

Papel do sistema calpaína-calpastatina sobre a proteólise muscular e sua relação com a maciez da carne em bovinos de corte (Calpain-calpastatin role on muscle proteolysis and its relationship with beef tenderness)

Lage, Josiane Fonseca: Mestranda em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, UFV. josilage@gmail.com | **Oliveira, Ivanna Moraes:** Doutoranda em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, UFV, bolsista da Capes. imoraesdeoliveira@yahoo.com.br | **Paulino, Pedro Veiga Rodrigues:** Professor Adjunto II, Universidade Federal de Viçosa, UFV. pveiga@ufv.br | **Flávio Ribeiro**

Resumo

O comércio varejista tem exigido dos frigoríficos o fornecimento de carnes e carcaças que apresentem certas características qualitativas, sendo a maciez uma das características organolépticas mais apreciadas pelo consumidor. Sugere-se que há vários fatores e mecanismos de natureza muito variada que atuam no amaciamento da carne, dentre eles: fatores físico-químicos, enzimas sem atividade peptidásica e peptidases. Embora o mecanismo exato seja pouco esclarecido, é aceito que a hidrólise de proteínas miofibrilares por proteínas endógenas é o principal mecanismo responsável pelo aumento da maciez *post-mortem*. Durante o período *post-mortem*, o processo de amaciamento da carne depende da espécie animal, do tipo de fibra muscular, de várias tecnologias aplicadas nos músculos *post-mortem*, entre outros aspectos. O amaciamento ocorre devido à alteração de componentes estruturais do músculo, devido à atuação de enzimas durante e após o *rigor mortis*. As enzimas calpaína e calpastatina são conhecidas como as grandes responsáveis pelo mecanismo de amaciamento da carne, sendo dependentes de íons cálcio para sua ativação. Existem duas isoformas de calpaínas, denominadas micro-calpaína e mili-calpaína, que são as responsáveis pela proteólise muscular. A enzima calpastatina regula o processo de amaciamento da carne, pois atua inibindo a atividade da calpaína. O amaciamento da carne é um processo que merece grande atenção, pois hoje tem crescido muito a exigência dos consumidores por produtos de qualidade. Portanto, objetivou-se nesta revisão entender todo esse processo bioquímico no qual estão envolvidos a ativação de enzimas proteolíticas e a degradação de proteínas miofibrilares.

Palavras-chave: enzimas proteolíticas | maciez | músculo | qualidade de carne

Abstract

Retailers have been requiring from beef packers the supply of beef carcass that have certain quality attributes, with tenderness being one of the most desired characteristics of consumers. It has been proposed that many factors and mechanisms of different origin are responsible for post-mortem beef tenderization, which includes physical and chemical factors, enzymes without peptidase activity and peptidases. Although the exact mechanism of action still not completely understood, it has been proposed that myofibrillar protein degradation by endogenous proteins would be the main mechanism involved with post-mortem beef tenderization. During the post-mortem period the tenderization process depends on some factors like animal species, muscle fiber type, post-mortem management, and other factors. Tenderization occurs due to changes on some structural components of the muscle that take place in response to the action of enzymes during and after rigor mortis. The calcium dependent proteases (calpains) and calpastatin are known to be the main factor responsible for beef tenderization. There are two calpain isoforms, called μ -calpain and m-calpain, which are responsible for post-mortem muscle degradation. The enzyme calpastatin also regulates the tenderization by inhibiting the activity of the calpains. Beef tenderization is a process that deserves a lot of attention, especially since consumer demand for products with higher quality have greatly increased. The objective of this review is to understand the biochemical process of activation of the proteolytic enzymes and degradation of myofibrillar proteins.

Keywords: meat quality | muscle | proteolytic enzymes | tenderness

Introducción

As exigências cada vez maiores dos consumidores por produtos de qualidade estão mobilizando os produtores e a indústria da carne a adequarem seus sistemas de produção com objetivo de oferecer aos seus clientes um produto com essa característica.

Nos últimos anos devido ao maior nível de exigência dos consumidores internos estimulados pela propaganda de carne de qualidade fez com que o comércio varejista passasse a exigir dos frigoríficos o fornecimento de carnes e carcaças que apresentassem certas características qualitativas (maciez, suculência e cor). Quando avaliados parâmetros que envolvem a qualidade de carne, a maciez é o fator de maior variabilidade, sendo o atributo mais desejável pelo consumidor.

A maciez é uma característica determinante da qualidade da carne e provavelmente uma das mais importantes características organolépticas observadas pelo consumidor. Há uma aparente mudança na comunidade científica e na indústria de carne, onde tem se buscado encontrar produtos padronizados e com garantia de maciez, desde que estas características sejam exatamente o que os consumidores desejam no produto carne (Koohmaraie, 1995).

O fator primário na determinação da maciez da carne está na idade de abate do animal. Animais abatidos jovens terão naturalmente uma carne mais macia em relação á animais abatidos mais velhos. Fatores como raça, dieta/tempo da dieta,

Papel do sistema calpaína-calpastatina sobre a proteólise muscular e sua relação com a maciez da carne em bovinos de corte

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120909.pdf>

atividade física, manejo anterior, durante o abate e após a morte, entre outros irão interferir de forma direta ou indireta nas condições fisiológicas dos animais, e esta condição irá influenciar nos mecanismos que atuarão no músculo para a sua transformação em carne. Portanto, objetivou-se estudar os mecanismos de transformação do músculo em carne, diante da atuação das enzimas proteolíticas.

Fatores responsáveis pela maciez

Os fatores e os mecanismos responsáveis pelas modificações que ocorrem durante a maturação da carne são ainda desconhecidos e por isso, geram muita controvérsia (Koochmaraie e Geesink, 2006). Têm sido sugeridos fatores e mecanismos de natureza muito variada para o processo de maturação da carne: fatores físico-químicos (pH, pressão osmótica, íons cálcio e processos oxidativos), enzimas sem atividade peptidásica (enzimas glicolíticas, ATPases e glicosidases) e peptidases (catepsinas, calpaínas, complexo endopeptidásico multicatalítico e outras endopeptidases musculares (Koochmaraie, 1996).

O amaciamento depende da alteração de componentes estruturais do músculo e associação de proteínas durante e após o *rigor mortis*. Os valores absolutos obtidos na máxima contração (*rigor*) são muito importantes, pois com eles serão determinada a taxa de decréscimo dessa contração. As catepsinas lisossomais foram responsáveis pelo amaciamento até a descoberta em 1970 de um novo sistema proteolítico. Este sistema foi referido como proteínase dependente de cálcio ou calpaína, devido à necessidade de utilização de cálcio na sua ativação, (Bush et al. 1972).

A fibra muscular

A unidade estrutural essencial de todos os músculos é a fibra. As fibras são células longas, estreitas, multinucleadas, que podem estender-se de uma extremidade para a outra do músculo, alcançando aproximadamente 10 a 100 µm de diâmetro (Walls, 1960). Os diâmetros das fibras musculares diferem de um músculo para o outro e entre espécies, raças e sexos e tendem a aumentar com idade, plano de nutrição, atividade física e pela administração de hormônios (Vestergaard et al. 2000).

As miofibrilas são estruturas cilíndricas, compridas e delgadas, formadas por um agrupamento ordenado de filamentos grossos e finos, paralelos entre si, cuja distribuição ao longo da miofibrila é responsável pela formação de bandas. É composta pela banda A e banda I, sendo esta dividida ao meio por uma linha transversal escura chamada linha ou disco Z. A unidade estrutural repetitiva da miofibrila onde os eventos morfológicos do ciclo de contração e relaxamento do músculo ocorrem é o sarcômero, que é definido como o segmento entre duas linhas Z sucessivas (Hopkins e Thompson, 2002).

O estabelecimento destas bandas e regiões é consequência do arranjo dos filamentos grossos (miosina) e finos (actina) no interior da miofibrila. As proteínas miosina e actina constituem de 75 a 80% das proteínas miofibrilares, e a porção restante, constituída pelas proteínas reguladoras da função muscular, que atuam direta ou indiretamente no complexo adenosina trifosfato actina-miosina. Durante a contração muscular as cabeças de miosina formam pontes com os filamentos de

actina, originando um complexo químico conhecido como actomiosina, esse complexo proporciona um estado de rigidez e de relativa inextensibilidade muscular. A actomiosina constitui a maior parte das proteínas miofibrilares presentes no músculo após o *rigor mortis*, (Goll et al. 1991).

O conjunto de túbulos T se estende por todo o sarcoplasma e forma uma rede ao redor de cada miofibrila. As membranas reticulares do retículo sarcoplasmático são os locais de armazenamento do cálcio, nas fibras em repouso. A habilidade de contrair e relaxar, característica do músculo vivo, é perdida quando o músculo é convertido em carne. Entretanto, alguns aspectos do mecanismo de contração e relaxamento no músculo vivo estão diretamente relacionados ao encurtamento das fibras e perda da maciez que ocorrem na carne *post-mortem*, (Robson et al. 1997).

Rigor Mortis

O *rigor* se instala quando não existe mais ATP suficiente para reverter o processo de contração muscular, formando um complexo irreversível, que leva ao enrijecimento muscular. O encurtamento do *rigor* difere da contração normal porque se formam mais pontes cruzadas de actomiosina. Nesse caso praticamente todos os sítios de ligação se unem promovendo um significativo encurtamento do sarcômero, em condições normais apenas 20% dos sítios possíveis se ligam. Do ponto de vista fisiológico, é considerado carne o músculo que passou pelo processo de *rigor* (Ouali et al. 1992).

Mecanismos de amaciamento da carne

Os três fatores que determinam o amaciamento da carne são: dureza intrínseca da carne, o enrijecimento e o amaciamento. Enquanto o enrijecimento e amaciamento ocorrem durante o período *post mortem*, a dureza intrínseca da carne, já existe no momento do abate e não muda durante o período *post-mortem* (Koochmaraie e Geesink, 2006). A dureza intrínseca da carne é definida como a resistência ao cisalhamento de um músculo não encurtado e a variação é devido ao tecido conectivo que é um componente do músculo (Marsh e Leet, 1966).

Enquanto a fase de enrijecimento é semelhante em todas as carcaças, considerando condições similares de processamento, a fase de amaciamento é altamente variável. A fase de enrijecimento é causada pelo encurtamento do sarcômero durante o desenvolvimento do *rigor mortis* (Koochmaraie, 1996). Trabalhos mostram que há uma relação negativa entre comprimento de sarcômero e dureza da carne, onde sarcômeros menores 2 μm resultam em carne mais dura (Wheeler, Shackelford e Koochmaraie, 2000).

Durante o amaciamento, a proteólise afeta todas as proteínas musculares, incluindo tecido conectivo. Embora existam boas evidências que proteínas miofibrilares específicas são degradadas durante o imediato período *post mortem* (Bandman e Zdanis, 1988), a proporção total de proteínas degradadas é considerada pequena, no entanto há uma considerável redução na dureza da carne (Davey e Gilbert, 1969).

Usualmente, a maturação da carne é feita em baixas temperaturas e alguns estudos mostraram que o ciclo *freeze-thaw-refrigeration* pode prevenir a alta taxa de encurtamento do sarcômero, levando a uma maior maciez da carne. A proteólise contribui para alterações na maciez através da degradação de proteínas do músculo, como observado em carcaças mantidas em baixas temperaturas. Entretanto, fatores físicos como o grau de encurtamento do músculo também contribui para a maciez final da carne. Baixas temperaturas também diminuem o processo glicolítico pela diminuição da atividade enzimática, ocorrendo também queda no pH da carne (Bowling et al. 1987).

O baixo pH pode causar inibição da atividade de enzimas proteolíticas, desnaturação de proteínas miofibrilares e encurtamento excessivo do sarcômero, que torna a carne mais dura com menor capacidade de retenção de água (Khan e Cohen, 1977).

O cálcio é necessário para a contração muscular, além de atuar como ativador de enzimas proteolíticas. A concentração do íon cálcio no sarcoplasma aumenta para 0,2 mM durante o amaciamento, devido a menor habilidade do retículo sarcoplasmático e mitocôndria a acumular íons cálcio (Veiseth et al. 2001).

O amaciamento da carne é provavelmente o resultado de uma série de processos interativos, incluindo: i) alta susceptibilidade das miofibrilas à proteólise; ii) provável sinergismo de ação de calpaínas e catepsinas; iii) grande aumento na pressão osmótica, que possivelmente causam liberação de proteínas contráteis das miofibrilas (Etherington, 1984).

Degradação de proteínas miofibrilares

A degradação de proteínas miofibrilares causa um enfraquecimento da estrutura muscular, levando ao amaciamento da carne e são resultantes da ativação de um sistema proteolítico enzimático. Esta degradação inclui troponina-I, troponina-T, desmina, vinculina, meta-vinculina, distrofina, nebulina e titina (Koochmaraie, 1996). As três maiores estruturas do citoesqueleto são degradadas quando a carne é amaciada: a junção da linha Z pelos filamentos intermediários, a junção da linha Z e M ao sarcolema pelas proteínas costâmericas e os filamentos elásticos da proteína titina (Taylor et al. 1995).

Titina/Conectina e Nebulina

Titina ou conectina é uma grande proteína (Labeit e Kolmerer, 1995) crucial para a organização do sarcômero, que contém ao longo de seu comprimento, sítios de ligações para outras proteínas do sarcômero, e sua região terminal carboxil tem sido reportada por se ligar a miosina (Maruyama, 1997). A região PEVK da proteína na banda I promove a elasticidade no sarcômero (Labeit e Kolmerer, 1995). Outra grande proteína, a nebulina está associada com actina, estando localizada na banda I do sarcômero (Hopkins e Taylor, 2004).

Tem sido estudado (Taylor, 1995) que esta proteína está envolvida na regulação da interação entre actina e miosina. Estudos envolvendo estas duas proteínas mostram

que a titina é degradada no período *post mortem* em no mínimo dois fragmentos (Hopkins e Taylor, 2004).

A degradação de ambas, titina e nebulina é uma razão para o aumento na fragilidade de miofibrilas na região da banda I (Taylor et al. 1995) e está ligada a uma maior diminuição na dureza que ocorre entre 24 e 72 horas *post mortem* (Wheeler e Koochmaraie, 1994).

Miosina, actina e α -actinina

A clivagem proteolítica da miosina tem sido reportada em músculos mantidos em temperaturas elevadas (Yates et al. 1983), mas não em músculos mantidos a 4°C ou em amostras mantidas em pH 7 (Bandman e Zdanis, 1988). A actina e α -actinina tem sido estudadas por serem mais resistentes a degradação em condições normais de resfriamento, além da calpaína não degradá-las (Goll et al. 1991). De acordo com Koochmaraie (1996) a degradação da miosina, actina ou α -actinina não contribuem para o amaciamento.

Troponina e tropomiosina

A degradação de troponina-T tem sido associada com a diminuição na dureza da carne (Huff-Lonergan et al. 1995). A tropomiosina e a troponina representam, juntas, entre 16 e 20% das proteínas miofibrilares. A tropomiosina é responsável pela sensibilidade do sistema actomiosina ao cálcio e a troponina é receptora deste íon. Ambas estão associadas à actina (Danieli-Betto et al. 1990).

μ - Calpaína e m - Calpaína

Todas as células de mamíferos contêm um sistema proteolítico dependente de cálcio, composto pela protease endógena calpaína e seu inibidor, a calpastatina. Existem duas isoformas de calpaínas mais conhecidas, denominadas micro-calpaína e mili-calpaína, sendo a definição dada pela quantidade de cálcio necessária para sua ativação, podendo as duas estar presentes em uma mesma célula (Goll et al. 1991).

As calpaínas receberam mais atenção que as catepsinas devido habilidade de modificação da densidade da linha-Z, mesmo quando essa mudança não se correlaciona com a maciez (Koochmaraie, 1995). O sistema calpaínas não tem ação sobre os filamentos de actina e miosina em si, e o sistema está localizado na linha Z (Goll et al. 1992).

A razão maior é o conhecimento limitado sobre estas duas enzimas e sua regulação *in situ*, além de suas funções biológicas exatas. A μ -calpaína se concentra na linha N1 e N2, na região da titina, podendo constituir um reservatório dessa enzima para a célula (Fernandez et al. 2005), sugerindo uma regulação especial entre a liberação de μ -calpaína para sítios de ligação e a existência de um equilíbrio finamente regulado entre a quantidade livre e ligada.

Considera-se que a calpaína está presente no citosol como uma forma inativa e quando há aumento no cálcio livre intracelular ou dentro de uma variação fisiológica

mais a presença de substrato, a proteinase é translocada para a membrana plasmática. Na forma ligada à membrana, a enzima vai realizar um processo autoproteolítico, o qual produz a forma ativa, onde a remoção de um fragmento de ambas subunidades da calpaína diminui a afinidade da calpaína a membrana e libera a forma ativa no citosol. Se a auto-proteólise ocorrer mais adiante, ocorre a inativação da enzima (Geesink et al. 2006).

Calpastatina

A calpastatina é inibidor específico da m e μ - calpaína. A isoforma predominante nos músculos esqueléticos é a μ que possui quatro domínios, capaz de inibir quatro calpaínas. A calpastatina pode impedir a ativação auto-proteolítica, a translocação da membrana, e a expressão da atividade catalítica da calpaína (Lee et al. 1992).

A calpastatina requer cálcio, é um substrato para as calpaínas e pode ser degradada na presença de cálcio (Koochmaraie, 1988). Sua degradação não conduz a perda total de atividade inibitória e até mesmo depois de uma proteólise intensa, alguma atividade ainda permanece. A quantidade de cálcio requerido pelas calpastatinas para formar o complexo calpaína-calpastatina é aproximadamente a mesma requerida pela μ -calpaína. Embora a ação das calpastatinas também seja dependente de cálcio, não existem evidências de que elas se liguem efetivamente a esses íons (Hopkins e Taylor, 2004).

Tem sido demonstrado que a calpastatina é degradada pela calpaína, entretanto a significância fisiológica desta degradação é ainda obscura, embora isto possa ser considerado como uma parte do processo regulatório do sistema proteolítico. (Geesink e Koochmaraie, 1999).

A μ -calpaína não está hábil a produzir a inativação da calpastatina, no entanto a m -calpaína produz um rápido e progressivo desaparecimento da atividade de calpastatina. Pelo exposto, pode-se observar que a proporção entre as atividades das calpastatina e calpaínas determina a velocidade da ativação proteolítica *post mortem*, e conseqüentemente, a velocidade de maturação da carne. Koochmaraie (1994) relatou que, é a atividade das calpastatinas determinada 24 horas após o abate que se relaciona com a maciez da carne. Animais com elevada atividade de calpastatina, usualmente produzem carne menos macias, mesmo após um período de maturação de 14 dias.

Koochmaraie et al. (1987) demonstraram que, durante a estocagem do músculo *L. dorsi* por 14 dias a 0°C, houve um aumento concomitante da fragmentação miofibrilar e diminuição na atividade de μ -calpaína, que depende de baixas concentrações de íons Ca^{++} , enquanto a m -calpaína que depende de concentrações relativamente altas de cálcio, permaneceu com atividade inalterada. Cerca de 50% da mudança total nesses parâmetros, ocorreram durante as primeiras 12 horas, quando a temperatura cai de aproximadamente 37°C para 10°C, indicando que o aumento da maciez durante o condicionamento pode acontecer antes que o pH final seja atingido, especialmente se a temperatura diminuir de forma lenta.

Atuação das enzimas no período *post mortem*

Na tenderização *post mortem*, os requerimentos de cálcio é uma limitação para as calpaínas, pois a degradação de proteínas exige altos níveis de cálcio, acima dos níveis esperados em condições intracelulares, até mesmo depois do rigor (Ducastaing et al. 1985).

A atividade da μ -calpaína decresce significativamente durante o princípio do rigor, em comparação com a atividade da m-calpaína que foi inalterada por 3 dias *post mortem* e em alguns casos se estendeu por até 56 dias *post mortem* (Geesink e Koohmaraie, 1999).

Geesink e Koohmaraie (1999) sugerem que o pH tem pouco efeito na inibição da calpaína pela calpastatina, sobre condições ideais de cálcio e temperatura (*in vitro*). Essa avaliação foi refutada por Geesink et al. (2001), devido aos conhecimentos sobre as concentrações de cálcio e devido ao fato de que as calpaínas têm implicações no turnover de proteínas no músculo vivo, em condições de níveis mais baixos de cálcio livre.

Quando o músculo entra em rigor há um aumento rápido na força iônica do fluido sarcoplasmático que chega em um máximo e atinge um platô (Ouali, 1992). Geesink e Koohmaraie, (1999) indicam que a baixa atividade de μ -calpaína ocorre devido à autólise instável em situações de alta condição iônica. Alguns resultados sugerem que a μ -calpaína é responsável pela proteólise *post mortem*, com uma pequena contribuição da m-calpaína (Geesink e Koohmaraie, 1999).

Já em estudos avaliando a atividade de ambas calpaínas, Camou et al. (2007) observaram que a atividade da μ -calpaína de 48 horas até 144 horas de estocagem *post mortem* foi pequena. Houve rápido decréscimo de atividade após 48 horas (menos de 4% da atividade no momento da morte), sendo a situação similar para a atividade de m-calpaína. Essa atividade foi medida *in vitro*, na temperatura de 22-24 °C e pH 7,5. A atividade *in situ* a 2-4°C e pH 5,8 depois de 24 horas *post-mortem* pode ser substancialmente menor.

O resultado indica que há alguma autólise da μ -calpaína no início das 24 horas *post-mortem*, mas há pequena atividade de μ -calpaína autolisada ou não, depois de 48 horas. A atividade da m-calpaína também diminui durante a estocagem *post mortem*, e somente 10-20% da atividade da m-calpaína permaneceu depois de 144h *post mortem* sob as condições deste estudo. Não existiram evidências no zimograma de que houve alguma autólise da m-calpaína durante as primeiras 144 horas *post mortem*.

Veiseth et al. (2001) em estudos com ovinos, avaliaram a atividade das duas calpaínas, baseados em zimografia, até 360 horas *post mortem*. Eles observaram que a μ -calpaína perdeu sua atividade gradualmente. Já a m-calpaína manteve-se estável durante todo o período, não havendo aparecimento de fragmentos na zimografia de caseína dessa enzima. Mas é bem sabido que podem não ser detectadas mudanças na massa molecular da subunidade maior da m-calpaína. Estes autores concluíram que a concentração de cálcio no músculo *post mortem* é alto bastante para ativar μ -calpaína, e insuficiente para ativar a m-calpaína. E que a

primeira teria papel mais importante na degradação de proteínas miofibrilares. Evidências recentes indicam que a μ - calpaína, e não a m-calpaína, possui um papel importante na fragmentação miofibrilar durante a estocagem refrigerada.

Geesink et al. (2006) em trabalho com ratos “knockout”, avaliaram a atividade da calpaína por zimografia e os resultados mostraram ausência de μ -calpaína e todas as suas formas autolisadas nos músculos dos “knockout”. A m-calpaína esteve ativa em ambos tratamentos. E a perda de atividade de m-calpaína no *post mortem* sugere que a enzima é ativada e perde sua atividade como resultado de autólise, no entanto, este fenômeno não é observado em músculos bovino ou ovino. Nestes músculos, a atividade de m-calpaína é estável a menos que a concentração de cálcio intracelular seja artificialmente elevada através de infusão de cálcio (Veiseth et al. 2001).

Evidências de atuação

1. Incubação de miofibrilas com calpaínas produzem o mesmo padrão proteolítico observado em músculos *post mortem*.
2. Infusão ou injeção de cálcio em músculos promove aceleração da proteólise *post mortem* e tenderização.
3. Diferenças nas taxas de proteólise *post mortem* e tenderização entre *Bos taurus* e *Bos indicus* podem ser explicadas pela variação na atividade de calpastatina.
4. O endurecimento na carne de animais tratados por beta-agonistas pode ser explicado pelo aumento na atividade de calpastatina. A administração desses hormônios leva a hipertrofia muscular e aumento do conteúdo protéico, provavelmente devido mecanismos que envolvem supressão de quebra de proteínas miofibrilares (Reeds et al. 1986).
5. A grande redução na taxa e extensão da proteólise e tenderização *post mortem* em cordeiros callipyge podem ser atribuídas a elevados níveis de calpastatina nesses animais (Taylor e Koohmaraie, 1998).
6. Animais transgênicos com alta expressão de calpastatina possuem uma alta redução da proteólise de proteínas musculares *post mortem*.
7. Há mínima degradação de actina e miosina durante as primeiras 72 horas de estocagem em 2-4°C e no entanto a maior parte do amaciamento ocorre neste período. As calpaínas são as únicas enzimas que não degradam actina e miosina.
8. A alfa-actinina (principal proteína do disco Z) não é degradada nas primeiras 72 horas. As calpaínas são as únicas que degradam o disco Z liberando a alfa-actinina sem degradá-la.

As concentrações de cálcio requeridas para autólise são as mesmas ou ligeiramente maiores que as requeridas para atividade de proteólise. Logo, essas concentrações seriam maiores que as concentrações presentes nas células vivas. Grande parte das enzimas da família das cisteínas proteases são proenzimas, ativadas com a remoção de um polipeptídeo pro - enzimático que bloqueia o acesso ao sítio ativo da enzima (Goll et al. 2003).

A análise da atividade proteolítica é sempre acompanhada de autólise, elevando a possibilidade de que a calpaína não autolisada seria uma proenzima, requerendo autólise para ativação.

Há estudos (Edmunds et al. 1991) que indicam que a autólise afeta a estabilidade das calpaínas, que podem iniciar dissociação de duas subunidades e inativar a enzima. A autólise dessas enzimas tem se mostrado como uma maneira de reduzir as concentrações de cálcio requeridas por ambos os tipos (Edmunds et al. 1991). No entanto esse nível requerido ainda ficaria acima da quantidade existente no músculo vivo (Etherington, 1984).

O mecanismo básico de ativação da calpaína envolve um aumento na sensibilidade da calpaína ao cálcio, sendo este mecanismo acompanhado por um processo auto-proteolítico o qual remove um pequeno fragmento de ambas subunidades 80 e 30 kDa, gerando então uma nova forma da enzima ativa na concentração de cálcio muito próxima a que está presente na célula (Goll et al. 2003). A autólise mais extensa da subunidade maior promove a perda de atividade. E como a autólise na m-calpaína é um processo inter e intramolecular, o resultado da autólise é perda completa de atividade proteolítica, diferente da μ -calpaína que é um processo somente intermuscular (Koochmaraie, 1992).

Condições ótimas de atuação das enzimas proteolíticas

As calpaínas têm atividade máxima *in vitro* em temperatura entre 10 °C e 25 °C e pH neutro, motivo pelo qual também são conhecidas como proteases neutras ativadas por cálcio. A μ -calpaína necessita de uma concentração do íon cálcio de 50-100 μ M e a m-calpaína entre 1-2 mM (Etherington, 1984). Devido à dificuldade em atribuir precisamente as mudanças ocorridas no condicionamento às proteases individuais e seus inibidores *in situ*, modelos do sistema tem sido estudados. Dransfield, Etherington e Taylor (1992) examinaram extratos de músculos bovinos *in vitro* quando estes eram estocados em temperaturas de (0°C a 30°C). Os autores postularam que as baixas concentrações de íons cálcio livre, no período imediatamente *post mortem*, poderiam ser insuficientes para ativar a μ -calpaína, mas que quando o pH caía para 6,1, o concentração de cálcio estaria alta o suficiente para ativar esta enzima (a m-calpaína atuaria de modo semelhante mas em níveis maiores de cálcio. Neste pH, as calpaínas estão ligadas ao seu inibidor, a calpastatina, mas a medida que ocorre redução do pH, de 6,0 para 5,5, estas calpaínas ativadas hidrolisam a calpastatina. O amaciamento é devido, no início, a ação da μ -calpaína, subseqüentemente, a m-calpaína é a responsável, e o amaciamento cessa à medida que as calpaínas se autodestroem por autólise (Dransfield, 1993).

A atividade mínima da calpaína tem sido reportada em 5 °C com pH 5,5, condições que prevalecem aproximadamente 24 horas após o abate e Boehm et al. (1998) sugeriram que o nível de atividade depois de 24 h deveria ser menor que 10%. Ao contrário, Koochmaraie et al. (1986) sugeriram que a μ -calpaína mantém 24-28% da sua atividade máxima em pH de 5,5 a 5,8 a 5 °C, quando miofibrilas são usadas como substrato, mas isso não foi confirmado por Kanawa et al. (2002) que não constatou atividade nestas condições quando usou como substrato as miofibrilas. Depois da exaustão do ATP e o desenvolvimento do *rigor mortis*, o sistema de

membrana do retículo sarcoplasmático e mitocôndria, não conseguem mais capturar íons cálcio, que serão liberados no sarcoplasma atingindo as miofibrilas (Jeacocke, 1993). O aumento da concentração de cálcio ativa a μ -calpaína permitindo que a proteólise aconteça, mas normalmente as calpaínas são inibidas pela sua ligação com a calpastatina, sendo que o cálcio remove esta inibição (Murachi et al. 1981). A calpastatina é eventualmente hidrolisada pela calpaína, e a m-calpaína possivelmente converte a μ -calpaína pela hidrólise (Hopkins e Taylor, 2004). A atividade de calpaína é promovida pelo alto nível de cálcio, alto pH e temperatura, e reduzida atividade de calpastatina (Dransfield, 1993).

Camou (2007) reportou que a atividade da m-calpaína é mais afetada que a atividade da μ -calpaína em valores de pH menores que 6,5, mas até a μ -calpaína no músculo estocado com pH 5,8 é inativa após 24 horas. O pH no músculo de bovinos, ovinos e suínos podem chegar a menos de 5,8 após 24 horas *post mortem*, indicando que as atividades de ambas enzimas podem ser muito pequenas nesse período, mas é preciso lembrar que a temperatura nesse experimento foi de 22 a 24°C, enquanto *in situ* a temperatura depois de 24 horas fica entre 2 e 4°C. Os resultados deste estudo sugerem que ambas calpaínas, podem não ser proteoliticamente ativas em músculos bovinos depois de 24 horas *post mortem*, contradizendo estudos que afirmam que estas são as principais responsáveis pela maior parte da degradação proteolítica de proteínas do citoesqueleto durante estocagem *post mortem*.

Deteção de atividade das enzimas proteolíticas

Weiseth et al. (2001) avaliaram os limites de deteção para atividade de calpaína entre três métodos. Os métodos avaliados foram zimografia de caseína (Weiseth et al. 2001), análise padrão de caseína (Koochmaraie, 1990), e caseína com ¹⁴C-marcado (Koochmaraie, 1992). A zimografia de caseína foi oito vezes mais sensível que o método padrão, e a caseína com ¹⁴C-marcado foi 8 vezes mais sensível que o zimograma e 64 vezes mais sensível que o método padrão. Esse estudo demonstrou que a limitação de cada ensaio e a habilidade para determinar a atividade da calpaína a qualquer hora *post mortem* é uma função do ensaio utilizado. Enquanto Koochmaraie (1990) reportou que a μ -calpaína tem pequena ou nenhuma atividade além de 2 a 3 dias *post mortem*, usando caseína com ¹⁴C-marcado (Geesink e Koochmaraie, 1999), demonstraram que músculos de ovinos podiam apresentar atividade até mesmo 56 dias *post mortem*.

Efeito da atividade das enzimas proteolíticas entre raças

A carne de *Bos indicus* tem sido reportada como menos macia que a de *Bos taurus* (Crouse et al. 1993). Segundo Shackelfort et al. (1991), o nível de atividade da calpastatina duas horas *post mortem* pode ser usado como indicador da maciez final da carne. A carne de zebuínos é menos macia que a carne de taurinos em virtude da proteólise reduzida das proteínas miofibrilares associada à alta atividade de calpastatina nos músculos (Whipple et al. 1990). Rubensam et al. (1998) avaliaram a atividade das enzimas em amostras de contrafile provenientes de 26 bovinos, sendo 14 Polled Hereford (HH), sete 3/4Hereford 1/4Nelore (3/4H1/4N) e cinco 5/8Hereford 3/8Nelore (5/8H3/8N), sendo machos castrados, abatidos aos dois anos de idade. A maior proporção de genes zebuínos em novilhos 5/8H3/8N

afetou significativamente a atividade de calpastatina, determinada no primeiro dia *post mortem* no músculo *L. dorsi*, sendo superior ($p < 0,05$) à de bovinos HH e 3/4H1/4N. Os autores concluíram que a atividade de calpastatina determinada 24 horas *post mortem* pode ser útil para a previsão da textura da carne, maturada ou não, em programas de melhoramento genético, e que a participação crescente do genótipo *Bos indicus* nos rebanhos da Região Sul do Brasil, poderá resultar em carne de pior textura.

Ibrahim et al. (2008) compararam as características de carcaça de animais Waguli (Wagyu x Tuli) com animais da raça Brahman (*Bos indicus*). O Waguli apresentou significativamente menor força de cisalhamento do que bovinos da raça Brahman depois de 7 a 10 dias de maturação pós abate, mas esta diferença diminuiu depois de 14 dias. A dureza da carne de animais da raça Brahman tem sido associada com o alto nível de calpastatina, e os animais da raça Waguli teve significativamente menor atividade de calpastatina no músculo *Longissimus dorsi*. Em conclusão, o músculo *Longissimus dorsi* de novilhos da raça Waguli teve menor valor de força de cisalhamento e baixa atividade de calpastatina, relacionando com maior maciez da carne.

O'Connor et al. (1997) reportaram que músculos de animais com ancestrais Brahman maturam mais devagar em relação á músculos de animais com ancestrais *Bos taurus* e que devem ser maturados por aproximadamente 21 dias para compensar o atraso no processo de amaciamento e isso ocorre porque há alta atividade de calpastatina. Pringle et al. (1997) também observaram maior atividade de calpastatina em músculo de novilhos da raça Brahman.

Efeito da atividade das enzimas proteolíticas entre fibras musculares

Geesink (2001) observou que há correlação negativa entre atividade de calpastatina e atividade de ATPase miofibrilar. Como a atividade de calpaína varia pouco entre músculos, esses resultados dão suporte à hipótese de que a proporção de calpaína e calpastatina possivelmente esclarece as diferenças observadas na taxa e extensão da proteólise *post mortem* entre músculos de contração rápida e lenta (Ouali et al. 1990). Músculos de contração rápida apresentam maior atividade de ATPase e portanto, apresentariam carne mais macia devido a menor atividade da calpastatina (Geesink et al. 2006).

Comprimento de sarcômero

A interação entre comprimento de sarcômero e proteólise *post mortem* ainda não está muito esclarecida quando relacionada com o amaciamento da carne. Weaver et al. (2008) encontraram força de cisalhamento maior em amostras de músculos com sarcômeros encurtados, e quando foi quantificada a troponina T houve aumento na proteólise aos 4 e 7 dias do período *post mortem* em amostras com sarcômero de comprimento longo.

Trabalhos clássicos de Marsh e Carse (1974) e Herring et al. (1965) demonstraram que músculos com comprimento de sarcômero longo apresentaram menor força de cisalhamento. Então, a força de cisalhamento final da carne reflete o balanço entre comprimento de sarcômero e extensão da proteólise *post mortem* (Jiang, 1998).

Wheeler e Koohmaraie (1994) propuseram que a interação de filamentos finos e grossos em sarcômeros curtos, possivelmente reduz a disponibilidade de sítios susceptíveis a atividade proteolítica.

Efeito da atividade de enzimas proteolíticas em diferentes músculos

Os músculos do dianteiro apresentam diferenças quanto ao tipo de fibra em relação aos músculos do traseiro (Kirchofer et al. 2002). Geralmente, os músculos do dianteiro são conhecidos como carne de pior qualidade, pois contêm uma proporção maior de fibras oxidativas quando comparados aos músculos do traseiro, o que reflete em menor atividade de calpaínas, devido maior quantidade de calpastatina, ocorrendo menor degradação muscular e dando origem a uma carne mais dura (Koohmaraie, 1996).

Quando se compara os músculos do traseiro, Olson et al. (1977) demonstraram que o músculo *psaos* tem significativamente menor atividade de calpaína do que o *semitendinosus* ou o *longissimus* e que após 24 h *post mortem* o nível de atividade foi quase zero. Esta menor atividade de calpaína no músculo *psaos* foi verificada mais tarde por Koohmaraie et al. (1988), que reportaram níveis músculo-específico, mas é importante ressaltar que esse músculo é esticado na carcaça e tem menor conteúdo de tecido conectivo, os quais contribuem com a menor força de cisalhamento. De fato, a relativa contribuição das três variáveis (atividade enzimática, comprimento de sarcômero e conteúdo de tecido conectivo) varia entre os músculos influenciando no amaciamento da carne (Wheeler et al. 2000).

Efeito da atividade de enzimas proteolíticas entre sexo

Animais não castrados crescem mais rapidamente e utilizam o alimento mais eficiente em uma mesma idade ou mesmo/peso, produzindo carcaça com mais músculo e menos gordura que animais castrados (Seideman et al. 1982). Em estudos com animais castrados e não castrados, Morgan et al. (1993) observaram maiores valores de força de cisalhamento e menores valores de índice de fragmentação miofibrilar (IFM) no *Longissimus dorsi* de animais castrados em comparação com animais não castrados. Adicionalmente, a força de cisalhamento diminui e o IMF aumentou com o incremento no tempo de maturação. A maciez no *Longissimus dorsi* é altamente correlacionada com o IFM (Culler et al. 1978), que indica a quantidade de proteólise miofibrilar que ocorre no músculo. Nesse mesmo estudo não houve diferença na atividade de m-calpaína e μ -calpaína 24 horas *post mortem* com relação à classe sexual. No caso da calpastatina, ela foi 81% mais alta em animais não castrados que nos castrados. A alta atividade de calpastatina é relacionada com o decréscimo da proteólise feita pela μ -calpaína nos sete dias *post mortem*, resultando em menor maciez da carne. Além da alta atividade de calpastatina, uma outra explicação para a menor maciez da carne de animais não castrados seria a maior concentração de zinco, que é um potente inibidor de calpaínas (Koohmaraie, 1990).

Huff-Lonergan et al. (1995) reportaram que machos não castrados exibiram uma degradação *post mortem* mais lenta de ambas titina e nebulina em relação aos machos castrados. A carne de animais mais velhos também demonstrou uma menor taxa de degradação *post mortem* do que vista em novilhos jovens castrados.

Papel do sistema calpaína-calpastatina sobre a proteólise muscular e sua relação com 12 a maciez da carne em bovinos de corte

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120909.pdf>

Entretanto, o padrão de degradação da carne ou músculo de animais mais velhos foi similar aos obtidos em animais jovens não castrados. É bom lembrar que o aumento de ligações cruzadas do colágeno em animais mais velhos é mais responsável pela dureza da carne do que a degradação de proteínas miofibrilares (Huff-Lonergan et al. 1995).

Efeito da estimulação elétrica de carcaças no amaciamento da carne

A estimulação elétrica de carcaças é feita usualmente para aumentar o amaciamento, a partir da ativação de algumas enzimas proteolíticas endógenas, como a μ -calpaína (Dransfield et al. 1992) e promove um aumento na degradação de proteínas do citoesqueleto como titina e nebulina no período *post mortem* (Ho et al. 1996).

A estimulação elétrica produz redução rápida do pH, no momento em que os valores de temperatura se encontram próximos a *in vivo*, promovendo mudanças significativas na maciez.

Efeito da solução de cloreto de cálcio no amaciamento da carne

O uso de infusões com cálcio retarda o crescimento microbiano e possibilita a ação de proteases endógenas. Há estudos com as soluções salinas (CaCl_2) contendo íons cálcio, adicionadas à carne, seguido de maturação a vácuo sob refrigeração (Boleman, 1995). O tempo geralmente utilizado para essa maturação varia de 7 a 14 dias (Lansdell, 1995). A injeção de cloreto de cálcio deve ser realizada após a instalação do *rigor mortis*, uma vez que a carne tratada em estado pré-rigor pode apresentar problemas de aparência e flavor (Rousset-Akrim et al., 1996). Além disso, dependendo da quantidade de sal adicionado à carne, pode ocorrer sabor indesejável. Morgan et al. (1991) observaram sabor amargo e metálico em carne na qual foi injetada solução de cloreto de cálcio em concentração de 300mM.

Heinemann et al. (2003) submeteram amostras de carne bovina (*Longissimus dorsi*) à maturação por 14 dias, após adição de soluções de cloreto de cálcio em três diferentes concentrações (100, 200 e 300mM). O aumento da concentração da solução de CaCl_2 adicionada às amostras teve um efeito positivo significativo sobre a textura da carne, reduzindo a força de cisalhamento. As amostras tratadas com solução 200 e 300mM apresentaram valores de força de cisalhamento semelhantes, próximos à faixa teórica de aceitação, cujo limite é 5,0kg (Felício, 1995).

Lansdell et al. (1995) adicionando solução 200mM na razão de 5% (v/p) à carne bovina, também observaram melhoria na textura. Moura et al. (1999), avaliando o efeito da adição de soluções 200 e 300mM de CaCl_2 à carne bovina, observaram que a maior redução da força de cisalhamento ocorreu com a concentração de 200mM. Segundo Kerth et al. (1995) quantidades maiores de cloreto de cálcio promovem melhores resultados de maciez.

Considerações Finais

O amaciamento da carne é um processo que merece grande atenção dos pesquisadores, pois hoje tem crescido muito a exigência dos consumidores por produtos de qualidade. Profissionais e pesquisadores, primeiramente, tem que

tentar entender todo esse processo bioquímico no qual estão envolvidas a ativação de enzimas proteolíticas e a degradação das proteínas miofibrilares, para depois atuarem na área de produção animal com qualidade. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos com o objetivo de se determinar a forma de ação das enzimas proteolíticas. Dessa forma, espera-se que a carne bovina possa atingir as expectativas das indústrias processadoras de alimentos que também prezam tanto por qualidade e também fazer com que chegue à mesa do consumidor um produto que atenda às suas exigências.

Referências Bibliográficas

1. BANDMAN, E.; ZDANIS, D. An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. **Meat Science**, v. 22, p. 1-19, 1988.
2. BOLEMAN, S.J.; BOLEMAN, S.L.; BIDNER, T.D. et al. Effects of *post mortem* time of calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking and total loss. **Meat Science**, v. 39, p. 35-41, 1995.
3. BOEHM, M. L.; KENDALL, T. L.; THOMPSON, V. F. et al. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2415–2434, 1998.
4. BOWLING, R.A., DUTSON, T.R.; SMITH, G.C. et al. Effects of cryogenic chilling on beef carcass grade, shrinkage and palatability characteristics. **Meat Science**, v. 21, p. 67-72, 1987.
5. BUSCH, W.A., GOLL, D.E.; PARRISH, F.C. JR. et al. Molecular properties of postmortem muscle. Isometric tension development and decline in bovine, porcine and rabbit muscle. **Journal of Food Science** 37, 289–299, 1972.
6. CAMOU, J.P.; MARCHELLO, J.A.; THOMPSON, V.F. et al. Effect of postmortem storage on activity of μ - and m-calpain in five bovine muscles. **Journal of Animal Science**, v.85, p.2670-2681, 2007.
7. CROUSE, J.D.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M. et al. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. Beef Research, **Progress Report n.4**, p.125-127, 1993.
8. CULLER, R.D.; PARRISH, F.C.Jr.; SMITH, G.C. et al. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine Longissimus muscle. **Journal of Food Science**, v.43, p.1777, 1978.
9. DANIELI-BETTO, D., BETTO, R. AND MIDRIO, M. Calcium sensitivity and myofibrillar protein isoforms of rat skinned skeletal muscle fibres. **Pflugers Archiv** 417, 303–308, 1990.
10. DAYEY, C. L.; GILBERT, K. V. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 69-74, 1969.
11. DRANSFIELD, E.; ETHERINGTON, D.J.; TAYLOR, M.A.J. Modelling post-mortem tenderisation-II: Enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. **Meat Science**, v.31, p.75, 1992.
12. DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization - IV- Role of calpain and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, v. 34, p. 217-234, 1993.
13. DUCASTAING, A., VALIN, C., SCHOLLMEYE, J. Effects of electrical stimulation on postmortem changes in the activities of two Ca dependent proteinases and their inhibitor in beef muscle. **Meat Science** 15, 193–202, 1985.
14. EDMUNDS, T.; NAGAINIS, P.A.; SATHE, S.K. et al. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. **Biochimie Biophysiology Acta**, v. 1077, p.197- 208, 1991.

15. ETHERINGTON, E.J. The contribution of proteolytic enzymes to postmortem changes in muscle. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1644–1650, 1984.
16. FELÍCIO, P.E. Maciez da carne, fator de competitividade. **DBO Rural Especial - Pecuária de Corte**, p. 88-91, 1995.
17. FERNANDEZ, E.; RAYNAUD, F.; COULIS, G. et al. Calpain 1–titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril, **FEBS Journal**, v. **272**, p. 2578–2590, 2005.
18. GEESINK, G.H.; TAYLOR, R.G.; BEKHIT, A.E.D. et al. Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderisation. **Meat Science**, v. 59, p. 417–422, 2001.
19. GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of Calpastatin on Degradation of Myofibrillar Proteins by μ -Calpain Under Postmortem Conditions. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2685-2692, 1999.
20. GEESINK, G. H., S. KUCHAY, A. H. CHISHTI, et al. Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2834–2840, 2006.
21. GOLL, D. E.; TAYLOR, R. G.; CHRISTIANSEN, J. A. et al. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. Proc. **Recip. Meat. Conf.**, v. 44, p.25–33, 1991.
22. GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; TAYLOR, R. G. et al. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, v. 74, p.225–237,1992.
23. GOLL, D. E., V. F. THOMPSON, H. LI, et al. The calpain system. **Physiol. Rev.** 83:731–801, 2003.
24. HERRING, H.K., CASSENS, R.G.; BRISKEY, E.J. Further studies on bovine muscle tenderness as influenced by carcass position, sarcomere length, and fiber diameter. **Journal of Food Science**, v.30, p. 1049-1054, 1965.
25. HEINEMANN, R.J.B.; PINTO, M.F. Efeito da injeção de diferentes concentrações de cloreto de cálcio na textura e aceitabilidade da carne bovina maturada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23(supl.), p.146-150, 2003.
26. HO, C.Y.; STROMER, M.H.; ROBSON, R.M. Effect of electrical stimulation on postmortem titin, nebulin, desmin, and troponin-T degradation and ultrastructural changes in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1563-1575, 1996.
27. HOPKINS, D.L.; TAYLOR, R.G. Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderness. In: **Muscle Development of Livestock Animals – Physiology, Genetics and Meat Quality**. Cambridge: Cabi Publishing, v.1, p.363-381, 2004.
28. HOPKINS, D.L. AND THOMPSON, J.M. The degradation of myofibrillar proteins in beef and lamb meat using denaturing electrophoresis – an overview. **Journal of Muscle Foods** 13, 81–102, 2002.
29. HUFF-LONERGAN, E.; PARRISH, F.C.; ROBSON, R.M. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1064-1073, 1995.
30. IBRAHIM, R.M.; GOLL, D.E.; MARCHELLO, J.A. et al. Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1426-1433, 2008.
31. JEACOCKE, R. E. The Concentrations of free magnesium and free calcium-ions both increase in skeletal-muscle fibers entering rigor-mortis. **Meat Science**, v. 35, p. 27–45, 1993.

32. JIANG, S.T. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. **Proceedings of the National Science Council**, ROC Part B: Life Sciences, v. 22, p. 97-107, 1998.
33. KANAWA, R.; JI, J. R.; TAKAHASHI, K. Inactivity of μ -calpain throughout postmortem aging of meat, **Journal of Food Science**, v. 67, p. 635–638, 2002.
34. KHAN, A.W.; COHEN, D.C. Rapid estimation of muscle proteins in beef-vegetable protein mixtures. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 25, p. 236-238, 1977.
35. 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, p.750-756, 1995.
36. KIRCHOFER, K.S.; CALKINS, C.R.; GWARTNEY, B.L. Fiber type composition of muscles of the beef chuck and round. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2872-2878, 2002.
37. KOOHMARAIE, M., SEIDEMAN, S. C., SCHOLLMMEYER, J. E. et al. Effect of postmortem storage on Ca^{2+} -dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. **Meat Science**, v. 19, p. 187–196, 1987.
38. KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S.C.; SCHOLLMMEYER, J.E. et al. Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. **Journal of Food Science**, v.53, p.407-410, 1988.
39. KOOHMARAIE, M. Inhibition of postmortem tenderization in ovine carcass through infusion of zinc. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1476, 1990.
40. KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 32: p. 93-104, 1994.
41. KOOHMARAIE, M., SCHOLLMMEYER, J.E. AND DUTSON, T.R. Effect of low-calcium-requiring calcium activated factor on myofibrils under varying pH and temperature conditions. **Journal of Food Science**, v.51, 28–32/65, 1986.
42. KOOHMARAIE, M. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with μ -calpains. **Journal of Animal Science**, v. 70, 3697–3708, 1992.
43. KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L. et al. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3596-3607, 1995.
44. KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. **Meat Science**, v. 43, p.193–201, 1996.
45. KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G.H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, v. 74, p. 34-43, 2006.
46. LABEIT, S.; KOLMERER, B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. **Science**, v. 270, p. 293-296, 1995.
47. LANSDELL, J.L.; MILLER, M. F.; WHEELER, T. L. et al. Postmortem injection of calcium-chloride effects on beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v.73, n.6, p.1735-1740, 1995.
48. LEE, W.J., MA, H.; TAKANO, E.; et al. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. **Journal Biology Chemistry**, v. 267, p. 8437-8442, 1992.
49. MARSH, B. B.; LEET, N. G. **Journal Food Science**, v.31, p. 450-459, 1966.
50. MARSH, B.B., CARSE, W.A. Meat tenderness and the sliding-filament hypothesis. **Journal of Food Technology**, v.9, p.129-139, 1974.

51. MARUYAMA, K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. **FASEB Journal** v. 11, p. 341-345, 1997.
52. MORGAN, J.B.; MILLER, R.K.; MENDEZ, F.M. et al. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. **Journal of Animal Science**, v.69, n.11, p.4469-4476, 1991.
53. MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1471-1476, 1993.
54. MOURA, A.C.; FILHO, A.L.; NARDON, R.F. et al. Efeito da injeção de cloreto de cálcio pós-morte e tempo de maturação no amaciamento e nas perdas de cozimento do músculo *Longissimus dorsi* de animais *Bos indicus* e *Bos taurus* selecionados para ganho de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.28, n.6, p.1382-1389, 1999.
55. MURACHI, T., TANAKA, K., HATANAKA, M. et al. Intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) and its highmolecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). In: Weber, G. (ed.) **Advances in Enzyme Regulation**, Vol. 19. Pergamon Press, New York, pp. 407-424, 1981.
56. O'CONNOR, S. F., TATUM, J.D.; WULF, D.M. et al. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1822-1830, 1997.
57. OLSON, D.G.; PARRISH, F.C.J.; DAYTON, W.R. et al. Effect of postmortem storage and calcium activated factor on myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. **Journal of Food Science**, v.42, p.117-124, 1977.
58. OUALI, A. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. **Journal Muscle Foods**, v.1, p.129-165, 1990.
59. OUALI, A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. **Biochimie**, v. 74, p. 251- 265, 1992.
60. PRINGLE, T.D., WILLIAMS, S.E.; LAMB, B.S. et al. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2955-2961, 1997.
61. REEDS, P. J.; HAY, S. M.; DORWOOD, P. M.; et al. **British Journal of Nutrition**, v. 56, p. 249-258, 1986.
62. ROBSON, R.M., HUFF-LONERGAN, E., PARRISH, F.C. Jr. Postmortem changes in the myofibrillar and other cytoskeletal proteins in muscle. In: **Proceedings 50th Reciprocal Meat Conference**. American Meat Science Association, Chicago, Illinois, p. 43-52, 1997.
63. ROUSSET-AKRIM, S.; GOT, F.; BAYLE, M.C. et al. Influence of CaCl₂ and NaCl injections on the texture and flavour of beef. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.333-343, 1996.
64. RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no Sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, 1998.
65. SEIDEMAN, S.C.; CROSS, H.R.; OLTJEN, R.R. et al. Utilization of the intact male for red meat production: a review. **Journal of Animal Science**, v. 55, p.826, 1982.
66. SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; et al. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 171-177, 1991.
67. SHACKELFORD, S.D., KOOHMARAIE, M., CUNDIFF, L.V. et al. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin 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, 1994.

68. TAYLOR, R.G.; GEESINK, G.H.; THOMPSON, V.F.; Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? **Journal of Animal Science**, v.73, p.1351, 1995.

69. TAYLOR, R. G.; KOOHMARAIE, M. Effects of postmortem storage on the ultrastructure of endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2811–2817, 1998.

70. VEISETH, E.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L. et al. Technical note: comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb *longissimus*. **Journal Animal Science**, v. 79, p. 904-906, 2001.

71. VESTERGAARD, M.; OKSBJERG, N.; HENCKEL, P. Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of *semitendinosus*, *longissimus dorsi* and *supraspinatus* muscles of young bulls. **Meat Science**, v.54, p.177-185, 2000.

72. YATES L.D.; DUTSON, T.R.; CALDWELL, J. et al. Effect of temperature and pH on the post mortem degradation of myofibrillar proteins, **Meat Science**, v. 8, p. 157–179, 1983.

73. WALLS, E. W. The microanatomy of muscle. In: G. H. Bourne (ed.). 1960. **Structure and Function Muscle**. Vol. 1. Academic Press, New York and London, 1960.

74. WEAVER, A.D.; BOWKER, B.C.; GERRARD, D.E. Sarcomere length influences postmortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. **Journal of Animal Science**, published online Apr 11, 2008.

75. WHEELER, T.L., KOOHMARAIE, M. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1232-1238, 1994.

76. WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. **Journal of Animal Science**, v.78, p.958-965, 2000.

77. WHIPPLE, G., KOOHMARAIE, M., DIKEMAN, M.E. et al. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science** 68, 2716–2728, 1990.

REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 12

Recibido 18.02.09 - Ref. prov. F0026C - Revisado 18.08.09 - Aceptado 10.11.09
Ref. def. 1209091_RED VET - Publicado 15.12.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120909.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org>
y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>

