por sua maior adaptação às condições tropicais, em regiões onde o estresse térmico e os ecto e endoparasitas limitam a produtividade das raças taurinas. Assim sendo, a raça do animal tem um efeito no corte escuro da carne, tendo a espécie *bos indicus* um efeito significativo na cor da carne quando comparada a raças europeias (VILJOEN, 2000).

Mesmo que a maioria do rebanho de corte seja terminada em pastagens, o Brasil atende importantes mercados externos. Segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior – Secex, no 1º trimestre de 2018, as exportações brasileiras de carne bovina *in natura* cresceram tanto em volume (31,1%) como em faturamento (20,5%) em comparação com o 1º trimestre de 2017. No 1º trimestre de 2018, as exportações brasileiras de carne bovina *in natura* mantiveram Hong Kong como o seu principal destino, com 22,9% de participação, 6,9 pontos percentuais acima do registrado no 1º trimestre de 2017, ocupando o lugar da China, que se encontra na segunda posição desde o 2º trimestre de 2017.

A terminação em confinamento permite um maior aporte energético devido a dietas ricas em concentrado em detrimento ao volumoso. Ainda assim há incidência de carnes DFD neste sistema de terminação. Em um experimento onde se testou o tempo de jejum por períodos entre 40 e 60 horas, os resultados mostraram uma maior incidência de cortes escuros em animais em jejum (VILJOEN, 2000) em comparação com animais que foram alimentados num período de até 12h pré-abate. Por conseguinte, o jejum também inibiu a resíntese de glicogênio muscular durante o período de recuperação do estresse.

Os resultados do estudo feito por O'QUINN et al. (2018) indicam a contribuição relativa da maciez, suculência e sabor à palatabilidade geral da carne bovina, as quais fornecem evidências de que o fracasso de um único traço de palatabilidade aumenta dramaticamente a probabilidade de falha global de palatabilidade, indicando que nenhum traço único de palatabilidade é mais importante, já que esta depende da aceitação das três características: maciez, suculência e sabor.

3 HIPÓTESE

O estresse e o potencial glicolítico muscular pré-abate não são os únicos fatores relacionados com o pH final e a cor da carne de bovinos terminados em pasto.

4 OBJETIVO

Avaliar a relação entre indicadores de estresse pré-abate com características de qualidade da carne e metabolismo muscular pós-morte de bovinos terminados em pastagem.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos envolvendo animais neste experimento estão de acordo com as normas de bem-estar animal e foram autorizados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, (número de protocolo CEUA Nº: 7432221018/18).

5.1 ANIMAIS, SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS

Foram colhidas amostras do músculo Longissimus, de 55 bovinos da raça Nelore (*bos indicus*), machos não-castrados, terminados exclusivamente em pasto, recebendo apenas sal comum. Os animais foram abatidos em frigorífico comercial, de acordo com procedimentos humanitários, conforme exigido pela legislação brasileira.

Os bovinos possuíam cronologia dentária aproximada 2 e 4 dentes (20 a 36 meses), peso de carcaça entre 300 a 360 kg e foram provenientes do estado do Tocantins, cuja distância do local de abate era de aproximadamente 1.800 km. As carcaças foram classificadas quanto ao acabamento em escassa (1 a 3 mm de espessura de gordura subcutânea).

Após a insensibilização, os animais foram sangrados e imediatamente foi coletada amostras de sangue de cada animal, sendo uma em tubos Vacutainer® heparinizados para as análises de cortisol e outra em Vacutainer® fluoretado para as análises de lactato plasmáticos.

Imediatamente após a remoção do couro foram colhidas amostras do músculo *Longissimus thoracis* (LT), de aproximadamente 10 g, na região entre a 12ª e 13ª costelas, para as análises de metabólitos e pH. As amostras foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido.

Posteriormente, as carcaças foram resfriadas (0 – 2 °C) por 48 horas. Após esse período, foi realizada uma avaliação do pH (pH48) e da temperatura das carcaças (T48), utilizando-se um peagâmetro digital portátil (Hanna Instruments – modelo HI99163, São Paulo, Brasil).

Com base nos valores de pH, foram selecionados selecionadas 29 carcaças, de acordo com o pH e classificadas em dois tratamentos: DFD (pH > 5.8; n=13) e normal (pH ≤ 5.8; n=16).

Em seguida, a meia-carcaça esquerda de cada animal foi dividida na região entre a 12ª e a 13ª costelas, para retirada de duas amostras de 2,5 centímetros de espessura no músculo LT, as quais foram identificadas e embaladas à vácuo individualmente e maturadas por 0 ou 14 dias.

5.2 ANÁLISES INSTRUMENTAIS DE QUALIDADE DE CARNE

5.2.1 Avaliações da cor

Após os períodos de maturação (0 ou 14 dias), as amostras foram retiradas das embalagens e deixadas em exposição ao oxigênio dentro de expositor refrigerado (5 - 7 °C) por 30 minutos. A leitura da cor foi realizada na superfície dos bifes, utilizando um espectrofotômetro portátil, modelo CM2500d (Konica Minolta Sensing Inc., São Paulo, Brasil), com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30 mm. As avaliações foram realizadas utilizando o sistema CIELAB, por meio de leituras de refletância da luz em três dimensões: L^* é o índice associado à luminosidade ($L^* = 0$ preto, 100 branco); a^* é o índice que varia do verde (-) ao vermelho (+); e b^* do azul (-) ao amarelo (+), segundo metodologia descrita por Honikel (1998).

5.2.2 Perdas por cocção e força de cisalhamento

A análise de PPC foi realizada segundo a metodologia proposta por Honikel (1998), pela diferença entre o peso inicial e final da amostra (antes e depois da cocção) e foi expressa em percentagem. As amostras foram assadas em forno elétrico (Modelo F130/L – Fornos Elétricos Flecha de Ouro Ind. E Com. Ltda, São Paulo, Brasil) a 170°C, até atingirem a temperatura interna no bife de 71°C. As temperaturas internas dos bifes foram avaliadas, por meio de termômetros individuais (Modelo RisePRO-Wireless Remote Digital Meat) com um sensor metálico tipo agulha que foram inseridos nos bifes até sua parte central. Logo em seguida, os bifes foram embalados individualmente e resfriados por 24 horas em refrigerador doméstico. Em seguida, foram retirados seis cilindros de 12 mm de diâmetro de cada bife com um vazador elétrico (WHEELER et al., 2001).

A análise de maciez foi realizada com o texturômetro TMS-PRO (Food Technology Corporation, Sterling, Virginia, USA) equipado com lâmina tipo Warner-Bratzler (WBSF).

Para determinação da força de cisalhamento, foi considerando o valor médio dos seis cilindros, seguindo metodologia de Shackelford, Wheeler e Koohmaraie (2004).

5.3 ANÁLISES DAS CARACTERÍSTICAS SANGUÍNEAS

5.3.1 Cortisol e lactato

As amostras de sangue foram coletadas utilizando tubos heparinizados (cortisol) e fluoretados (lactato) e colocadas em gelo imediatamente após a amostragem. Ao final do abate, as amostras foram centrifugadas a 2100 x *g* durante 15 min a 4 °C e o plasma armazenado a - 20 °C até o momento das análises. As concentrações de cortisol e lactato foram realizadas em laboratório comercial (Laboratório de Diagnóstico de Análises Clínicas - DAC) localizado em Pirassununga/SP, usando um kits ELISA (Monobind Inc., Lake Forest, CA, EUA).

5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.4.1 Glicólise *in vitro*

As amostras do músculo LT foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em uma relação de 100mg/mL em uma solução de glicólise anaeróbica contendo Na₂ HPO₄ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 60 mM, ATP 5 mM, ADP 0,5 mM, NAD⁺ 0,5 mM, glicogênio 30 mM, carnosina 25 mM, creatina 30 mM e acetato de sódio 10 mM (pH 7,4), conforme metodologia descrita por ENGLAND et al., (2014).

Os tubos foram mantidos a 25°C durante todo o ensaio. As alíquotas foram coletadas após 0, 0.5, 2, 4, 8, 12, e 24 horas post mortem para posteriores análises de pH e metabólitos.

5.4.2 Mensuração do potencial hidrogeniônico (pH)

As amostras para análise de pH foram preparadas utilizando o método proposto por Bendall (1973). As alíquotas coletadas nos tempos 0; 0.5; 2; 4; 8; 12 e 24 horas foram transferidas para um tubo de centrifuga de 1,5 mL contendo 100 uL de solução de iodo-acetato de sódio 25 mM e KCl 750 mM (pH 7,0). Amostras foram mantidas por cinco minutos a 25°C e posteriormente centrifugadas a 14.000 x *g* por cinco minutos. Em seguida, foi realizada a mensuração do pH utilizando um peagâmetro digital portátil (Hanna Instrumentos – modelo HI99163, São Paulo, Brasil).

5.4.3 Avaliação dos metabólitos

Para análise de glicogênio, as alíquotas foram coletadas, homogeneizadas em uma proporção de 1:1 com uma solução de HCl 2,5 M, aquecidas a 90°C por duas horas e centrifugadas a 14.000 x *g* por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi neutralizado com KOH 1,25 M. Para as análises de glicose e G-6-P, as alíquotas foram coletadas e adicionadas ao mesmo volume de PCA 1M, incubadas no gelo por 20 minutos e centrifugadas a 14.000 x *g* por 5 minutos. Em sequência, o sobrenadante foi neutralizado com 2M KOH. As análises de metabólitos foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Bergmeyer (1984) e modificada para placas de 96 poços (HAMMELMAN et al., 2003). Todos os metabólitos foram analisados em temperatura ambiente (25°C) e mensurados com espectrofotômetro Multiscan Go FI-01620 (ThermoFisher, Vantaa, Finlândia) em absorbância no comprimento de onda de 340 nm.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram analisados por análise de variância, utilizando o procedimento Mixed do software SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC), em um delineamento inteiramente casualizado, com 13 repetições para o tratamento DFD e 16 repetições para o tratamento normal. O tratamento (Normal – pH < 5.8 e DFD – pH ≥ 5.8) foi considerado como efeito fixo e o animal como efeito aleatório.

Os dados que foram avaliados em diferentes tempos foram analisados como medidas repetidas no tempo, considerando os efeitos fixos de tratamento, tempo e interação tempo e tratamento e o animal como efeito aleatório. As estruturas de covariância foram modeladas e a que apresentou melhor ajuste (menor valor de AICC) para cada variável foi utilizada (CROWDER e HAND, 1990).

7 RESULTADOS

7.1 pH 48 horas

Conforme esperado foi observado um maior valor de pH para as amostras DFD em comparação ao tratamento normal ($P < 0,0001$; Figura 2).

Figura 2. Médias dos valores de pH avaliado 48h após o abate de acordo com os tratamentos.

7.2 Variáveis sanguíneas

Não foi observada diferença entre os tratamentos tanto para as concentrações de lactato e quanto de cortisol plasmáticos (Tabela 1).

Tabela 1. Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidade ($Pr > F$) dos valores de cortisol e lactato plasmáticos, em função dos tratamentos.

Características	Tratamentos		EPM²	$Pr > F$
	DFD¹	Normal		
Lactato, (mg/dL)	83,3	87,6	5,86	0,61
Cortisol, (µg/dL)	3,7	4,3	0,36	0,29

Nota: ¹ Carne com pH > 5,8; ²Erro Padrão da Média. Fonte: autora

7.3 Qualidade da carne

Não foi observada interação entre os tratamentos e o tempo de maturação para a maioria das características de qualidade da carne (Tabela 2), exceto para os valores de a^* ($P<0,01$; Figura 3). O tratamento DFD apresentou maiores valores de L^* ($P=0,01$), b^* ($P<0,01$), diferença total de cor (DE; $P=0,01$), assim como maior força de cisalhamento ($P=0,03$) e perdas por cocção ($P=0,01$) em relação ao tratamento normal.

O tempo de maturação não influenciou a maioria das características de qualidade, exceto a força de cisalhamento, que apresentou menores valores nas amostras maturadas por 14 dias em relação as não maturadas ($P<0,01$), conforme esperado.

Tabela 2. Médias, erro padrão da média ($\pm$) e probabilidade ($Pr>F$) dos valores de cortisol e lactato plasmáticos, em função dos tratamentos.

Características ¹	Tratamentos		Tempo de maturação		Pr>F		
	Normal	DFD	0	14	Tratamento	Tempo	Tratamento * Tempo
Cor							
L^*	35,5 $\pm$ 0,56	37,7 $\pm$ 0,62	36,0 $\pm$ 0,59	37,2 $\pm$ 0,59	0,01	0,13	0,58
a^*	15,2 $\pm$ 0,26	14,7 $\pm$ 0,29	16,5 $\pm$ 0,28	13,4 $\pm$ 0,28	0,19	<0,01	<0,01
b^*	12,0 $\pm$ 0,24	13,1 $\pm$ 0,26	12,5 $\pm$ 0,25	12,6 $\pm$ 0,25	<0,01	0,92	0,47
DE	40,5 $\pm$ 0,56	42,7 $\pm$ 0,62	41,5 $\pm$ 0,59	41,6 $\pm$ 0,59	0,01	0,92	0,79
FC, N	50,1 $\pm$ 2,61	58,9 $\pm$ 2,90	63,0 $\pm$ 2,76	45,9 $\pm$ 2,76	0,03	<0,01	0,19
PPC, %	16,9 $\pm$ 0,55	19,1 $\pm$ 0,62	18,2 $\pm$ 0,59	17,8 $\pm$ 0,59	0,01	0,60	0,20

Nota: L^* = luminosidade; b^* = intensidade de amarelo, DE = diferença total de cor, FC = força de cisalhamento, PPC= perdas por cocção, DFD = amostras com pH>5.8,

Com relação aos valores de a^* da cor os valores diminuíram para ambos os tratamentos nas amostras maturadas (Figura 3), enquanto que o efeito dos tratamentos foi diferente em função do tempo, sendo que nas amostras não maturadas os valores de a^* foram maiores nas amostras normais ($P<0,05$), enquanto que nas amostras maturadas por 14 dias, os valores se inverteram, com maiores valores para o tratamento DFD ($P<0,05$), em comparação ao normal.

Figura 3. Média dos valores do croma a^* de em função do tratamento e tempo de maturação.

^{a,b} Letras minúsculas diferentes diferem entre si dentro do tempo de maturação ($P < 0,05$);

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem entre si dentro do tratamento ($P < 0,05$);

7.4 pH e metabólitos *in vitro*

Houve interação entre tratamentos e tempo ($P < 0,01$) para os valores de pH *in vitro* (Figura 4). Não houve diferença entre os valores de pH inicial, porém após 30 min, o pH das amostras do tratamento normal, foram inferiores ao tratamento DFD, em todos os tempos avaliados ($P < 0,01$). O pH de ambos o tratamentos reduziu com o tempo, sendo que após 24 h, o pH do grupo normal atingiu média de 5,6, enquanto que das carnes DFD esse valor foi de 5,9.

Figura 4. Valores médios do pH muscular avaliado no sistema *in vitro*, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.

Da mesma forma que o observado para o pH, houve interação entre os tratamentos e os tempos avaliados para as concentrações de glicogênio, lactato, G-6-P e glicose ($P < 0,01$).

As concentrações de glicogênio diminuíram ao longo do tempo para ambos os tratamentos (Figura 5). O tratamento normal apresentou maior concentração inicial ($P < 0,01$) em relação ao tratamento DFD. Porém nos tempos 30 min, 2h e 4h não houve diferença entre os mesmos e após 8h ($P = 0,02$) e 24 horas ($P = 0,01$) *post mortem*, maiores valores foram encontrados no tratamento DFD ($P = 0,02$ e $P=0,01$, respectivamente).

As concentrações de glicose aumentaram com tempo *post mortem* (Figura 6). Na medida inicial (hora 0), foi observada uma maior concentração de glicose no tratamento normal ($P < 0,01$), no entanto, nos tempos 0,5; 2 e 4 horas os valores foram semelhantes. Após 8 e 24 horas o tratamento normal apresentou maior concentração em relação ao DFD ($P < 0,001$).

Figura 5. Valores médios das concentrações de glicogênio muscular avaliado no sistema *in vitro*, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.

Figura 6. Valores médios das concentrações de glicose muscular avaliado no sistema *in vitro*, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.

As concentrações de G-6-P não diferiram entre os tratamentos até 4h, porém foram maiores no tratamento normal após 8, 12 e 24 h em comparação ao tratamento DFD ($P < 0,01$; Figura 7).

Figura 7. Valores médios das concentrações de glicose-6-fosfato muscular avaliado no sistema *in vitro*, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.

As concentrações de lactato aumentaram em função do tempo para ambos os tratamentos (Figura 8). Menores concentrações de lactato ($P < 0,01$) foram observados no tratamento DFD no tempo inicial (hora 0), porém nos tempos 0,5; 2 e 4 horas os tratamentos apresentaram valores semelhantes, sendo que nos tempos 8 e 24 horas, as concentrações foram maiores no tratamento normal ($P < 0,01$).

Figura 8. Valores médios das concentrações de lactato muscular avaliado no sistema *in vitro*, em função dos tratamentos e tempo de avaliação.

8 DISCUSSÃO

Após o abate, inicia-se uma série de processos metabólicos que visam a produção de energia para manutenção da homeostasia do organismo, que levam a acidificação do músculo e consequentemente a redução do pH, chegando a valores ideais entre 5,5 a 5,6 (PEARSON e YOUNG, 1989). Quando o pH não cai adequadamente e fica com valores acima de 5,8 a carne é considerada DFD (SCHEFFLER et al., 2011). A principal causa do alto pH final em bovinos é devido ao estresse pré-abate que consome as reservas de glicogênio muscular antes do abate e causa um baixo nível de lactato após a morte.

O cortisol é geralmente considerado como o principal indicador bioquímico usado para medir o estresse pré-abate (RUSSELL et al., 2012). CHEN et al. (2015) afirmaram que o transporte está entre os maiores estressores físicos em diversas categorias animais, causando alterações comportamentais que incluem um aumento da reatividade a eventos estressantes e as respostas fisiológicas incluíram níveis elevados de cortisol no plasma.

Os níveis de lactato também podem estar relacionados ao estresse pré-abate (TADICH et al., 2013; WARNER et al., 2007). A concentração de lactato eleva-se rapidamente pelas reações comportamentais físicas ao estresse (CHEN, 2015). A medula adrenal libera catecolamina quando o estresse pré-abate ativa o sistema simpato-adrenal. Assim, o glicogênio do fígado é liberado rapidamente e os níveis de lactato no sangue aumentam (WARRISS, 2010).

Neste estudo, não foram observadas diferenças entre os tratamentos tanto para os níveis de cortisol quanto de lactato (Tabela 1). Apesar dessas duas variáveis estarem relacionadas com o estresse pré-abate e, por consequência, a ocorrência de carnes DFD, isso não ocorreu neste estudo, indicando que essas variáveis não são bons indicadores do pH final e que outros mecanismos estão envolvidos nesse processo.

Embora as carnes DFD possam ser avaliadas visualmente, medições objetivas de cores têm sido usadas como critérios para definir o dark cutting (HOLMAN et al., 2016). Neste estudo, os valores de L* e b* foram influenciadas pelos tratamentos, sendo que os maiores valores foram observados no tratamento DFD, contrariamente ao esperado.

JEREMIAH et al. (1991), VAZ e RESTLE (2000), encontraram que animais castrados tiveram carne de cor mais clara, demonstrando que animais castrados tiveram um maior metabolismo energético muscular, gerando maior acúmulo de lactato, além de uma cor de carne mais vermelha (a^*) e mais amarela (b^*). No estudo de MACH et al. (2009) apud SILVA et al. (2014), avaliando condição sexual mostrou que animais não castrados tiveram uma carne mais escura ($<L^*$), menos vermelha ($<a^*$) e menos amarela ($<b^*$), de acordo com os valores encontrados neste presente estudo (Figura 3 e Tabela 2).

Para o croma a^* houve interação entre tempo e tratamento ($P = 0,0001$), sendo avaliado nos dois tempos de maturação 0 e 14, obtendo um maior valor de a^* para carne normal em relação ao DFD, e um menor valor de a^* no maior tempo de maturação para ambos os tratamentos (Figura 3).

ANDRADE et. al. (2010) revelaram que a maturação contribui com a maciez de carnes de bovinos aos sete e 21 dias por reduzir a força de cisalhamento, entretanto, interfere negativamente na coloração, portanto, a escolha do tempo de maturação adequado para carnes bovinas depende do atributo a ser valorizado. Entretanto, MORGAN et al. (1993) apud SILVA et al. (2014), identificaram que bovinos não castrados têm maior atividade da calpastatina no músculo *Longissimus* e menor proteólise durante os primeiros sete dias *post mortem*, podendo ser atribuída a uma diminuição da maciez. Com o exposto, para FC, houve diferença entre os tratamentos mostrando que o tratamento normal foi mais macia que a DFD. Os valores de PPC também foram maiores no tratamento DFD, o que está coerente com a maior capacidade de retenção de água observada nas carnes DFD.

A carne apresenta fatores que favorecem o crescimento microbiano, como a alta atividade de água (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Um dos pontos relevantes em termos de retenção de água, independentes do pH é a desnaturação das proteínas oriundas da queda de energia do músculo. Com a diminuição do ATP, inicia-se o processo de desnaturação das proteínas cuja integridade do animal vivo depende do fornecimento de energia (LAWRIE, 2005 apud SILVA, 2017).

Neste estudo, o pH avaliado *in vitro* diminuiu em ambos os tratamentos ao longo do tempo, sendo que o tratamento DFD apresentou maiores valores em quase todos os tempos avaliados, exceto no tempo 0h, onde não houve diferença entre os tratamentos. Os maiores valores de pH para o tratamento DFD, observados neste estudo,

são condizentes com as maiores concentrações de glicogênio muscular para esse mesmo tratamento nos tempos 8h e 24h, sendo que após 4h já houve um maior valor numérico para o tratamento DFD, semelhante ao observado para os valores de glicose (Figura 6) e glicose6-fosfato (Figura 7). Da mesma forma, esses resultados são condizentes com as menores concentrações de lactato (Figura 8).

A resolução do pH final coincide com o fim da glicólise, e isto tem sido atribuído a falta de substrato disponível (LAWRIE, 2005; FERGUSON e GERRARD, 2014).

Os menores valores de lactato para a carne DFD em relação à carne normal (Figura 6) condiz com SILVA et al. 2014 os quais dizem que, se ocorrer deficiência nas reservas de glicogênio muscular, ocorrerá uma menor formação de lactato e o pH final permanecerá alto.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que as diferenças no pH final das carnes não está associada com as concentrações plasmáticas de cortisol e lactato e, embora essas variáveis sejam utilizadas como indicadores de estresse pré-abate e, conseqüentemente, baixas reservas de glicogênio muscular e maior pH final, elas não foram bons indicadores do pH final da carne e de cortes escuros. Adicionalmente, com relação aos resultados de cor, apesar dos maiores valores de L^* observados no tratamento DFD, os valores de ambos os tratamentos estão dentro da faixa considerada normal para a carne vermelha.

Os resultados observados para os metabólitos avaliados no período *post-mortem* indicam que embora tenha ocorrido uma queda nos valores de pH para ambos o tratamentos, a magnitude dessa redução foi diferente entre os tratamentos, que também foram condizentes com os outros metabólitos indicadores do metabolismo *post-mortem*.

Por fim, pode-se sugerir que as diferenças observadas nos valores de pH final (48h) não refletiram o mecanismo esperado para a cor da carne (mais escura para o grupo de alto pH), porém foram condizentes com os resultados do metabolismo muscular *post-mortem*. No entanto, o mecanismo responsável por essas diferenças entre os grupos não ficou claramente esclarecido.

9 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, é possível afirmar que os indicadores de estresse pré-abate não são adequados para diferenciar carnes pelo pH final. Além disso, as diferenças nos valores de pH final não recapitulam o mecanismo esperado de cortes mais escuros para as amostras de alto pH. Finalmente, os metabólitos avaliados são indicadores das diferenças encontradas no pH final, porém o mecanismo responsável por essa diferença não foi determinado.

10 REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, 2018. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>> Acesso em: 10 de dezembro, 2018.
- ABRIL, M.; CAMPO, M. M.; ÖNENÇ, A.; SAÑUDO, C. A E , P.; NEGUERUELA, A. I. Beef Colour evolution as a function of ultimate pH. **Meat Science**, v.58, p.69-78, 2001.
- ANDRADE, P. L. et al. Qualidade da carne maturada de bovinos Red Norte e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1791-1800, 2010.
- BEKHIT, A.E.D.; FAUSTMAN C. Metmyoglobin reducing activity: A review. **Meat Science**, v.71, p.407–39, 2005.
- BENDALL, J. Postmortem changes in muscle. In: Bourne, G.H. (Ed.), Structure and Function of Muscle, **Academic Press**, New York, v.2, p.234-309, 1973.
- BERG, R.T.; BUTTERFIELD, R.M. New concepts of cattle growth. Sydney, **Sydney University Press**, p.240, 1976.
- BODAS, R.; RODRIGUEZ, A.B.; LOPEZ S.; FERNANDEZ, B.; MANTECON, A.R.; GIRALDEZ, F.J. 2007. Effects of the inclusion of sodium bicarbonate and sugar beet pulp in the concentrate for fattening lambs on acid-base status and meat characteristics. **Meat Science**, v.77, p.696–702, 2007.
- CHEN, Y.; ARSENAULT, R.; NAPPER, S.; GRIEBEL; P. Models and Methods to Investigate Acute Stress Responses in Cattle. **Animals**, v.5, p.1268-1295, 2015.
- CIE. Colorimetry, 2nd ed., CIE Publications n. 15.2, **Commission Internationale de l'Eclairage**, Viena, 1986.
- COCKRAM, M. S.; CORLEY, K. T. T. Effect of pre-slaughter handling on the behaviour and blood composition of beef cattle. **British Veterinary Journal**. V.147, p.444-454, 1991.
- CROWDER, M.J.; HAND, D.J. Analysis of repeated mesures. London: Chapman & Hall, 1990, 257p.
- DI MARCO, O.N.; BARCELLOS, J.O.J.; COSTA, E.C. **Crescimento de bovinos de corte**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- ENGLAND, E.M.; MATARNEH, S.K.; OLIVER, E.M.; APAOBLAZA, A.; SCHEFFLER, T.L.; SHI, H.; GERRARD, D.E. Excess glycogen does not resolve high ultimate pH of oxidative muscle. **Meat Science**, v.114, p.95-102, 2016.
- ENGLAND, E. M.; MATARNEH, S. K.; SCHEFFLER, T. L.; WACHET, C.; GERRARD, D. E. pH inactivation of phosphofructokinase arrests post mortem glycolysis. **Meat Science** v.98, 850-857, 2014.
- ENGLAND, E.M.; SCHEFFLER, T.L.; KASTEN, S.C.; MATARNEH, S.K.; GERRARD, D.E. Exploring the unknowns involved in the transformation of muscle to meat. **Meat Science**, v.95, n.4, p.837–843, 2013.

ESTRADA, M.M. Desempenho, características da carcaça e qualidade da carne de novilhas de diferentes genótipos terminadas no sistema pasto/suplemento. Dissertação- Mestrado, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.10, 2014.

FELÍCIO, P. E. Uma análise crítica, porém otimista da carne bovina do Brasil central agropecuário. Encontro Nacional Do Boi Verde. **A Pecuária Sustentável**, Uberlândia, Anais... v.1, p.111-119, 1999.

FERGUSON, D. M.; GERRARD, D. E. Regulation of post mortem glycolysis in ruminant muscle. *Animal Production Science*, 2014, 54, 464–481.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.182, 2008.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M. **Avaliação da Qualidade de Carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: Editora UFV, v.2, p. 472, 2017.

GONDIM, F. Bioquímica Muscular, Maciez Da Carne E Melhoramento Das Raças Zebuínas. **Revista Política Agrícola**. Ano XXII, nº4, 2013.

HAMMELMAN, J. E.; BOWKER, B. C.; GRANT, A. L.; FORREST, J. C.; SCHINCKEL, A. P.; & GERRARD, D. E. Early postmortem electrical stimulation simulates PSE pork development. **Meat Science**, v.63, n.1, p.69–77, 2003.

HOLMAN; B.W.B.; MAO, Y.; COOMBS, C.E.O.; VAN DE VEM, R.J.; HOPKINS, D.L. Relationship between colorimetric (instrumental) evaluation and consumer-defined beef colour acceptability. **Meat Science**. v.121, p.104–106, 2016.

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

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S.; HANSEN, S. The intricate relationship between animal nutrition, muscle growth and fresh meat quality: How does it all fit together? **Journal of Animal Science**, v.96, s.3, p.495, 2018.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S.M. New frontiers in understanding drip loss in pork: recent insights on the role of postmortem muscle biochemistry. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, p.19–26, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE**. Estatística da Produção Pecuária jan.-mar. 2018 Publicado em: 14.06.2018 às 09:00.

KENNY, F. J.; TARRANT, P. V. 1988. The effect of oestrus behaviours on muscle glycogen concentration in dark cutting beef heifers. **Meat Science**, v.22, p.21-31, 1998.

KENNY, F.J.; TARRANT, P.V. The Reaction of bulls to short-haul road transport. **Animal Behavior Science**, v.17, p.209-227, 1987.

KIM, Y. H. B.; WARNER, R. D.; ROSENVOLD, K. Influence of high pre-rigor temperature and fast pH fall on muscle proteins and meat quality: a review. **Animal Production Science**, v.54, p.375-395, 2014.

KIM, Y.H.B.; HUNT, M.C. Advance technology to improve meat color. ‘Control of meat quality.’ **Research Signpost**, Trivandrum, Kerala, India, p. 31–60, 2011.

KOOHMARAIE, M. The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. 48th Annual Reciprocal Meat Conference. **American Meat Science Association**, 1995.

LACOURT, A., TARRANT, P. V. Glycogen depletion patterns in myofibres of cattle during stress. **Meat Science**, v.15, n.2, p.85-100, 1985.

LANNA, D.P.D.; FERRAZ, J.B.S.; ALMEIDA, R. Integrando genética e nutrição no sistema de pastejo. **Seminário nacional sobre produção de carne com qualidade**, Ministério da Agricultura, 2004.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. Porto Alegre: Artmed, v.6, p.384, 2005.

LOUDON, K.M.W.; LEAN, I.J.; PETHICK, D.W.; GARDNER, G.E.; GRUBB, L.J.; EVANS, A.C.; MCGILCHRIST, P. On farm factors increasing dark cutting in pasture finished beef cattle. **Meat Science**, v.144, p.110–117, 2018.

LU, X.; ZHANG, Y.; QIN, L.; MA, W.; ZHU, L.; LUO, X. Association of ultimate pH and stress-related blood variables in cattle. **Meat Science**, China, v.139, p.228-230, 2018.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária Da Carne Bovina**. São Paulo, p.135, 2000.

MACH, N. et al. Burdizzo prepubertal castration effects on performance, behaviour, carcass characteristics, and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Meat Science**, v.81, p.329-334, 2009.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, v.71, n.1, p.100–121, 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Boas práticas de manejo, transporte/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo**. Mateus J.R. Paranhos da Costa, Murilo Henrique Quitiliano, Stavros Platon Tseimazides, Brasília, 2013.

MARSH, B.B.; LOCHNER, J.V.; TAKAHASHI, G.; KRAGNESS, D.D.; (1981) Effects of early post-mortem pH and temperature on beef tenderness. **Meat Science**, v.5, n.6, p.479–483. 1981.

MCDONALD, L.E. Veterinary Endocrinology And Reproduction. In: Martin, P.A.; Crump, M.H. (Eds). **The Adrenal Gland**, p.165-200, 1989.

MILLER, M. Dark, Firm and Dry Beef. **Texas Tech University**, 2007.

MINOLTA. Precise Color Communication – Color Control, from **Feeling to Instrumentaion**. **Minolta Camera Co., Ltd.**, Osaka-Japan, p. 49, 1993.

O'QUINN, T.G.; LEGAKO, J.F.; BROOKS, J.C.; M.F. MILLER, M.F. Evaluation of the contribution of tenderness, juiciness, and flavor to the overall consumer beef eating experience. **Translation Animal Science**, v.2, p.26–36, 2018.

PEARSON, A. M.; YOUNG, R. B. Muscle and meat biochemistry. San Diego: Academic, 1989. Cap. 9. p. 235-265.

PONNAMPALAM, E.N.; HOPKINS, D.L.; BRUCE, H.; LI, D.; BALDI, G. BEKHIT, A.E.D. Causes and Contributing Factors to “Dark Cutting” Meat: Current Trends and Future Directions: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.6, p.400-430, 2017.

PONNAMPALAM, E.N.; BUTLER, K.L.; MCDONAGH, M.B.; JACOBS, J.L.; HOPKINS, D.L. Relationship between muscle antioxidant status, forms of iron, polyunsaturated fatty acids and functionality (retail colour) of meat in lambs. **Meat Science**, v.90, p.297–303. 2012a.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. São Paulo, v.4, p. 870, 2000.

ROÇA, R.O. **Modificações pós-morte da carne**. 2001. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br>> Acesso em: 07 de dezembro, 2018.

RUSSELL, E.; KOREN, G.; RIEDER, M.; VAN UUM, S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. **Psychoneuroendocrinology**, v.37, n.5, p.589-601, 2012.

SAS. **Statistical Analyses System Institute** "SAS User's Guide: Statistic". SAS Institute INC., Cary, Carolina do Norte, 2009.

SAÑUDO, C.; MACIE, E.S.; OLLETA, J.L.; VILLARROEL, M.; PANEA, B.; ALBERTÍ, P. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. **Meat Science**, v.66, p.925-932, 2004.

SAVELL, J.W.; MUELLER, S.L.; BAIRD, B.E. The chilling of carcasses. **Meat Science**, v.70, n.3, p.449–459, 2005.

SAWYER, J.; APPLE, J.; JOHNSON, Z.; BAUBLITS, R.; YANCEY, J. Fresh and cooked color of dark-cutting beef can be altered by post-rigor enhancement with lactic acid. **Meat Science**, v.83, p.263–270, 2009.

SCHEFFLER, T. L.; PARK, S.; GERRARD, D. E. Lessons to learn about postmortem metabolism using the AMPK γ 3 R200Q mutation in the pig. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 244-250, 2011.

SCHEFFLER, T.L.; SCHEFFLER, J.M.; KASTEN, S.C.; A.A. SOSNICKI, A.A.; D.E. GERRARD. High glycolytic potential does not predict low ultimate pH in pork. **Meat Science**, v.95, p.85–91, 2013.

SCOTT, S. L.; SCHAEFER, A. L.; JONES, S. D. M.; MEARS, G. J.; STANLEY R. W. Stress indicators and lean tissue yield in transported cattle treated with electrolyte. **39th ICoMMST**. Calgary, Alberta, Aug. 1-6. V.52. p. 22-23, 1993.

SECEX. **Secretaria de Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://portal.siscomex.gov.br/legislacao/orgaos/secretaria-de-comercio-exterior-secex>> Acesso em: 10 de dezembro de 2018.

SHACKELFORD, S. D. et al. Development of optimal protocol for visible and nearinfrared reflectance spectroscopic evaluation of meat quality. **Meat Science**, Amsterdam, v.68, n.3, p.371-81, 2004.

SILVA, B.; POLETI, M.D.; MONCAU, C.T.; ROSA, A.F.; SILVA, S.L.E.S.; BALIEIRO, J.C.C. Características endócrinas, metabólicas e indicadoras da qualidade da carne em bovinos Nelore castrados e não castrados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p.904-910, 2014.

SILVA, I.G.S. Carne PSE (pale, soft, exudative) e DFD (dark, firm, dry) em abate industrial de bovinos. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

TADICH, N.; TEJEDA, C.; BASTIAS, S.; ROSENFELD, C.; GREEN, L. E. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. **The Veterinary Journal**, v.197, n.2, p.401-405, 2013.

TARRANT, P.V. Animal behaviour and environment in the dark-cutting condition in beef—a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.13, p.1–21, 1989.

TARRANT, P. V.; McVEIGH, J. M. 1979. The effect of skeletal muscle needle biopsy on blood constituents, muscle glycogen and heart rate of cattle. **Research in Veterinary Science**, v.27, p.325-328, 1979.

THOMPSON, J.M.; PERRY, D.; DALY, B.; GARDNER, G.E.; JOHNSTON, D.J.; PETHICK, D.W. Genetic and environmental effects on the muscle structure response post-mortem. **Meat Science**, v.74, n.1, p.59–65, 2006.

VAZ, F.N.; RESTLE, J. Aspectos qualitativos da carcaça e da carne de machos Hereford, inteiros ou castrados, abatidos aos quatorze meses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, p.1894-1901, 2000.

VILJOEN, H.F. Meat quality of dark-cutting cattle. **Magister Scientiae Agriculturae** – Department of Food Science Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Pretoria. South Africa. 135p, 2000.

WARRISS P.D. The handling of cattle pre-slaughter and its effects on carcass and meat quality. **Appl Anim Behavior Science**, v.28, p.171–86, 2010.