

LUIZ ÁLVARO MONTEIRO Jr.

**AVALIAÇÃO DO pH, TEMPERATURA E
IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA MACIEZ DA CARNE
DE OVINOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de concentração: Clínica Veterinária).

BOTUCATU – SP

2005

LUIZ ÁLVARO MONTEIRO Jr.

AVALIAÇÃO DO pH, TEMPERATURA E IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MACIEZ DA CARNE DE OVINOS

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de concentração: Clínica Veterinária).

Orientador: **Prof. Dr. Enio Pedone Bandarra.**

BOTUCATU – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Monteiro Junior, Luiz Álvaro.

Avaliação do pH, temperatura e imunoistoquímica de proteínas envolvidas na maciez da carne de ovinos / Luiz Álvaro Monteiro Junior. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Orientador: Enio Pedone Bandarra

Assunto CAPES: 50505009

1. Carne 2. Ovino

CDD 664.9

CDD 636.3

Palavras-chave: Desmina; Imunoistoquímica; Ovinos; Troponinas C e T e pH

Aos meus pais
Luiz Alvaro e Marilu,
que sempre me incentivaram e proporcionaram chegar até aqui,

A Daniel Silveira (in memoriam) e
João Adolfo Silveira (in memoriam),
que, desde os primórdios, me incentivaram
e deram o prazer da sua convivência,

dedico

Aos mestres, incentivadores e amigos

Enio Pedone Bandarra

Roberto de Oliveira Roça

Renée Laufer Amorim

Márcio Rubens Graf Kuchembuck

Antônio Carlos Farias dos Reis

Pedro Paulo Pires

Minha sincera homenagem

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. **Enio Pedone Bandarra** pelas oportunidades, valiosas sugestões, paciência e experiência adquirida.

Ao Dr. **Roberto de Oliveira Roça**, pelas valiosas sugestões, colaborações.

Aos Pesquisadores **Roberto A. de A. Torres Jr. e Manuel Cláudio M. Macedo** e ao Médico Veterinário **Paulo Felipe I. Goiozo** pelas sugestões e assessorias estatísticas prestadas.

A Dra. **Laura Maria Alvarez de Figueiredo** pelos incentivos e auxílios prestados em minha formação.

A amiga e Dra. **Renée Laufer Amorim**, pelos auxílios e sugestões nas análises imunoistoquímicas.

Aos colegas **Giovana Wingeter Di Santis, Veridiana M. B. D. de Moura e Helder Esteves Thomé**, pelo apoio na colheita das amostras e testes imunoistoquímicos.

Aos funcionários do Serviço de Patologia Veterinária, **Maury Raul e Noel de Almeida Mello** pela disponibilidade em auxiliar no processamento das amostras.

Ao frigorífico **Suin Quality** e à Médica Veterinária **Solange Pelicci** por permitirem a realização dos ensaios experimentais em suas dependências.

A todos que direta ou indiretamente participaram desta pesquisa.

Sumário

	Pág.
LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
1- RESUMO	1
2- ABSTRACT	3
3- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	5
4- MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1- Material	17
4.1.1- Animais	17
4.1.2- Equipamento para insensibilização	18
4.2- Métodos	18
4.2.1- Amostragem da musculatura	18
4.2.2- Temperatura e pH das carcaças	19
4.2.3- Análise imunoistoquímica	19
4.2.4- Análise estatística	21
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6- CONCLUSÕES	30
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8- ANEXOS	40

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela-01: Média e desvio padrão do pH e da temperatura nos três momentos de avaliação	22
Tabela-02: Média e desvio padrão da porcentagem de fibras marcadas pela imunoistoquímica	25
Tabela-03: Comparação entre as variáveis analisadas pelo teste da Correlação de Pearson	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura-01: Fluxograma de abate dos ovinos.....	17
Figura-02: Média do pH das carcaças nos três momentos de avaliação ...	23
Figura-03: Média da temperatura das carcaças nos três momentos de avaliação	24
Figura-04: Fibras musculares sem alterações coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina. (A: 100 x e B: 400 x).....	25
Figura-05: Marcação imunoistoquímica com anticorpos primários para Desmina da fibra muscular de amostras obtidas após 30 minutos do abate. (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / A: 200 x e B: 400 x).....	26
Figura-06: Marcação imunoistoquímica com anticorpos primários para Desmina na fibra muscular de amostras obtidas após 12 horas (A: 200 x) e 24 horas (B: 100 x) após o abate. (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer).....	26
Figura-07: Nota-se que todas as fibras musculares estão marcadas com a utilização de anticorpos primários anti-Troponina C, após 30 minutos do abate (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / 200 x).....	26
Figura-08: Fibras musculares marcadas com anticorpos primários Anti-Troponina C onde se pode observar que todas as fibras apresentam-se marcadas. (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / A: 12 horas após o abate – 200x e ; 24 horas após o abate – 200x).....	27
Figura-09: Utilização de anticorpos primários Anti-Troponina T, em fibras coletadas após 30 minutos do abate, onde se observa degradação parcial	

das proteínas (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / **A:** 100x e **B:** 200 x).....27

Figura-10: Marcações imunoistoquímicas para com anticorpos primários para troponina T, onde se podem notar poucas fibras marcadas (setas), (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / **A:** 12 horas após o abate e **B:** 24 horas após o abate – 200x).....27

Figura-11: Variação da porcentagem de fibras marcadas pela imunoistoquímica, em relação aos momentos de análise.29

MONTEIRO Jr., L.A. Avaliação do pH, temperatura e imunoistoquímica de proteínas envolvidas na maciez da carne de ovinos. Botucatu, 2005. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

1- RESUMO

O presente trabalho teve por principal objetivo a realização de estudos que elucidassem certas atividades das enzimas presentes nas células musculares, sobre as proteínas que determinam a maciez da carne. Ressalta-se a importância das análises imunoistoquímicas, pois foram raras as citações literárias específicas encontradas sobre este assunto, relacionadas às alterações ocorridas na carne de ovinos, no processo de transformação do músculo em carne nas primeiras vinte e quatro horas após o abate.

Nos ensaios experimentais foram utilizados trinta ovinos machos mestiços da raça Suffolk que foram abatidos de forma humanitária. O método de insensibilização utilizado foi a eletronarcose que, sabidamente, influencia alguns fatores que irão determinar a qualidade da carne.

Foi retirado um fragmento do músculo *Longissimus dorsi* de cada carcaça, aproximadamente 30 minutos após a sangria, de forma semelhante ao “toilete” de contusão da região lombar de cada carcaça, os quais foram acondicionados em recipientes plásticos individuais, com as devidas identificações e mantidos sob refrigeração (2° a 4° C), por 24 horas e depois recortados e fixados em solução de formalina tamponada a 10%, para a realização de cortes histológicos.

A temperatura e pH das carcaças foram mensurados com a utilização de um potenciômetro portátil medidor de pH, com probe seca, que possui um termômetro em sua estrutura. As análises imunoistoquímicas foram realizadas a partir do bloqueio da peroxidase endógena: em partes iguais de metanol e água oxigenada 20 volumes, após, fez-se a incubação com anticorpos primários: desmina, troponina C e troponina T na diluição 1:100, que incubados em solução de BSA 1% a 4°C por 18 horas e em câmara úmida. A coloração foi realizada com o cromógeno Diamino-Benzidina e a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer.

A análise do pH e da temperatura das carcaças nos três momentos de mensuração mostrou intensa diminuição dos valores, principalmente nas doze horas iniciais. Após vinte e quatro horas, a média do pH e da temperatura apresentava-se em 5,51 e 4,58°C, respectivamente. As marcações imunoistoquímicas revelaram degradação significativa da Desmina e da Troponina T, não sendo observada degradação considerável da Troponina C.

A comparação estatística entre as variáveis: pH, temperatura e proteínas citoplasmáticas revelou forte influência entre a diminuição do pH e da temperatura e a degradação das proteínas constituintes do sarcômero muscular.

Palavras chave: ovinos, imunoistoquímica, desmina, troponinas C e T e pH.

MONTEIRO Jr, L.A. Evaluation of pH, temperature and imunoistochemistry of some proteins involved in meat tenderization of sheep. Botucatu, 2005. Thesis (Doctor in Veterinary Clinics) - College of Veterinary Medicine and Zootecnicns - UNESP - Campus of Botucatu, State University of São Paulo "Júlio de Mesquita Filho".

2- ABSTRACT

The present research had as main objective the accomplishment studies that could elucidate some activities of muscular enzymes on proteins that determine meat tenderness. The Importance of the imunoistochemistry analyses is standed out, therefore specific related literature citations are rare on this subject about the modifications occured in the transformation process of muscle in meat at the first twenty four hours after slaughter of sheep.

In the experimental assays, thirty crossbred male Suffolk sheep had been slaughtered using a humanitarian method. The slaughter method used was electronarcosis that influenciates in some meat quality factors.

Longissimus dorsi fragment was excised from the carcass after 30 minutes after bleeding and maintained in a single individual identified plastic recipe at 2° a 4° C during 24 hours. After this, the fragments was intended and fixed in formalin solution (10%) to histological assay. pH an temperature was measured using a dry pHmeter equipment. Imunoistochemistry analysis were made by blocking endogenous peroxidasis using the proportion of 1:1 of hydrogen peroxide (20 v.) and methanol. After this procedures the tissue was incubated with primary antibodies to desmin and troponina C and T (1:100) in a 1%BSA solution at 4°C in a wet chamber about 18 hours. The tissue was colored using

Diamino-Benzidin and colored again using Meyer hematoxin to slide analysis.

The carcasses pH and temperature analysis were measured at three moments and showed intensive decrease of values, mainly in initial twelve hours. After twenty four hours, the average of pH and temperature was presented in 5,51 and 4,58°C, respectively. Imunoistochemistry assessment had disclosed significant degradation of Desmin and Troponin T. This was not observed in the degradation of Troponin C.

Statistics comparison of the three variables: pH, temperature and cytoplasmatic proteins disclosed to a great influence of pH and temperature decline in the degradation of muscular proteins.

Key Words: sheep, imunoistochemistry, desmin, troponin C and T and pH.

3- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Originárias da Europa e da Oceania, as raças de corte mais utilizadas no Brasil – principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centroeste, onde a ovinocultura tem voltado a crescer – são a Texel, Ile de France, Suffolk e Hampshire Down. Após duas décadas de crise na ovinocultura, hoje a oferta não supre a demanda, havendo necessidade de importação de cordeiros oriundos do Uruguai e do Chile. A produção nacional, segundo a Federação Brasileira dos Criadores de Ovinos de Carne, gira em torno de 29 mil toneladas, com um déficit de 600 mil cordeiros. No estado de São Paulo estima-se um rebanho de 500 mil cabeças, conforme LUCCAS, (2003).

Já a maciez é considerada a característica mais importante na qualidade da carne e determina a aceitabilidade pelos consumidores, devido a sua grande importância na palatabilidade (ALARCON-ROJO e DRANSFIELD, 1995, WUFF, et al, 1996, EILERS et al, 1996). Segundo DRANSFIELD (1994) e KOOHMARAE (1992), também é de considerável importância para a indústria, pois determina a taxa de vendas deste produto.

Como observado por MONTEIRO Jr. (2000), a crescente demanda pela carne ovina vem ocasionando considerável aumento na quantidade de produtores destes animais e estes fatos ensejam a realização de pesquisas relacionadas a esta espécie. Ressalta-se, ainda, a importância das pesquisas nesta área visando o bem estar animal e a qualidade da carne (SWATLAND, 2000).

Apesar das inúmeras pesquisas realizadas sobre os processos de maciez da carne, nas diversas espécies de abate, ainda há dúvidas na literatura com relação à atividade das enzimas e seus respectivos inibidores, porém o ideal seria diminuir a ação dos inibidores para se intensificar o processo de amaciamento da carne (ALARCON-ROJO e DRANSFIELD 1995). WHEELER, et al, (1997), WHEELER e KOOHMARAIE (1994) indicam que há escassez de trabalhos na literatura que possam esclarecer os processos que determinam a maciez da carne.

Uma das maiores exigências dos mercados consumidores é a maciez da carne, por isso as indústrias buscam tecnologia para melhorar esta característica deste produto. (BIAGINI, 2001).

O abate de animais destinados ao consumo segue normativas federais específicas. Desta forma é apenas permitida a utilização de métodos mecânicos como pistolas de penetração ou pistolas de concussão, eletronarcose e métodos químicos como o emprego de dióxido de carbono, proibindo-se o uso da marreta ou choupa. (BRASIL, 2000).

A insensibilização de ovinos por eletronarcose proporciona bons resultados em relação à queda do pH das carcaças, um dos fatores que determina boa qualidade da carne, e propicia menor estresse dos animais, conforme observado por CHRYSTALL et al (1981), TROEGER (1991), WOTTON et al (1992) e MONTEIRO Jr. (2000).

Conforme GRANDIN (1996, 2000 a, 2000 b, 2000 c), faz-se necessário um bom gerenciamento de todos os procedimentos em um abatedouro para proporcionar condições de bem-estar aos animais e, principalmente, boa qualidade da carne.

Segundo CASTILLO et al (1998), pode-se melhorar a qualidade da carne com a utilização da estimulação elétrica das carcaças, pois este procedimento acelera o rigor mortis e conseqüentemente a queda do pH e o processo de maturação da carne.

Estudos realizados por CRAIG, et al (1999), RATHGEBER et al (1999) e VEERAMUTHU e SAMS (1999), indicam que tanto o atordoamento por eletronarcose, quanto a estimulação elétrica pós-abate interferem significativamente acelerando o rigor mortis e a diminuição do pH das carcaças, devido a glicólise mais rápida e mais intensa.

Estudos feitos por EILERS et al (1996), mostram que a estimulação elétrica pode melhorar a maciez devido ao aceleração do início do rigor mortis e intensifica a queda do pH.

Dentre os diversos fenômenos que se sucedem no *post mortem*, nota-se que a carcaça do animal recém abatido, após um período de repouso, apresenta em seus músculos pH em torno de 6,9 a 7,2. Quando o suprimento de oxigênio é cortado na sangria, o músculo passa a ter metabolismo anaeróbio e há formação de ácido láctico a partir das reservas energéticas que se esgotam mais rapidamente. Como resultado, os prótons (H^+) que são produzidos durante a glicólise proporcionam a diminuição significativa do pH intracelular. As calpaínas I e II são ativadas a partir do momento em que há queda do pH muscular. Se houver demora no início desta queda, as calpaínas podem ligar-se a calpastatina, diminuindo assim a proteólise e o amaciamento. (FRONING e UIJTENBOOGAART, 1988; GILL, et al, 1998; VERGARA e GALLEG0, 2000 e Mc GEEHIN, et al, 2001).

KOOHMARAIE (1992) e DRANSFIELD (1994), detectaram maior atividade das calpaínas quando o pH apresentava-se entre 7,0 e 5,5 e observaram que o início da inativação das calpaínas ocorre quando o pH encontra-se menor que 6,3.

Para HWANG e THOMPSON (2001), estudando a influência do pH e da temperatura na atividade do sistema de calpaínas e na maciez da carne de carcaças que sofreram estimulação elétrica, concluíram que o ideal de diminuição do pH muscular é que este se apresente com valores entre 5,9 e 6,2 após apenas uma hora e meia após o abate e que a temperatura apresente-se entre 29 e 30 °C quando o pH atingir valores próximos a 6,0. Estes fatores irão proporcionar que a carne se torne muito mais macia após 14 dias de maturação.

Ainda, KILLEFER e KOOHMARAIE (1994) e ILIAN, et al (2001), citam grande importância da bioquímica da maciez da carne, que não é completamente entendida. Em seus estudos com bovinos e ovinos, objetivando determinar a ação das calpaínas e calpastatinas, puderam determinar a ação do pH na maciez e quantificar frações de mRNA que codificam estas enzimas. Seus resultados mostraram que há influência da quantidade de mRNA na codificação das enzimas e que a atividade das calpaína 1 e calpastatina diminuíram significativamente nas primeiras 24 horas após o abate, porém a atividade da calpaína 2 manteve-se inalterada. Concluíram, ainda, que na maturação da carne, o efeito das calpaínas está diretamente relacionado com a expressão do mRNA da fibra muscular.

De acordo com GEESINK, et al (2001), que induziram estresse em carneiros e aplicaram estimulação elétrica de alta voltagem, com o objetivo de determinar a influência destes fatores no pH, na temperatura e na maciez da carne, demonstraram que não ocorre influência significativa do estresse na maciez final da carne, medida pela força de cisalhamento.

Sabe-se que as atividades musculares não desaparecem no momento da morte do animal. Varias alterações ocorrem após o abate, as quais são denominadas de "conversão do músculo em carne", sendo dependentes dos tratamentos *ante-mortem* e das técnicas de abate e conservação da carne.

A unidade fundamental do músculo – a fibra muscular – apresenta-se envolvida por uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, o endomísio. Os feixes musculares são formados por um agrupamento de fibras musculares que também se encontram envoltas por tecido conjuntivo, o qual é denominado de perimísio. O conjunto de feixes musculares origina o músculo propriamente dito, e este está delimitado por outro envoltório conjuntivo – o epimísio (BANKS, 1992 e ROÇA, 2000).

As miofibrilas, que compõem a fibra muscular, possuem como unidade estrutural o sarcômero. Esta estrutura é delimitada por duas linhas transversais chamadas de linhas Z. Cada sarcômero é composto por diversas proteínas que formam filamentos grossos e finos. Os filamentos grossos são constituídos principalmente por miosina, mas neles encontram-se também as proteínas C, M, I e F. Nos filamentos finos, o principal constituinte é a actina, que está associada a outras proteínas: tropomiosina,

troponinas C, T e I, e β -actinina. A α -actinina, desmina, filamina, vimentina e sinemina estão localizadas na linha Z. Na banda I encontra-se a nebulina e a titina localiza-se ao longo dos filamentos grossos e finos (BANKS, 1992 e FERNANDES, 1997).

KOOHMARAIE (1992) indica que o peso molecular das calpaínas na fibra muscular é de 110 kDa, por mensuração eletroforética com o uso de Dodecil Sulfato de Sódio em gel Poliacrilamida, e, quando esta proteína é degradada, observam-se subunidades: calpaína I e calpaína II, de 80 e 30 kDa respectivamente. As calpaínas podem ser encontradas no núcleo e nas mitocôndrias das células musculares, porém a maior concentração se dá na banda Z, podendo ser ativadas pela ação de íons Cálcio.

A atividade do sistema de calpaínas ocorre diretamente sobre as moléculas constituintes da linha Z, desmina, titina, nebulina, tropomiosina, troponinas e proteína C, porém não atuam diretamente na actina e na miosina. A hidrólise e liberação dos filamentos finos estão na dependência da hidrólise da tropomiosina e das troponinas. Os sarcômeros são desestruturados quando ocorre a degradação das linhas Z e da desmina, que conferem firmeza à estrutura do sarcômero. A degradação da actina e da miosina é realizada pelas catepsinas B e D, e a do colágeno, pelas catepsinas B e L. O pH da fibra é fator limitante para a atividade destas enzimas, pois necessitam de ambiente ácido para agirem. O sistema enzimático muscular que determina a degradação das proteínas constituintes das miofibrilas é composto por duas enzimas: *μ -calpaína* e *m-calpaína*. A atividade destas enzimas está diretamente relacionada aos níveis de íons Cálcio (Ca^{2+}) disponíveis no sarcoplasma. A ação destas

enzimas irá determinar a autólise das miofibrilas, além de possuírem ação sobre si mesmas, por mecanismos ainda desconhecidos, a qual inibe a degradação excessiva das proteínas (KUBOTA et al, 1993; ROÇA, 2000, GEESING, et al, 2001 e HOPKINS e THOMPSON, 2002).

Segundo KING e GATES (1985), As calpaínas são endopeptidases tecido-específicas e fazem a organização do citoesqueleto das células musculares.

Conforme DRANSFIELD (1994) e ALARCON-ROJO e DRANSFIELD (1995) e HUFF-LONERGAN, et al (1995), a maciez é determinada pela ação de enzimas proteolíticas intracitoplasmáticas. Dentre as principais enzimas envolvidas no processo de maciez, destacam-se as calpaínas e as calpastatinas que se encontram nos lisossomos das células musculares. Ainda não se caracterizou completamente a ação de cada proteinase envolvida neste processo, mas acredita-se que atuem na hidrólise das estruturas musculares, aumentando a maciez da carne. Pode-se, ainda, utilizar a injeção ou imersão da carne em soluções contendo íons Ca^{++} (CaCl_2), que auxilia no processo de amaciamento. Fatores como variações no pH e na temperatura podem influenciar a ativação das enzimas.

Estudos realizados por KARGES, et al (2001); MONTGOMERY, et al (2002); WERTZ, et al (2004); e KUBER, et al (2004), onde foi administrada vitamina D3 em 4, 7, 21 e 35 dias antes do abate, com o objetivo de aumentar a concentração de Cálcio no sangue e nos músculos e, desta forma, aumentar a maciez da carne, observaram não haver influência deste componente. Estes pesquisadores determinaram a maciez a partir da mensuração da força de cisalhamento e da degradação da

troponina T – por eletroforese – em amostra do *Longissimus dorsi* de bovinos.

O estresse pré-abate induzido experimentalmente por BERTRÁN, et al (1997), proporcionou intensas alterações no declínio do pH *post mortem* e diminuição considerável da maciez da carne. Além disso, estes pesquisadores observaram que a atividade das enzimas responsáveis pela degradação protéica intramuscular: calpaínas, catepsinas e calpastatinas, diminuiu significativamente nos animais estressados, pois os valores da força de cisalhamento foram mais elevados após sete dias de maturação das amostras.

A colheita de amostras em diferentes regiões de um mesmo músculo não acarreta variações estatisticamente significativas na análise de maciez da carne, segundo JEREMIAH e MURRAY (1984).

Estudos realizados por WUFF, et al (1996), demonstram que há muitas variações bioquímicas na musculatura durante o *post mortem*. Durante as primeiras 24 horas, principalmente, nota-se intensa atividade de calpaínas que hidrolisam a desmina, a titina e a nebulina. A tropomiosina e a troponina C facilitam o fenômeno da hidrólise destas proteínas.

KOOHMARAIE (1996) e KOOHMARAIE, et al, (1996) indicam que a maciez da carne vem desde o campo até o processamento na indústria. E, nestes processos, ocorrem mudanças estruturais como: a) enfraquecimento do disco Z do sarcômero, com a fragmentação das miofibrilas; b) degradação da desmina, que faz a ligação transversal entre as miofibrilas; c) degradação da titina, responsável pela tensão entre as miofibrilas; d) degradação da nebulina (banda I), porém não se sabe como

exatamente este processo ocorre e e) desaparecimento da troponina T (banda I), sendo este um bom indicador da proteólise intra-miofibrilar.

Dentre as modificações que irão determinar a maciez da carne, notadas por KOOHMARAIE (1992), durante o resfriamento, pode-se citar: o enfraquecimento das bandas Z devido à fragmentação das miofibrilas, a degradação da desmina, titina, nebulina (banda I), troponina T (banda I), que indicam a intensa proteólise *post mortem* e a ação do cálcio acelerando o rigor mortis e o amaciamento. A troponina C, proteína miofibrilar, atua quando ligada ao cálcio, favorecendo também a maciez da carne.

De acordo com WHIPPLE et al, 1990, pesquisando amostras de *Longissimus dorsi* de bovinos, as calpastatinas, inibidoras específicas das calpaínas, têm maior atividade após 24 horas do abate, pois a proteólise é reduzida.

Mais importante que a atividade da calpastatina, a relação μ -calpaína/calpastatina é o fator determinante da maciez da carne entre diferentes genótipos bovinos (PRINGLE et al, 1997).

ILIAN, et al (2001), determinaram que quanto maior a quantidade e a ação das calpaínas e menor a atividade das calpastatinas, maior a maciez da carne dos ovinos após a maturação. Para que a carne fique macia, deve ocorrer a degradação da linha Z, desmina, titina, nebulina, desaparecimento da troponina T e sem comprometimento da actina e da miosina de acordo com KOOHMARAIE, (1994).

Segundo RÜBENSAN e MONTEIRO, 2000, a atividade de calpastatina pode determinar um animal que produzirá carne macia e, assim, aumentar a precocidade na terminação.

OU, et al (1991), pesquisaram a influência da idade e da castração de ovinos na atividade das calpaínas e calpastatinas. Os animais do experimento foram alimentados de forma semelhante e seus resultados demonstram que a idade mais avançada dos animais pode acarretar grande influência na atividade enzimática intramuscular e no crescimento do músculo. Além disso, notaram que os animais que foram submetidos a castração apresentaram crescimento muscular mais acentuado, mas sem ocorrerem alterações significativas nas atividades das calpaínas e calpastatinas.

Uma possível seleção de animais com baixa atividade de calpastatinas poderia proporcionar a produção de carne de maior maciez. Em vista disto, SHACKELFORD et al, (1994), realizaram ensaios experimentais para determinar a herdabilidade de tais características, avaliando a atividade de calpastatina, força de cisalhamento e o teor de gordura intramuscular. Os resultados permitiram aos autores concluir que a seleção genética dos animais para baixa atividade de calpastatinas pode melhorar a maciez da carne.

Comparativamente, bovinos cruzados Brahman apresentam maturação mais lenta da carne, em relação a bovinos europeus, em virtude da alta atividade da calpastatina, segundo O'CONNOR et al, (1997).

WOODWARD, et al (2000), propuseram uma avaliação *in vivo* – utilizando biopsias – do *Longissimus dorsi* e *Supra spinatus* de bovinos como um fator de seleção genética para maciez e como parte do teste de progênie para estes animais. Seus resultados mostraram que, comparando-se os dados das biopsias e da carne após o abate, existe

relação entre a quantidade e atividade das calpastatinas antes e depois do abate, sendo possível utilizar este teste para melhorar a maciez da carne.

A aplicação das técnicas de marcações imunoistoquímicas é bastante usada em medicina humana. A exemplo disso, SABUCEDO e FURTON (2003) mediram a degradação de troponina I cardíaca de bovinos para determinar a sua relação com o tempo de óbito destes animais. Para tal, foi utilizada a quantificação eletroforética desta proteína e a técnica de Wester-Blot com anticorpos monoclonais, pois a troponina I é homóloga nos mamíferos. Conforme os dados obtidos foi possível concluir que é possível se aproximar o tempo de óbito dos animais e, comparativamente, o de seres humanos.

Estudos específicos mostram grande interesse da comunidade científica em marcações e determinações da ultra-estrutura química das proteínas das fibras musculares, porém mostram pouca aplicabilidade na maciez da carne, mas com vantagens futuras para a pesquisa e para a indústria. Como fora feito por pesquisadores como TSITSILONIS, et al (2002), que desenvolveram métodos com a utilização de anticorpos policlonais para se determinar a degradação das proteínas musculares.

Os objetivos desta pesquisa foram: a) correlacionar as variações de temperatura e pH com alterações nas proteínas envolvidas nos processos de maciez da carne; b) demonstrar imunoistoquimicamente a diminuição gradual das proteínas citoplasmáticas envolvidas no processo de maciez da carne dos ovinos; c) correlacionar os resultados imunoistoquímicos às informações observadas na literatura nos três momentos de avaliação; d) mensurar as variações de pH e temperatura ocorridas nas 24 horas pós abate; e) gerar informações científicas sobre as

marcações imunoistoquímicas da transformação do músculo em carne, pois as informações sobre as ações enzimáticas são, muitas vezes, contraditórias.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material

4.1.1- Animais

Para o desenvolvimento dos ensaios experimentais foram utilizados 30 ovinos machos, com idade variando entre seis meses e um ano, mestiços Suffolk. Os animais foram abatidos com a utilização do método de eletronarcose, em virtude dos melhores resultados obtidos por MONTEIRO Jr. (2000), e pela disponibilidade dos equipamentos no abatedouro.

O transporte, jejum e dieta hídrica, e inspeção pré-abate seguiram as normas do Serviço de Inspeção (BRASIL, 2000). Os procedimentos realizados desde os currais de espera para o abate até a colheita das amostras estão demonstrados no figura 01.

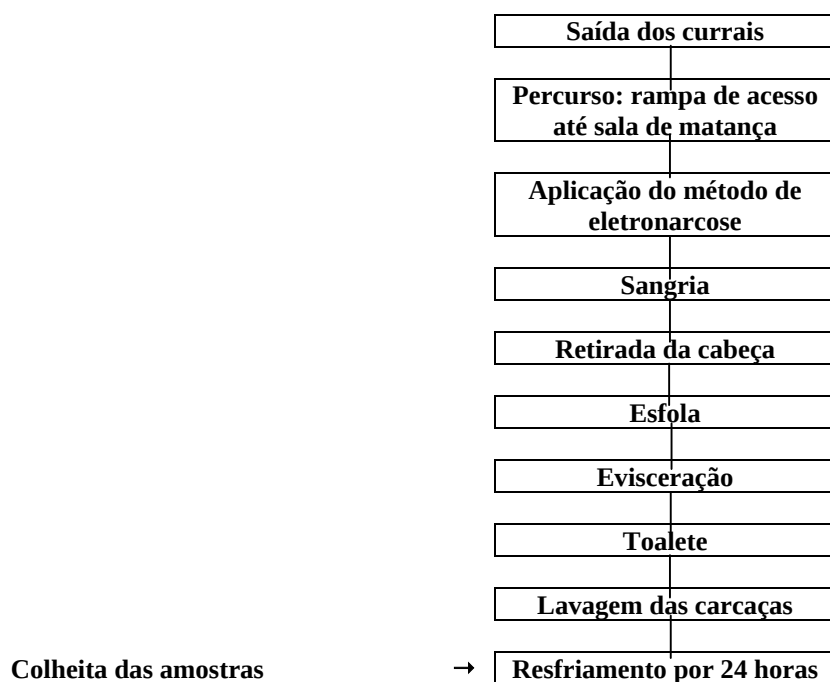


Figura – 01: Fluxograma de abate dos ovinos.

4.1.2- Equipamento para Insensibilização

O equipamento para a realização da eletronarcose foi do tipo “garfo”, que operou em 220 volts e com corrente de 200 mili-amperes (MONTEIRO Jr., 2000). A aplicação da corrente elétrica foi feita na região temporal com as cabeças previamente molhadas para se evitar o efeito isolante de corrente elétrica da lã. Posteriormente foi realizada a sangria com faca esterilizada por água em ebulição, conforme o padrão do Serviço de Inspeção.

4.2- Métodos:

4.2.1- Amostragem da Musculatura:

Foi excisado um fragmento do músculo *Longissimus dorsi* de cada carcaça, aproximadamente 30 minutos após a sangria, de forma semelhante ao *toilete* de contusão da região lombar, pois não se podia comprometer esteticamente as carcaças dos animais.

Os momentos de colheita dos fragmentos e das mensurações do pH e da temperatura foram:

- **Momento “1”:** cerca de 30 minutos após a sangria;
- **Momento “2”:** 12 horas após a sangria;
- **Momento “3”:** 24 horas após a sangria.

Estes fragmentos foram acondicionados em recipientes plásticos individuais, com as devidas identificações e mantidos sob refrigeração (2° a 4° C), por 24 horas. Nos momentos previamente

estipulados, foram retirados fragmentos de aproximadamente 2 x 2 x 1 cm, os quais foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%, para a realização de cortes histológicos em parafina e coloração das lâminas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968), objetivando a análise das fibras musculares em cada momento de colheita. Tais procedimentos seguiram as normas do serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu.

4.2.2- Temperatura e pH das Carcaças:

Para a mensuração das variações de temperatura e pH das carcaças foi utilizado um potenciômetro portátil medidor de pH, com probe seca, que possui um termômetro em sua estrutura. Realizou-se a mensuração destas variáveis nas amostras colhidas conforme citado anteriormente, do músculo *Longissimus dorsi*, (CHRYSTALL et al., 1981; EILERS et al., 1996 e MONTEIRO Jr., 2000). As tomadas de temperatura e pH foram feitas nos momentos das colheitas dos fragmentos para o processamento laboratorial.

4.2.3- Análise Imunoistoquímica:

Anteriormente à análise imunoistoquímica, foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina para triagem das lâminas, conforme a técnica descrita por LUNA (1968).

Utilizando-se um micrótomo eletrônico, foram feitos cortes da musculatura de aproximadamente três micrômetros de espessura, os quais foram transferidos para lâminas de vidro previamente preparadas com uma

solução de Organosilano, objetivando a perfeita aderência do material. Buscou-se incluir os fragmentos de músculo, em parafina, de forma em que estes, após o corte em micrótomo, apresentassem cortes transversais das fibras nas lâminas.

As lâminas permaneceram 24 horas em estufa a 55°C, conforme a técnica utilizada no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária, descrita a seguir.

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena: em partes iguais de metanol e água oxigenada 20 volumes, em duas trocas de 5 minutos cada (a solução foi preparada no momento do uso), posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e mais duas lavagens em solução de TRIS por 5 minutos cada. Após, fez-se a incubação com anticorpos primários: desmina, troponina C e troponina T na diluição 1:100 (Novocastra Laboratories LTDA.), incubados em solução de BSA 1% (albumina bovina - Sigma). A incubação foi feita a 4°C por 18 horas (overnight) em câmara úmida. As lâminas foram novamente lavadas – duas vezes – em solução de TRIS, por 5 minutos cada.

Foi realizada a reação com anticorpos secundários com a utilização do kit LSAB, onde as lâminas permaneceram incubadas por 30 minutos na solução “A”, lavadas duas vezes em solução de TRIS por 5 minutos cada uma e novamente incubadas na solução “B” por mais 30 minutos e posteriormente lavadas mais duas vezes em solução de TRIS por 5 minutos cada uma.

A coloração foi realizada com o cromógeno composto por 0,025g de DAB (3,3' Diamino-Benzidina - Sigma) diluído em 100 ml de TRIS, filtrando-se à solução e adicionando-se 600µl de água oxigenada 20

volumes, deixando-se reagir por 3 minutos em ambiente desprovido de iluminação. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer por 30 segundos. Posteriormente as lâminas foram montadas com lamínulas para análise em microscópio óptico.

A avaliação das fibras marcadas pela imunoistoquímica foi realizada da seguinte forma: tomou-se 100 fibras, aleatoriamente, de cada lâmina e quantificou-se qual a porcentagem de fibras marcadas.

4.2.4- Análise Estatística:

Avaliaram-se as variáveis: temperatura e pH e marcações imunoistoquímicas pelo Teste de Tukey, determinando-se média e desvio padrão, utilizando-se o programa SAS (SAS, 1988). A comparação dos resultados entre as variáveis foi feita com o emprego do Teste da correlação de Pearson (WICHERN e JOHNSON, 1992).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Estão apresentados a seguir os resultados obtidos nos ensaios experimentais, com suas respectivas análises estatísticas.

As mensurações do pH e da temperatura nos momentos 0,5, 12 e 24 horas após o abate estão representados na tabela 01. Pode-se notar que houve diferença significativa na comparação dos valores em cada momento de avaliação, demonstrando a diminuição gradativa das duas variáveis. As figuras 01 e 02 ressaltam os resultados apresentados na tabela 01 e Anexos (tabelas 1 e 2).

Tabela-01: Média e Desvio Padrão do pH e da Temperatura nos três momentos de avaliação.

	0,5 horas	12 horas	24 horas
pH	6,63 ± 0,18 a	5,86 ± 0,16 b	5,51 ± 0,13 c
Temperatura	35,39 ± 0,66 a	6,90 ± 0,82 b	4,58 ± 0,37 c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa em uma determinada variável, em relação ao momento de análise, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos a partir da mensuração do pH mostram considerável diminuição dos valores nos momentos de análise, apresentando diferença estatística significativa. Estes valores estão de acordo com os estudos realizados por CHRYSTAL, et al. (1981), KOOHMARAIE, (1996), CASTILLO, et al. (1998) e MONTEIRO Jr., (2000).

A rápida diminuição da temperatura ocorreu devido à retirada dos fragmentos dos músculos das carcaças e acondicionamento individual sob refrigeração, diferentemente do que ocorre quando se determinam estes valores diretamente das carcaças na câmara fria dos abatedouros, conforme os trabalhos de CHRYSTALL, et al. (1988), KOOHMARAIE, et al., (1992), KOOHMARAIE, (1996) e KOOHMARAIE, et al, (1996).

Figura-02: Média do pH das carcaças nos três momentos de avaliação.

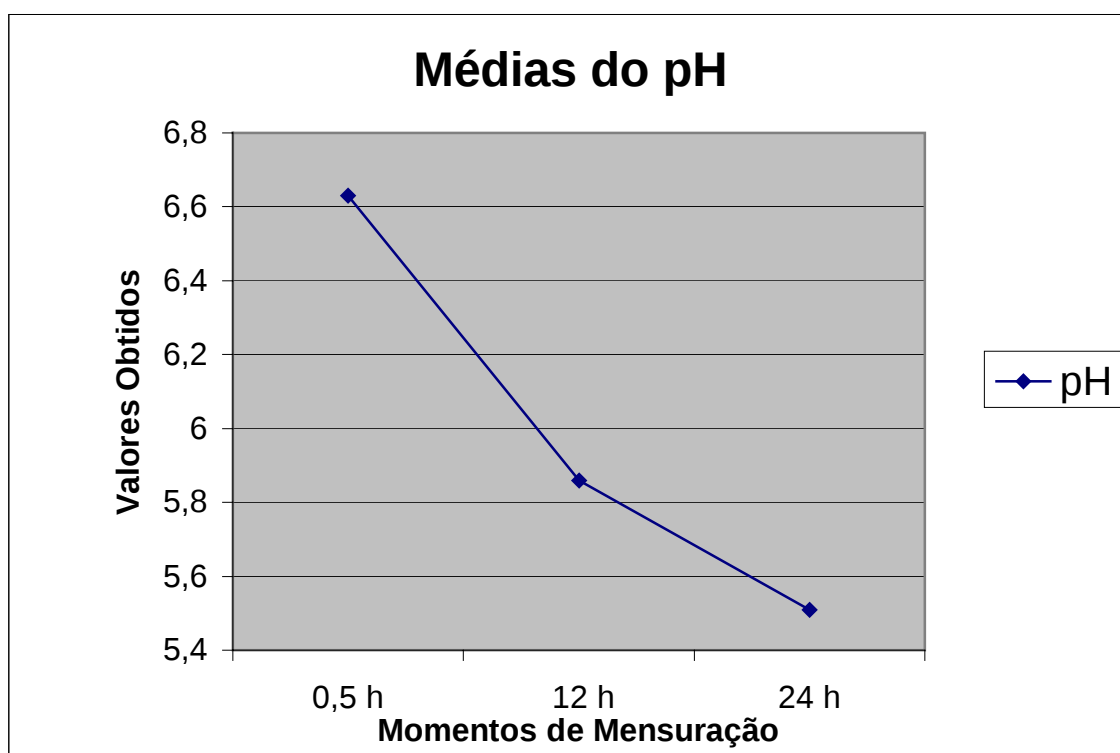
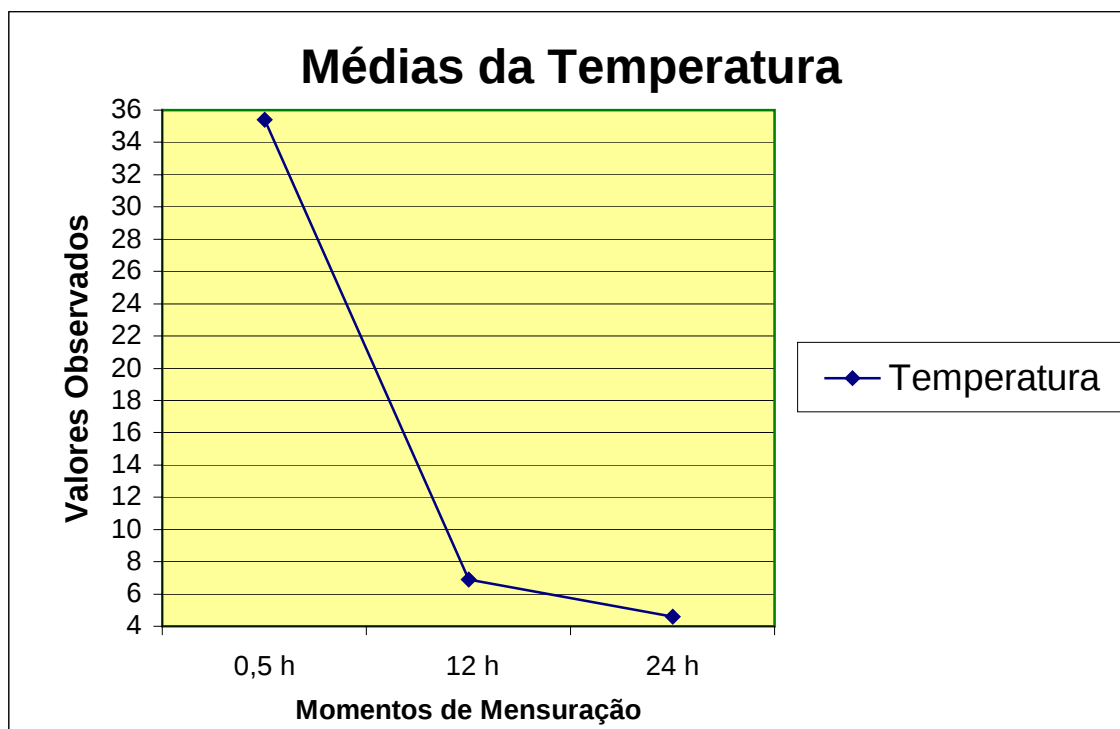


Figura-03: Média da temperatura das carcaças nos três momentos de avaliação.



A avaliação do percentual de fibras marcadas pela técnica de imunoistoquímica estão representadas na tabela 02 e Anexos (tabelas 3,4 e 5). Nota-se que houve diferença estatística para as variáveis Desmina e Troponina T, o que demonstra que estas proteínas estão sendo degradadas durante as primeiras 24 horas pós-abate, de forma gradual. A Troponina C não apresentou variações significativas em sua degradação.

A hidrólise das proteínas citadas também foi observada nos estudos realizados por WHIPPLE, et al, (1990), KOOHMARAIE, (1992, 1994 e 1996) e WUFF, et al., (1996), porém tais ensaios foram realizados utilizando-se técnicas eletroforéticas para quantificação das proteínas. Contudo, tais resultados divergem dos obtidos por DRANSFIELD, (1994), que notou que a atividade enzimática que degrada as proteínas da fibra muscular ocorre de forma mais intensa após as 24 horas iniciais do

processo de transformação do músculo em carne. Na presente pesquisa buscou-se uma nova forma de se determinar tal degradação, o que não foi encontrado na literatura disponível.

Tabela-02: Média e Desvio Padrão da porcentagem de fibras marcadas pela imunoistoquímica.

Anticorpo Primário	0,5 horas	12 horas	24 horas
Desmina	83,76 ± 5,99 a	71,46 ± 6,97 b	63,86 ± 8,21 c
Troponina C	99,40 ± 1,04 a	99,07 ± 1,57 a	99,10 ± 1,93 a
Troponina T	75,77 ± 4,46 a	65,77 ± 3,29 b	59,60 ± 4,56 c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa em uma determinada variável, em relação ao momento de análise, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

A maciez da carne está relacionada com a degradação das proteínas da linha Z, desmina, titina, nebulina e o desaparecimento da troponina T, de acordo com KOOHMARAIE, (1994), o que pode ser observado nos resultados obtidos neste estudo.

As figuras 04 a 10 mostram a coloração de Hematoxilina e eosina e as marcações imunoistoquímicas das proteínas das fibras musculares.

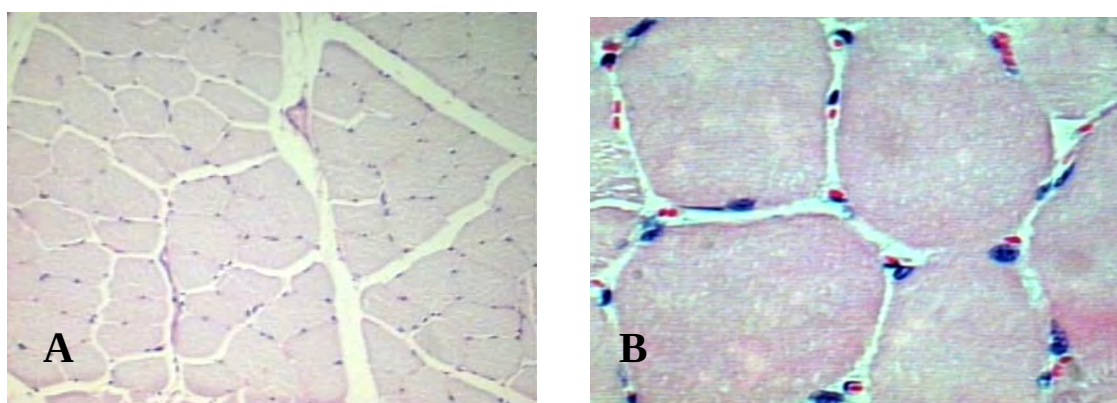


Figura-04: Fibras musculares sem alterações coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina. (A: 100 x e B: 400 x).

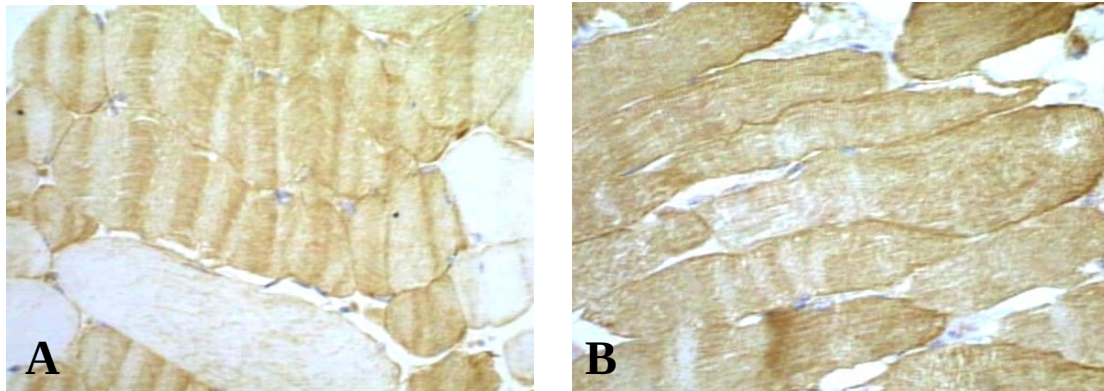


Figura-05: Marcação imunoistoquímica com anticorpos primários para Desmina da fibra muscular de amostras obtidas após 30 minutos do abate. (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / **A:** 200 x e **B:** 400 x).

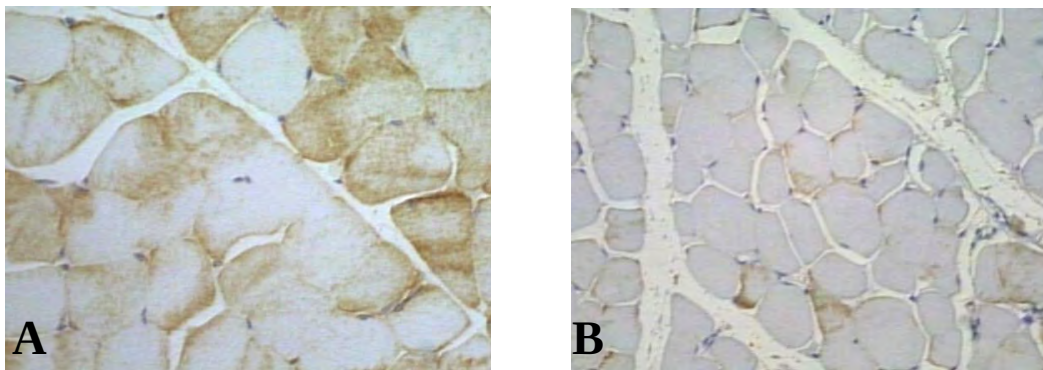


Figura-06: Marcação imunoistoquímica com anticorpos primários para Desmina na fibra muscular de amostras obtidas após 12 horas (**A:** 200 x) e 24 horas (**B:** 100 x) após o abate. (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer)

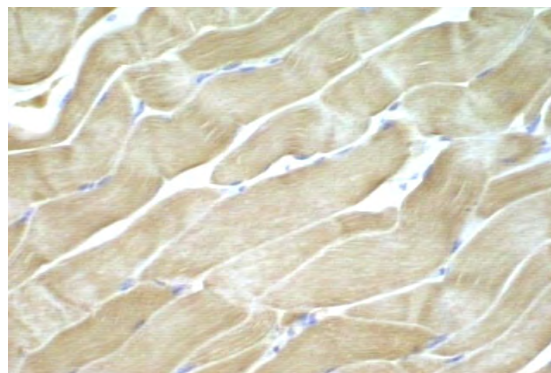


Figura-07: Nota-se que todas as fibras musculares estão marcadas com a utilização de anticorpos primários anti-Troponina C, após 30 minutos do abate (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / 200 x).

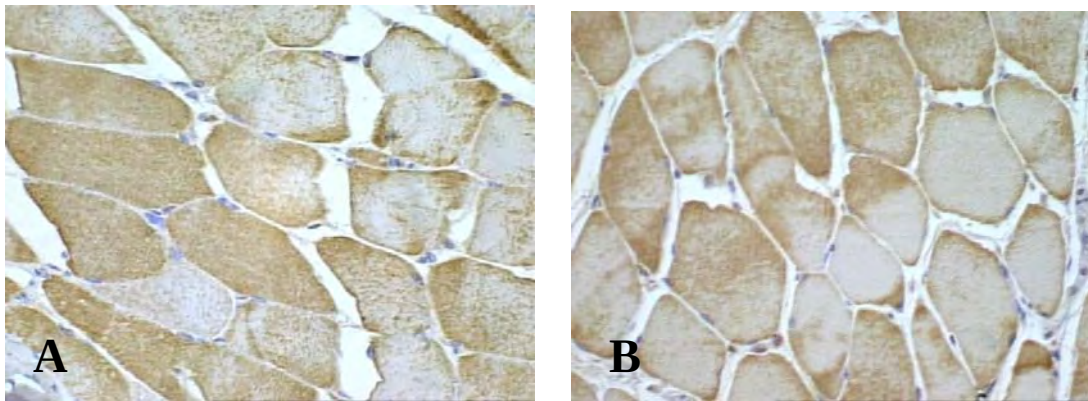


Figura-08: Fibras musculares marcadas com anticorpos primários Anti-Troponina C onde se pode observar que todas as fibras apresentam-se marcadas. (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / **A:** 12 horas após o abate – 200x e ; 24 horas após o abate – 200x).

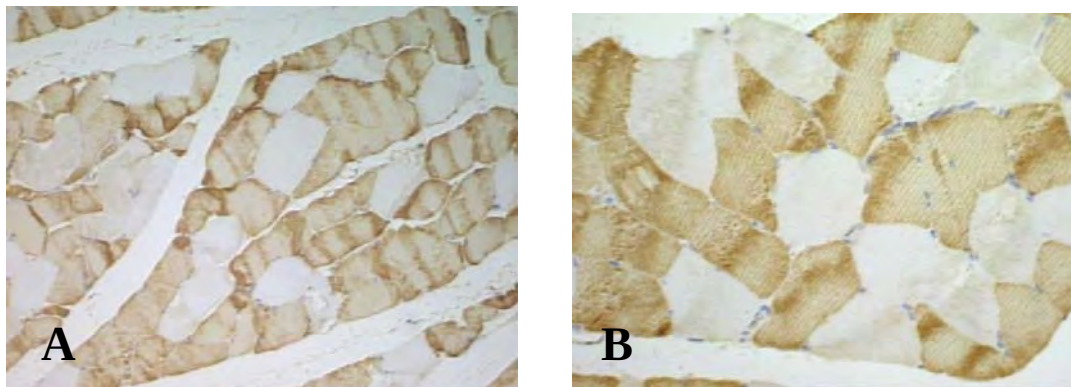


Figura-09: Utilização de anticorpos primários Anti-Troponina T, em fibras coletadas após 30 minutos do abate, onde se observa degradação parcial das proteínas (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / **A:** 100x e **B:** 200 x).

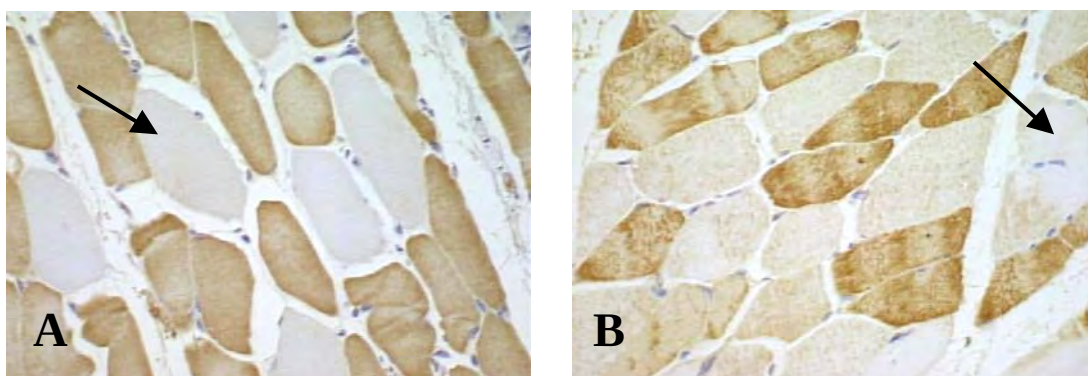


Figura-10: Marcações imunoistoquímicas para com anticorpos primários para troponina T, onde se podem notar poucas fibras marcadas (setas), (Anticorpo secundário LSAB, cromógeno DAB e contra-coloração: Hematoxilina de Meyer / **A:** 12 horas após o abate e **B:** 24 horas após o abate – 200x).

A tabela 03 especifica a correlação entre os resultados obtidos nas análises.

Tabela-03: Comparação entre as variáveis analisadas pelo teste da Correlação de Pearson.

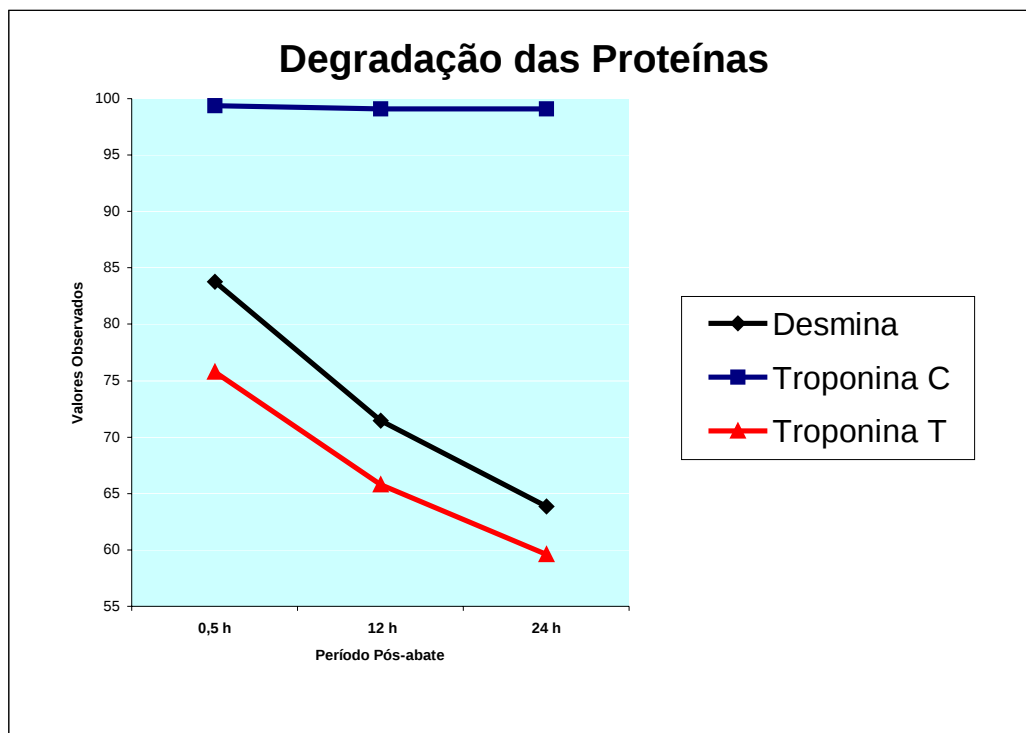
	Temperatura	Desmina	Troponina C	Troponina T
pH	0,91767 *	0,71520 *	0,06410	0,81465 *
Temperatura		0,72538 *	0,09070	0,81218 *
Desmina			0,09325	0,72120 *
Troponina C				0,16641

Valores na mesma linha seguidos de * apresentam correlação entre si, com $p < 0,0001$.

A figura 10 representa graficamente o percentual da diminuição gradual das proteínas: desmina, troponina C e troponina T, marcadas pela imunoistoquímica.

Conforme os valores apresentados na tabela 03, pode-se observar que existe alta correlação entre a diminuição do pH e a diminuição da temperatura. Além disso, a degradação das proteínas envolvidas em parte do processo de maciez da carne – desmina e troponina T – mostram-se diretamente relacionadas com o processo químico que ocorre nas fibras musculares nas primeiras 24 horas após o abate, quando, em função da temperatura e da anaerobiose, ocorre a diminuição gradual do pH, conforme os estudos de TSITSILONIS, et al., (2002), KUBER, et al., (2004) e VEISETH, et al., (2004). Não se observou degradação significativa da troponina C, nas 24 horas de avaliação, conforme ILIAN, (2001) e YAMADA, (2003).

Figura-11: Variação da porcentagem de fibras marcadas pela imunohistoquímica, em relação aos momentos de análise.



Considerando-se os resultados obtidos, as técnicas imunohistoquímicas empregadas nos ensaios desta pesquisa podem, num futuro próximo, ser de grande aplicabilidade nos estudos sobre maciez da carne e para o diagnóstico de eventuais lesões musculares onde ocorre degradação destas e outras proteínas intrínsecas da célula muscular.

6- Conclusões:

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios experimentais desta pesquisa, pode-se concluir que:

- σ A excisão dos fragmentos de músculo e o acondicionamento individual destas amostras, após a colheita, proporciona diminuição rápida da temperatura dos músculos;
- σ O processo de maciez *post mortem* tem início durante o *rigor mortis* pois foi observada degradação gradativa da Desmina e da Troponina T nas primeiras 24 horas pós-abate;
- σ Não ocorre degradação significativa da Troponina C até 24 horas após o abate;
- σ A hidrólise da Desmina e da Troponina T está relacionada com a diminuição dos valores do pH e da temperatura das carcaças;
- σ Não há relação entre a diminuição do pH e da temperatura com a desnaturação da Troponina C;
- σ A diminuição do número de fibras marcadas pelas técnicas de imunoistoquímica dos fragmentos musculares para Desmina e Troponina T indicam que este processo ocorre em concomitância, possivelmente com o auxílio da Troponina C, a qual foi pouco hidrolisada nos três momentos de análise.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: *

ALARCON-ROJO, E.; DRANSFIELD, E. Alteration of post-mortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. **Meat Science**, v. 41, n. 2, p. 163-78, 1995.

BELTRÁN, J.A., et al. Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef. **Meat Sci.**, v. 45, n. 2, p. 201-7, 1997.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2^a ed., Brasil: Manole, 1992, 629p.

BIAGINI, G.R. Qualidade da carne bovina: maciez. **Frigorífico: açougueiro moderno**, v. 7, n. 69, abr., p. 50, 2001.

BRASIL Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de abate humanitário de animais de açougue. S.D.A./ M.M.A. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14-6, 24 de janeiro de 2000, Seção I. (Internet: www.agricultura.gov.br/das/dipoa/Anexo20Abate.htm).

CASTILLO, A., et al. Use of hot water for beef carcass decontamination. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 1, p. 19-25, 1998.

* **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. NBR6023: Referências Bibliográficas. Rio de Janeiro, 2002.

- CHRYSTALL, B.B., et al. Residual blood in lamb muscles, **Meat Sci.**, England, 5: 339-45, 1981.
- CRAIG, E.W., et al. The effects of antemortem electrical stunning and postmortem electrical stimulation on biochemical and textural properties of broiler breast meat, **Poult. Sci.**, v. 78, n. 3, p. 490-4, 1999.
- DRANSFILD, E. Modelling post-mortem tenderization-V: inactivation of calpains. **Meat Science**, v. 37, p. 391-409, 1994.
- EILERS, J.D., et al. Modification of early post mortem muscle pH and use of post mortem aging to improve beef tenderness. **J. Anim. Sci.**, v 74, p. 790-8, 1996.
- FERNANDES, J.R. A maturação da carne bovina. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP “**PRESERVAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DE CARNE BOVINA IN NATURA**”, 1997, Campinas. Campinas: ITAL, 1997, p. 47-55.
- FRONING, G.W.; UIJTENBOOGAART, T.G. Effect of post mortem electrical stimulation on color, texture, pH and cooking losses of hot and cold deboned chicken broiler breast meat. **Poultry Sci.**, Champaign, v. 67, p. 1536-44, 1988.
- GEESINK, G.H., et al. Effects of stress and high voltage electrical stimulation on tenderness of lamb *m. longissimus*. **Meat Sci.**, n. 57, p. 265-71, 2001.
- GEESINK, G.H., et al. Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization. **Meat Science**, v. 59, p. 417-22, 2001.

- GILL, M., et al. Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of *Longissimus* porcine muscle from normal and PSE meat. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 385-90, 1998.
- GRANDIN, T. Factor that impede animal movement at slaughter plants. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 209, n. 4, p. 757-9, 1996.
- GRANDIN, T. Guias recomendadas para el manejo de animais para empacadores de carne. Internet: <http://www.grandin.com/spanish/spanish.0498.htm>. 2000a, 14 p.
- GRANDIN, T. La conducta animal y su importancia en el manejo del ganado. Internet: <http://www.grandin.com/spanish/spanish2.htm>. 2000 b, 14 p.
- GRANDIN, T. Manejo y procesado del ganado. Internet: <http://www.grandin.com/spanish/ganaderia94.htm>. 2000 c, 11 p.
- HOPKINS, D.L., THOMPSON, J.M. The relationship between post-mortem calcium concentration or pH and indicators of proteolysis in ovine muscle. **Meat Sci.**, n. 61, p. 411-14, 2002.
- HUFF-LONERGAN, E., et al. Effects of post mortem aging time, animal age, and Sex on degradation of titin and nebulin in bovine *Longissimus* muscle. **J. Anim. Sci.**, n. 73, p. 1064-73, 1995.

- HWANG, I.H., THONPSON, J.M. The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objectivetenderness in electrically stimulated beef *longissimus dorsi* muscle. **Meat Sci.**, n. 58, p. 167-74, 2001
- ILIAN, M.A., et al. Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle specific calpains. **J. anim. Sci.**, v. 79, n. 1, p. 122-32, 2001.
- JEREMIAH, L.E.; MURRAY, A. C. The influence of anatomical location within the longissimus dorsi muscle on overall tenderness and on the concentration and solubility of intramuscular collagen. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 64, 1045, 1984.
- KARGES, K., et al. Effects of supplemental vitamin D3 on feed intake, carcass characteristics, tenderness, and muscle properties of beef steers. **J. anim. Sci.**, v. 79, n. 11, p. 2844-50, 2001.
- KILLEFER, J, KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis and steady-state mRNA expression. **J. anim. Sci.**, n. 72, p. 606-14, 1994.
- KING, L. E., Jr., e GATES R. E. Calcium-activated neutral protease purified from beef lung: Properties and use in defining structure of epidermal growth factor receptors. **Arch. Biochem. Biophys.** 242:146-156, 1985.

- KOOHMARAIE, M. Role of the neutralproteinases in post mortem musculeprotein degradation on meat tenderness. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v.45, p. 63-71, 1992.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, n. 1/2, p. 93-104, 1994.
- KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Sci.** 43:S193–S201, 1996.
- KOOHMARAIE, M., et al. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 2935-42, 1996.
- KUBER, P.S., et al. Effects of biological type and dietary fat treatment and factors associated with tenderness: I. Measurements on beef longissimus muscle. **J. Anim. Sci.**, v. 82, n. 3, p. 770-8, 2004.
- KUBOTA, E.H, et al. Maturação da carne; um processo enzimático. **Revista Nacional da Carne**. V. 18, n. 200, out., p. 12-5, 1993.
- LUCCAS, J. A marcha das ovelhas. **Globo Rural**, ano 18, n. 214, ago, p. 50-5, 2003.
- LUNA, L.G. **Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces**, Institute of Pathology: Mc Graw-Hill, 1968, 258p.
- Mc GEEHIN, B., et al. Factors affecting the pH decline in lamb after slaughter. **Eat Sci.**, n. 58, p. 79-84, 2001.

- MONTEIRO Jr., L.A. Avaliação das técnicas de insensibilização de ovinos abatidos na região de Botucatu – SP. Botucatu: F.M.V.Z. / UNESP, 2000. 164 p. Dissertação (Mestrado – área de Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista.
- MONTGOMERY, J.L., et al. Effect of vitamin D3 supplementation level on the post mortem tenderization of beef from steers. **J. Anim. Sci.**, v. 80, n. 4, p. 971-81, 2002.
- O’CONNOR, S.F. et al. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos Taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1822-30, 1997.
- OU, B., et al. Effects of age and castration on activities of calpains and calpastatin in sheep skeletal muscle. **J. Anim. Sci.**, n. 69, p. 1919-24, 1991.
- PRINGLE, T.D., et al. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbreed steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955-61, 1997.
- RATHGEBER, B.M., et al. Rapid postmortem pH decline and delayed chilling reduce quality of turkey breast meat, **Poult. Sci.**, v. 78, n. 3, p. 477-84, 1999.
- ROÇA, R.O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA, UNESP, 2000, 201 p.

- RÜBENSAN, J.M.; MONTEIRO, E.M. Maciez e atividade de calpastatina em carne bovina. **Documentos CPPSul/EMBRAPA**, n. 28, 2000, 53 p.
- S.A.S. Institute. **SAS Proceadures Gide**, Release 6, 3^a ed., Cary, 1988, 441p.
- SABUCEDO, A.J., FURTON, K.G. Estimation of postmotem interval using the protein marker cardiacTroponin I. **Forensic Sci. Int.**, v. 134, n. 1, p. 11-6, 2003.
- SHACKELFORD, S.D. et al. Herdabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine *post rigor* calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler shear force, retail product yield and growth rate. **Jour. of Anim. Sci.**, v. 72, p. 857-63, 1994.
- SWATLAND, H.J. **Slaughtering**. Internet: <http://www.bert.aps.uoguelph.ca/~swatland/ch1.9.html>. 2000, 10 p.
- TROEGER, K. Slaughtering: animal protection and meat quality, current practice - What needs to be done?, **Fleischwirtsch.**, Frankfurt, v. 71, n. 3, p. 298-302, 1991.
- TSITSILONIS, O.E., et al. A skeletal muscle troponina T specific ELISA based on the use of an antibody against the soluble troponina T (16-31) fragment. **J. Immun. Meth.**, v.268, n. 2, p. 141-8, 2002
- VEERAMUTHU, G.I.; SAMS, A.R. Postmortem pH, myofibrillar fragmentation, and calpain activity in Pectorialis from electrically stimulated and muscule tensioned broiler carcasses, **Poult. Sci** , v. 78, n. 2, p. 272-6, 1999.

- VEISETH, E., et al. Indicators of tenderization are detectable by 12h postmortem in ovine longissimus. **J. Anim. Sci.**, v. 82, n. 5, p. 1428-36, 2004.
- VERGARA, H., GALLEG0, L. Effect of electrical stunning on meat quality of lamb. **Meat Sci.**, n. 56, p. 345-9, 2000.
- WERTZ, A.E., et al. Feeding 25-hydroxyvitamin D3 to improve beef tenderness. **J. Anim. Sci.**, v. 82, n. 5, p. 1410-08, 2004.
- WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine *Longissimus* muscle. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 1232-8, 1994.
- WHEELER, T.L., et al. Effect of postmortem injection time and postinjection aging time on the calcium-activated tenderization process in beef. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 2652-60, 1997.
- WHIPPLE, G. et al. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2716-28, 1990.
- WICHERN, D.W.; JOHNSON, R.A. **Applied Multivariate Statistical Analysis**, 3a ed., New Jersey: Prentice Hall, 1992, 642 p.
- WOODWARD, B.W., et al. Evaluation of calpastatin activity measures in ante- and postmortem muscle from half-sib bulls and steers. **J. Anim. Sci.**, v. 78, n. 4, p. 804-9, 2000.

WOTTON, S.B., et al. Pig Slaughtering procedures: head-to-back stunning, **Meat Sci.**, v. 32, p. 245-55, 1992.

WUFF, D.M., et al. Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, sub primal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from Limousin steers. **J. Anim. Sci.**, n. 74, p. 569-76, 1996.

Anexos

Tabela 1: Resultados individuais da mensuração do pH das carcaças nos três momentos de avaliação.

Animal	Momento 1	Momento 2	Momento 3
1	6,7	5,9	5,6
2	6,5	6,1	5,7
3	6,8	6,0	5,4
4	6,9	5,9	5,5
5	6,6	5,8	5,3
6	6,9	6,1	5,6
7	6,6	5,9	5,5
8	6,8	5,8	5,4
9	6,7	6,0	5,8
10	6,4	5,7	5,5
11	6,5	5,8	5,3
12	6,7	5,7	5,4
13	6,8	6,1	5,5
14	6,2	5,6	5,4
15	6,4	6,1	5,8
16	6,6	5,9	5,6
17	6,5	5,7	5,5
18	6,7	5,8	5,4
19	6,5	5,6	5,3
20	6,8	6,0	5,7
21	6,9	5,9	5,6
22	6,6	6,1	5,5
23	6,7	5,8	5,4
24	6,5	5,9	5,6
25	6,8	6,0	5,5
26	6,5	5,8	5,5
27	6,7	5,9	5,6
28	6,5	5,7	5,5
29	6,3	5,6	5,4
30	6,8	5,7	5,5
Média	6,63	5,86	5,51

Tabela 2: Resultados individuais da mensuração da temperatura (° C) das carcaças nos três momentos de avaliação.

Animal	Momento 1	Momento 2	Momento 3
1	34,80	8,7	4,30
2	35,90	7,3	4,7
3	35,70	7,8	4,5
4	36,20	8,0	4,0
5	36,50	8,3	5,3
6	35,80	6,9	4,2
7	35,30	8,2	4,2
8	35,70	7,5	4,8
9	33,80	7,4	4,5
10	34,80	6,8	4,3
11	35,60	6,6	5,2
12	34,10	7,2	4,9
13	35,20	6,9	4,6
14	35,70	6,3	4,3
15	36,20	7,0	4,5
16	34,30	5,9	4,0
17	35,60	7,1	5,1
18	36,00	6,2	4,7
19	35,80	6,3	4,9
20	34,70	5,9	4,3
21	34,40	6,4	5,0
22	35,30	5,8	4,1
23	35,80	6,4	4,9
24	35,50	6,0	4,4
25	34,80	6,5	4,7
26	35,20	5,7	4,1
27	35,70	8,1	4,8
28	35,90	7,0	5,2
29	36,00	6,9	4,7
30	35,40	6,1	4,3
Média	35,39	6,90	4,58

Tabela 3: Resultados individuais da porcentagem de fibras marcadas pela imunoistoquímica para Desmina, nas fibras musculares, nos três momentos de avaliação.

Animal	Momento 1	Momento 2	Momento 3
1	83	79	71
2	87	69	58
3	81	64	53
4	88	75	70
5	92	69	74
6	89	78	74
7	86	77	54
8	85	68	62
9	86	78	67
10	84	69	72
11	93	72	65
12	82	66	57
13	74	70	59
14	83	62	76
15	94	71	65
16	78	61	58
17	82	69	54
18	86	67	63
19	79	63	50
20	80	72	62
21	91	85	76
22	83	74	61
23	87	79	68
24	77	73	67
25	74	65	59
26	85	78	63
27	72	63	52
28	91	85	77
29	88	82	76
30	73	61	53
Média	83,76	71,46	63,86

Tabela 4: Resultados individuais da porcentagem de fibras marcadas pela imunoistoquímica para Troponina C, nas fibras musculares, nos três momentos de avaliação.

Animal	Momento 1	Momento 2	Momento 3
1	96	98	99
2	100	100	99
3	97	95	91
4	98	94	97
5	100	100	100
6	100	100	100
7	99	100	100
8	99	98	98
9	100	100	100
10	100	97	100
11	98	100	100
12	100	99	100
13	100	99	99
14	100	100	100
15	100	97	95
16	99	100	100
17	100	100	100
18	100	100	99
19	100	98	100
20	100	100	100
21	99	100	100
22	100	100	100
23	100	99	97
24	100	100	100
25	100	100	100
26	99	98	100
27	100	100	100
28	98	100	100
29	100	100	99
30	100	100	100
Média	99,40	99,07	99,10

Tabela 5: Resultados individuais da porcentagem de fibras marcadas pela imunoistoquímica para Troponina T, nas fibras musculares, nos três momentos de avaliação.

Animal	Momento 1	Momento 2	Momento 3
1	67	69	66
2	77	68	61
3	78	71	57
4	75	62	54
5	79	64	51
6	83	72	61
7	78	66	59
8	74	65	57
9	77	68	58
10	81	66	72
11	76	65	57
12	77	65	60
13	79	63	56
14	76	69	63
15	79	66	58
16	64	62	57
17	75	67	63
18	72	63	51
19	66	58	56
20	72	63	66
21	73	62	58
22	76	65	61
23	79	64	57
24	74	63	56
25	75	69	62
26	79	65	60
27	72	64	59
28	82	70	61
29	80	72	65
30	78	67	66
Média	75,77	65,77	59,60