EFEITO DA INJEÇÃO PÓS-MORTE DE CLORETO DE CÁLCIO E TEMPO DE MATURAÇÃO, NO AMACIAMENTO E PERDAS POR COZIMENTO DO MÚSCULO *Longissimus dorsi* DE ANIMAIS *Bos indicus* E *Bos taurus* SELECIONADOS PARA GANHO DE PESO

APARECIDA CARLA DE MOURA
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. ALBINO LUCHIARI FILHO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Moura, Aparecida Carla de
Efeito da injeção pós-morte de cloreto de cálcio e tempo de maturação, no amaciamento e perdas por cozimento do músculo *longissimus dorsi* de animais *Bos indicus* e *Bos taurus* selecionados para ganho de peso / Aparecida Carla de Moura. - - Piracicaba, 1997.
78 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Amaciamento 2. Bovino de corte 3. Carne bovina 4. Contrafilé 5. Cozimento 6. Gado zebu 7. Ganho de peso 8. Injeção pós-morte de cloreto de cálcio 9. Maturação I. Título.

CDD 664.92
636.213

EFEITO DA INJEÇÃO PÓS-MORTE DE CLORETO DE CÁLCIO E TEMPO DE MATURAÇÃO, NO AMACIAMENTO E PERDAS POR COZIMENTO DO MÚSCULO *Longissimus dorsi* DE ANIMAIS *Bos indicus* E *Bos taurus* SELECIONADOS PARA GANHO DE PESO

APARECIDA CARLA DE MOURA

Aprovada em: 24.04.1997

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Albino Luchiari Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício	FEA/UNICAMP
Prof. Dr. Paulo Roberto Leme	IZ/Nova Odessa

Prof. Dr. ALBINO LUCHIARI FILHO
Orientador

Aos meus pais Neyde e João
pelo carinho e constante apoio

Dedico

Ao meu noivo
Carlos G. S. Pedreira

Ofereço

"A satisfação está no esforço
e não no resultado final"

Ghandhi

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ALBINO LUCHIARI FILHO, pela orientação, amizade e confiança, que muito contribuíram para o enriquecimento profissional e para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Waldomiro S. Myiada, pela coordenação do curso;

Aos Professores do Departamento de Zootecnia, Zoologia e Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos ensinamentos no decorrer do curso;

As funcionárias do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Claudia, Vera e Cleide, pela simpatia, colaboração e amizade;

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, pela amizade e companheirismo;

Ao Dr. Murilo de Melo e ao funcionário José Carlos Amaral, do CEBTEC, pela ajuda e apoio durante a fase experimental;

Ao Dr. Romeu F. Nardon e Dr. Paulo R. Leme, pela amizade e apoio na utilização dos animais abatidos neste trabalho;

Aos funcionários do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa - Departamento de Bovinocultura de Corte, Joel Domingos, José A. de Oliveira, José O. de Andrade, José R. Almussa, Nicola A.

Andrilli, Nivaldo Martins, Olinda A. de Oliveira Costa, Pedro J. da Silva e Roberto Gaspar pelo auxílio e amizade durante a fase de abate dos animais;

Ao Carlos, Marcelo, Sônia e Wladimir Silveira Pedreira pelo carinho e incentivo;

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo, estímulo e amor;

Aos participantes da comissão julgadora da tese, Dr. Paulo R. Leme e Dr. Pedro E. de Felício, pela honra da participação e sugestões de correções na tese;

À Fapesp, pela bolsa de auxílio à pesquisa;

À Capes, pela bolsa de auxílio financeiro;

À Deus, por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i

LISTA DE TABELAS iii

LISTA DE QUADROS v

RESUMO vi

SUMMARY vii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 5

2.1. Organização do músculo 5

2.2. Calpaínas 8

2.2.1. Características da calpaína I ou μ-calpaína e da calpaína II ou m-calpaína 10

2.2.2. Características da calpastatina 12

2.2.3. Outros inibidores das calpaínas 13

2.2.4. Localização e quantidades das proteases cálcio-dependentes encontradas nos diversos tecidos animais 15

2.2.5. Mudanças pós-morte em músculo esquelético 17

2.2.6. Ativação das proteases 19

2.3. A utilização de Cloreto de Cálcio no amaciamento da carne 21

2.3.1. A influência do cloreto de cálcio na maciez da carne 24

2.3.2. A influência do cloreto de cálcio nas características sensoriais e perdas por cozimento 32

3. MATERIAL E MÉTODOS 36

3.1. Material 36

3.1.1. Animais 36

3.1.2. Obtenção das amostras 36

3.1.3. Preparo da solução, injeção e maturação 36

3.2. Métodos 37

3.2.1. Força de cisalhamento e perdas por cozimento 37

3.3. Análise Estatística 38

3.3.1. Parcela subdividida de fatorial 3X3 38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39

4.1. Força de Cisalhamento 40

4.1.1. Influência da raça, tempo de maturação e concentração de cloreto de cálcio... 40

4.1.2. Influência das interações raça*tempo de maturação, raça*concentração de cloreto de cálcio e tempo de maturação*concentração de cloreto de cálcio 42

4.2. Perdas por Evaporação 48

4.2.1. Influência da raça, tempo de maturação e concentração de cloreto de cálcio... 48

4.2.2. Influência das interações raça*tempo de maturação, raça*concentração de cloreto de cálcio e tempo de maturação*concentração de cloreto de cálcio 51

4.3. Perdas por Gotejamento 54

4.3.1. Influência da raça, tempo de maturação e concentração de cloreto de cálcio... 54

4.3.2. Influência das interações raça*tempo de maturação, raça*concentração de cloreto de cálcio e tempo de maturação*concentração de cloreto de cálcio 56

4.4. Perdas Totais 59

4.4.1. Influência da raça, tempo de maturação e concentração de cloreto de cálcio... 59

4.4.2. Influência das interações raça*tempo de maturação, raça*concentração de cloreto de cálcio e tempo de maturação*concentração de cloreto de cálcio..... 62

5. CONCLUSÕES..... 66

5.1. Força de Cisalhamento..... 66

5.2. Perdas por Evaporação..... 67

5.3. Perdas por Gotejamento..... 67

5.4. Perdas Totais..... 67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização de um músculo esquelético desde a estrutura até o nível molecular..... 5

Figura 2. Efeito da interação raça x tempo de maturação sobre a Força de Cisalhamento..... 44

Figura 3. Efeito da interação raça x concentração de cloreto de cálcio sobre a Força de Cisalhamento..... 46

Figura 4. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação sobre a Força de Cisalhamento..... 48

Figura 5. Efeito da interação raça x tempo de maturação sobre as Perdas por Evaporação..... 52

Figura 6. Efeito da interação raça x concentração de cloreto de cálcio sobre as Perdas por Evaporação..... 53

Figura 7. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação sobre as Perdas por Evaporação..... 54

Figura 8. Efeito da interação raça x tempo de maturação sobre as Perdas por Gotejamento..... 57

Figura 9. Efeito da interação raça x concentração de cloreto de cálcio sobre as Perdas por Gotejamento..... 58

Figura 10. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação sobre as Perdas por Gotejamento..... 59

Figura 11. Efeito da interação raça x tempo de maturação sobre as Perdas Totais..... 63

Figura 12. Efeito da interação raça x concentração de cloreto de cálcio sobre as Perdas Totais..... 64

Figura 13. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação sobre as Perdas Totais..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias da Força de Cisalhamento (kg) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça x tempo de maturação 41

Tabela 2. Médias da Força de Cisalhamento (kg) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça x concentração de cloreto de cálcio 41

Tabela 3. Médias da Força de Cisalhamento (kg) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação 42

Tabela 4. Médias das Perdas por Evaporação (%) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça x tempo de maturação 49

Tabela 5. Médias das Perdas por Evaporação (%) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça x concentração de cloreto de cálcio 50

Tabela 6. Médias das Perdas por Evaporação (%) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação 50

Tabela 7. Médias das Perdas por Gotejamento (%) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça x tempo de maturação 55

Tabela 8. Médias das Perdas por Gotejamento (%) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça x concentração de cloreto de cálcio 55

Tabela 9. Médias das Perdas por Gotejamento (%) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação 56

Tabela 10. Médias das Perdas Totais (%) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça x tempo de maturação 60

Tabela 11. Médias das Perdas Totais (%) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça x concentração de cloreto de cálcio 61

Tabela 12. Médias das Perdas Totais (%) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração de cloreto de cálcio x tempo de maturação 62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Balanço da Bovinocultura..... 1

Quadro 2. Efeito do armazenamento pós-morte entre 2 a 4 °C de proteases cálcio-dependentes sobre as miofibrilas..... 18

EFEITO DA INJEÇÃO PÓS-MORTE DE CLORETO DE CÁLCIO E TEMPO DE MATURAÇÃO, NO AMACIAMENTO E PERDAS POR COZIMENTO DO MÚSCULO *Longissimus dorsi* DE ANIMAIS *Bos indicus* E *Bos taurus* SELECIONADOS PARA GANHO DE PESO

Autora: Aparecida Carla de Moura

Orientador: Prof. Dr. Albino Luchiari Filho

RESUMO

Neste estudo foram utilizados 64 machos inteiros (16 Caracu, 16 Guzerá, 16 Nelore Controle e 16 Nelore Seleção) de cujas carcaças, 24 horas após o abate, uma amostra do músculo *Longissiumus dorsi* (contra-filé) entre as 6ª e 9ª vértebras lombares foi retirada e dividida em nove sub-amostras. Em cada 3 sub-amostras escolhidas ao acaso foi injetada, na quantia correspondente a 10% do seu peso, uma das seguintes soluções: a) água (controle), b) 200 mM de cloreto de cálcio e c) 300 mM de cloreto de cálcio. Cada sub-amostra foi então embalada a vácuo, refrigerada (2 °C) e maturada por 1, 7 ou 14 dias até a realização de testes de força de cisalhamento e perdas por cozimento. Dos resultados da análise estatística (modelo split plot em esquema fatorial 3X3) observou-se que a raça influenciou a força de cisalhamento, mas não as perdas por cozimento. A maturação por um período de 7 dias reduziu a força de cisalhamento e as perdas por evaporação, gotejamento e totais. Maiores concentrações de cloreto de cálcio resultaram em menor força de cisalhamento e maiores perdas por evaporação, embora não afetassem as perdas por gotejamento e totais. A concentração de 200 mM foi a que representou a melhor redução da força de cisalhamento. Conclui-se assim, que a injeção pós-morte de uma solução de cloreto de cálcio acelera o processo de amaciamento, sem afetar as perdas por cozimento.

EFFECTS OF POSTMORTEM CALCIUM CHLORIDE INJECTION AND AGING TIME ON TENDERNESS AND COOKING LOSSES ON *Longissimus dorsi* MUSCLE FROM *Bos indicus* AND *Bos taurus* ANIMALS SELECTED FOR WEIGHT GAIN

Author: Aparecida Carla de Moura

Adviser: Prof. Dr. Albino Luchiari Filho

SUMMARY

In this study, 64 intact males (16 Caracu, 16 Guzerat, 16 Nellore Control and 16 Nellore Selection) were used. Twenty four hours after slaughter a sample from *Longissimus dorsi* muscle, taken between the 6th and 9th lumbar vertebrae was removed and divided into nine sub-samples. Each 3 sub-samples, picked at random, were injected with a volume equivalent to 10% of the sub-sample weight of one of the following solutions: a) water (control), b) 200 mM calcium chloride or c) 300 mM calcium chloride. Each sub-sample was then, vacuum-wrapped, cooled to 2 ^{o}C, and aged for 1, 7 or 14 days for shear force and cooking losses tests. Analysis of variance (split plot model with a 3X3 factorial arrangement in the sub-plots) showed an effect of breed on shear force but not on evaporation, drip, or cooking losses. Aging for 7 days resulted in lowest shear force and lowest evaporation, drip, and cooking losses. Increasing calcium chloride concentration resulted in lower shear force and greater evaporation losses although it did not affect either dripping or total losses. Lowest shear force values corresponded to the 200 mM calcium chloride injection treatment. It is concluded that postmortem injection with calcium chloride hastens tenderization but does not affect other meat characteristics.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos o rebanho bovino brasileiro sofreu mudanças, como pode ser observado no Quadro 1. Dentro dessas mudanças podemos citar o aumento do rebanho e o aumento da produção por abate, uma vez que a população brasileira também aumentou e o consumo de carne (devido a estabilização da economia) também está aumentando.

Quadro 1. Balanço da Bovinocultura

BRASIL	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995
Rebanho*	129,6	134,6	136,8	140,1	141,7	144,5	146,0	148,3	150,8	152,4
Produção/ Abate*	21,4	18,9	20,1	21,1	21,1	22,8	22,7	24,2	24,7	24,8
População Brasil**	134,7	137,3	139,8	142,3	144,7	147,1	149,4	151,6	153,7	155,8
Consumo Interno***	3.981	3.434	3.291	3.912	4.089	4.169	3.999	4.236	4.413	4.787

Fonte: Anuário Estatístico da Produção Animal (1996)

Rebanho em 31 de dezembro de cada ano

*Milhões de Cabeças

**Milhões de Habitantes

***Milhares de Toneladas de Equivalente Carcaça

Com o novo dinheiro, o Real, valendo mais, o consumidor está começando a ter consciência que pode e deve ser exigente na qualidade dos produtos que está adquirindo.

Numa pesquisa realizada por Felício (1995) sobre o que os clientes de hipermercados, supermercados e casas de carne valorizam na carne grelhada, a maciez foi eleita em primeiro lugar (64%), como sendo a característica de qualidade mais importante.

No Brasil, a carne produzida é predominantemente de animais *Bos indicus* sendo considerada menos macia talvez devido a sua menor espessura de gordura, provavelmente devido a problemas no manejo de resfriamento da carne e conseqüente encurtamento pelo frio, quando comparados aos animais *Bos taurus*. Uma explicação para essa menor maciez seria que a carne de animais *Bos indicus* apresentam maior atividade da calpastatina (Whipple et al., 1990).

Uma vez que a maciez da carne é a característica organoléptica mais importante para o consumidor, e os animais criados no Brasil apresentam carne menos macia, uma das soluções seria a utilização de métodos tecnológicos para melhorar sua maciez.

Vários métodos foram testados nos últimos anos, sendo que os mais comuns são: estimulação elétrica, suspensão pélvica, manejo de câmara fria, maturação e a utilização de cloreto de cálcio.

A estimulação elétrica acelera a taxa de glicólise pós-morte, acelera a queda do pH pós-morte, apressa o desenvolvimento do rigor e aumenta certas características de palatabilidade (principalmente a maciez). Esta técnica foi muito utilizada na década de 70-80, principalmente em carcaças com quantidades limitadas de gordura subcutânea, evitando-se o aparecimento de anel escuro (heat-ring) e encurtamento pelo frio (cold-shortening). Seu mecanismo de ação sobre o amaciamento da carne se dá pelo aumento do comprimento do sarcômero, da atividade autolítica das enzimas, e da liberação de enzimas lisossômicas pela ruptura da fibra muscular resultante das contrações massivas durante estimulação (Savell et al., 1978; Cross, 1979; Crouse et al., 1983, 1987; Takahashi et al., 1984; Ducastaing et al., 1985).

Normalmente, as carnes são suspensas pelo tendão de Aquiles que resulta em uma tensão máxima no músculo "psoas", tornando-o muito tenro. A suspensão pélvica consiste em

suspender a carcaça do animal abatido pela pélvis, aumentando a tensão sobre diversos músculos do lombo e da perna, tornado-os mais tenros que os das carnes suspensas de acordo com as práticas comerciais (Forrest et al., 1979).

Quanto ao manejo de câmara fria, a redução da temperatura da carcaça logo após o abate serve para minimizar a desnaturação protéica e inibir o crescimento de microorganismos. Entretanto, uma rápida redução da temperatura pode provocar conseqüências indesejáveis como o endurecimento pelo frio e o rigor do descongelamento. Assim sendo, uma temperatura ótima durante o *rigor mortis* para diminuir estes efeitos indesejáveis é de 15-16 ^{o}C. Em bovinos o processo de rigor inicia-se entre 6-12 horas após o abate (Canhos & Dias, 1983).

A maturação consiste no armazenamento de cortes de carne, embalados a vácuo, por um período de 15 a 21 dias em temperaturas entre -1 a 2 ^{o}C. Nesta faixa de temperatura, segundo Davey & Gilbert (1968) ocorre a perda da força de tensão do componente miofibrilar da célula muscular pela desintegração das bandas Z.

A utilização de uma solução de cloreto de cálcio (através da injeção, marinação ou infusão), em cortes comerciais ou nas carcaças inteiras, é um dos recursos tecnológicos mais recentes para reduzir a variabilidade da maciez. Este processo consiste em fornecer cálcio exógeno para as proteases cálcio-dependentes (μ-, m-calpaína e calpastatina), acelerando o processo de amaciamento através da ativação de m-calpaína, a qual em condições normais pós-morte é pouco ativada, por que necessita de uma maior concentração de íons cálcio para ser ativada.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da injeção de cloreto de cálcio na força de cisalhamento, nas perdas por armazenamento e nas perdas por cozimento na

carne de animais da raça Caracu, Guzerá e Nelore. Desta última foram usados animais de dois rebanhos, um controle e outro selecionado para ganho de peso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ORGANIZAÇÃO DO MÚSCULO

No diagrama número 1 temos a organização de um músculo esquelético desde a estrutura até o nível molecular (Forrest, 1979), sendo que para nosso estudo a miofibrila é o componente estrutural mais importante diretamente ligado a maciez da carne.

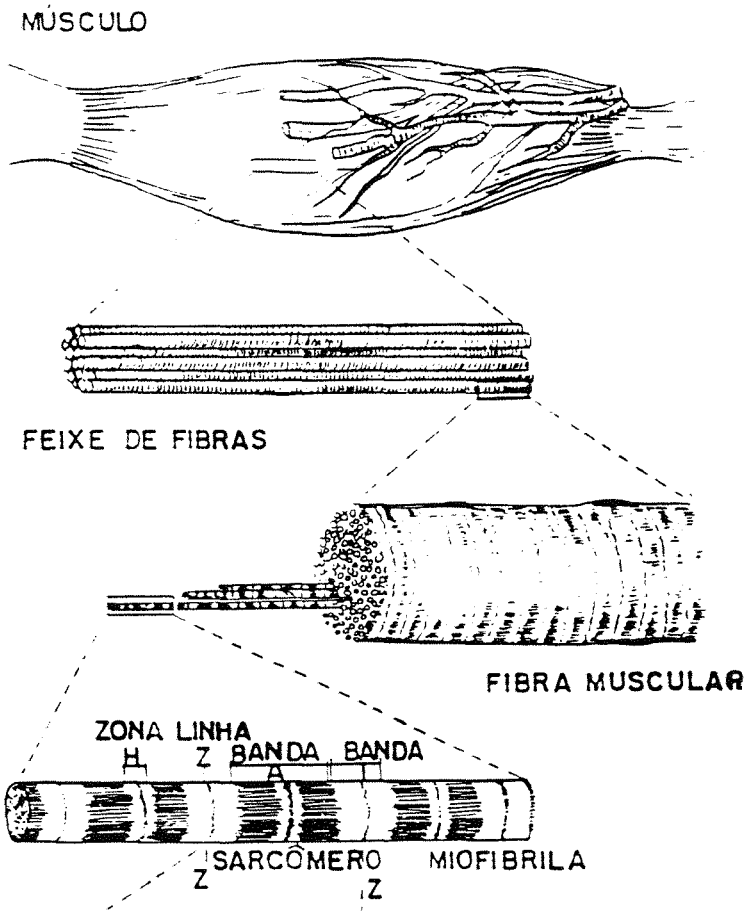

Figura 1. Organização de um músculo esquelético desde a estrutura até o nível molecular (Forrest, 1979).

A miofibrila é uma organela específica do tecido muscular, composta basicamente de cadeias protéicas arranjadas em filamentos grossos e finos.

Esses filamentos se alinham paralelamente e se recobrem entre si em certas regiões ao longo do seu eixo longitudinal, dando uma aparência característica de bandas ou estrias, formando áreas que se alteram em densidade de coloração mais ou menos escura. Esse efeito de bandas é que explica o uso do termo músculo estriado como referência ao músculo esquelético.

As bandas claras são chamadas Banda-I, onde se encontram grandes quantidades de filamentos finos de actina. As bandas escuras são chamadas de Banda-A, onde predominam os filamentos grossos de miosina. Ambas as bandas A e I são cortadas por linhas relativamente finas. A banda-I é seccionada por uma banda fina e escura, chamada de Disco-Z, sendo a unidade entre dois discos-Z adjacentes definida como sarcômero. Um sarcômero é formado, portanto, por uma banda-A e duas metades de banda-I, localizadas de cada lado da banda-A. O sarcômero é a unidade estrutural repetitiva da miofibrila e é também a unidade básica na qual os eventos do ciclo de contração e relaxamento muscular ocorrem (Forrest, 1979).

O comprimento do sarcômero não é constante; sua dimensão, bem como a da banda-I, são dependentes do estado de sua contração do músculo (Judge et al., 1989). Na região ventral da banda-A existe uma área de menor densidade que o restante da banda, composta principalmente de miosina. Essa região mais clara é chamada de Zona-H. A banda-A também é cortada no centro por uma estreita e densa linha conhecida como Linha-M. De cada lado da linha-M aparece uma estreita região de relativa baixa densidade e é chamada de Pseudozona-H.

As proteínas actina e miosina constituem aproximadamente de 75 a 80% das proteínas miofibrilares e a fração restante consiste em proteínas reguladoras. Dentre as proteínas

reguladoras encontramos a tropomiosina, a troponina, duas M-proteínas, a α-actinina, a C-proteína e a β-actinina. Tropomiosina, troponina e β-actinina estão associadas com o filamento da actina, a C-proteína está presente no filamento da miosina, a α-actinina é componente da linha-Z e as M-proteínas acredita-se serem substâncias que compõem a linha-M.

Sendo a maciez da carne uma das características organolépticas mais estudadas e importantes em carnes vermelhas, Koohmaraie (1988a, 1992a,b,c) cita que um dos mecanismos responsáveis pelas mudanças que ocorrem durante o armazenamento pós-morte das carcaças é a proteólise das proteínas miofibrilares, sendo que estas mudanças intra-estruturais no músculo esquelético (perda da integridade da estrutura do tecido) estão relacionadas com a maciez.

Assim, para as proteases serem consideradas como possíveis responsáveis pelas mudanças na carne (resultando na maciez da carne), elas devem apresentar as seguintes características: 1) estarem localizadas dentro das células do músculo esquelético; 2) terem acesso ao substrato (ex: miofibrilas) e, 3) serem capazes de hidrolizar as mesmas proteínas "in vitro" que são degradadas durante armazenamento pós-morte (Goll et al., 1992; Koohmaraie, 1988a,1992a,b,c).

Com o avanço no estudo desses mecanismos, Koohmaraie (1988a, 1990a, 1992a,b,c) e Goll et al. (1992) observaram que no mínimo dois sistemas proteolíticos poderiam ser responsáveis pelas mudanças pós-morte, produzindo um aumento da maciez da carne. Entre estes dois sistemas proteolíticos estavam as enzimas lisossômicas (catepsinas) e as proteases cálcio-dependentes (Calpaína e Calpastatina). Recentemente foi acrescentado o complexo das proteases multicatalíticas (CDP) nesta lista de proteases relacionadas com o amaciamento da carne.

Para nosso estudo as proteases cálcio-dependentes são muito importantes, uma vez que elas estão intimamente relacionadas com os íons cálcio.

2.2. CALPAÍNAS

O primeiro relato da existência de uma protease cálcio-dependente (CDP-I e CDP-II) foi feito por Guroff, citado por Koohmaraie (1988a, 1990a), que relatou a existência de uma protease em cérebro de rato. Sua presença foi reportada por Meyer et al. (1964), citados por Koohmaraie (1992b), e determinada em músculo esquelético por Huston & Krebs (1968), também citados por Koohmaraie (1988a), que estavam estudando a ativação de uma fosforilase kinase. O relato de uma relação entre cálcio no processo de amaciamento da carne foi feito por Davey & Gilbert (1969), e sua posterior purificação foi feita por Dayton et al. (1976 a,b).

Em 1981, Murachi propôs o nome de calpaína para esta protease cálcio-dependente que foi aceito, no mesmo ano, pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (Murachi, 1985).

O nome calpaína é devido a sua primeira parte "Cal" ser derivada do cálcio, como por exemplo, a calcitonina e a calmodulina e o seu final "pain" devido as bem conhecidas cisteínas proteinases, incluindo a papaína, a clostripaína e a bromelina. Além disso, o inibidor endógeno foi designado de Calpastatina (Murachi, 1985). Murachi (1985) e Koohmaraie (1988a) ainda relatam a existência de outros nomes dados para as proteases cálcio-dependentes (CDP-I, CDP-II, μ-calpaína e m-calpaína), como fator de ativação da kinase (KAF), fator ativado pelo cálcio (CAF), fator de transformação do receptor (RTF), protease neutra cálcio-dependente (CDNP), protease ativada pelo cálcio (CAP) e protease neutra ativada pelo cálcio (CANP).

A calpaína apresenta duas formas que foram isoladas por Murachi (1985) em uma eluição de uma coluna de DEAE-Sephacel com pH 7,5. Elas são heterodímeros de 110.000 Dalton, compostas de uma subunidade catalítica de 80.000 Dalton e uma subunidade regulatória de 30.000 Dalton (Murachi, 1985; Koohmaraie, 1988a; McClelland et al., 1989; Goll et al., 1992; Melloni et al., 1992).

Segundo Koohmaraie (1988a) a subunidade de 30.000 Dalton é a mesma em ambas as enzimas, enquanto que a de 80.000 Dalton é um produto de diferentes genes.

A subunidade de 80.000 Dalton apresenta 4 domínios. O primeiro vai do aminoácido 1-90 apresentando o domínio N-terminal; o segundo domínio contém um resíduo cisteína (sítio ativo de cisteína) e engloba os aminoácidos 90-300 e tem sido dita como a subunidade catalítica por causa da sua seqüência de aminoácidos identificar outras proteinases sulfidril, tais como a papaína; o terceiro domínio apresenta um C-terminal e vai do aminoácido 300-500, e o quarto domínio vai do aminoácido 550-700 e é a subunidade ligante de cálcio por que sua seqüência de aminoácidos identifica outras proteínas ligantes de cálcio, tais como a calmodulina e troponina-C (Goll, 1991; Koohmaraie, 1992b).

O volume específico parcial das calpaínas é de 0,73 cm^3/g, baseado na composição de aminoácidos e volumes específicos dos seus resíduos de aminoácidos (Edmunds et al., 1991).

A calpastatina é um tetrâmero de peso molecular de aproximadamente 70.000 Dalton, localizado no mesmo local que as calpaínas (Murachi, 1985).

De Martino & Blumenthal (1982) em um exame do papel da calmodulina sobre as atividades das calpaínas em cérebro, encontraram uma proteína reguladora denominada regulador da protease cálcio-dependente (CDPR), que é capaz de estimular as atividades das

calpaínas I e II em 25 vezes, mas não alterando o requerimento de cálcio para sua atividade, mas ainda não se tem a certeza da sua existência.

Pontremoli et al. (1987), descobriram um ativador da calpaína chamado carnitina-isovalérica (IVC), que é um produto do metabolismo da leucina e sua característica mais importante é que ela inverte o efeito do inibidor endógeno de CDP neutrófilo humano, embora ainda, segundo Koohmaraie (1988a), não se tenha evidências de seu papel em calpaínas no músculo esquelético.

Goll (1991) e Goll et al. (1992), também reportaram a existência de uma terceira proteína, que passou a ser um ativador das calpaínas (n-calpaína). Esse ativador apresenta uma seqüência homóloga a μ- e m-calpaína e necessita de 3.000-4.000 μM cálcio, sendo que este responde a fluxos de cálcio, em concentrações médias de nanomolar, devendo ser uma kinase, uma fosfatase ou uma molécula de calmodulina.

2.2.1. Características da calpaína I ou μ-calpaína e da calpaína II ou m-calpaína

A calpaína I requer apenas pequena concentração de cálcio (5-50 μM de cálcio) para 50% da sua ativação (também podendo ser ativada por íons Sr^{+2}, Mn^{+2} e Ba^{+2} na falta de cálcio.

A ativação ótima pelo Mn^{+2} se dá com 2-3 mM Mn^{+2} (para a forma não-autolizada, e menor quantidade para a forma autolizada), o qual afeta as propriedades catalíticas da m-calpaína, fazendo com que haja redução de seu requerimento de cálcio (Edmunds et al., 1991).

Sua ação em condições existentes durante armazenamento pós-morte foi comprovada, onde em um trabalho de Koohmaraie et al. (1986) observaram que a calpaína I reteve de 24-25% da sua atividade a pH 5,5-5,8 e 5 ^{o}C, e que este nível de atividade foi suficiente para reduzir as mudanças nas miofibrilas associadas com o armazenamento pós-morte. Há uma forte

relação entre a atividade de μ-calpaína e pH, onde reduzindo o pH in vitro se reduz a atividade de μ-calpaína (Thomson et al., 1995).

Há um declínio gradual nas atividades de calpaína I com aproximadamente 50% de perda da atividade após oito horas, e perda de 80% da atividade de 7 a 14 dias pós-morte, enquanto que m-calpaína e calpastatina perdem sua atividade lentamente com 70% e 54% da sua atividade presente após 120 horas pós-morte, respectivamente (Koohmaraie, 1992a; Thomson et al., 1995).

A atividade de calpaína I é conhecida por ser instável *in vitro* e na presença de íons cálcio, é rapidamente autolisada, particularmente na falta de um substrato (Dransfield, 1992).

Após o isolamento, a calpaína I é estável por mais de 1 mês e a calpaína II é estável por 1 semana a 4 ^{o}C, no entanto ambas as enzimas mostram uma redução marcante na atividade após o congelamento à -20 ^{o}C (Karlsson et al., 1985).

A calpaína II requer uma maior concentração de cálcio (300-1.000 μM de cálcio). Sua atividade máxima é atingida em pH 7,5 e 25 ^{o}C. Com estas características conclui-se que sua atividade durante armazenamento pós-morte (pH 5,5; 2-4 ^{o}C; baixa concentração de cálcio) seria reduzida (Koohmaraie, 1988a).

Por causa da atividade da calpaína II permanecer praticamente constante durante o armazenamento pós-morte e por haver uma redução progressiva na sua atividade, Koohmaraie & Seidman (1987) e Koohmaraie (1992a) sugeriram que a calpaína I, e não a calpaína II, deve estar envolvida no amaciamento pós-morte. A razão dessa afirmação deriva da observação de que ambas calpaínas vão à autólise e provável ativação inicial, seguida da atividade catalítica sobre autólises contínuas em análises in vitro onde suficiente cálcio está disponível para ativação das calpaínas. Assim, a rápida perda de calpaína I durante armazenamento pós-morte

deve ser um bom indicador que a calpaína I , ao contrário da calpaína II, é ativada sobre condições de pós-morte. Portanto, parece que em condições de pós-morte apenas a calpaína I é ativada e a razão da estabilidade da calpaína II é a insuficiente concentração de cálcio.

Amostras injetadas com cálcio mostraram após oito dias de armazenamento, baixos níveis da μ-calpaína, entretanto as atividades de m-calpaína e calpastatina foram reduzidas significantemente, sugerindo que a m-calpaína foi ativada (Uytterhaegen et al., 1994).

O efeito do congelamento (em nitrogênio líquido, com armazenamento a -70 ^{o}C) sobre as atividades dos componentes do sistema das calpaínas foi estudado por Koohmaraie (1990a), sendo que a calpaína I e II são marcantemente estáveis nestas condições, mas não a calpastatina. O inibidor apresentou atividades originais de 67, 55 e 45% após 2, 4 e 6 semanas a -70 ^{o}C, respectivamente. O congelamento deve, então, ser evitado e usadas amostras frescas quando da quantificação dessas proteases.

As calpaínas são reguladas pela calpastatina e pela inativação autolítica (Kendall et al., 1993), e são controladas pelo cálcio, fosfolipídeos, calpastatina e ativadores (Wang et al., 1993), ou ainda pelo cálcio-livre e pela calpastatina (Goll et al., 1992).

2.2.2. Características da Calpastatina

A calpastatina apresenta um papel central na regulação da atividade das calpaínas nas células. Ela atua na mesma concentração de cálcio requerida para atividade catalítica das calpaínas, inibindo a translocação das calpaínas para as membranas, removendo ambas as formas ativas e inativas de calpaínas das membranas e inibindo a ativação autolítica das calpaínas (Forsberg et al., 1989; Koohmaraie, 1992b).

Segundo Murachi (1985) a inibição pela calpastatina é independente da concentração de cálcio.

A calpastatina tem baixa força iônica e um amplo pH ótimo, sendo que não muda na faixa de pH entre 6,2 a 8,6 (Kendall et al., 1993).

A relação entre a dose do inibidor e a atividade inibitória não é linear na análise (Wheeler & Koohmaraie, 1991).

A atuação do inibidor (calpastatina) se dá de três formas: 1) através da interação entre as calpaínas e a calpastatina, sendo a interação reversível e ambas retém sua atividade total após dissociação; 2) a ligação entre as calpaínas e a calpastatina requer cálcio, mas a dependência de cálcio da inibição difere para calpaína-I e calpaína-II, sendo o mesmo cálcio requerido para a atividade catalítica da respectiva protease; 3) em músculo esquelético bovino, uma molécula do inibidor parece inibir 6 moléculas da protease e quando grandes quantidades da protease estão presentes, o inibidor é hidrolisado (Koohmaraie, 1988a).

A ligação da calpastatina-cálcio-dependente ocorre em dois lugares da molécula de calpaína; uma no domínio da calmodulina da subunidade de 28.000 Dalton e uma outra no domínio de calmodulina da subunidade da molécula. A calpastatina é um inibidor competitivo das calpaínas, devendo também se ligar a um terceiro local, o sítio ativo, nas calpaínas, quando do aumento da concentração de cálcio (Goll et al., 1992).

2.2.3. Outros inibidores das calpaínas

Wang et al. (1993) citaram que as calpaínas também são inibidas por íons Fe^{+2}, Fe^{+3}, Ni^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cd^{+2} ou Hg^{+2}. Além desses íons, as calpaínas também são inibidas por algumas substâncias descritas a seguir.

E-64 é um peptídeo epoxisuccinil originário do *Aspergillus japonicus*. Não inibe as calpaínas na presença de EDTA, mas é um inibidor irreversível de outras proteinases cisteínas. Assim, previne a degradação proteolítica indesejável pelas proteinases cisteínas durante purificação de calpaína (Edmunds et al., 1991).

A leupeptina é um peptídeo aldeído de origem microbiana que inibe no estado análogo de transição das proteinases cisteínas e liga-se a essas enzimas muito fortemente, mas não covalentemente (Koohmaraie, 1992a, Uytterhaegen et al., 1994).

PMSF é um inibidor geral de proteinases séricas, ligando irreversivelmente a serina ativa a um derivado enzima sufonil (Uytterhaegen et al., 1994).

O iodoacetato inibe irreversivelmente a atividade das calpaínas por sua atuação nas cadeias cisteínas laterais, bloqueando estas cadeias ou alterando a conformação da molécula da calpaína (Dayton et al., 1976a,b).

O inibidor calpaína-I (N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal) reduz a atividade de calpaína e catepsina B e L (Uytterhaegen et al., 1994).

O zinco é um inibidor não-específico e potente das calpaínas. A ligação é reversível por agentes quelantes e diálise. A concentração de zinco em músculo vermelho é de três a quatro vezes maior do que músculo branco (Koohmaraie et al., 1990; Koohmaraie, 1992c).

Assim, na presença de todos os inibidores a autólise das calpaínas ocorre, mas apenas de uma forma limitada, e o mecanismo de inibição da calpaína pelo zinco é diferente daquelas da leupeptina, E-64 e calpastatina (Koohmaraie, 1992a; Wang et al., 1993).

2.2.4. Localização e quantidades das proteases cálcio-dependentes encontradas nos diversos tecidos animais

As calpaínas estão localizadas na membrana plasmática ou disco-Z do músculo esquelético (para μ-calpaína: 66% no disco-Z, 20% na banda-I, e 14% na banda-A), associadas com estruturas subcelulares tais como as mitocôndrias ou miofibrilas. Os níveis de calpaína diferem em relação ao sexo, idade e espécie animal (Goll et al., 1992; Gopalakrishna & Barsky, 1985; Koohmaraie, 1994).

Segundo Murachi (1985) e Forsberg et al. (1989) as calpaínas e a calpastatina estão localizadas no citosol das células.

As calpaínas (μ e m-calpaína) existem em animais terrestres e insetos, mas não em plantas (Goll et al., 1992). Apenas a m-calpaína está contida em músculo, ovos e eritrócitos de carpa, músculo de tilápia, garras e músculos abdominais de lagosta (Wang et al., 1993). Entretanto, existem dois tipos de calpaína com peso molecular de 280.000 purificada de *Drosophilae* e quatro tipos de calpaína com Mr de 310.000, 195.000, 125.000 e 59.000 em lagostas.

A quantidade de calpaínas no músculo esquelético está ao redor de 3,4 μg/g de peso de músculo fresco (Dayton, 1976b). Segundo Murachi (1985), a quantidade de calpaínas está ao redor de 0,1-10 mg/100g de tecido úmido.

A quantidade de uma fração de calpastatina medida a 750 mm, por Murachi (1985) foi de 0,647 unidades.

A atividade total de calpaína (I e II) encontrada por Etherington et al. (1987) foi de 73,4 unidades/g, e a porcentagem da atividade de calpaína I de 64%. Já, Koohmaraie (1990a) encontrou uma atividade para calpaína II (em caseína e com A_{278}) de 0,4-0,5 unidades.

Segundo Dransfield (1992) o músculo *Pectorales profundus* apresentou uma quantidade de 60,9±35 unidades de calpaína I.

Amostras, em estudo de Shackelford et al. (1994), tiveram médias de 1,3 a 5,9 unidades de atividade de calpastatina por grama de músculo.

Diferenças de maciez dentro das espécies e dentro dos músculos existem, e segundo Shackelford et al. (1994) a carne de animais *Bos indicus* apresenta menor maciez do que aquela de animais *Bos taurus*. Essa diferença é explicada pelo aumento da atividade da calpastatina 24 horas pós-morte.

No fígado e coração se tem uma maior quantidade de calpastatina do que de calpaínas (Gopalakrishna & Barsky, 1985).

Em aves, a moela é uma rica fonte de calpaína (Parkes et al., 1985).

Em trabalho realizado por Ouali & Talmant (1990), a razão calpaína I:calpaína II foi praticamente similar em todos os músculos, enquanto que a razão calpaína II:calpastatina foi considerado um índice de eficiência do sistema proteolítico (condicionamento da carne). Neste trabalho, os suínos apresentaram um menor nível de calpastatina e maior razão calpaína II:calpastatina, os bovinos apresentaram maior nível de calpastatina e reduzida razão calpaína II:calpastatina, e os ovinos apresentaram níveis intermediários, mas a calpaína II apareceu mais em músculos vermelhos do que em músculos brancos. Geralmente músculos vermelhos tem uma maior concentração de calpastatina.

Segundo Koohmaraie & Shackelford (1991), a razão calpastatina:μ-calpaína+m-calpaína é aproximadamente 2,0 em bovinos, 1,2 em ovinos e 0,7 em músculo esquelético de suínos.

Morgan et al. (1993) mostraram que 24 horas pós-morte a atividade de calpastatina foi 81% maior em músculo *longissimus dorsi* de touro. A atividade de calpastatina em touros (24 horas após o abate) foi de 2,41 unidades/g e em novilhos (zero hora após o abate) foi de 2,24 unidades /g de calpastatina.

Em um estudo feito por Singh et al. (1995) o jejum não afetou o grau de maciez ou o nível de atividade de calpastatina, mas causou uma redução nas atividades de μ- e m-calpaína.

2.2.5. Mudanças pós-morte em músculo esquelético

Na tabela 2 estão relacionados os principais efeitos das proteases cálcio-dependentes (calpaína e calpastatina) durante o armazenamento pós-morte.

O primeiro composto a ser removido das miofibrilas é a linha N_2 , que é composta de nebulina ou titina, ou ambos. Se a linha N_2 representa a estrutura que une os filamentos de elastina da miofibrila com os filamentos contráteis da miofibrila, a perda deste elemento estrutural no músculo pós-morte poderá ser um passo-chave no amaciamento após o rigor. As calpaínas só atuam sobre os filamentos grosso e fino quando os discos-Z forem totalmente removidos (Bandman, 1992; Goll et al., 1992).

As mudanças observadas nas miofibrilas durante o armazenamento pós-morte, são virtualmente idênticas a aquelas causadas pelo tratamento com calpaínas, podendo-se, assim, concluir que 90% ou mais do amaciamento que ocorre durante armazenamento pós-morte pode ser atribuído às calpaínas (Goll, 1991).

QUADRO 2. EFEITO DO ARMAZENAMENTO PÓS-MORTE ENTRE 2 A 4 °C DE PROTEASES CÁLCIO-DEPENDENTES SOBRE AS MIOFIBRILAS

1. ENFRAQUECIMENTO E DEGRADAÇÃO DO DISCO Z, O QUAL LEVA A FRAGMENTAÇÃO DAS MIOFIBRILAS;
2. NÃO DEGRADAÇÃO DE ACTINA E MIOSINA;
3. DEGRADAÇÃO DE TROPONINA-T COM APARECIMENTO DE UM COMPONENTE DE APROXIMADAMENTE 30.000 DALTON. LOCALIZADO NA BANDA-I. É UM BOM INDICADOR DA EXTENSÃO DA PROTEÓLISE PÓS-MORTE;
4. APARECIMENTO DE UM COMPONENTE DE 95.000 DALTON;
5. DEGRADAÇÃO DA DESMINA, A QUAL LEVA À FRAGMENTAÇÃO DAS MIOFIBRILAS, PROVAVELMENTE ATRAVÉS DA RUPTURA DAS LIGAÇÕES TRANSVERSAS ENTRE MIOFIBRILAS;
6. DEGRADAÇÃO DA TITINA (CONECTINA), AS QUAIS CONECTAM FILAMENTOS DE MIOSINA NO SEU COMPRIMENTO DA LINHA M AO DISCO-Z. ESTÁ RELACIONADA A ELASTICIDADE DO MÚSCULO. QUANDO A TITINA É DESTRUÍDA PELA RADIAÇÃO OU PROTEÓLISE CONTROLADA A TENSÃO DOS MÚSCULOS ESTIRADOS É REDUZIDA;
7. AUMENTO NAS ATIVIDADES DE ATPASE DAS MIOFIBRILAS PELOS ÍONS MG^{+2} E CA^{+2};
8. DEGRADAÇÃO DE NEBULINA, POR CAUSA DA SUA LOCALIZAÇÃO NAS MIOFIBRILAS (BANDA-I).

FONTE: GOLL ET AL. (1992); KOOHMARAIE (1988A, 1992A,B,C, 1994).

2.2.6. Ativação das proteases

A ativação das proteases é feita por íons cálcio e por agentes redutores de SH (Murachi, 1985).

Os íons cálcio são liberados do retículo sarcoplásmico e da mitocôndria pela queda na temperatura e redução do ATP, resultando num aumento da permeabilidade das membranas rompidas no pós-morte (perda da capacidade de reter íons cálcio pós-morte). O retículo sarcoplásmico nas fibras vermelhas é menos desenvolvido do que nas fibras brancas; assim as fibras vermelhas contém menor quantidade de íons cálcio. Mas as fibras vermelhas apresentam mais mitocôndrias, o que resulta em maior suprimento de cálcio livre pós-morte (Whipple et al., 1990).

A elevada concentração de cálcio ativa a μ-calpaína a qual por sua vez hidrolisa poucas proteínas miofibrilares que podem ser utilizadas como substrato; havendo redução dessas proteínas a μ-calpaína irá sofrer autólise levando à sua inativação. A autólise e subsequente perda da atividade proteolítica das calpaínas é altamente dependente da presença do substrato, pH e temperatura. A taxa de autólise e subsequente perda da atividade proteolítica é reduzida pela presença de substrato, redução da temperatura e aumento do pH (Koohmaraie, 1992b).

Segundo Dayton (1976b) as calpaínas começam autólise a 37 °C na presença de cálcio suficiente e isto ocorre mais rapidamente na falta de um substrato ou inibidor.

A autólise por 45 segundos a 25 °C reduz a concentração de cálcio requerida para metade da atividade proteolítica máxima de ambas μ- e m-calpaína de tecido muscular bovino, sem afetar apreciavelmente suas atividades específicas. A autólise remove aproximadamente 10% da massa da molécula de calpaína. Isto faz com que ocorra uma mudança conformacional, tornando as moléculas hidrodinamicamente mais assimétricas (Edmunds et al., 1991).

A autoativação necessita uma menor concentração de cálcio do que a proteólise do substrato. Em baixa concentração de cálcio a ativação cinética eficiente corresponde a um processo intramuscular (onde com um excesso de substrato a autólise cinética não é reduzida), enquanto que em baixas concentrações de cálcio a ativação é devida, possivelmente, por um processo intermolecular (quando irreversivelmente inibida a calpaína I pode ser um substrato para a calpaína I ativa) (Cottin et al., 1991).

A autólise na μ-calpaína é considerada um processo intramolecular, pois cada μ-calpaína irá degradar sua molécula de μ-calpaína vizinha, mas não ela mesmo e, portanto a autólise não irá ser completa. Como resultado, mesmo após autólise extensiva in situ ou in vitro, alguma atividade de μ-calpaína irá permanecer. A autólise para a m-calpaína é considerada um processo inter e intramolecular, onde cada molécula de m-calpaína irá degradar a si mesma e moléculas de m-calpaína vizinhas. Como um resultado, após autólise extensiva, nenhuma atividade de m-calpaína pode ser detectada (Edmunds et al., 1991; Koohmaraie, 1992b).

Sem cálcio as calpaínas são estáveis in vitro. Com a presença de cálcio, ocorre uma redução da atividade da enzima pela autólise. Na presença de íons cálcio, o inibidor bloqueia completamente a autólise das enzimas com rápidas autólises. Portanto, na presença de íons cálcio, o complexo calpaína+inibidor deve controlar indiretamente a autólise subsequente das enzimas (Vidalenc et al., 1983).

Na presença de cálcio, ambas as isoformas sofrem autólise, num processo que leva a um aumento na afinidade ao cálcio e permite um aumento da sua atividade em concentrações de cálcio fisiologicamente acessíveis. A primeira clivagem, a qual ocorre muito rapidamente (em 5 minutos) após a adição de cálcio, a enzima converte a subunidade Mr 30.000 em um forma de

Mr 18.000 e converte a subunidade Mr 80.000 em uma forma de Mr 78.000. Depois vem a degradação (mais demorada) da cadeia Mr 78.000 que se completa dentro de duas horas (resulta em fragmentos de Mr 55.000 e Mr 37.000 ou Mr 32.000 e Mr 28.000). Estes eventos aumentam a sensibilidade ao cálcio pelas enzimas. A incubação contínua na presença de cálcio resulta em maior autólise da subunidade larga e perda da atividade enzimática. A perda da atividade enzimática se processa muito mais devagar do que a divisão na subunidade larga (Cottin et al., 1991; Crawford et al., 1987; Ouali & Talmant, 1990; Parkes et al., 1985).

Após duas horas de incubação de calpaína, na presença de cálcio se tem a proteólise completa da calpaína, mas neste estágio a enzima ainda retém aproximadamente 70% de sua atividade original (Parkes et al., 1985).

Com redução do pH (pela hidrólise do ATP e ativação da glicólise) para 5,5-5,8, o aumento da atividade de proteases lisossômicas podem degradar μ-calpaína e inibidor, reduzindo assim suas atividades; ou ainda devido a redução do pH, reduz-se a solubilidade das enzimas resultando na redução da atividade (Vidalenc et al., 1983).

Uma vez que a calpastatina está localizada no mesmo lugar dentro das células musculares esqueléticas que as calpaínas, o aumento das concentrações de cálcio deverá induzir a atividade proteolítica das calpaínas (Goll et al., 1992).

2.3. A UTILIZAÇÃO DO CLORETO DE CÁLCIO NO AMACIAMENTO DA CARNE

O cálcio (juntamente com o fósforo) apresenta uma função vital em quase todos os tecidos do corpo e deve estar disponível aos animais em quantidades e proporções adequadas.

Estes elementos compõem mais de 70% do total de elementos minerais do corpo. Noventa e nove por cento do cálcio e 80% do fósforo do corpo encontram-se nos ossos e dentes. Aproximadamente 1% do cálcio está vastamente distribuído em outros tecidos, com a maior concentração no plasma sangüíneo. Cálcio é essencial na formação do esqueleto, no revestimento normal do sangue, na movimentação cardíaca, na excitabilidade neuromuscular, na ativação enzimática e na permeabilidade das membranas (McDowell et al., 1993).

A absorção do cálcio é realizada no duodeno, por absorção ativa ou passiva, sendo a quantidade absorvida dependente da fonte, da proporção cálcio:fósforo, do pH intestinal, do consumo de lactose e dos níveis dietéticos de cálcio, fósforo, vitamina D, ferro, alumínio, manganês e gorduras. A secreção gástrica normal de ácido clorídrico ou íon hidrogênio é indispensável para que a absorção seja eficaz. O baixo pH duodenal é responsável pela maior absorção nessa parte do corpo. A absorção do cálcio é favorecida pela forma ativa da vitamina D, que leva à formação de uma proteína transportadora de cálcio nas células epiteliais. É, ainda de importância para a absorção de cálcio, uma cálcio-ATPase. A excreção é feita, na maior parte das vezes, pelas fezes, mas com mínimas perdas por via urinária (já que 95 a 99% do cálcio é reabsorvido nos canalículos renais). A deficiência de cálcio pode causar ossos fracos, crescimento retardado, baixa produção de leite e tetania (convulsões). A prevenção e o controle das deficiências de cálcio podem ser feitas pelo tratamento direto dos animais através da suplementação, no alimento ou na água, ou indiretamente pela fertilização apropriada dos solos nos quais as pastagens a serem consumidas irão crescer. O nível máximo de cálcio, para bovinos e ovinos, é de 2%. O excesso desse mineral pode provocar problemas ósseos, além de reduzir a eficiência da utilização de outros minerais como fósforo, magnésio, ferro, iodo, zinco e manganês (McDowell et al., 1993).

Segundo Nakamura (1973) e Taylor & Etherington (1991), o íon cálcio é conhecido como um agente regulador do sistema contrátil, além de apresentar um papel importante no fenômeno de amaciamento da carne durante maturação pós-morte. Íons cálcio removem especialmente as linhas-Z das fibras musculares, enfraquecendo a força das fibras musculares e a sua concentração aumenta gradualmente durante a maturação pós-morte. Esse aumento, quando o nível de ATP intracelular cai abaixo de 0,1 mM (normalmente com um pH perto de 6,2), parece ser devido a liberação de cálcio que estava ligado ao retículo sarcoplasmático e a mitocôndria. Nessas condições, íons cálcio podem ativar as calpaínas e tem sido observado que o enfraquecimento precoce pós-rigor das enzimas das fibras musculares é devido especialmente a proteólise dessas enzimas. Quando o pH ao redor de 5,5 é atingido, membranas lisossômicas são quebradas, liberando as catepsinas que continuam atuando durante os últimos estágios do processo de amaciamento.

Apesar das diferenças de maciez da carne entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus*, também são verificados diferenças na concentração dos íons cálcio, além das diferenças de maciez em diferentes cortes cárneos. Em um experimento de Kotula & Lusby (1982) sobre a composição mineral de músculos de novilhos entre 1 e 6 anos de idade, foram observadas que as concentrações de todos os minerais variaram entre os diferentes músculos estudados e que o conteúdo de cálcio não foi afetado pela idade.

Marchello et al. (1984) observaram diferenças significativas no teor de minerais entre a carne moída e o contra-filé. A carne moída apresentou maiores quantidades de sódio, cálcio, ferro, magnésio e zinco, enquanto que o contra-filé apresentou maiores concentrações de potássio e fósforo. As causas das diferenças de minerais desses cortes cárneos foram os

diferentes teores de água e de gordura das carnes, além da função e vascularização dos músculos individualmente.

Zarkadas et al. (1987) investigando a composição mineral de carnes e produtos cárneos de bovinos, suínos e aves selecionados, observaram variações de minerais intra e inter espécies. A variação no conteúdo de mineral foi devido a composição elementar ser afetada por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais.

Nour & Thonney (1988), estudando o efeito da dieta, maturidade, tipo de manejo e peso ao abate sobre a concentração de minerais nos tecidos e ossos das carcaças de bovinos, observaram que o peso da carcaça não teve efeito na concentração de cálcio dos tecidos, e que a dieta e a raça influenciaram a concentração de cálcio.

2.3.1. A influência do Cloreto de Cálcio na maciez da carne

Com o avanço nos estudos da ciência da carne e com o conhecimento do importante papel dos íons cálcio no amaciamento da carne (através do sistema proteolítico das proteases cálcio-dependentes), a partir de 1988 foram realizados inúmeros experimentos utilizando o cloreto de cálcio ($CaCl_2$) para o amaciamento da carne.

Segundo Koohmaraie (1986), teoricamente a adição de cálcio endógeno a carne pós-rigor deveria resultar em amaciamento similar a obtida pela adição de cálcio a carne pré-rigor, embora o processo de amaciamento possa ocorrer mais lentamente do que em carne pré-rigor devido a baixa temperatura e pH.

Koohmaraie et al. (1988b), infundindo carcaças de cordeiros com 0,3 M de cloreto de cálcio, imediatamente após a morte, observaram acelerado amaciamento e proteólise das proteínas miofibrilares da carne, 24 horas pós-morte.

Em 1989, Koohmaraie et al. realizaram outro experimento com carcaças de ovinos infundidos com vários níveis de cloreto de cálcio (a 10% do peso vivo), após estimulação elétrica, e observaram que o tratamento com 0,3 M de cloreto de cálcio foi o que apresentou a concentração mais efetiva na redução da força de cisalhamento 24 horas pós-morte. E que o amaciamento que ocorreu pela infusão das carcaças com cloreto de cálcio não foi devido a força iônica da solução de cloreto de cálcio, mas sim a ativação das proteases cálcio-dependentes.

Koohmaraie et al. (1990) verificaram que a infusão de carcaças de ovinos com cloreto de cálcio acelerou o amaciamento pós-morte e que a baixa estimulação elétrica não teve efeito no amaciamento da carne, sendo desnecessária antes da infusão com cloreto de cálcio. Entretanto, amostras de carne de animais Brahman e cruzados Brahman injetadas com cloreto de cálcio tiveram elevadas perdas de cozimento e a injeção de cloreto de cálcio apresentou um efeito claro e definido nas atividades dos componentes do sistema proteolítico das proteases cálcio-dependentes, acelerando o amaciamento pós-morte.

Em um trabalho realizado por Koohmaraie & Shackelford (1991), foi avaliado o efeito da infusão de cloreto de cálcio na maciez de carcaças de cordeiros alimentados com β-agonistas, sendo verificado que o cloreto de cálcio acelerou o amaciamento pós-morte, aumentou o marmoreio, reduziu a firmeza da carne, aumentou os escores de coloração e a porcentagem de rendimento da carcaça e apresentou um efeito positivo nas atividades dos componentes do sistema proteolítico das proteases cálcio-dependentes (CDP-I, CDP-II e CDP-inibidor).

Morgan et al. (1991), usando injeção de cloreto de cálcio para aumentar a maciez da carne em vacas adultas (velhas), observaram que a injeção de cloreto de cálcio reduziu os valores de força de cisalhamento, a quantidade de tecido conectivo detectável e o comprimento

do sarcômero (24-40%) e melhorou as classificações de painel sensorial de amaciamento em aproximadamente 40-50%. O aumento da maciez durante a maturação da carne, segundo os autores, foi o resultado da degradação proteolítica pelas proteases endógenas das células do músculo esquelético ou das enzimas lisossômicas, ou da ação sinérgica de ambas as proteases. O encurtamento do sarcômero em 24-40%, foi devido a baixa quantidade de gordura externa nas carcaças, provocando o encurtamento pelo frio. Quando o comprimento do sarcômero é reduzido a 30-35% do seu comprimento original ocorre o endurecimento da carne. No entanto, o maior encurtamento do sarcômero (acima de 40%) resulta num efeito de amaciamento devido ao filamento grosso de miosina penetrar na linha-Z. Além disso, quanto maior a quantidade de solução de cloreto de cálcio adicionada, maior foi a concentração de íons cálcio encontrada.

St. Angelo et al. (1991) observaram que a infusão de 0,3 M de cloreto de cálcio mais 1% de ascorbato sódico ou 0,25% maltol, em carcaças frescas de cordeiros, resultaram na aceleração do amaciamento pós-morte através da ativação das proteases cálcio-dependentes, da inibição da oxidação lipídica e da redução do sabor "requentado".

Em um estudo da combinação do efeito de cloreto de cálcio e desossa à quente sobre o amaciamento do coxão, Wheeler et al. (1991) observaram que a desossa à quente não teve efeito sobre os valores da força de cisalhamento, mas apresentou sucesso quando usada em conjunto com a injeção de cloreto de cálcio (facilitando o processo da injeção). A injeção de 300 mM de cloreto de cálcio (10% peso vivo) pré-rigor fez com que a maciez da carne aumentasse rapidamente (1 dia pós-morte), não necessitando assim o processo de maturação à baixa temperatura para o amaciamento da carne.

Eilers et al. (1992) observaram que independente do tempo de maturação, a injeção de volumes iguais de cloreto de cálcio e ácido lático (1:1) melhoraram em 35% o valor da força de cisalhamento de cortes desossados à quente ou à frio.

Injetando uma solução de cloreto de cálcio em músculo 24 horas pós-morte, Wheeler et al. (1992) demonstraram que a carne foi amaciada como se fosse injetada pré-rigor, e que usando o tratamento congelamento+descongelamento+injeção não se tem amaciamento adicional.

Whipple & Koohmaraie (1992) observaram que o congelamento reduz a atividade da calpastatina e a aplicação de cálcio exógeno ativa o sistema proteolítico das calpaínas. Assim sendo, o congelamento associado à marinação reduziu significantemente a atividade da calpastatina (devido a sua hidrólise pela m-calpaína e porque a calpastatina pode servir como substrato para as calpaínas).

Huff et al. (1993), estudando a injeção de vários compostos e a maturação pós-morte para aumentar a maciez da carne, observaram que a injeção com cloreto de cálcio reduziu os valores de força de cisalhamento, através do aumento da proteólise como mostrado pelo índice de fragmentação miofibrilar e o SDS-PAGE.

Koohmaraie et al. (1993) declararam que 300 mM de cloreto de cálcio (10%) é uma quantidade mais do que necessária, e que a utilização de cloreto de cálcio foi usado com sucesso em vários cortes cárneos menos macios e reconhecido por ter um potencial para amaciar a carne no setor de processamento.

Num estudo sobre o tempo pós-morte de injeção, a concentração mínima e o nível de injeção de cloreto de cálcio que aumentasse o amaciamento da carne, Wheeler et al. (1993a) observaram que o nível de injeção entre 5 e 10% do peso da amostra não apresentou diferença

na força de cisalhamento, mas que, injetando-se 200 mM de cloreto de cálcio a 5% de peso da amostra dentro das 24 horas pós-morte, pode produzir consistentemente carne macia sem comprometer outras qualidades, como palatabilidade e porção de carne magra. Ainda, a injeção de 200 mM de cloreto de cálcio a 5% resulta em aproximadamente 250 ppm de cálcio à carne, um aumento sete vezes o controle, o que irá fornecer uma fonte mais do que necessária de cálcio ao consumidor. Outro dado interessante, é que a carne que inicialmente já é macia (força de cisalhamento < 5 kg) não ficará mais macia pela injeção de cloreto de cálcio.

Segundo Wheeler et al. (1993b), com a injeção de 200 mM de cloreto de cálcio (5%) ocorre, em média, um aumento de 3,5% do peso do produto o que é conservado através dos processos de empacotamento e maturação, mas com uma quantidade de purga um pouco mais elevada. O custo dos materiais da injeção de cloreto de cálcio e da mão-de-obra poderiam ser pagos pelo aumento do peso do produto. Foi observado, também, que a variação na maciez é reduzida em 30% e, assim, o produto cloreto de cálcio-injetado é mais uniforme em maciez. Não ocorre ainda um maior amaciamento da carne porque as calpaínas uma vez ativadas pelo cálcio degradam as proteínas musculares e também elas mesmas. Assim, este é um processo limitado, ao contrário da degradação descontrolada como ocorre com a papaína.

Wheeler et al. (1993c) realizaram um trabalho sobre o processo de injeção com cloreto de cálcio para garantir a maciez e fortificar a carne com cálcio e concluíram que a injeção com cloreto de cálcio aumentou a maciez da carne em todos os tempos de maturação empregados, o tempo de maturação pós-morte necessário para se ter carne macia foi reduzido para 1 dia, e a desossa à frio não apresentou efeito sobre a maciez das amostras estudadas.

Em um estudo conduzido por Whipple & Koohmaraie (1993a) foi concluído que a marinação com cloreto de cálcio da carne de vacas adultas pode reduzir o valor da força de

cisalhamento, entretanto neste experimento as vacas apresentaram valores de força cisalhamento abaixo de 5 kg (não comum em vacas adultas). Em animais alimentados com agonistas β-adrenérgicos, a marinação com cloreto de cálcio aumentou a maciez da carne independentemente da dieta, mas bifes de animais β-adrenérgicos permaneceram menos macios do que os dos animais controle, e o aumento no amaciamento foi devido a ativação da m-calpaína, uma vez que a sua atividade e a da calpastatina foram reduzidas.

Segundo Whipple & Koohmaraie (1993b) a marinação por 48 horas com 150 mM de cloreto de cálcio, após 5 dias pós-morte, aumenta a maciez da carne, o que pode ser explicado pela ativação natural da m-calpaína (a qual não é ativada durante a maturação normal da carne). Este método de amaciamento da carne é também aumentado pelo congelamento (inativação da calpastatina), servindo então como uma forma de fortificação e amaciamento da carne pelo cálcio.

Diles et al. (1994) concluíram que o cloreto de cálcio pode ser injetado 30 minutos ou 24 horas pós-morte, e que em ambos os tempos há redução dos valores da força de cisalhamento. A aplicação de 200 mM de cloreto de cálcio a 30 minutos e 150 mM a 24 horas pós-morte com maturação por 14 dias melhoraram os valores sensoriais e de força de cisalhamento. Assim, a injeção de cloreto de cálcio pode ser útil para maior velocidade de entrega de produtos cárneos, pela eliminação da necessidade de armazenamento pós-morte acima de 7 dias, e para maximizar a maciez e a palatabilidade da carne de lombo de vacas adultas.

Alarcon-Rojo & Dransfield (1995) observaram que o cloreto de cálcio produziu carne mais macia que o controle. Os autores utilizaram ainda outros íons ativadores e verificaram que, o cloreto de magnésio apresentou 73% da efetividade dos sais de cálcio (aumentou a

maciez em 20%), seguido pelo cloreto de sódio que apresentou 43% da efetividade dos sais de cálcio (aumentou a maciez em 10%). Trinta milimolar de cloreto de cálcio foi a quantidade suficiente para impedir a ação dos inibidores cisteína (reduz a dureza da carne em 22% no primeiro dia e 35% no segundo dia de armazenamento). Ainda, com apenas 1 dia de imersão 25% dos íons cálcio na solução foram absorvidos pela carne e no segundo dia de armazenamento a concentração de cálcio na carne atingiu o seu equilíbrio com a solução. Portanto, a difusão dos íons cálcio foi 67% no primeiro dia. Com armazenamento superior a 8 dias, soluções com cloreto de cálcio produziram carnes 40% macias.

Em um estudo dos efeitos dos diferentes tempos de injeção com cloreto de cálcio sobre a maciez e perdas por cozimento, Boleman et al. (1995) observaram que os valores de força de cisalhamento foram maiores em amostras controles comparadas com amostras injetadas e aumentaram linearmente com o tempo de injeção. O cloreto de cálcio aplicado 1 hora pós-morte foi mais efetivo na redução da força de cisalhamento (16,3%) prevenindo perdas por umidade excessiva, entretanto, injeções às 12 ou 24 horas pós-morte também são eficazes na redução dos valores de força de cisalhamento (valores menores que aplicação pré-rigor).

Avaliando a aceitação do consumidor de bifes amaciados com cloreto de cálcio, Hoover et al. (1995) observou que os bifes controles receberam pior pontuação do que bifes tratados com cloreto de cálcio.

Kerth et al. (1995) estudando o aumento da maciez da carne e da qualidade de lombos 48 horas após abate tratados com injeção de cloreto de cálcio, verificaram que os tratamentos com 200 ou 250 mM de cloreto de cálcio (5%) tiveram maior maciez e melhor avaliação sensorial.

Segundo Lansdell et al. (1995), os efeitos da injeção com cloreto de cálcio aplicada em condições comerciais, foram consistentes com os resultados de experimentos laboratoriais usando 200 mM cloreto de cálcio a 5%. Os valores de força de cisalhamento e avaliação sensorial indicaram que a porcentagem de carne dura foi reduzida. A aplicação comercial da injeção de cloreto de cálcio aumentou a palatabilidade da carne com um efeito mínimo sobre outras características de qualidade e a adaptação deste método de amaciamento pela indústria poderá reduzir a variação encontrada na maciez da carne.

Em uma avaliação da aceitação da venda ao consumidor de carne amaciada por cloreto de cálcio, Miller et al. (1995) observaram que para 50% dos consumidores a maciez é a característica de qualidade mais importante, seguida pelo sabor (40%). Ainda, a carne injetada (200 mM a 5% e com 7 dias de maturação) com cloreto de cálcio foi a preferida pelos consumidores uma vez que este processo reduz a variação na maciez, sem efeito negativo sobre as características da qualidade e palatabilidade da carne.

McFarlane & Unruh (1996) realizaram o primeiro trabalho de injeção com cloreto de cálcio para amaciamento de lombo em suínos, relacionado com o resfriamento tradicional e resfriamento rápido, e concluíram que a injeção com cloreto de cálcio pode aumentar a maciez da carne suína que em experimentos anteriores mostrou alta variabilidade em sua maciez.

Em um estudo com novilhos Limousin, Wulf et al. (1996) observaram que diferentes tipos de cortes respondem diferentemente ao tratamento com cloreto de cálcio. Entretanto, a força de cisalhamento foi reduzida pela injeção de cloreto de cálcio em todos os cortes estudados, e o amaciamento foi maior em contra-filé e alcatra do que em coxão. A razão, para uma menor resposta a injeção de cloreto de cálcio em coxão do que em alcatra e contra-filé, foi provavelmente o maior conteúdo de tecido conectivo do coxão. O efeito da injeção de cloreto

de cálcio sobre a força de cisalhamento também diferiu entre os graus de cozimento. Quando o grau de cozimento aumenta, ocorre uma melhora na maciez da carne devido a injeção de cloreto de cálcio, ou seja, a injeção com cloreto de cálcio reduz os efeitos do endurecimento pelo aquecimento.

O uso de cloreto de cálcio, segundo Wheeler et al. (1992), foi aprovado pela FDA como geralmente reconhecido como seguro (GRAS) nos níveis máximos de 3% do peso da amostra de uma solução de 0.8 M (reg. #318.7 [c] [4]; FSIS, 1973).

2.3.2. A influência do Cloreto de Cálcio nas características sensoriais e perdas por cozimento

Segundo vários autores, apesar do cloreto de cálcio apresentar vantagens no amaciamento e apresentação da carne, alguns experimentos mostram que pode afetar a coloração, a palatabilidade, o rendimento do produto cárneo, as perdas por evaporação, o gotejamento e as perdas totais por cozimento, fazendo com que o produto seja rejeitado pelo consumidor. Miller et al. (1986) observaram que a utilização de 0,5% de cloreto de cálcio apresentou maior coloração vermelha e aceitação, do que 1% de cloreto de cálcio. Bifes adicionados com sais de cloreto se tornaram ranceificados somente após 70 dias de armazenamento congelado. Ainda, um aumento na incidência de "sabor-requentado" ocorreu quando o sal aumentou de 0,5 a 1% em todos os tratamentos, devido ao íon cloreto criar uma sensação metálica nas avaliações de painel sensorial.

Segundo Koohmaraie et al. (1990b), as perdas por cozimento e a taxa de cozimento de carcaças de ovinos injetadas com cloreto de cálcio não foram afetadas. Entretanto, em contra-filés de bovinos Brahman injetados com cloreto de cálcio houve maiores perdas por cozimento

no dia 1 mas não no dia 14 de maturação, e a injeção de cloreto de cálcio não teve efeito sobre a taxa de cozimento.

Morgan et al. (1991) observaram que as amostras injetadas com cloreto de cálcio apresentaram maior intensidade no sabor, durante o armazenamento, (o sabor foi caracterizado como mais metálico, ácido ou sabor de fígado). Também não foram observadas diferenças entre o tempo e as perdas de cozimento.

Wheeler et al. (1991) constataram que a interação de desossa à quente e injeção de cloreto de cálcio em músculos *Biceps femoris* resultou em um aumento no tempo de cozimento e grandes perdas por cozimento (3-5%), o mesmo não ocorrendo para músculos *Semimembranosus*. E que a injeção com cloreto de cálcio aumenta, um pouco, a descrição de sabor salgado e ácido.

Eilers et al. (1992) concluíram que a carne de animais injetados com cloreto de cálcio apresentaram características de sabor menores do que amostras não injetadas com cloreto de cálcio.

Num estudo de Wheeler et al. (1992) do efeito do tempo de injeção pós-morte e do congelamento sobre a efetividade do cloreto de cálcio em aumentar a maciez, os efeitos dos tratamentos sobre as perdas por cozimento não foram consistentes.

Boles & Shand (1993) e Wheeler et al. (1993a) estudando diferentes concentrações e níveis de injeção de cloreto de cálcio obtiveram um resposta proporcional ao aumento da concentração de cloreto de cálcio, um aumento do sabor desagradável (salgado, ácido e azedo), e ainda uma coloração mais escura.

Segundo Wheeler et al. (1993b) foi detectado na avaliação sensorial um aumento na maciez de músculos injetados com cloreto de cálcio, mas sem diferenças em sabor e suculência.

Diles et al. (1994) concluíram que após 3 dias de exposição, todos os bifes injetados com cloreto de cálcio (independente da concentração utilizada) apresentaram mais de 40% de descoloração. As perdas por cozimento não foram afetadas pelas concentrações de cloreto de cálcio ou pelo tempo de maturação e, após 14 dias de maturação foram obtidos os menores valores de força de cisalhamento. A injeção de cloreto de cálcio aumentou a suculência, a maciez e a palatabilidade, enquanto que a maturação aumentou a maciez, a intensidade e a descrição de sabor e palatabilidade geral.

Resultados obtidos por Lansdell et al. (1995) mostram que a injeção de cloreto de cálcio aumentou a maciez sensorial para os músculos coxão-mole e contra-filé, mas não afetou a intensidade de sabor ou causou algum problema com o sabor. A injeção com cloreto de cálcio afetou as características de cozimento (temperatura interna, perda por cozimento, tempo de cozimento, cor após cozimento), no entanto o contra-filé e coxão-mole apresentaram grande perda por purga durante armazenamento por 7 dias, e o coxão-mole apresentou uma perda por gotejamento maior do que os controles.

Em um trabalho de aceitação pelo consumidor da carne amaciada por cloreto de cálcio, Hoover et al. (1995) e Miller et al. (1995) observaram que a injeção com 200 mM de cloreto de cálcio aumentou a maciez e a suculência e, não foram observados problemas com sabor quando feitas comparações com amostras controle.

Segundo Boleman et al. (1995) a injeção com cloreto de cálcio fez com que as perdas por purga fossem maiores, enquanto que as perdas por cozimento aumentaram com o tempo de injeção (quanto mais tardia a injeção, maiores foram as perdas). Assim, injeção com cloreto de cálcio 1 hora pós-morte foi a mais efetiva para reduzir os valores da força de cisalhamento e prevenir perda excessiva de umidade.

Dyer et al. (1995) e Kerth et al. (1995) também observaram que o emprego de cloreto de cálcio melhorou os escores de sabor e painel sensorial.

McFarlane & Unruh (1996) observaram que amostras de carne controle injetadas com água tiveram perdas por purga aumentadas após 3 dias de armazenamento, semelhantes as amostras injetadas com cloreto de cálcio.

Quanto ao problema de descoloração apresentado em bifes injetados com cloreto de cálcio (devido o sal induzir a oxidação), Wheeler et al. (1996) mostraram que com a injeção de 1% de vitamina C junto com 300 mM de cloreto de cálcio, os bifes apresentaram-se mais vermelhos e tiveram baixa descoloração no 5º e 7º dia de armazenamento, ocorrendo ainda a redução da rancificação oxidativa, do sabor "requentado" e de sabores ruins.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1.Animais

Foram utilizados 64 bovinos machos inteiros, sendo 16 Caracu (C), 16 Guzerá (G), 16 Nelore Controle (NC) e 16 Nelore Seleção (NS) oriundos do projeto de seleção da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho. Estes animais permaneceram em confinamento, na Estação Experimental de Zootecnia de Nova Odessa por um período médio de 177 dias, no qual receberam uma dieta contendo 55% de concentrado (76,5% milho, 19,2% farelo de algodão, 1,62% uréia, 0,18% amônia, 1,5% calcário e 1% sal mineral) e 45% de volumoso (silagem de milho e/ou silagem de milho+sorgo). As médias no final do confinamento foram de 19,7 meses de idade, o peso vivo ao abate de 473 kg e o rendimento da carcaça de 59,2%.

3.1.2. Obtenção das amostras

Após o abate as carcaças permaneceram por 24 horas em resfriamento, quando uma amostra do músculo *Longissimus dorsi* (contra-filé), entre as 6ª e a 9ª vértebras lombares (lado direito), foi retirada para realização deste trabalho.

3.1.3. Preparo da solução, injeção e maturação

As soluções de cloreto de cálcio (0, 200 e 300 mM) foram preparadas com água destilada e homogeneizadas no Centro de Biotecnologia da ESALQ em Piracicaba.

A amostra do músculo *Longissiumus dorsi* foi subdividido em nove partes que sofreram, ao acaso, os seguintes tratamentos com injeção de cloreto de cálcio, na base de 10% do peso da amostra: a) água (controle), b) 200 mM de cloreto de cálcio e c) 300 mM de cloreto de cálcio. Após injeção das respectivas amostras, elas foram embaladas à vácuo e transferidas para uma câmara fria (2 ^{o}C), onde permaneceram por 1, 7 e 14 dias, para posterior análise da força de cisalhamento e das perdas por cozimento.

3.2. Métodos

3.2.1. Força de Cisalhamento e Perdas por Cozimento

A metodologia da força de cisalhamento e testes de cozimento empregados, foram aquelas indicadas pelo AMSA (1978), com algumas modificações. No 1º , 7º e 14º dia após o abate, bifes de 2,5 cm de espessura foram assados no forno com temperatura de 200 ^{o}C até atingir uma temperatura interna de 75 ^{o}C, a monitoração da temperatura foi feita com um termômetro. Os bifes foram pesados antes e depois do cozimento para a determinação da porcentagem de perdas por cozimento, resfriados à temperatura ambiente por 1 hora, retiradas amostras de ½ polegada de diâmetro (6 amostras/bife) e feito a análise da força de cisalhamento utilizando-se do Warner Bratzler Shear Force Device.

3.3. Análise Estatística

3.3.1. Parcela Subdividida de Fatorial 3X3

A análise foi realizada com o programa SAS (1990) onde os dados foram analisados com um modelo split plot em esquema fatorial 3X3. A parcela consistiu das raças (Caracu, Guzerá, Nelore Controle e Nelore Seleção) e a sub-parcela das concentrações de cloreto de cálcio (0, 200 e 300 mM) e dos tempos de maturação (1, 7 e 14 dias). O modelo incluiu os principais efeitos de raça (para cada animal), concentração de cloreto de cálcio e tempo de maturação e as interações entre raça*concentração de cloreto de cálcio, raça*tempo de maturação e concentração de cloreto de cálcio*tempo de maturação. Os erros incluíram animal (dentro de raça) para a parcela e os termos de interação para a sub-parcela.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis estudadas neste experimento, após a análise realizada pelo programa SAS (1990), foram observados resultados significativos para a força de cisalhamento (quando comparados raça, animal dentro de raça, concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e as interações raça*concentração de cloreto de cálcio, raça*tempo de maturação e concentração de cloreto de cálcio* tempo de maturação); para as perdas por evaporação (quando comparados raça, animal dentro de raça, tempo de maturação e a interação raça*tempo de maturação); para as perdas por gotejamento (quando comparados raça, animal dentro de raça e tempo de maturação) e para as perdas totais (quando comparados animal dentro de raça, tempo de maturação e a interação raça*tempo de maturação).

No entanto, devemos lembrar antes da apresentação dos resultados e discussão, que a injeção com cloreto de cálcio foi empregada 24 horas pós-morte (pós-rigor) e, segundo alguns trabalhos como o de Wheeler et al. (1992), Whipple & Koohmaraie (1992) e Kerth et al. (1995), o emprego de cloreto de cálcio no período pós-morte também é eficiente para amaciar a carne, mas não tão eficiente quanto sua aplicação no período pré-rigor, uma vez que possíveis mudanças na permeabilidade da membrana celular durante o desenvolvimento do rigor podem restringir a entrada de cálcio na célula muscular, assim, impedindo a completa ativação das calpaínas.

Com os resultados obtidos foram montadas as tabelas e gráficos das médias encontradas para cada parâmetro estudado.

4.1. Força de Cisalhamento (FC)

4.1.1. Influência da Raça, Tempo de Maturação e Concentração de Cloreto de Cálcio

Para as raças estudadas (Tabela 1 e 2) observa-se que na média geral os animais Guzerá apresentaram carne com maior FC (mais dura), enquanto que os animais Nelore Controle e Nelore Seleção apresentaram carne com valores de FC intermediários e os animais Caracu foram os que tiveram menor FC (carne mais macia). Entretanto, devemos observar que de uma maneira geral os valores estiveram bem abaixo daqueles para a carne considerada dura (FC$\geq$ 5,0 kg), como isso seria esperado que o amaciamento da carne, através do uso da solução de cloreto de cálcio fosse menor, pois segundo Wheeler et al. (1993a) quanto mais dura for a carne, mais efetivo será o tratamento com cloreto de cálcio. Com carne de baixa FC, não ocorre um maior amaciamento, porque as calpaínas uma vez ativadas pelo cálcio não apenas degradam as proteínas musculares, mas também elas mesmas. Assim este é um processo limitado, ao contrário da degradação descontrolada como ocorre com a papaína (Wheeler et al., 1993b).

Para o tempo de maturação estudado (Tabela 1 e 3), observou-se que quanto maior o período de maturação, menor foram as médias para FC encontradas (maior amaciamento). O maior amaciamento ocorreu nos seis primeiros dias de armazenamento (67%). O mesmo resultado foi encontrado por Eilers et al. (1996), onde o amaciamento de todos os cortes testados também aumentou quando o tempo de maturação pós-morte foi aumentado. Além disso, segundo Taylor et al. (1995) aproximadamente 65 a 80% de todo o amaciamento pós-morte ocorre durante os três primeiros dias pós-morte.

Tabela 1. Médias da força de cisalhamento (kg) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça X tempo de maturação.

	MATURAÇÃO (dias)			
RAÇA	1	7	14	MÉDIAS
CARACU	3,15 ^{A,c}	2,49 ^{B,b}	2,29 ^{C,b}	2,64 ^{b}
GUZERÁ	4,87 ^{A,a}	3,46 ^{B,a}	2,95 ^{C,a}	3,76 ^{a}
NELORE CONTROLE	4,23 ^{A,ab}	3,27 ^{B,a}	2,76 ^{C,a}	3,42 ^{ab}
NELORE SELEÇÃO	3,97 ^{A,b}	3,24 ^{B,a}	2,63 ^{C,ab}	3,28 ^{ab}
MÉDIAS	4,06 ^{A}	3,12 ^{B}	2,66 ^{C}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre a força de cisalhamento dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito da raça sobre a força de cisalhamento dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Tabela 2. Médias da força de cisalhamento (kg) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça X concentração de cloreto de cálcio

	$CaCl_2$ (mM)			
RAÇA	0	200	300	MÉDIAS
CARACU	3,00 ^{A,c}	2,59 ^{B,c}	2,34 ^{C,b}	2,64 ^{b}
GUZERÁ	4,49 ^{A,a}	3,53 ^{B,a}	3,26 ^{B,a}	3,76 ^{a}
NELORE CONTROLE	3,95 ^{A,ab}	3,23 ^{B,ab}	3,08 ^{B,a}	3,42 ^{ab}
NELORE SELEÇÃO	3,90 ^{A,b}	2,98 ^{B,bc}	2,97 ^{B,a}	3,28 ^{ab}
MÉDIAS	3,84 ^{A}	3,08 ^{B}	2,91 ^{C}	

$^{A, B, C}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a força de cisalhamento dentro raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito de raça sobre a força de cisalhamento dentro da concentração de cloreto de cálcio. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Para o cloreto de cálcio (Tabelas 2 e 3), observamos que quanto maior a concentração empregada, menor a força de cisalhamento obtida. Entretanto podemos notar que a redução na FC entre as concentrações 0-200 foi de 20% enquanto que de 200-300 a redução foi de somente 5,5%.

Tabela 3. Médias da força de cisalhamento (kg) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração X tempo de maturação

	MATURAÇÃO (dias)			
$CaCl_2$ (mM)	1	7	14	MÉDIAS
0	4,70 ^{A,a}	3,76 ^{B,a}	3,05 ^{C,a}	3,84 ^{a}
200	3,82 ^{A,b}	2,85 ^{B,b}	2,57 ^{B,b}	3,08 ^{b}
300	3,65 ^{A,b}	2,73 ^{B,b}	2,36 ^{B,b}	2,91 ^{c}
MÉDIAS	4,06 ^{A}	3,12 ^{B}	2,66 ^{C}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre a força de cisalhamento dentro da concentração de cloreto de cálcio. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a força de cisalhamento dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

4.1.2. Influência das interações Raça*Tempo de Maturação, Raça*Concentração de Cloreto de Cálcio e Concentração de Cloreto de Cálcio*Tempo de Maturação

Estudando-se a interação raça*tempo de maturação (Tabela 1), observamos que houve um efeito do tempo de maturação sobre as raças (P<0,05), onde ocorreu uma redução significativa na FC do 1º ao 7º dia (0,66-1,41 kg), enquanto que do 7º ao 14º dia essa redução foi menor (0,20-0,61 kg), mas de maneira significante (P<0,05) e semelhante para todas as raças estudadas. Quanto ao efeito da raça dentro do tempo de maturação no dia 1 de maturação,

observa-se que os animais C apresentaram menor FC, enquanto que os animais NC apresentaram valores de FC semelhantes ou iguais entre os animais de FC intermediário (NS) e FC alto (G). No entanto, 7 dias após maturação, a variação na maciez encontrada foi reduzida, onde os animais C continuaram com menores valores de FC enquanto que as demais raças apresentaram altos valores de FC (carne menos macia que o C, mas mais macia que ao dia 1 de maturação). Aos 14 dias de maturação, nota-se que os animais C ainda apresentam carne tão macia quanto os animais NS, mas mais macia que os animais G e NC. Com os resultados obtidos podemos assim verificar que os animais C apresentaram carne mais macia, em todos os dias de maturação empregados, mostrando o que parece ser uma influência positiva do sangue *Bos taurus* sobre a maciez da carne. Animais NC e NS apresentaram FC intermediários, enquanto que os animais G, apesar de sofrerem maturação, continuaram a apresentar carne menos macia (maior FC) em relação aos demais animais e mostrando assim a possível influência do sangue *Bos indicus* na dureza da carne (Figura 2). Estes resultados concordam com alguns pesquisadores (Koch et al., 1982; Crouse et al., 1987 e 1989; Whipple al., 1990) que animais *Bos indicus* apresentam maior FC e segundo Shackelford et al. (1995) animais *Bos indicus* apresentam maior FC para os músculos *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii*, *Supraspinatus*, *Biceps femoris* e *Quadriceps femoris*.

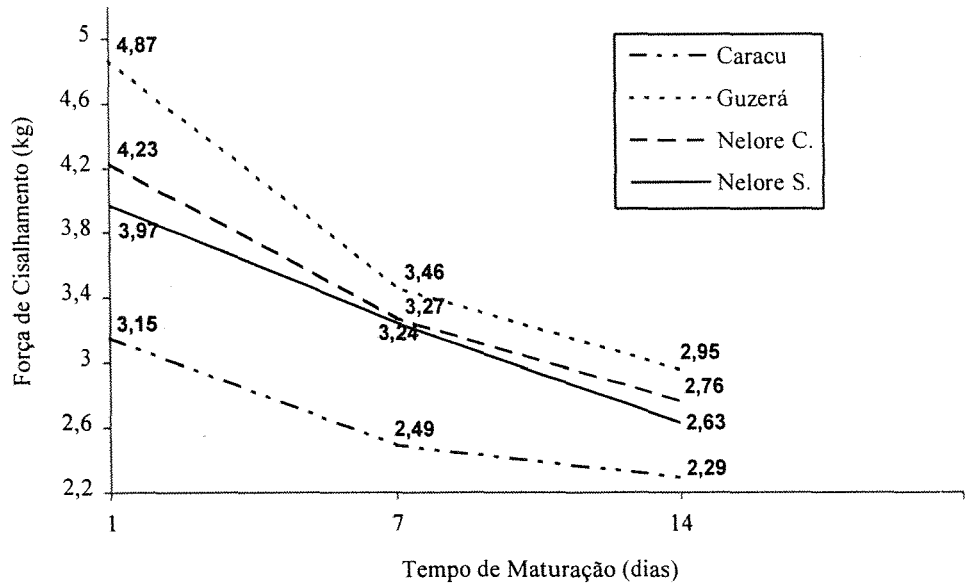

Figura 2. Efeito da interação raça X tempo de maturação sobre a Força de Cisalhamento (kg).

Comparando-se a interação raça*concentração de cloreto de cálcio, observa-se que houve um efeito da concentração de cloreto de cálcio dentro da raça (Tabela 2), onde a FC foi reduzida significativamente quando da aplicação de 200 ou 300 mM de cloreto de cálcio. A aplicação de 300 mM de cloreto de cálcio mostrou não ser estatisticamente diferente de 200 mM para as raças G, NC e NS; entretanto reduziu a FC ($P<0,05$) para a raça C (quanto maior foi a quantidade aplicada, maior foi o amaciamento). Nossos resultados (amaciamento de 20-32%) são semelhantes aos mencionados por vários autores (Morgan et al., 1991; Wheeler et al., 1993a; Lansdell et al. 1995), que obtiveram valores na redução da variação da maciez de 24-50%, principalmente com carnes com força de cisalhamento $\geq$ 5,0 kg. Entretanto, os resultados de FC observados (amaciamento de 0,17-0,76 kg com cloreto de cálcio) são semelhantes aos encontrados por Koohmaraie et al. (1990) que obteve uma redução da FC em 1 kg. A utilização

de cloreto de cálcio foi importante para reduzir a FC através do fornecimento de cálcio exógeno. Segundo alguns autores (Alarcon-Rojo & Dransfield, 1995; Koohmaraie et al., 1988b, 1989, 1990; Koohmaraie & Shackelford, 1991), durante o processo de amaciamento da carne a quantidade de cálcio liberada pelo retículo sarcoplasmático só é suficiente para ativar μ-calpaína (que requer uma pequena quantidade de íons cálcio para ser ativada), enquanto que a m-calpaína permanece intacta (mas disponível para ativação). Assim, a aplicação de cálcio exógeno (na forma de cloreto de cálcio) ativa ambas as calpaínas resultando em um amaciamento maior e mais rápido. Quanto maior a concentração de cloreto de cálcio empregada, menor será a FC. Entretanto, com o emprego de uma maior concentração de cloreto de cálcio (300 mM), foi observado em muitos trabalhos carne com sabor desagradável caracterizado como um sabor mais salgado, ácido, amargo e metálico, provavelmente devido ao íon cloreto criar uma sensação metálica, mas que pode ser contornado com a aplicação de antioxidantes (Miller et al., 1986; Morgan et al., 1991; St. Angelo, 1991; Boles & Shand, 1993). Quanto ao nível de cloreto de cálcio a ser injetado, segundo Wheeler et al. (1993a) a utilização de 200 mM de cloreto de cálcio foi a quantidade ótima para eliminar a dureza da carne sem comprometer outras características de qualidade. Para o efeito da raça dentro da concentração de cloreto de cálcio, o emprego da solução controle fez os animais C apresentarem menor FC, enquanto que os animais NC apresentaram valores intermediários aos NS e G, e os animais G apresentaram carne menos macia. Aplicando-se 200 mM os animais C ainda continuaram apresentando carne mais macia, enquanto que os animais G continuaram a apresentar maior FC e os animais NC e NS apresentaram valores intermediários de FC. Com a aplicação de 300 mM, a variação na FC foi reduzida, onde os animais G, NS e NC apresentaram maior FC e os

animais C apresentaram menor FC. Com isso observamos a influência do sangue *Bos indicus* e *Bos taurus* para estes animais (Figura 3).

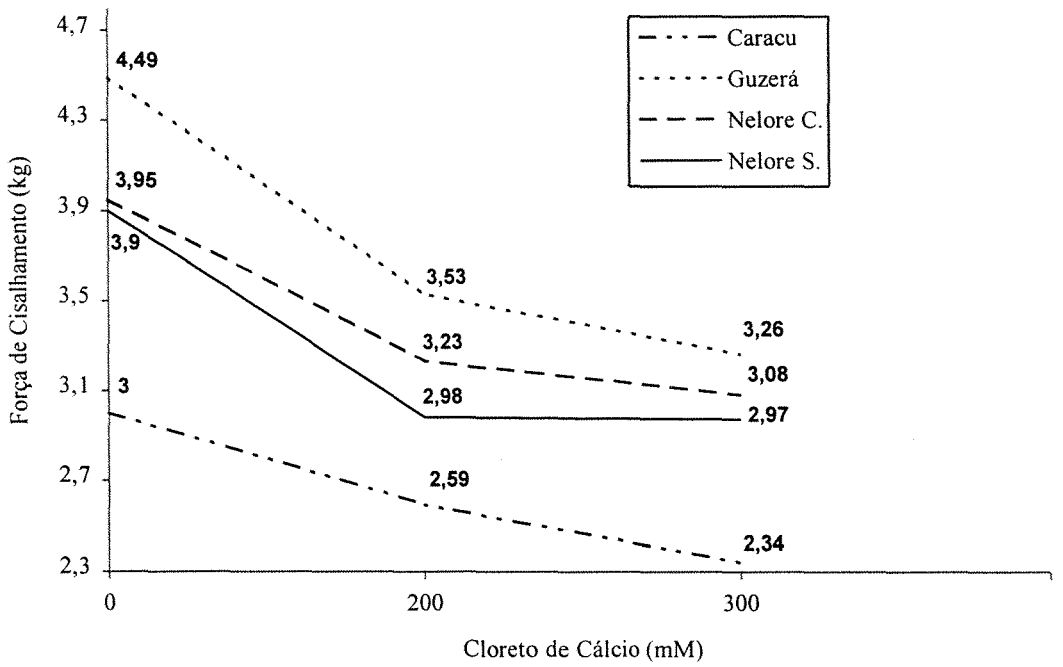

Figura 3. Efeito da interação raça X concentração de cloreto de cálcio sobre a Força de Cisalhamento (kg).

Para a interação concentração de cloreto de cálcio*tempo de maturação (Tabela 3), observamos que houve um efeito positivo (P<0,05) do tempo de maturação dentro da concentração, onde houve uma redução significativa (0,92-0,94 kg) do 1º ao 7º dia. No entanto do 7º para o 14º dia não houve um efeito da maturação sobre a FC para as concentrações 200 e 300 mM de cloreto de cálcio (0,28-0,37 kg), mas somente houve uma redução da FC ao 14º dia com a utilização da solução controle (0,71 kg). Assim observamos que com a utilização do cloreto de cálcio o amaciamento da carne foi acelerado (devido ao estado avançado da

proteólise), reduzindo-se assim o tempo de maturação que seria necessário para se ter a mesma carne macia. Para muitos autores (Koohmaraie et al. 1988b, 1990; Koohmaraie & Shackelford, 1991; Morgan et al., 1991; Wheeler et al., 1991; Wheeler et al., 1992) o tempo de maturação requerido para se ter uma carne macia é reduzido (para 24 horas) com a aplicação de cloreto de cálcio logo após o abate. Em relação ao efeito da concentração de cloreto de cálcio dentro do tempo de maturação (Figura 4), observou que a aplicação de cloreto de cálcio reduziu ($P<0,05$) a FC em todos os tempos de maturação estudados, sendo que entre a utilização de 200 ou 300 mM de cloreto de cálcio essa diferença não foi significativa ($P>0,05$). O fornecimento de cálcio exógeno (cloreto de cálcio), portanto, acelera o processo de amaciamento da carne, provavelmente por ativar completamente a μ- e a m-calpaína, a qual eventualmente resulta em perda de sua atividade devido à autólise, ou ainda devido ao cálcio induzir mudanças estruturais que quebram a miofibrila e a integridade do colágeno, ou mesmo pela perda da atividade da calpastatina que pode ser hidrolizada pelas calpaínas, servindo como um substrato (Mellgren et al., 1986; Koohmaraie, 1988b, 1989, 1990; Koohmaraie & Shackelford, 1991; Morgan et al., 1991; Whipple & Koohmaraie, 1992; Wheeler et al., 1993).

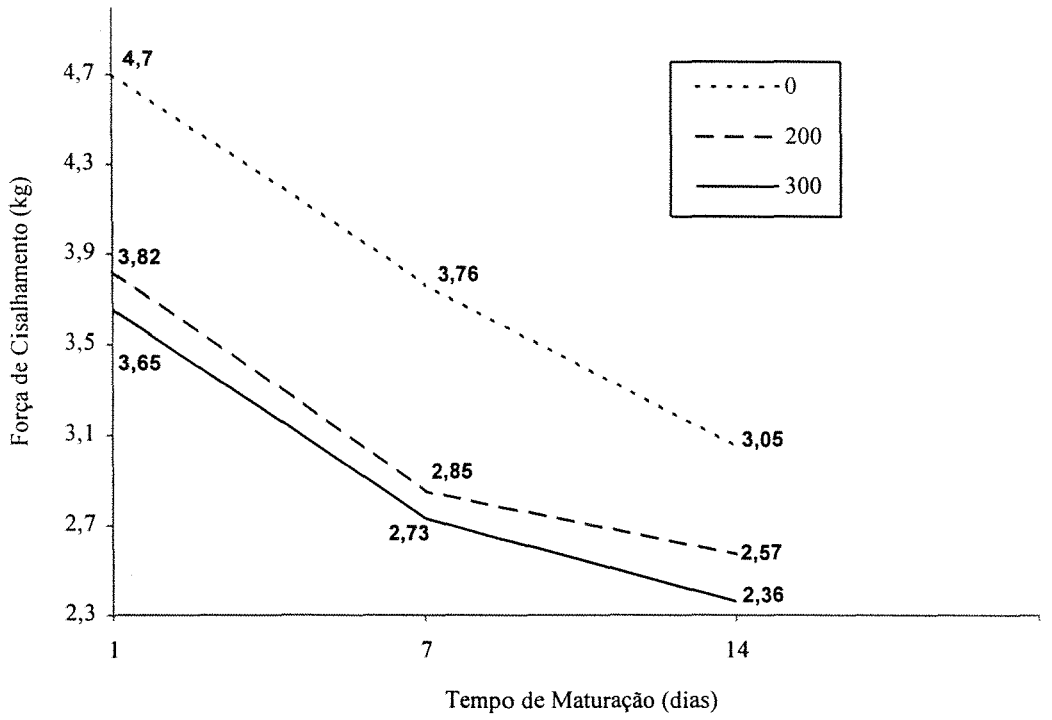

Figura 4. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio X tempo de maturação sobre a Força de Cisalhamento (kg).

4.2. Perdas por Evaporação (PE)

4.2.1. Influência da Raça, Tempo de Maturação e Concentração de Cloreto de Cálcio

Nas Tabelas 4 e 5 observamos, de uma maneira geral, que as PE não foram influenciadas pelas raças estudadas (P>0,05). Entretanto o tempo de maturação e a concentração de cloreto de cálcio (Tabelas 4,5 e 6) apresentaram diferenças (P<0,05).

Tabela 4. Médias das Perdas por Evaporação (%) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça X tempo de maturação

	MATURAÇÃO (dias)			
RAÇA	1	7	14	MÉDIAS
CARACU	15,37 ^{A,b}	15,78 ^{A,a}	15,46 ^{A,a}	15,54 ^{a}
GUZERÁ	16,78 ^{A,ab}	15,45 ^{AB,a}	14,57 ^{B,a}	15,60 ^{a}
NELORE CONTROLE	15,71 ^{A,ab}	17,34 ^{A,a}	15,79 ^{A,a}	16,28 ^{a}
NELORE SELEÇÃO	18,34 ^{A,a}	16,99 ^{AB,a}	15,30 ^{B,a}	16,88 ^{a}
MÉDIAS	16,55 ^{A}	16,39 ^{A}	15,28 ^{B}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre as perdas por evaporação dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito da raça sobre as perdas por evaporação dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Para o tempo de maturação (Tabelas 4 e 6), o resultado geral mostra que a maturação por 1 ou 7 dias não afetaram as PE, mas após 14 dias de maturação as PE foram menores. Isto ocorreu porque com o aumento no tempo de armazenamento as perdas de líquidos são reduzidas, uma vez que a maior perda ocorre principalmente nos primeiros dias de armazenamento. Estudando-se a influência da concentração de cloreto de cálcio sobre as PE, nas tabelas 5 e 6 são apresentados os resultados gerais dessa influência, onde quanto maior foi a concentração de íons cálcio (300 mM) maiores foram as perdas por evaporação. A concentração de 200 mM de cloreto de cálcio mostrou perdas intermediárias e a não injeção com cloreto de cálcio (0 mM) resultou em menores PE.

Tabela 5. Médias das Perdas por Evaporação (%) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça X concentração de cloreto de cálcio

	$CaCl_2$ (mM)			
RAÇA	0	200	300	MÉDIAS
CARACU	14,70 ^{B,a}	15,27 ^{AB,a}	16,63 ^{A,a}	15,54 ^{a}
GUZERÁ	15,05 ^{A,a}	15,92 ^{A,a}	15,84 ^{A,a}	15,60 ^{a}
NELORE CONTROLE	16,08 ^{A,a}	16,43 ^{A,a}	16,32 ^{A,a}	16,28 ^{a}
NELORE SELEÇÃO	16,46 ^{A,a}	17,41 ^{A,a}	16,76 ^{A,a}	16,88 ^{a}
MÉDIAS	15,57 ^{B}	16,26 ^{AB}	16,39 ^{A}	

$^{A, B, C}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre as perdas por evaporação dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito de raça sobre as perdas por evaporação dentro de concentração de cloreto de cálcio. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Tabela 6. Médias das Perdas por Evaporação (%) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração X tempo de maturação

	MATURAÇÃO (dias)			
$CaCl_2$ (mM)	1	7	14	MÉDIAS
0	15,90 ^{A,a}	15,73 ^{A,a}	15,09 ^{A,a}	15,57 ^{b}
200	16,84 ^{A,a}	16,82 ^{A,a}	15,11 ^{A,a}	16,26 ^{ab}
300	16,91 ^{A,a}	16,61 ^{A,a}	15,64 ^{A,a}	16,39 ^{a}
MÉDIAS	16,55 ^{A}	16,39 ^{A}	15,28 ^{B}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre as perdas por evaporação dentro de concentração de cloreto de cálcio. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre as perdas por evaporação dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

4.2.2. Influência das interações Raça*Tempo de Maturação, Raça*Concentração de Cloreto de Cálcio e Concentração de Cloreto de Cálcio*Tempo de Maturação

Para a interação raça*tempo de maturação (Tabela 4), o tempo de maturação não apresentou influência sobre as raças C e NC ($P<0,05$), mas para os animais G e NS as PE foram menores quanto maior foi o tempo de maturação empregado. Para o efeito da raça sobre o tempo de maturação, observa-se que para o dia 1 de maturação os animais C apresentaram valores baixos de PE, enquanto que os NS tiveram os maiores valores de PE e os animais G e NC apresentaram valores de PE intermediários. Para os 7 e 14 dias de maturação, as PE não tiveram diferenças estatísticas para todas as raças estudadas. Assim, o tempo de maturação também reduz a variabilidade para as perdas por evaporação. Ainda, animais *Bos indicus* apresentaram uma tendência de terem maiores PE, enquanto que animais *Bos taurus* apresentaram as menores PE. Quanto maior foi a quantidade de líquidos perdidos nos sete primeiros dias de maturação, menores foram as perdas durante o restante do processo de maturação (Figura 5). Na média, 3,5% do peso é aumentado e retido através do empacotamento e processo de maturação, e uma purga um pouco acima do normal é esperada ocorrer (Wheeler et al., 1993b).

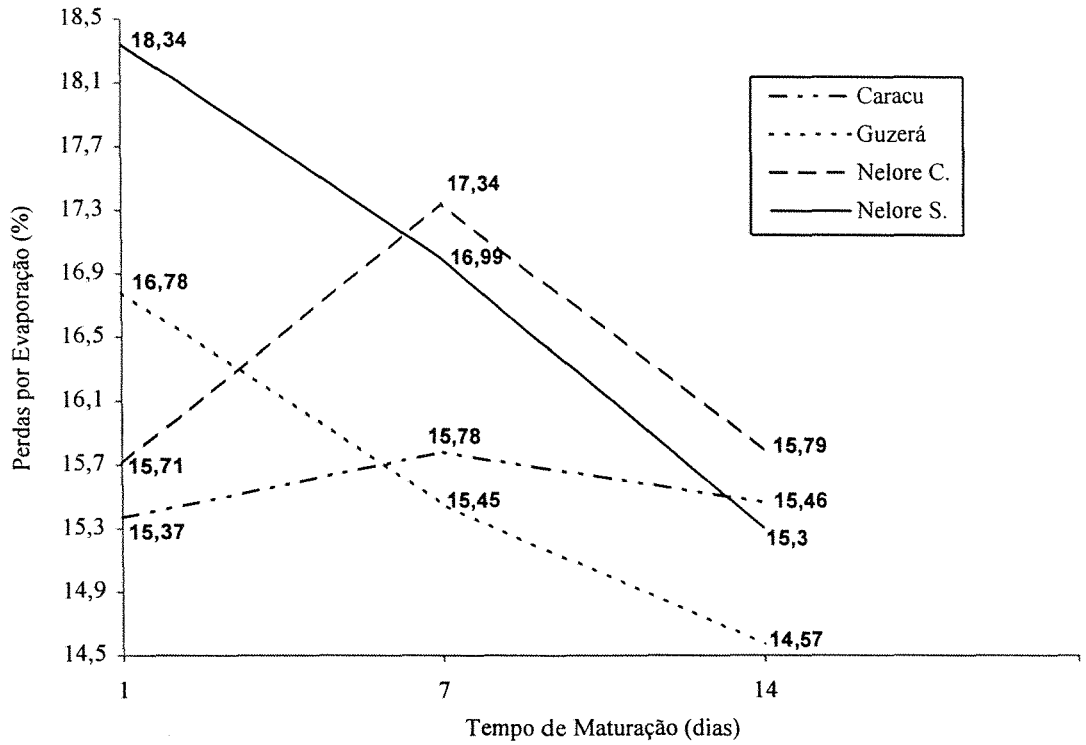

Figura 5. Efeito da interação raça X tempo de maturação sobre as Perdas por Evaporação (%).

Estudando-se a interação raça*concentração de cloreto de cálcio (Tabela 5), observa-se que não houve efeito da concentração de cloreto de cálcio dentro das raças G, NC e NS, mas para a raça C quanto maior foi a concentração empregada, maiores foram as perdas por evaporação (Figura 6). Para o efeito da raça dentro da concentração de cloreto de cálcio, a raça não influenciou nas PE.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da interação entre a concentração de cloreto de cálcio e o tempo de maturação, onde o tempo de maturação não apresentou efeito ($P<0,05$) dentro das concentrações estudadas e as concentrações de cloreto de cálcio não tiveram efeito dentro dos tempos de maturação estudados (Figura 7).

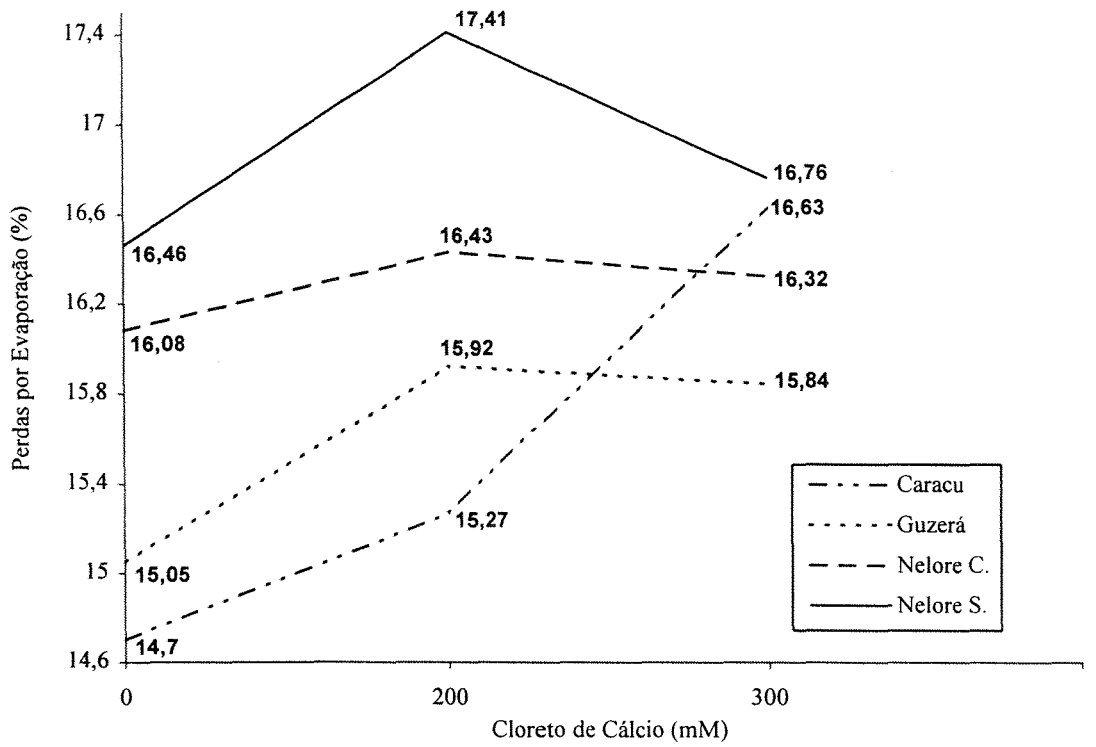

Figura 6. Efeito da interação raça X concentração de cloreto de cálcio sobre as Perdas por Evaporação (%).

Conclue-se, portanto, que para as interações estudadas, as PE para as raças G e NS foram reduzidas com os 14 dias de maturação e que no 1º dia de maturação as raças estudadas apresentaram grande variabilidade entre as PE, mas que foram reduzidas pela maturação por 7-14 dias. A influência da concentração de cloreto de cálcio dentro da raça só foi significativa para a raça C, onde aumentando a concentração de cloreto de cálcio, maiores foram as PE. Não houve efeito da interação tempo de maturação*concentração de cloreto de cálcio, e do efeito das raças dentro das concentrações de cloreto de cálcio sobre as PE.

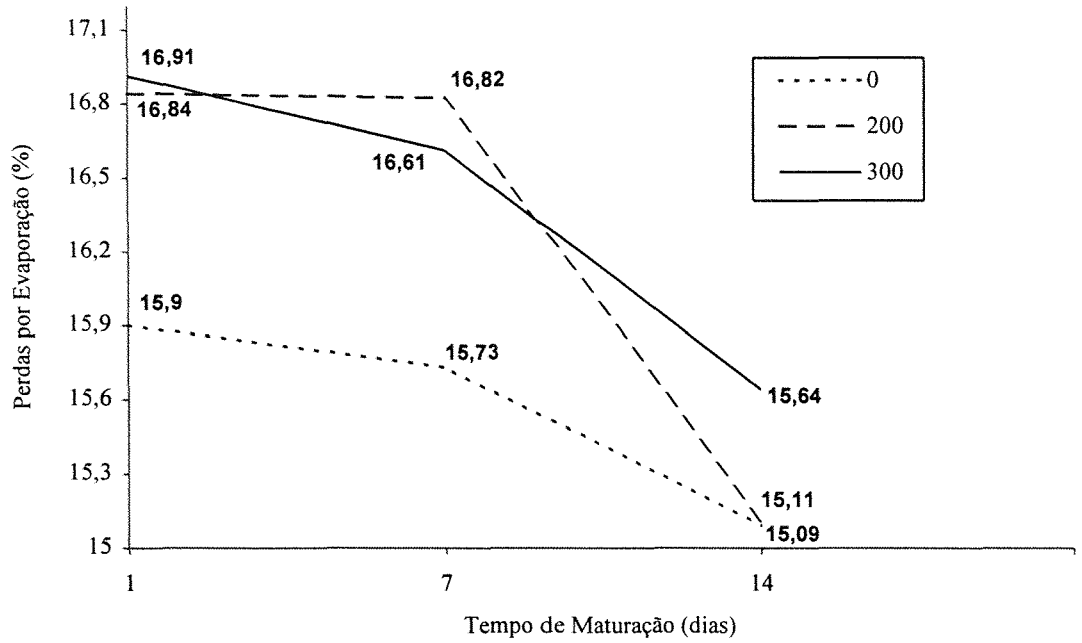

Figura 7. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio X tempo de maturação sobre as Perdas por Evaporação (%).

4.3. Perdas por Gotejamento (PG)

4.3.1. Influência da Raça, Tempo de Maturação e Concentração de cloreto de cálcio

Estudando-se a influência da raça (Tabelas 7 e 8), as raças não influenciaram as perdas por gotejamento.

De uma maneira geral, podemos observar nas Tabelas 7 e 9 que a maturação teve um efeito significativo ($P<0,05$) quando as carnes foram maturadas por 7 dias; entretanto, quando maturadas por 14 dias elas apresentaram valores de PG iguais aqueles ao 1º dia de maturação (elevadas PG).

Tabela 7. Média das Perdas por Gotejamento (%) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça X tempo de maturação

	MATURAÇÃO			
RAÇA	1	7	14	MÉDIAS
CARACU	12,72 ^{A,a}	11,03 ^{B,a}	12,12 ^{A,a}	11,96 ^{a}
GUZERÁ	11,29 ^{A,ab}	11,28 ^{A,a}	11,70 ^{A,ab}	11,42 ^{a}
NELORE CONTROLE	11,49 ^{A,ab}	10,53 ^{A,a}	10,86 ^{A,b}	10,96 ^{a}
NELORE SELEÇÃO	10,82 ^{A,b}	9,92 ^{A,a}	11,01 ^{A,ab}	10,59 ^{a}
MÉDIAS	11,58 ^{A}	10,69 ^{B}	11,42 ^{A}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre as perdas por gotejamento dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito da raça sobre as perdas por gotejamento dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Tabela 8. Médias das Perdas por Gotejamento (%) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça X concentração de cloreto de cálcio

	$CaCl_2$ (mM)			
RAÇA	0	200	300	MÉDIAS
CARACU	12,15 ^{A,a}	12,30 ^{A,a}	11,42 ^{A,ab}	11,96 ^{a}
GUZERÁ	11,43 ^{A,a}	11,23 ^{A,ab}	11,60 ^{A,a}	11,42 ^{a}
NELORE CONTROLE	10,97 ^{A,a}	10,65 ^{A,b}	11,26 ^{A,ab}	10,96 ^{a}
NELORE SELEÇÃO	10,91 ^{A,a}	10,77 ^{A,b}	10,08 ^{A,b}	10,59 ^{a}
MÉDIAS	11,37 ^{A}	11,24 ^{A}	11,09 ^{A}	

$^{A, B, C}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre as perdas por gotejamento dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito de raça sobre as perdas por gotejamento dentro de concentração de cloreto de cálcio. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Para a concentração de cloreto de cálcio (Tabelas 8 e 9) também não foram observadas diferenças estatísticas para as diferentes concentrações de cloreto de cálcio empregadas. Segundo Wheeler et al. (1993a) a quantidade de purga (drip loss) não foi proporcional ao nível de injeção em todos os músculos estudados e o tratamento com 200 mM teve maior purga do que o tratamento com 300 mM. Este efeito foi consistente com o aumento da capacidade de retenção de água associada com o aumento de sal.

Tabela 9. Médias das Perdas por Gotejamento (%) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração X tempo de maturação

	MATURAÇÃO (dias)			MÉDIAS
$CaCl_2$ (mM)	1	7	14	
0	11,68 ^{A,a}	10,99 ^{A,a}	11,44 ^{A,a}	11,37 ^{a}
200	11,56 ^{A,a}	10,58 ^{A,a}	11,58 ^{A,a}	11,24 ^{a}
300	11,51 ^{A,a}	10,50 ^{A,a}	11,26 ^{A,a}	11,09 ^{a}
MÉDIAS	11,58 ^{A}	10,69 ^{B}	11,42 ^{A}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre as perdas por gotejamento dentro de concentração de cloreto de cálcio. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P<0,05$).

$^{a, b, c}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre as perdas por gotejamento dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P<0,05$).

4.3.2. Influência das interações Raça*Tempo de Maturação, Raça*Concentração de Cloreto de Cálcio e Concentração de Cloreto de Cálcio*Tempo de Maturação

Na Tabela 7 observa-se que o tempo de maturação dentro da raça não influenciou os animais G, NC e NS; entretanto, para os animais C a maturação por 7 dias reduziu as PG, enquanto que a maturação por 14 dias foi igual a maturação por 1 dia. Para o efeito da raça

dentro do tempo de maturação, ao 1º dia de maturação observa-se uma grande variabilidade nas PG, com maiores perdas para os animais C, seguidos dos animais G e NC e menores perdas para os NS. Ao 7º dia esta variabilidade não existiu (foi eliminada), enquanto que ao 14º dia de maturação esta variabilidade nas PG novamente se apresentou, mas os NC tiveram as menores PG ao invés dos animais NS (Figura 8).

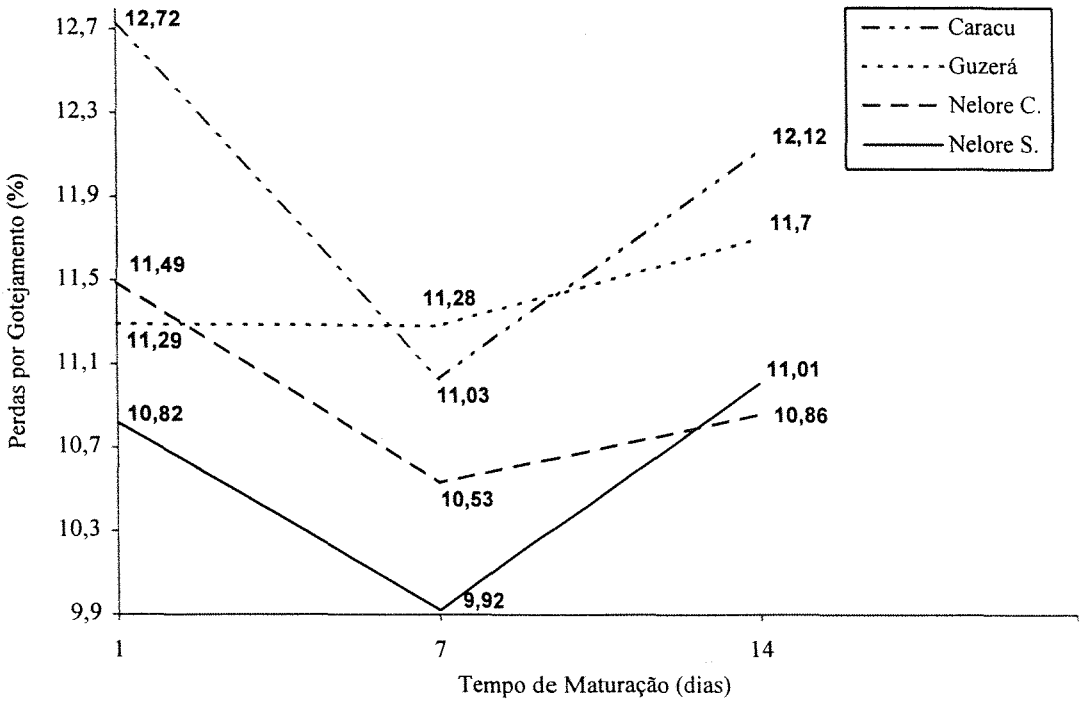

Figura 8. Efeito da interação raça X tempo de maturação sobre as Perdas por Gotejamento (%).

Para a interação raça*concentração de cloreto de cálcio (Tabela 8), não existiu um efeito da concentração de cloreto de cálcio dentro da raça. Entretanto, quando estudamos o efeito da raça dentro da concentração de cloreto de cálcio, observa-se que sem cloreto de cálcio

(0 mM), as PG são iguais para todas as raças, para 200 mM as menores PG foram para os animais NC, NS seguidos dos G e as maiores PG foram para os animais C. Quando da aplicação e 300 mM, os animais NS continuaram a apresentar menores PG, seguidos pelos valores intermediários de PG dos animais C e NC e menores PG dos animais G (Figura 8).

Estudando-se a interação concentração de cloreto de cálcio*tempo de maturação não foi observado diferenças estatísticas (P>0,05) para o efeito do tempo de maturação dentro da concentração de cloreto de cálcio e nem do efeito da concentração de cloreto de cálcio dentro do tempo de maturação (Figura 10).

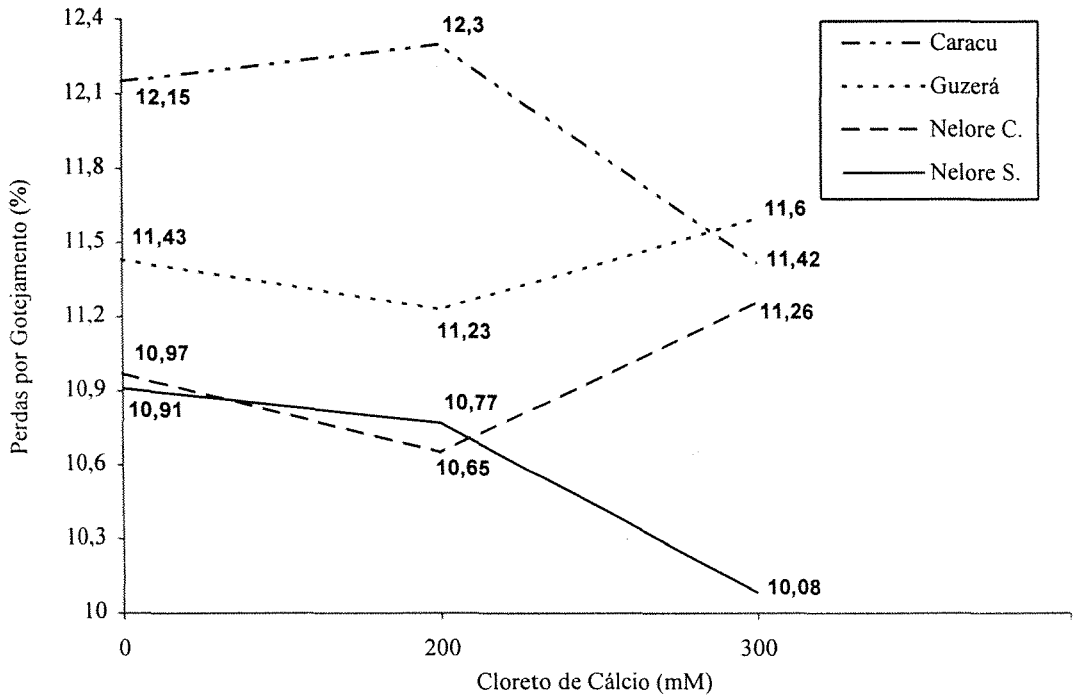

Figura 9. Efeito da interação raça X concentração de cloreto de cálcio sobre as Perdas por Gotejamento (%).

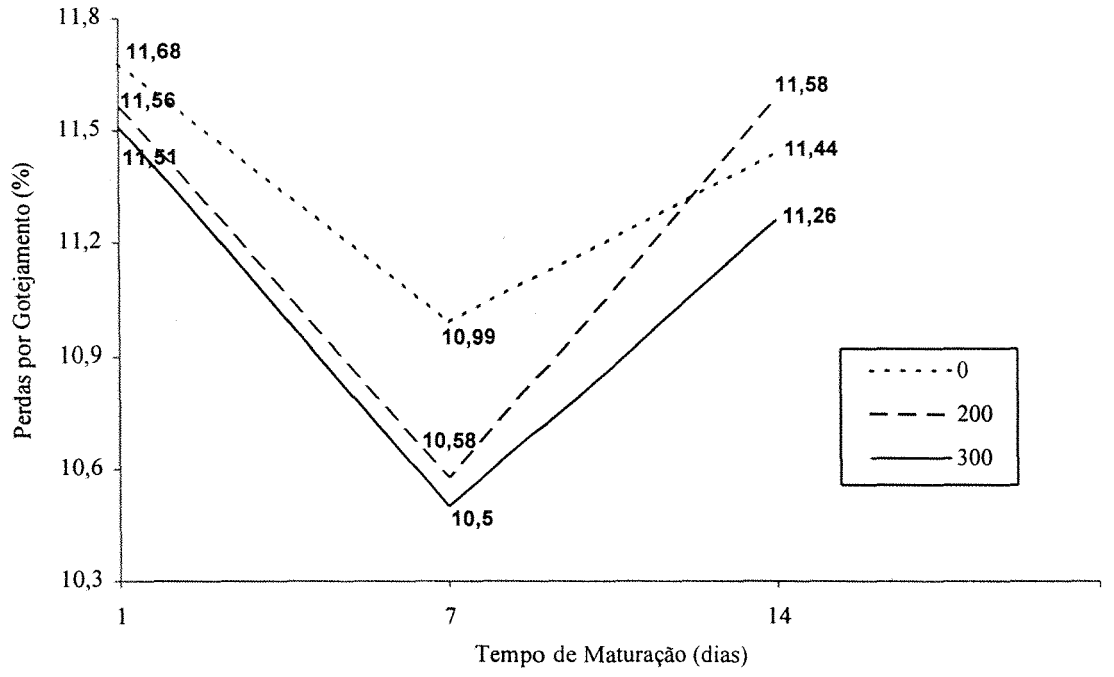

Figura 10. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio X tempo de maturação sobre as perdas por Gotejamento (%).

4.4. Perdas Totais (PT)

4.4.1. Influência da Raça, Tempo de Maturação e Concentração de Cloreto de Cálcio

De uma maneira geral, a raça e a concentração de cloreto de cálcio não influenciaram as PT (Tabelas 10, 11 e 12). Entretanto, as PT foram influenciadas ($P<0,05$) pelo tempo de maturação.

Segundo alguns pesquisadores (Diles et al., 1994; Morgan et al., 1991; Lansdell et al., 1995) independente da concentração e tempo de aplicação de cloreto de cálcio após abate, não foram encontradas diferenças nas perdas por cozimento.

No entanto, Koohmaraie et al. (1990), Wheeler et al. (1991), Wheeler et al. (1992) observaram que a utilização de cloreto de cálcio aumentou as perdas por cozimento, principalmente quando da maturação por 1 dia (25,09%) em relação a maturação por 14 dias (22,50%).

A razão para esta maior perda por cozimento (3-5%) foi, segundo Wheeler et al. (1991), a retenção na carne de alguma quantidade da solução injetada.

Segundo Boleman et al. (1995) o tempo de injeção e o tempo de maturação influenciaram nas perdas totais e perdas por cozimento.

Tabela 10. Médias das Perdas Totais (%) em relação a raça, tempo de maturação e a interação raça X tempo de maturação

	MATURAÇÃO (dias)			
RAÇA	1	7	14	MÉDIAS
CARACU	28,09 ^{A,a}	26,81 ^{A,a}	27,58 ^{A,a}	27,49 ^{a}
GUZERÁ	28,05 ^{A,a}	26,73 ^{AB,a}	26,27 ^{B,a}	27,02 ^{a}
NELORE CONTROLE	27,20 ^{A,a}	27,88 ^{A,a}	26,64 ^{A,a}	27,24 ^{a}
NELORE SELEÇÃO	29,17 ^{A,a}	26,91 ^{B,a}	26,33 ^{B,a}	27,47 ^{a}
MÉDIAS	28,13 ^{A}	27,08 ^{B}	26,70 ^{B}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre as perdas totais dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito de raça sobre as perdas totais dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

Tabela 11. Médias das Perdas Totais (%) em relação a raça, concentração de cloreto de cálcio e a interação raça X concentração de cloreto de cálcio

	$CaCl_2$ (mM)			
RAÇA	0	200	300	MÉDIAS
CARACU	26,86 [A,a]	27,58 [A,a]	28,05 [A,a]	27,49 [a]
GUZERÁ	26,48 [A,a]	27,14 [A,a]	27,43 [A,a]	27,02 [a]
NELORE CONTROLE	27,06 [A,a]	27,08 [A,a]	27,59 [A,a]	27,24 [a]
NELORE SELEÇÃO	27,39 [A,a]	28,17 [A,a]	26,84 [A,a]	27,47 [a]
MÉDIAS	26,95 [A]	27,49 [A]	27,48 [A]	

[A, B, C] Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre as perdas totais dentro de raça. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P<0,05$).

[a, b, c] Efeito de raça sobre as perdas totais dentro de concentração de cloreto de cálcio. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P<0,05$).

Para o tempo de maturação (Tabelas 10 e 12) observa-se que a maturação por 6 dias reduziu as PT, enquanto que entre o período dos 7 aos 14 dias a maturação não teve efeito sobre as PT. Nossos resultados se assemelham aos de Boleman et al. (1995) e Koohmaraie (1990), onde nos primeiros 7 dias de maturação as perdas totais também foram reduzidas.

Segundo Hamm (1986) é possível que um aumento no pH e/ou uma desintegração proteolítica durante a maturação deva resultar num aumento da retenção de água. Isto deve contar para uma menor perda por cozimento das amostras maturadas.

Tabela 12. Médias das Perdas Totais (%) em relação a concentração de cloreto de cálcio, tempo de maturação e a interação concentração X tempo de maturação

	MATURAÇÃO (dias)			MÉDIAS
$CaCl_2$ (mM)	1	7	14	
0	27,58 ^{A,a}	26,73 ^{A,a}	26,53 ^{A,a}	26,95 ^{a}
200	28,39 ^{A,a}	27,40 ^{AB,a}	26,69 ^{B,a}	27,49 ^{a}
300	28,41 ^{A,a}	27,12 ^{A,a}	26,89 ^{A,a}	27,48 ^{a}
MÉDIAS	28,13 ^{A}	27,08 ^{B}	26,70 ^{B}	

$^{A, B, C}$ Efeito da maturação sobre as perdas totais dentro de concentração de cloreto de cálcio. Médias horizontais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

$^{a, b, c}$ Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre as perdas totais dentro de maturação. Médias verticais seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (P<0,05).

4.4.2. Influência das interações Raça*Tempo de Maturação, Raça*Concentração de Cloreto de Cálcio e Concentração de Cloreto de Cálcio*Tempo de Maturação

Na Tabela 10, temos a influência da interação raça*tempo de maturação sobre as PT; onde, o tempo de maturação apresentou um efeito positivo dentro das raças G e NS que apresentaram menores PT quanto maior foi o tempo de maturação empregado. Para as raças C e NC, nenhum efeito foi encontrado para as PT. Para o efeito da raça dentro do tempo de maturação (Figura 11), não foram observadas diferenças para as raças estudadas (P>0,05).

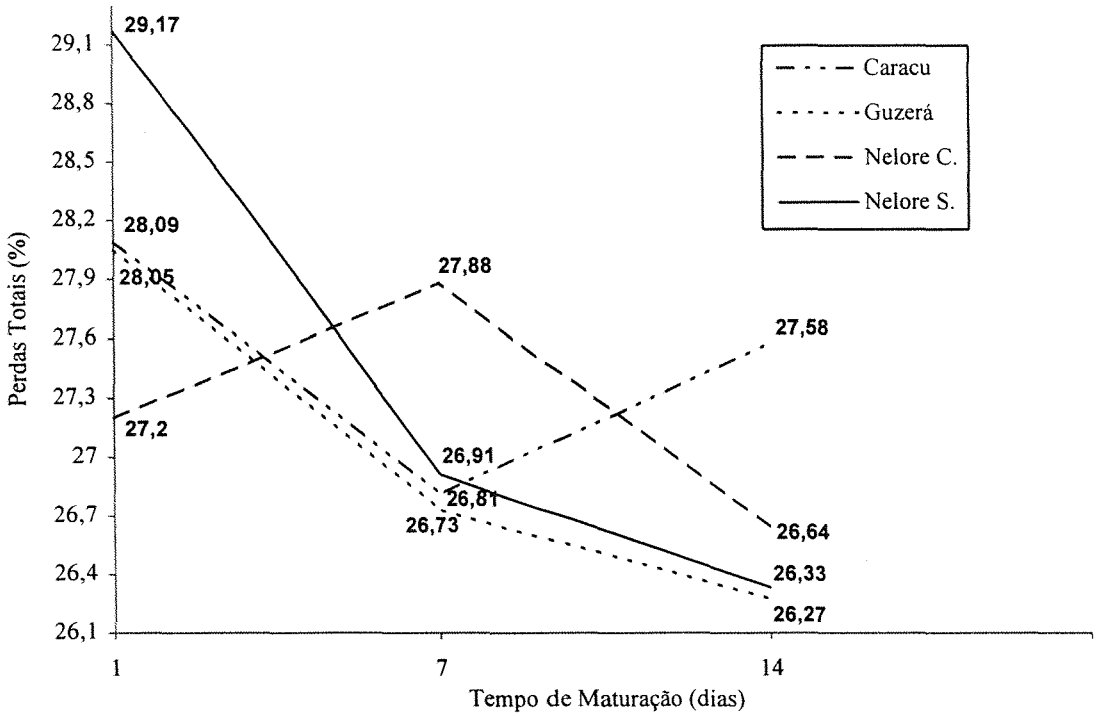

Figura 11. Efeito da interação raça X tempo de maturação sobre as Perdas Totais (%).

Para a interação raça*concentração de cloreto de cálcio (Tabela 11), não foram observadas diferenças (P>0,05) para os efeitos da concentração de cloreto de cálcio dentro de raça, nem para o efeito da raça dentro da concentração de cloreto de cálcio (Figura 12).

Na Tabela 12, observamos diferenças para a interação concentração de cloreto de cálcio*tempo de maturação, onde para o efeito do tempo de maturação dentro da concentração observa-se que entre a não injeção de cloreto de cálcio (0 mM) e 300 mM não houve diferenças entre os tempos de maturação estudados. Entretanto, para a concentração 200 mM quanto maior foi o período de maturação, menores foram as PT (Figura 13). Para o efeito da

concentração de cloreto de cálcio dentro do tempo de maturação não foram encontradas diferenças estatísticas para esta interação (P>0,05).

Independente do corte cárneo estudado, Morgan et al. (1991) e Wheeler et al. (1992) não encontraram diferenças entre as perdas por cozimento ou o efeito dos tratamentos empregados.

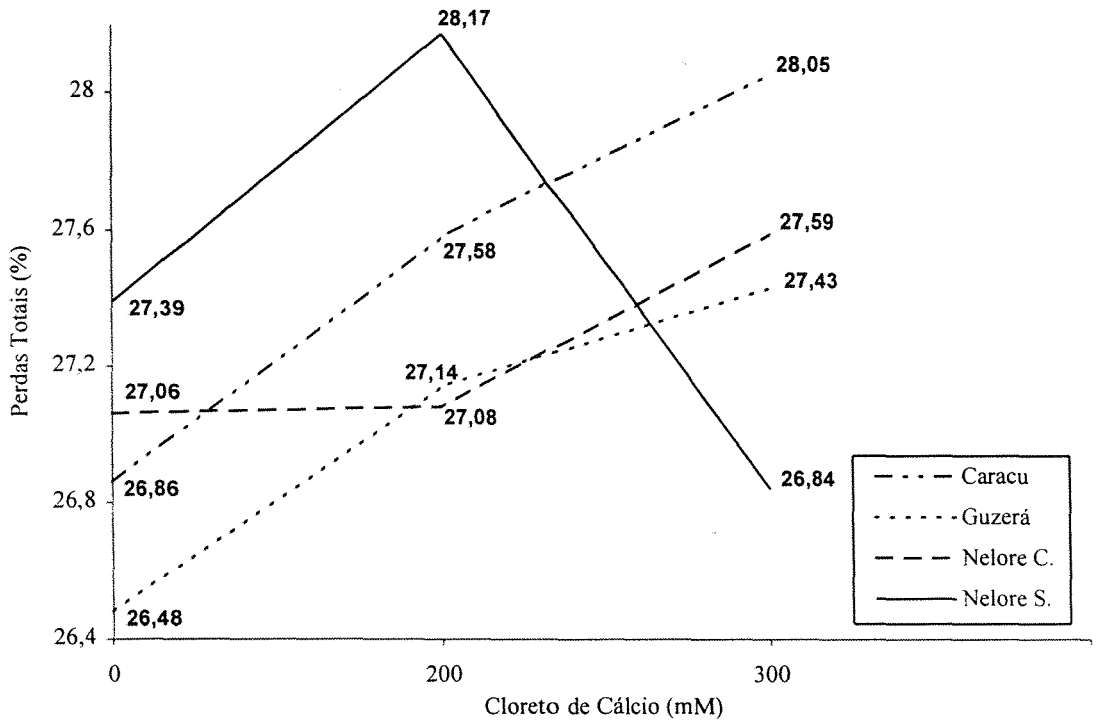

Figura 12. Efeito da interação raça X concentração de cloreto de cálcio sobre as Perdas Totais (%).

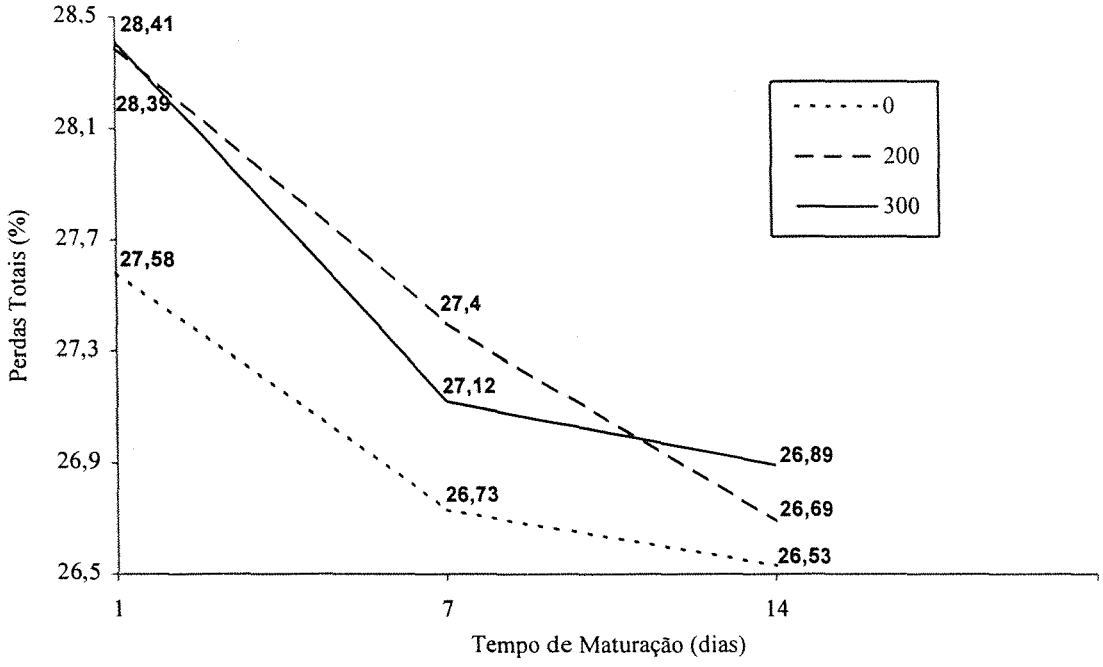

Figura 13. Efeito da interação concentração de cloreto de cálcio X tempo de maturação sobre as Perdas Totais (%).

5. Conclusões

Com os resultados anteriormente mostrados, e nas condições deste experimento com animais novos cuja carne já apresentava uma maciez razoável, podemos concluir que:

5.1. Força de Cisalhamento

- Os animais zebuínos não apresentaram força de cisalhamento diferente entre si, mas apresentram maior força de cisalhamento quando comparados com animais taurinos. Animais Caracu apresentaram menores valores de força de cisalhamento, seguidos pelos animais Nelore Controle e Nelore Seleção, enquanto que os animais Guzerá apresentaram maiores valores, evidenciando assim a influência do sangue de animais *Bos indicus* e *Bos taurus* sobre a maciez da carne;
- Quanto maior o tempo de maturação menor foi a força de cisalhamento, sendo que 7 dias de maturação foi o período suficiente para se obter carne macia e com menor variação na maciez em carne injetada com cloreto de cálcio pós-rigor. Entretanto, 1 dia de maturação também resultou em redução da força de cisalhamento;
- Quanto maior foi a concentração de cloreto de cálcio injetada, menor a força de cisalhamento, mas a concentração de 200 mM de cloreto de cálcio resultou em uma redução de 20% na força de cisalhamento e a de 300 MM em 24%, acrescentando, portanto, pouco em relação à primeira. Observa-se que o cloreto de cálcio reduz significantemente a força de cisalhamento provavelmente pela ativação da m-calpaína, que em condições normais de pós-morte não é totalmente ativada.

5.2. Perdas por Evaporação

- As perdas por evaporação não foram influenciadas pelas raças estudadas;
- Quanto maior o tempo de maturação empregado, menores foram as perdas por evaporação;
- E quanto maior foi a concentração de cloreto de cálcio injetada, maiores foram as perdas por evaporação.

5.3. Perdas por Gotejamento

- As perdas por gotejamento não foram influenciadas pelas raças;
- A maturação por 7 dias reduziu as perdas por gotejamento, enquanto que para 1 ou 14 dias as perdas por gotejamento foram iguais e maiores do que aos 7 dias de maturação;
- A concentração de cloreto de cálcio não influenciou as perdas por gotejamento.

5.4. Perdas Totais

- As perdas totais não foram influenciadas pelas raças e pela concentração de cloreto de cálcio;
- O tempo de maturação influenciou positivamente as perdas totais onde a maturação por 7 dias reduziu as perdas totais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FNP Consultoria & Comércio. **Anuário estatístico da produção animal**. São Paulo: Argos, 1996. 312p.

ALARCÓN-ROJO, A.D.; DRANSFIELD, E. Alteration of post-mortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. **Meat Science**, v. 41, n. 2, p. 163-178, Feb. 1995.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Guidelines for cookery and sensory evaluation of meat**. Chicago, 1978. 24 p.

BANDMAN, E. Changes in myofibrillar and cytoskeletal proteins in postmortem muscle. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 45, p. 47-50, 1992.

BOLEMAN, S.J.; BOLEMAN, S.L.; BIDNER, T.D.; McMILLIN, K.W.; MONLEZUN, C.J. Effects of postmortem time of calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking, and total loss. **Meat Science**, v. 39, n.1, p. 35-41, Jan. 1995.

BOLES, J.A.; SHAND, P.J. Effect of calcium injection on the color, retail storage life and sensory properties of beef top round. **Reciprocal Meat Conference Proceedings of Nebraska**, v. 46, p. 71, 1993.

CANHOS, D.A.L.; DIAS, E.L. **Tecnologia de carne bovina e produtos derivados**. Piracicaba: FEALQ, 1983. 440p.

COTTIN, P.; POUSSARD, S.; DESMAZES, J.P. Free calcium and calpain I activity. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 1079, n. 20, p. 139-145, 1991.

CRAWFORD, C.; WILLIS, A.C.; GAGNON, J. The effects of autolysism on the structure of chicken Calpain II. **Biochemistry Journal**, v. 248, n. 2, p. 579-588, Feb. 1987.

CROSS, H.R. Effects of electrical stimulation on meat tissue and muscle properties - a review. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 2, p. 509-514, Feb. 1979.

CROUSE, J.D.; SEIDEMAN, S.C.; CROSS, H.R. The effects of carcass electrical stimulation and cooler temperature on the quality and palatability of beef and steer beef. **Journal of Animal Science**, v. 56, n. 1, p.81-90, Jan. 1983.

CROUSE, J.D.; SEIDEMAN, S.C.; CUNDIFF, L.V. The effect of carcass electrical stimulation on meat obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Food Quality**, v. 10, n. 6, p. 407-416, Jun. 1987.

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V. Studies in meat tenderness. 6. The nature of myofibrillar proteins extraced from meat during aging. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 343-347, 1968.

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 69-74, 1969.

DAYTON, W.R.; GOLL, D.E.; ZEECE, M.G.; ROBSON, R.M.; RUVILLE, W.J. A Ca+2-acticated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. **Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 2150-2158, Oct. 1976a.

DAYTON, W.R.; REVILLE, W.J.; GOLL, D.E.; STROMER, M.H. A Ca+2-acticated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of purified enzyme. **Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 2159-2167, Oct. 1976b.

DEMARTINO, G.N.; BLUMENTHAL, D.K. Identification and partial purification of a factor that stimulates calcium-dependent proteases. **Biochemistry**, v. 21, n. 18, p. 4297-4303, 1982.

DILES, J.J.B.; MILLER, M.F.; OWEN, B.L. Calcium chloride concentration, injection time, and aging period effects on tenderness, sensory, and retail color attributes of loin steaks from mature cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 8, p. 2017-2021, Aug.1994.

DYER, S.A.; ROGERS, R.W.; ELLIS, D. Effects of calcium chloride in a low pH marinade on sensory characteristics and microbial growth on beef steaks. **Journal of Animal Science**, v.73, (suppl. 1), p. 11, Dec. 1995.

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization. - III: Role of Calpain in conditioning. **Meat Science**, v. 31, n. 1, p. 85-94, Jan. 1992.

DUCASTAING, A.; VALIN, C.; SCHOLLMEYER, J.; CROSS, R. Effects of electrical stimulation on post-mortem changes in the activities of two Ca dependent neutral proteinases and their inhibitor in beef muscle. **Meat Science**, v. 15, n. 4, p. 193-202, Apr. 1985.

EDMUNDS, T.; NAGAINIS, P.A.; SATHE, S.K. Comparison of the autolyzed and unautolized forms of μ- and m-Calpain from bovine skeletal muscle. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 1077, n. 2, p. 197-208, Feb. 1991.

EILERS, J.D.; MARTIN, A.M.; MORGAN, J.B.; MILLER, R.K.; MENDEZ, F.M.; HALE, D.S.; ACUFF, G.R.; SAVELL, J.W. Evaluation of calcium chloride and latic acid injection on chemical, microbiological and descriptive attributes of mature cow beef. **Journal of Animal Science**, v. 70, (suppl. 1), p. 15, Dec. 1992.

EILERS, J.D.; TATUM, J.D.; MORGAN, J.B.; SMITH, G.C. Modification of early-postmortem muscle pH and use of postmortem aging to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p. 790-798, Apr. 1996.

ETHERINGTON, D.J.; TAYLOR, M.A.; DRANSFIELD, E. Conditioning of meat from different species. Relationship between tenderizing and the levels of Cathepsin B, Cathepsin L, Calpain I, Calpain II e B-glucoronidase. **Meat Science**, v. 20, n. 1, p. 1-18, Jan. 1987.

FELÍCIO, P.E. **A carcaça Nelore para o desossador**. In: Seminário Manah " O Nelore para Carne", 5., Fazenda Mundo Novo, 1995. Anais. Brotas: Fazenda Mundo Novo, 1995. p 18-34.

FORREST, J.C.; ABERLE, E.D.; HEDRICK, H.B.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A **Fundamentos de ciencia de la carne**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1979. 364p.

FORSBERG, N.E.; ILIAN, M.A.; ALI-BAR, A.; CHEEKE, P.R.; WEHR, N.B. Effects of cimaterol on rabbit growth and myofibrillar protein degradation and on calcium-dependent proteinase and calpastatin activities in skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 12, p. 3313-3321, Dec. 1989.

GOLL, D.E. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 44, p. 25-33, 1991.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; CHRISTIANSEN, J.A. Role of the Calpain system in muscle growth. **Biochemie**, v. 74, n. 3, p. 225-237, Mar. 1992.

GOPALAKRISHNA, R.; BARSKY, S.H. Quantitation of tissue Calpain activity after isolation by hydrophobic chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 148, n. 2, p. 413-423, Feb. 1985.

HOOVER, L.C.; COOK, K.D.; MILLER, M.F.; HUFFMAN, K.L.; WU, C.K.; LANSDELL, J.L.; RAMSEY, C.B. Restaurant consumer acceptance of beef loin strip steaks tenderized with calcium chloride. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 12, p. 3633-363, Dec. 1995.

HUFF, E.J. BEEKMAN, D.D.; PARRISH Jr., F.C.; ROBSON, R.M. Postmortem aging and injection treatments to enhance beef tenderness. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 46, p. 67, 1993.

JUDGE, M.D.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C. **Principles of meat science**. 2ed. Dubuque: Kendal/Hunt, 1989. 351p.

KARLSSON, J.O.; GUSTAVSSON, S.; HALL, C.; NILSSON, E. A simple one-step procedure for the separation of Calpain I, Calpain II and Calpastatin. **Biochemical Journal**, v. 231, n. 1, p. 201-204, Jan. 1985.

KENDALL, T.L.; KOOHMARAIE, M.; ARBONA, S.E.; YOUNG, L.L. Effect of pH and ionic strength on bovine m-Calpain and Calpastatin activity. **Journal of Animal Science**, v. 71, n.1, p. 96-104, Jan. 1993.

KERTH, C.R.; MILLER, M.F.; RAMSEY, C.B. Improvement of beef tenderness and quality traits with calcium chloride injection in beef loins 48 hours postmortem. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 3, p. 750-756, Mar. 1995.

KOCH, R.M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D. Characterization of biological types of cattle (Cycle III). III. Carcass composition, quality and palatability. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 35-45, Jan. 1982.

KOOHMARAIE, M.; SCHOLLMEYER, J.E.; DUTSON, T.R. Effect of low-calcium-requiring calcium-activated factor on myofibrilis under varying pH and temperature conditions. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 28-32, Jan. 1986.

KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S.C. Effect of post-mortem storage on Ca+2-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. **Meat Science**, v. 19, n. 1, p. 187-196, Jan. 1987.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous protease in meat tenderness. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 41, p. 89-100, 1988a.

KOOHMARAIE, M.; BABIKER, A.S.; SCHOROEDER, A.L.; MERKEL, R.A.; DUTSON, T.R. Aceeleration of postmortem tenderization process of ovine carcass through activation of Ca^{+2}-dependent proteases. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 6, p. 1638-1641, Jun. 1988b.

KOOHMARAIE, M. CROUSE, J.D.; MERSMANN, H.J. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium chloride: effect of concentration and ionic strength. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 4, p. 934-942, Apr. 1989.

KOOHMARAIE, M. Quantification of Ca+2-dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 659-665, Mar. 1990a.

KOOHMARAIE, M. Inhibition of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of zinc. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 5, p. 1476-1483, May 1990b.

KOOHMARAIE, M.; WHIPPLE, G.; CROUSE, J.D. Acceleration of postmortem tenderization in lamb and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium chloride. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 5, p. 1278-1283, May 1990.

KOOHMARAIE, M. & SHACKELFORD, S.D. Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed β-adrenergic agonist. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 6, p. 2463-2471, Jun. 1991.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca+2-dependent proteases (Calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochemie**, v. 74, n. 3, p. 239-245, Mar. 1992a.

KOOHMARAIE, M. Effects of ph, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle -Calpain. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 10, p. 3071-3080, Oct. 1992b.

KOOHAMARIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 45, p. 63-74, 1992c.

KOOHMARAIE, M. WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D. Calcium chloride injection/infusion to ensure meat tenderness. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 46, p. 68, 1993.

KOOHAMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, n. 1/2, p. 93-104, Jan./Feb. 1994.

KOTULA, A.W. & LUSBY, W.R. Mineral composition of muscles of 1-to 6- year old steers. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 544-548, Mar. 1982.

LANSDELL, J.L.; MILLER, M.F.; WHEELER, T.L. KOOHMARAIE, M.; RAMSEY, C.B. Postmortem injection of calcium chloride effects of beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 6, p. 1735-1740, Jun. 1995.

MARCHELLO, M.J.; MILNE, D.B.; SLANGER, W.D. Selected macro and micro minerals in ground beef and longissimus muscle. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 105-106, Jan. 1984.

MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATORE, B. The Calpain-Calpastatin system in mammalian cells: Properties and possible functions. **Biochemie**, v. 74, n. 3, p. 217-223, Mar. 1992.

McCLELLAND, P.; LASH, J.A.; HATHAWAY, D.R. Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular Calpain II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 29, p. 17428-17431, 1989.

McDOWELL, L.R.; CONRAD, J.H.; HEMBRY, F.G. Minerals for grazing ruminats in tropical regions. 2.ed. Gainesville, UFL, **Bulletin**. p. 77. 1993.

McFARLANE, B.J.; UNRUH, J.A. Effects of blast chilling and postmortem calcium chloride injection on tenderness of pork longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 8, p. 1942-1845, Aug. 1996.

MILLER, M.F.; DAVIS, G.W.; SEIDEMAN, S.C.; RAMSEY, C.B. Effects of chloride salts on appearance, palatability, and storage traits of flaked and formed beef bullock restructured steaks. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1424-1436, Jun. 1986.

MILLER, M.F.; HUFFMAN, K.L.; GILBERT, S.Y.; HAMMAN, L.L.; RAMSEY, C.B. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2308-2314, Aug. 1995.

MORGAN, J.B.; MILLER, R.K.; MENDES, F.M.; HOLE, D.S.; SAVELL, J.W. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 11, p. 4469-4476, Nov. 1991.

MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J.W.; CROUSE, J.D. Meat tenderness and the Calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **Jounal of Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1471-1476, Jun. 1993.

MURACHI, T. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors: Calpain and Calpastatin. **Biochemical Society Symposium**, v. 49, p. 149-167, 1985.

NAKAMURA, R. Factors associated with postmortem increase of extractable Ca in chicken breast muscle. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 7, p. 1113-1114, Jul. 1973.

NOUR, A.Y.M. & THONNEY, M.L. Minerals of carcass soft tissue and bone of serially slaughtered cattle as affected by biological type and management. **Journal of Agricultural Science**, v. 111, n. 3, p. 41-49, Mar. 1988.

OUALI, A.; TALMANT, A. Calpains and Calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. **Meat Science**, v. 28, p. 331-348, 1990.

PARKES, C.; KEMBHAVI, A.A.; BARRETT, A.J. Calpain inhibition by peptide epoxides. **Biochemical Journal**, v. 230, n. 2, p. 509-516, Feb. 1985.

SAVELL, J.W.; SMITH, G.C.; CARPENTER, Z.L. Effect of electrical stimulation on quality and palatability of light-weight beef carcass. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 1221-1228, May 1978.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, R.E.; ROHRER, G.A.; SAVELL, J.W. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor capastatin activity, intramuscular fat content, warner-bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 4, p. 857-863, Apr. 1994.

SINGH, K.; DOBBIE, P.M.; THOMSON, B.C.; MERCER, G.J.K.; SIMMONS, N.J.; SPECK, P.A Short-term fasting effect on the calpain proteolytic system in different ovine muscles. **Journal of Animal Science**, v. 73, suppl. 1, p. 168, 1995.

ST. ANGELO, A.J.; KOOHMARAIE, M.; CRIPPEN, K.L.; CROUSE, J. Acceleration of tenderization/inhibition of warmed-over flavor by calcium chloride-antioxidant infusion into lamb carcasses. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, p. 359-362, Feb. 1991.

TAKAHASHI, G.; LOCHNER, J.V.; MARSH, B.B. Effects of low-frequency electrical stimulation on beef tenderness. **Meat Science**, v. 11, n. 3, p. 207-225, Mar. 1984.

TAYLOR, M.A.J. & ETHRINGTON, D.J. The solubilization of myofibrillar proteins by calcium ions. **Meat Science**, v. 29,n. 3, p. 211-219, Mar. 1991.

TAYLOR, R.G.; GEESINK, G.H.; THOMPSON, V.F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL, D.E. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 5, p. 1351-1367, May 1991.

THOMSON, B.C.; DOBBIE, P.M.; SINGH, K.; SPECK, P.A Post mortem kinectics of the calpain system in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v. 73, suppl. 1, p. 167, 1995.

UYTTERHAEGEN, L.; CLAEYS, E.; DEMEYER, D. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 5, p. 1209-23, May1994.

VIDALENC, P. COTTIN, P. MERDACI, N.; DUCASTING, A. Stability of two Ca^{+2}- dependent neutral proteinases and their specific inhibitor during post-mortem storage of rabbit skeletal muscle. **Journal of Sciene and Food Agricultural**, v. 34, p. 1241-1247, 1983.

WANG, J.H.; MA, W.C.; SU, J.C.; CHEN, C.S.; JIANG, S.T. Comparision of the properties of m-calpain from tilapia and grass shrimp muscles. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1379-1384, Sep. 1993.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. A modified procedure for simultaneous extraction and subsequent assay of calcium-dependent and lysossomal protease systems from a skeletal muscle biopsy. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 4, p. 1559-1565, Apr. 1991.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J.D. Effects of calcium chloride injection and hot boning on the tenderness of round muscles. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 12, p. 4871-4875, Dec. 1991.

WHEELER, T.L.; CROUSE, J.D.; KOOHMARAIE, M. The effect of postmortem time injection and freezing on the effectiveness of calcium chloride for improving beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3451-3457, Nov. 1992.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; LANDESLL, J.L.; SIRAGUSA, G.R.; MILLER, M.F. Effects of postmortem injection time, injection level, and concentration of calcium chloride on beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 11, p. 2965-2974, Nov. 1993a.

WHEELER, T.L.; MILLER, M.F.; DALRYMPLE, R.H. Calcium injection. **Reciprocal Conference Proceedings of Nebraska**, v. 46, p. 81-83, 1993b.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J.D. A calcium chloride injection process to produce guaranteed tender and calcium fortified meat. Beef Research - Progress Report nº 4. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **ARS 71**, 187p., 1993c.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. Effect of vitamim C concentration and co-injection with calcium chloride on beef display color. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 8, p. 1846-1853, Aug. 1996.

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

WHIPPLE, G. & KOOHMARAIE, M. Freezing and calcium chloride marination effects on beef tenderness and calpastatin activity. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 10, p. 3081-3085, Oct. 1992.

WHIPPLE, G. & KOOHMARAIE, M. Calcium chloride marination effects on beef steak tenderness and calpain proteolitic activity. **Meat Science**, v. 33, n. 2, p. 265-275, Feb. 1993.

WHIPPLE, G. & KOOHMARAIE, M. Improving beef tenderness with calcium marination. Beef Research - Progress Report nº 4. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **ARS 71**, 187 p., 1993.

WULF, D.M.; MORGAN, J.B.; TATUM, J.D.; SMITH, G.C. Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from Limousin steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 3, p. 569-576, Mar. 1996.

ZARKADAS, C.G.; MARSHALL, W.D.; KHALILI, A.D.; NGUYEN, Q.; ZARKADAS, G.C.; KARATZAS, C.N.; KHANIZADEH, S. Mineral composition of selected bovine, porcine and avian muscles, and meat products. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 3, p. 520-525, Mar. 1987.